



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

**DOKTORA
TEZİ**

**YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
(YBSK) YÖNTEMİ İLE KANSER TEDAVİSİNDE
KULLANILAN İLAÇLARIN MİKTAR TAYİNİ
VE İLAÇ-DNA ETKİLEŞİMLERİNİN
BELİRLENMESİ**

EVİN KAPÇAK

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

MAYIS 2017



**YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (YBSK) YÖNTEMİ İLE
KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN MİKTAR TAYİNİ
VE İLAÇ-DNA ETKİLEŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

Evin KAPÇAK

**DOKTORA TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2017

EVİN KAPÇAK tarafından hazırlanan “YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (YBSK) YÖNTEMİ İLE KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN MİKTAR TAYİNİ VE İLAÇ-DNA ETKİLEŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

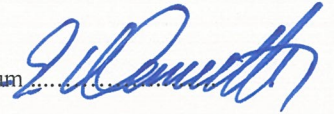
Danışman: Doç. Dr. Hayriye Eda ŞATANA KARA
Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

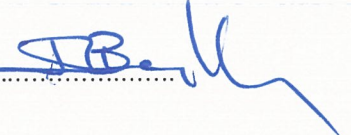
Başkan: Prof. Dr. Nusret ERTAŞ
Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

Üye: Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU
Analitik Kimya Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

Üye: Doç. Dr. Aysel BERKKAN
Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

Üye: Doç. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL
Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

Tez Savunma Tarihi: 22 / 05 / 2017

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Mustafa ASLAN

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi durumda aleyhime olabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Evin KAPÇAK

22.05.2017

YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (YBSK) YÖNTEMİ İLE KANSER
TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN MİKTAR TAYİNİ VE İLAÇ-DNA
ETKİLEŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ

(Doktora Tezi)

EVİN KAPÇAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2017

ÖZET

Bu tez çalışmasının amacı, kanser tedavisinde kullanılan Temzolomid molekülünün DNA ile etkileşim türünün kromatografik olarak belirlenmesi ve böylece ilaç-DNA etkileşim mekanizmalarının kolay, hızlı, daha seçimli ve güvenli bir şekilde tanımlanmasını sağlayabilmektir. DNA interaktif ajanlar grubunun bir üyesi olan Temozolomid, büyük ve küçük oluklardaki DNA bazlarının alkilasyonuna öncülük eden antitümör aktiviteye sahip bir alkilleyici ajandır. Kromatografik ve spektroskopik teknikler kullanılarak elde edilen sonuçlar doğrultusunda ilacın DNA'ya bağlanma katsayıları sırasıyla $3,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve $2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Etkileşim türü sadece interkalatif değil oyuk bağlanmanın da yer aldığı kompleks bir etkileşimdir. Etkileşim çalışmalarının yanı sıra ilacın farmasötik formundan miktar tayini valide edilmiş kromatografik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Doğrusal aralık 5-100 $\mu\text{g/mL}$ ve teşhis sınırı 0,02 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Yöntemin doğruluğu geri kazanım çalışması ile belirlenmiş ve %98,8-100,3 olarak bulunmuştur.

BilimKodu : 1.004

AnahtarKelimeler : YBSK, Temozolomid, İlaç-DNA etkileşimi, Spektrofotometri

SayfaAdedi : 111

Danışman : Doç. Dr. H. Eda ŞATANA KARA

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTICANCER DRUGS AND
EVALUATION OF DRUG-DNA INTERACTION USING HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

(Ph. D. Thesis)

EVİN KAPÇAK

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

May 2017

ABSTRACT

The aim of this thesis was evaluation of interaction mechanism of anticancer drug Temozolomide and DNA by using high performance liquid chromatography and identified the drug-DNA interaction mechanism easily, rapidly, more selectively, and safely. Temozolomide, a member of the DNA interactive agents group, is an alkylating agent with antitumor activity leading to the alkylation of DNA bases in the minor and major grooves. In terms of the results obtained by using chromatographic and spectroscopic techniques, the binding coefficients of the drug and DNA were calculated $3,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve $2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively. The type of interaction is complex including intercalative and groove binding. In addition to the interaction studies, the quantitative determination of Temozolomide in its pharmaceutical form has been carried out by validated chromatographic method. The linear range and LOD value were 5-100 $\mu\text{g/mL}$ and 0,02 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The accuracy of method was determined by recovery test and found to be 98,8-100,3% .

ScienceCode : 1.004

KeyWords : HPLC, Temozolomide, Drug-DNA interaction, Spectrophotometry

PageNumber : 111

Advisor : Assoc. Prof. H. Eda ŞATANA KARA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında ve sosyal yaşamımda ilgi ve desteğini esirgemeyen, tezimin her aşamasında mesleki bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Hayriye Eda ŞATANA KARA'ya,

Çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu anlayış ve destekten dolayı Prof. Dr. Nusret ERTAŞ'a ve Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hasan BASAN'a,

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Hilal TORUL'a,

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya

G.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım esnasında bana her türlü malzeme ve cihaz desteğini sağlayan Drog-san İlaçları A.Ş.'ye ve Ar-Ge Laboratuvarındaki takım arkadaşlarıma,

Desteğini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim canım babama,

ve...

Bana her zaman güçlü olmayı, mücadeleden vazgeçmemeyi, hep daha fazlasını öğrenmeyi ve kendimi geliştirmeyi ilke edindiren, şu an yanımda olmasa da bana öğrettikleriyle hala yanımda hissettiğim sevgili anneme,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kanserin Tedavi Yöntemleri.....	5
2.2. Kemoterapi.....	5
2.3. Kanser Tedavisinde Kemoterapötik İlaçların Rolü.....	5
2.4. Kanser Türleri.....	6
2.4.1. Beyin kanseri ve Glioblastoma.....	7
2.4.2. Glioblastoma tedavisinde TMZ kullanımı.....	7
2.5. TMZ ile İlgili Genel Bilgiler.....	7
2.6. TMZ ile Yapılmış Elektrokimyasal, Spektroskopik ve Kromatografik Çalışmalar	10
2.6.1. TMZ ile yapılmış elektrokimyasal çalışmalar.....	10
2.6.2. TMZ ile yapılmış spektroskopik çalışmalar.....	11
2.6.3. TMZ ile yapılmış kromatografik çalışmalar.....	12
2.7. Deoksiribonükleik Asit (DNA) Yapısı.....	12
2.8. İlaç-DNA Etkileşimi.....	16
2.8.1. İlaç-DNA etkileşim türleri.....	17
2.8.2. İlaç-DNA etkileşim türlerinin belirlenmesinde kullanılan teknikler.....	20

	Sayfa
2.9. Kromatografi.....	22
2.9.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.....	23
2.9.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK).....	25
2.9.3. YBSK’da temel parametreler ve sistem uygunluk testleri (SUT).....	28
2.9.4. YBSK’da metod geliştirme ve validasyon.....	30
2.10. Spektroskopi.....	34
2.10.1. Ultraviyole-Görünür bölge spektroskopisi (UV-GB).....	35
2.10.2. Floresans spektroskopisi.....	39
2.10.3. Spektroflorimetrik yöntemler ile DNA-ilaç etkileşimlerinin belirlenmesi.....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Gereç.....	49
3.1.1. Kimyasal malzemeler.....	49
3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler.....	49
3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı.....	50
3.2.1. Tampon çözeltiler.....	50
3.2.2. TMZ-DNA etkileşim çalışmaları için kullanılan çözeltiler.....	50
3.2.3. Miktar tayini çalışmaları için kullanılan çözeltiler.....	52
3.3. TMZ-DNA Etkileşimi ve TMZ Miktar Tayini İçin Kullanılan YBSK Yöntemi	53
3.3.1. YBSK sistem optimizasyonu.....	53
4. BULGULAR.....	55
4.1. pH Taraması Çalışmaları.....	55
4.2. YBSK Optimizasyon Çalışmaları.....	55
4.3. Sistem Uygunluk Parametreleri.....	57
4.4. İlaç-DNA Etkileşim Çalışmaları.....	58

	Sayfa
4.4.1. Kromatografik çalışmalar.....	58
4.4.2. Spektroskopik çalışmalar.....	67
4.5. TMZ Bilinmeyen Türünün Analizi İçin Yapılan Çalışmalar.....	75
4.6. TMZ Miktar Tayini Yöntem Validasyonu.....	79
4.6.1. Doğrusallık çalışmaları.....	79
4.6.2. Kesinlik çalışmaları.....	80
4.6.3. Sağlamlık çalışmaları.....	82
4.6.4. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) çalışmaları.....	85
4.7. Miktar Tayini ve Geri kazanım çalışmaları.....	86
4.7.1. Miktar tayini çalışmaları.....	86
4.7.2. Geri kazanım çalışmaları.....	87
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	89
KAYNAKLAR.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	111

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Elektrokimyasal yöntemlerle TMZ tayini.....	11
Çizelge 2.2. Spektroskopik yöntemlerle TMZ tayini.....	11
Çizelge 2.3. Kromatografik yöntemler TMZ tayini.....	12
Çizelge 2.4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.....	23
Çizelge 2.5. YBSK analizlerinde kullanılan sabit fazların grup ve formülleri.....	28
Çizelge 2.6. Sistem uygunluk testlerine ait parametreler.....	29
Çizelge 2.7. Validasyon için istenen parametreler.....	32
Çizelge 3.1. İlaç-DNA etkileşiminin incelenmesinde kullanılacak çözelti grupları.....	51
Çizelge 4.1. YBSK analizinde kullanılan kromatografik şartlar.....	57
Çizelge 4.2. Sistem uygunluğu çalışmalarında elde edilen alan ve standart sapma değerleri.....	57
Çizelge 4.3. Sistem uygunluğu analizleri sonucunda elde edilen parametrelerin değerlendirilmesi.....	58
Çizelge 4.4. DNA çözeltilerine ait alan değerleri.....	59
Çizelge 4.5. TMZ çözeltilerine ait alan değerleri.....	60
Çizelge 4.6. TMZ çözeltilerindeki bilinmeyen pikine ait alan değerleri.....	61
Çizelge 4.7. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve artan derişimde TMZ çözeltilerinin alan değerleri.....	63
Çizelge 4.8. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve artan derişimde TMZ çözeltilerinin 6. saat sonunda elde edilen alan değışimleri.....	63
Çizelge 4.9. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve artan derişimlerde DNA çözeltilerinin alan değerleri.....	65
Çizelge 4.10. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve artan derişimde DNA çözeltilerinin 6. saat sonunda elde edilen alan değışimleri.....	65
Çizelge 4.11. TMZ-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için kromatografik yöntem ile elde edilen veriler.....	66

Sayfa

Çizelge 4.12. TMZ-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için UV-GB spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler.....	69
Çizelge 4.13. MM-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için UV-GB spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler.....	72
Çizelge 4.14. MM-DNA baskılama katsayısının hesaplanması için floresans spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler.....	73
Çizelge 4.15. Stok ve son seyreltmesi su ile hazırlanan 20 ppm TMZ çözeltisine ait pik alanı değişimi.....	76
Çizelge 4.16. Stok ve son seyreltmesi pH 4,5 asetat tamponu ile hazırlanan 20 ppm TMZ çözeltisine ait pik alanı değişimi.....	76
Çizelge 4.17. Doğrusallık parametresine ait YBSK sonuçları.....	80
Çizelge 4.18. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan validasyon parametreleri	80
Çizelge 4.19. Gün içi kesinlik sonuçları.....	81
Çizelge 4.20. Günler arası kesinlik sonuçları (20,04 µg/ml, 25,05 µg/ml ve 30,06 µg/ml TMZ çözeltileri)	81
Çizelge 4.21. Sağlamlık parametresi organik faz oranı çalışma verileri.....	82
Çizelge 4.22. Sağlamlık parametresi pH değeri çalışma verileri.....	83
Çizelge 4.23. Sağlamlık parametresi sıcaklık değeri çalışma verileri.....	84
Çizelge 4.24. Sağlamlık parametresi akış hızı çalışma verileri.....	84
Çizelge 4.25. Sağlamlık parametresi dalga boyu çalışma verileri.....	85
Çizelge 4.26. TS ve TAS değerlerinin belirlenmesi.....	86
Çizelge 4.27. Miktar tayini çalışmalarına ait sonuçlar.....	86
Çizelge 4.28. Geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar.....	88

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. TMZ'nin özellikleri	8
Şekil 2.2. TMZ, Mitozolomid ve Dakarbazin moleküllerinin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.3. TMZ ve Dakarbazin'in bozunma reaksiyonu mekanizması.....	10
Şekil 2.4. DNA bazları.....	13
Şekil 2.5. DNA sarmalında birbirine zıt yönlü zincirler.....	14
Şekil 2.6. DNA sarmalı, büyük ve küçük oluklar	16
Şekil 2.7. Ligandın DNA sarmalına interkalasyonu	18
Şekil 2.8. Polisiklik aromatik halkalardan oluşan bazı DNA interkalatörleri	19
Şekil 2.9. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi cihazının şematik gösterimi	26
Şekil 2.10. Elektromanyetik spektrum.....	35
Şekil 2.11. UV-GB spektrofotometresinin şematik gösterimi.....	35
Şekil 2.12. Spektroflorometrenin bileşenleri	41
Şekil 2.13. Dinamik ve statik sönmülemeye ait Stern-Volmer grafiği.....	43
Şekil 2.14. Statik ve dinamik sönmüleme bir arada iken Stern-Volmer grafiği.....	45
Şekil 2.15. Bazı florofor boya maddelerinin yapıları	46
Şekil 2.16. Etidyum bromür kimyasal özellikleri	46
Şekil 2.17. Metilen mavisi kimyasal özellikleri	47
Şekil 2.18. Akridin turuncusu kimyasal yapısı	48
Şekil 4.1. Hareketli fazın belirlenmesi için yapılan pH taraması verilerine ait grafik; 0,1 M NaOH (a), pH 4,5 asetat (b), pH 5,5 asetat (c), pH 3,5 asetat (d), pH 6,0 fosfat (e), pH 7,0 fosfat (f), pH 8,0 fosfat (h), pH 9,0 borat (g), 0,1 M HCl (i) ve deiyonize su (j).....	55
Şekil 4.2. 20,04 µg/ml TMZ ile hazırlanan sistem uygunluğu çözeltisine ait kromatogram.....	58
Şekil 4.3. DNA çözeltilerine ait kromatogramlar; $2,03 \times 10^{-6}$ M (a); $5,08 \times 10^{-6}$ M (b); $1,02 \times 10^{-5}$ M (c); $1,52 \times 10^{-5}$ M (d); $2,03 \times 10^{-5}$ M (e)	59

Şekil	Sayfa
Şekil 4.4. TMZ çözeltilerine ait kromatogramlar $5,2 \times 10^{-5}$ M (a); $1,3 \times 10^{-4}$ M (b); $2,6 \times 10^{-4}$ M (c); $3,9 \times 10^{-4}$ M (d); $5,2 \times 10^{-4}$ M (e)	60
Şekil 4.5. TMZ bilinmeyenine ait kromatogramlar $5,2 \times 10^{-5}$ M (a); $1,3 \times 10^{-4}$ M (b); $2,6 \times 10^{-4}$ M (c); $3,9 \times 10^{-4}$ M (d); $5,2 \times 10^{-4}$ M (e)	61
Şekil 4.6. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $5,2 \times 10^{-5}$ M TMZ karışımına ait kromatogram.....	62
Şekil 4.7. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $1,3 \times 10^{-4}$ M TMZ karışımına ait kromatogram.....	62
Şekil 4.8. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ karışımına ait kromatogram.....	62
Şekil 4.9. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $3,9 \times 10^{-4}$ M TMZ karışımına ait kromatogram.....	62
Şekil 4.10. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $5,2 \times 10^{-4}$ M TMZ karışımına ait kromatogram.....	62
Şekil 4.11. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $2,3 \times 10^{-6}$ M DNA karışımına ait kromatogram.....	64
Şekil 4.12. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $5,08 \times 10^{-6}$ M DNA karışımına ait kromatogram.....	64
Şekil 4.13. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA karışımına ait kromatogram.....	64
Şekil 4.14. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $1,52 \times 10^{-5}$ M DNA karışımına ait kromatogram.....	64
Şekil 4.15. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $2,03 \times 10^{-5}$ M DNA karışımına ait kromatogram.....	64
Şekil 4.16. TMZ-DNA için kromatografi çalışmalarında bağlanma katsayısının hesaplanması için kullanılan grafik.....	67
Şekil 4.17. DNA spektrumu.....	68
Şekil 4.18. $8,32 \times 10^{-5}$ M TMZ çözeltisi (a) üzerine $1,66 \times 10^{-6}$ M (b), $3,32 \times 10^{-6}$ M (c), $4,98 \times 10^{-6}$ M (d), $6,64 \times 10^{-6}$ M (e) ve $8,3 \times 10^{-6}$ M (f) DNA ilavesi ile elde edilen spektrum.....	69
Şekil 4.19. TMZ-DNA için UV-GB çalışmalarında bağlanma katsayısının hesaplanması için kullanılan grafik.....	70
Şekil 4.20. 1×10^{-5} M MM çözeltisi (a) üzerine $1,66 \times 10^{-6}$ M (b), $3,32 \times 10^{-6}$ M (c), $4,98 \times 10^{-6}$ M (d), $6,64 \times 10^{-6}$ M (e) ve $8,3 \times 10^{-6}$ M (f) DNA ilavesi ile elde edilen spektrum.....	71
Şekil 4.21. MM-DNA için bağlanma katsayısının hesaplanması için kullanılan grafik.....	72
Şekil 4.22. MM çözeltisi üzerine artan hacimlerde $8,13 \times 10^{-5}$ M DNA çözeltisinin; 25 µl DNA (a), 50 µl DNA (b), 100 µl DNA (c), 150 µl DNA (d), 200 µl DNA (e), 250 µl DNA (f) eklenmesiyle elde edilen floresans sinyalleri.....	73

Sayfa

Şekil 4.23. MM-DNA etkileşiminin belirlenmesi için kullanılan Stern-Volmer grafiği.....	74
Şekil 4.24. MM-DNA karışımı üzerine artan hacimlerde 10^{-3} M TMZ çözeltisinin; 50 µl TMZ (a), 100 µl TMZ (b), 150 µl TMZ (c), 200 µl TMZ (d), 250 µl TMZ (e) eklenmesiyle elde edilen floresans sinyalleri.....	75
Şekil 4.25. Stok ve son seyreltmesi su ile hazırlanan $8,3 \times 10^{-5}$ M TMZ çözeltisine ait UV-GB spektrumu 0 (a), 10 (b), 20 (c), 30 (d), 40 (e), 50 (f) dak.	77
Şekil 4.26. DAD dedektörden elde edilen bilinmeyen türe ait su ile hazırlanan çözelti spektrumu (A) ve pH 4,5 asetat tamponu ile hazırlanan çözelti spektrumu (B).....	77
Şekil 4.27. TMZ, MTIC ve AIC'e ait UV-GB absorbands spektrumları.....	78
Şekil 4.28. TMZ, MTIC ve AIC'e ait 3 boyutlu UV-GB absorbands spektrumları.....	78
Şekil 4.29. Doğrusallık parametresine ait kalibrasyon grafiği.....	79
Şekil 4.30. Miktar tayini standart çözeltisine ait kromatogram.....	87
Şekil 4.31. Miktar tayini numunesine ait kromatogram.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
A	Adenin
dk	Dakika
G	Guanin
k'	Kapasite Faktörü
L	Litre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molarite
nA	Nanoamper
nm	Nanometre
R_s	Rezolüsyon Gücü
C	Sitozin
N	Teorik Plaka Sayısı
T	Timin
V	Volt

Kısaltmalar	Açıklama
AT	Akridin Turuncusu
AIC	5(4)-Aminoimidazol-4(5)-karboksiamid
BSS	Bağıl Standart Sapma (Enjeksiyon Kesinliği)
dsDNA	Çift sarmallı Deoksiribonükleik Asit (Double Stranded DNA)
CD	Dairesel Dikroizm (Circular Dichroism)
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTIC	(5-(3-Dimetiltriazen-1-il)-imidazo-4-karboksamit
EtBr	Etidyum Bromür
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (Food and Drug Administration)
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre
GBM	Glioblastoma Multiforme
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MM	Metilen Mavisi
MTIC	5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazo-4-karboksamit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
RNA	Ribonükleik Asit
SUT	Sistem Uygunluk Testleri
TAS	Tayin Alt Sınırı
TMZ	Temozolomid
TS	Teşhis Sınırı
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı (The International Conference on Harmonisation)
UV-GB	Ultraviole-Görünür Bölge
USP	Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopia)
YBSK	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ

Kanser, dünyanın gelişmiş ve gelişmekte olan birçok ülkesinde kalp hastalıklarından sonra ilk sıralarda yer alan ölüm nedenlerinden biridir. Hızlı ve kontrolsüz şekilde çoğalan hücreler sonucunda ortaya çıkan bu hastalığın tedavisindeki asıl amaç, kullanılan ilaçların kontrolsüz hücre çoğalmasını baskılamaktır.

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren hastalık türüdür. Tümör adı verilen katı kitle ya da kan/kemik iliği ile ilişkili sıvı kanser, bir veya daha çok hücrede büyüme kontrolünün kaybolmasına sebep olur. Hücre bölünmesi esnasında gerçekleşen hatalı DNA replikasyonu, kanserli hücre oluşumunun temel faktörüdür. Hücre bölünmesi, doku tamiri ve yenilenmesi amacıyla yapılmaktadır. Ancak bu etmenler aynı zamanda bir kanser hazırlayıcısı olabilmektedirler. DNA'nın hatalı eşleşmesinin neden olduğu düşünülen bu faktörlere hazırlayıcı (predispozan) faktörler denir [1].

Kanserin meydana geliş süreci oldukça karmaşıktır ve tüm kanser türlerinde, temel patolojik mekanizmalar benzer olsa da kanserler farklı şekilde ilerler ve hastalığın gelişimi ve tedavisi, başlangıç yaşına, büyüme hızına, tutulan organa, yayılım hızına, evrelerine ve tedaviye verdikleri cevaba göre büyük farklılıklar gösterir [1]. Ancak tüm kanser hücreleri anormal hücre çoğalması ve yayılması (metastaz) olmak üzere iki temel özelliğe sahiptirler.

Tüm vücudu etkileyebilen bu hastalık, organları meydana getiren en küçük birim olan hücrelerin içinde başlar. Kanser hücresinin en temel özelliği, hızlı çoğalma, planlı hücre ölümünden korunma ve farklı organ ya da dokuları da etkilemesidir. Sağlıklı bir hücrenin yaşam döngüsü üç temel parametre içerir; büyüme, bölünüp çoğalma ve hücre ölümü. Kanserli hücre, hücrenin normal döngüsünün dışına çıkmasıyla meydana gelir. Normal süreçteki hücre bölünmesinin engellenmesi durumunda ise anormal fonksiyonlara sahip hücreler oluşur. Bu anormal hücreler ya ölür ve bağışıklık sistemi tarafından yok edilir ya da çevresine uyum gösterir. Hücre ölümüne neden olabilecek süreçlerden biri olarak adlandırılan “apoptozis (programlanmış hücre ölümü)” süreci, hücre organellerinin hücreye ölme talimatı vermesiyle başlar ve hücre bileşenlerini parçalayan enzimler üretilerek hücrenin içyapısı parçalanır. Makrofaj ya da fagosit gibi bağışıklık sistemi hücreleri, bu parçalanmış hücrenin kalıntılarını yutar [2].

Kanser; hücre içi fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak meydana gelen mutasyonlar, radyasyon, kimyasal etmenler ya da ultraviyole gibi kanserojen ajanlara maruz kalma sonucunda ortaya çıkar. Kanserli hücrelerin sağlıklı hücrelerden en önemli farkı, çevreden gelen normal büyüme sinyalleri olmadan da yaşayabilmeleri ve sınırsız bir replikasyon potansiyeline sahip oldukları için kontrolsüz olarak büyüüp çoğalmalarıdır [3].

Prokaryot canlılar hariç her hücre bir sitoplazma ve çekirdekten meydana gelir. Hücre merkezindeki çekirdek içinde hücrenin ve organizmanın bütün genetik bilgisini depolayan deoksiribonükleik asit (DNA) mevcuttur. DNA zincirleri özgül proteinleri sentezlemekle görevli gen adı verilen birimlerden oluşur. DNA, yaşayan organizmaların canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için ihtiyaç duyduğu genetik bilgiyi içeren bir nükleik asittir. DNA'yı bu kadar önemli bir biyomolekül yapan özelliği; bilginin uzun süreli saklanması, kalıtsal özelliklerin belirlenmesi ve genetik bilginin kopyalanmasında oynadığı önemli roldür [4].

DNA'nın bazı kimyasal maddelerle (ilaç, metal, çevresel atıklar, vb.) etkileşmesi ve farklı yöntemler kullanılarak bu etkileşimlerin tayin edilebilmesi yeni ilaç tasarımlarının geliştirilmesi için önemlidir. Birçok kanser ilacı DNA molekülleri ile etkileşmektedir. Bu etkileşimin bir kısmı kovalent bağlar yardımı ile gerçekleşirken bir kısmı ise kovalent olmayan etkileşimler ile DNA-ilac kompleksini oluştururlar.

Klinik olarak kullanılabilir, yan etkileri en aza indirilmiş bir ilacı sentezleyebilmek için ilacın etki mekanizmasının aydınlatılmasının yanı sıra hücre ve ona özgü özelliklerin de bilinmesi gerekir.

Antikanser ilaçların tayini, DNA ile etkileşimlerinin ve bu etkileşimlerin türünün belirlenmesine yönelik analitik metotlara olan gereksinim son derece önemlidir. Ortaya çıkan değişikliklerin saptanması ve açıklanması giderek zorlaşmaktadır. Bu nedenler, yenilenmiş analitik tekniklerin ve metodolojilerin uygulanmasına temel oluşturmaktadır. DNA-ilac etkileşimlerini araştırmak için çoğunlukla spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemler kullanılmakla beraber, kromatografik yöntemlerden de bu amaçla yararlanılmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK) yöntemi ile kanser tedavisinde kullanılan Temozolomid (TMZ) etken maddesinin farmasötik formundan miktar tayininin yapılması ve DNA ile etkileşiminin belirlenmesi hedeflenmiştir. Etkileşimin

belirlenmesi için YBSK metodunun yanı sıra UV-GB ve floresans spektroskopisi kullanılarak elde edilen sonuçlar desteklenecektir. Bu amaçla, YBSK çalışmaları için çalışma kolonu, mobil faz, sıcaklık ve akış hızı gibi parametreler optimize edildikten sonra öncelikle TMZ ve DNA'nın ayrı ayrı kromatogramları alınacaktır. Daha sonra etkileşimin belirlenmesi için belirli derişimde ilaç-DNA çözeltisi hazırlanarak farklı inkübasyon sürelerinde kromatogramları kaydedilecektir. Etkileşim öncesi ve sonrası benzer sürelerde elde edilen kromatogramlardan hareketle etkileşim türü ve bağlanma katsayısı hesaplanacaktır. Kromatografik çalışmalara ek olarak etkileşim çalışmaları spektroskopik yöntemlerle de tekrarlanacaktır. UV-GB çalışmaları için belirli derişimde TMZ çözeltisi üzerine artan derişimlerde DNA çözeltisi eklenecek ve spektrumlar alınacaktır. TMZ'ye ait spektrumun dalga boylarındaki değişimlerden hareketle ilaç-DNA arasındaki etkileşim aydınlatılmaya çalışılacaktır. Bu çalışmalara ek olarak floresans yönteminin de kullanılması planlanmıştır. Hem TMZ'in hem de DNA molekülünün floresans özellik göstermemesinden dolayı çalışmalar dolaylı yöntem kullanılarak gerçekleştirilecektir. Bunun için DNA ile interkalatif olarak etkileşen boya maddesi olan Metilen mavisi (MM) kullanılması düşünülmüştür. Belirli derişimdeki MM çözeltisinin floresans spektrumu kaydedildikten sonra üzerine artan derişimlerde DNA çözeltisi ilave edilerek MM'nin floresans sinyalinin sönümlenmesi gözlenecektir. Deneyin sonraki aşamasında, DNA-MM karışımı üzerine TMZ ilave edilerek ilaç molekülünün yarışmalı olarak DNA ile etkileşmesi ve bunun sonucunda MM'nin emisyon şiddetindeki değişiklik gözlenecektir. Her iki spektroskopik yöntemden elde edilen veriler ile bağlanma katsayıları, sönümlenme katsayısı hesaplanacak ve elde edilen verilerin kromatografik yöntemle elde edilen veriler ile uyumluluğu tartışılacaktır. Planlanan tezin ikinci aşamasında ise valide edilen kromatografik yöntem kullanılarak TMZ'nin farmasötik formundan miktar tayini gerçekleştirilecektir. Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için geri kazanım çalışmaları yapılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tedavi Yöntemleri

Hücrenin biyokimyasal sürecini değiştiren ve doğrudan ya da dolaylı olarak hücrenin çoğalmasını engelleyen kemoterapi [5], normal hücrelere zarar vermeden kanserli hücreleri yok etmek, tümörlü hücrelerin gelişimini baskılamak ya da ağrıları kontrol altına almak amacıyla kanser hastalıklarının tedavisinde tek başına ya da cerrahi ve radyoterapi ile birlikte kullanılan bir tedavi yöntemidir [6]. Cerrahi tedaviden sonra uygulanan kemoterapi gibi, kanser tedavisinde ilk basamaktan sonra uygulanan tedaviye *adjuvan tedavi* adı verilir. İlk basamak tedaviden önce uygulanan tedavi ise *neoadjuvan tedavi* olarak adlandırılır [7]. Kanser tedavisinde en sık kullanılan tedavi yöntemleri şunlardır;

- Kemoterapi
- Radyoterapi
- Cerrahi operasyon
- Hormonal tedavi
- Biyoterapi

2.2. Kemoterapi

Kemoterapi, kanserli hücrelerin büyüme kontrolünü sağlamak ya da bu hücreleri tamamen öldürmek için antikanser ilaçlar kullanılarak uygulanan bir tedavi yöntemidir. Kemoterapide temel hedef, sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücrenin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak ya da kanserli hücreyi tamamen yok etmektir. Ancak, sağlıklı hücre ve kanserli hücre dokuları arasındaki benzerlikler kemoterapi ajanlarının seçiciliğini olumsuz yönde etkilemektedir [8].

2.3. Kanser Tedavisinde Kemoterapötik İlaçların Rolü

Kemoterapötik ajanlar etkinliklerine göre iki gruba ayrılır: Döneme özgü ilaçlar ve döneme özgü olmayan ilaçlar.

•Döneme özgü ilaçlar, çoğalmakta olan hücrelerde ve hücre döngüsünün bir döneminde (hücre döngüsü dönemleri; DNA sentezine hazırlık dönemi, DNA sentezi veya replikasyon dönemi, mitoz hazırlık dönemi ve mitoz dönemidir) etki gösterirler. DNA'nın çift sarmalını açarak DNA sentezinde kullanılan enzimlerin salgılanmasını ve DNA transkripsiyonunu baskırlar. Antimetabolitler, bleomisinpeptit antibiyotikleri, podofilin alkaloidleri ve bitki alkaloidleri bu grup içerisinde yer alır.

•Döneme özgü olmayan ilaçlar ise, dinlenme ya da bölünme evresinde olan hücrenin DNA'sında hasar oluşturarak öldürücü etki gösterirler. Alkilleyici ajanlar, antibiyotikler, sisplatin, nitrozoüreler döneme özgü olmayan ilaçlardır [8,9].

Vücudumuzdaki tüm hücrelerin yaşam süreleri, hücre çekirdeğindeki genetik materyalde kodlanmıştır. Bölünme sonucunda oluşup gelişen hücrenin, dokudaki işlevi sona erdiğinde hücre yıkıma uğrayarak kaybolur ve “planlı hücre ölümü” gerçekleşir. Bu programın bozulmasıyla kanserli hücrelerin vücutta kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlamaları, kanserli hücreleri sağlıklı hücrelerden ayıran en önemli farklılıktır. Kanser hücrelerinin özellikleri;

- i) Büyüme hormonu sinyallerine artmış duyarlılık sonucu kontrolsüz büyüme potansiyeli
- ii) Planlı hücre ölümü sisteminin bozulması sonucu mutasyona uğramış veya genetik olarak hatalı hücrelerin hızla çoğalması
- iii) Normal süreç içinde yaşlanma yeteneğini yitiren hücrelerin sonsuz bölünme potansiyeline erişmesi
- iv) Yeni damarlanmalar yapabilme yeteneği, tümör hücrelerinin çoğalma ve kitlesel büyüme hızını artırması
- v) Komşu dokuları istila etme ve uzak bölgelere metastaz yapabilme yeteneğidir [10].

2.4. Kanser Türleri

En sık rastlanan kanser türleri: akciğer, karaciğer, beyin, mide, meme, prostat, kolon ve rahim ağzı kanseri olarak belirtilmektedir [11].

Her yıl milyonlarca insan kansere yakalanmakta ve birçoğu kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Karşılaşılan kanser vakalarının önemli bir kısmını beyin tümörlerine bağlı kanserler oluşturmaktadır.

2.4.1. Beyin kanseri ve Glioblastoma

Glioblastoma multiforme (GBM) yetişkinlerde en sık karşılaşılan beyin tümörüdür. Yetişkinlerde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü veya dördüncü sırada yer alırken, çocuklarda ikinci sırada görülmektedir [12].

Hücrelerin normal yaşam döngüsünde, yaşlanarak fonksiyonunu yitiren beyin hücreleri ölür ve yerini yeni hücreler alır. Ancak bazen bu program bozularak vücudun ihtiyacı olmamasına rağmen yeni hücreler üretilir, ölmesi gereken hücreler ise yaşamaya devam eder. Bu fazladan oluşan hücreler zaman içerisinde çoğalmaya başlayarak bir tümör oluşumuna sebep olur.

Birincil beyin tümörüne sebep olan bu hücreler, kanserli beyin tümörü veya iyi huylu olabilir. İyi huylu beyin tümörlerinde kanserli hücre oluşmaz fakat yine de beyin gibi hassas bir bölgede bulundukları için hayati tehlike oluşturabilirler [12,13].

2.4.2. Glioblastoma tedavisinde TMZ kullanımı

Beyin tümörlerinin kemoterapisinde karşılaşılan en büyük sorun, kan-beyin bariyeridir. Kemoterapi ajanlarının difüzyonu yavaş bir süreç olduğundan, kan beyin bariyeri bozulmuş olsa bile, kemoterapide kullanılan ilaçların çoğu yine de merkezi sinir sisteminde yeterli doku konsantrasyonlarına ulaşamaz [14,15].

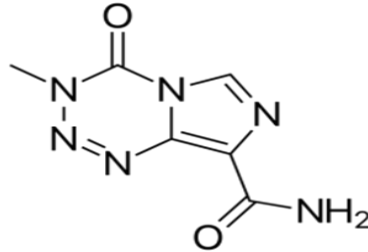
Glioblastomanın tedavisinde etkinliği araştırılan sitotoksik ajanlardan biri TMZ'dir [16]. TMZ ile yapılan bilimsel çalışmalardaki artışın en önemli nedeni, diğer sitotoksik ajanlara göre kan-beyin bariyerinde daha hızlı penetre olmasıdır [15].

Son birkaç yıl içerisinde Glioblastoma tedavisinde en sık kullanılan ve sitotoksik etkisi çok yüksek olan bu molekül, oral olarak kullanılmakta ve kan-beyin bariyerinde yaklaşık %20 civarında penetre olmaktadır [17,18].

2.5. TMZ ile İlgili Genel Bilgiler

TMZ'nin kimyasal yapısı ve genel özellikleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Yapısı



Kapalı Formülü	C ₆ H ₆ N ₆ O ₂
Kimyasal Adlandırma	3-metil-4-oksoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8 karboksamid
Molekül Ağırlığı	194,151 g/mol
Erime Noktası	212 °C

Şekil 2.1. TMZ'nin özellikleri

Farmakodinamik özellikleri; Newlands ve arkadaşları, TMZ molekülünü ilk defa bir imidazotetrazinon serisi içinde sentezlemişlerdir. Bu bileşik sınıfı; yan yana bağlı üç azot atomu taşıyan bir tetrazinon halka sistemiyle birleşmiş bir imidazol halkasıdır [19].

TMZ molekülünün kristal yapısının çözülmesiyle birlikte [20], TMZ ile DNA reaksiyonunun anlamlı bir yapı-işlev moleküler modeli çıkarılmıştır [21]. Üç Guanin dizisi N7 metilasyonu için ideal sterik ve bazik ortamı sağladığı için bu model, TMZ halkasının açılma ve sitotoksik aktivite oranının DNA sekansına özgü olabileceğini öngörmektedir. Ancak, aynı araştırmacıların daha yeni bulguları, pH'ın, tetrazinon halkasındaki açılma oranını ve böylece TMZ'nin kimyasal açıdan aktif bir türe dönüşmesini belirleyen tek faktör olduğunu düşündürmektedir [22]. TMZ, asidik pH'da (<5) karardır ancak fizyolojik pH'da (>7) metiltriazen-imidazol-karboksamide hidrolize olur. TMZ, 8-karbamoil-3-metilimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H), imidotetrazin sınıfının monofonksiyonel alkilleyici bir ajanıdır. TMZ, kimyasal olarak metilimidazotetrazinon olarak sınıflandırılır ve temel yapısını 3 azot atomu içeren imidazol halkası oluşturmaktadır. Moleküllerin fiziksel, kimyasal ve anti tümör etkileri komşu 3 azot atomunun fonksiyonuyla ilişkilidir [23].

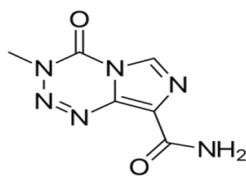
DNA interaktif ajanlar grubunun bir üyesi olan TMZ, küçük ve büyük oluklardaki DNA bazlarının alkilasyonuna öncülük eder [19]. Yapılan *in-vivo* ve *in-vitro* klinik öncesi çalışmalarda, TMZ molekülünün farklı tümör türlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir.

Malign Glioma ya da Malign Melanoma hastalarındaki klinik etkinliği ve yaşam kalitesini artırma özellikleri TMZ'nin dikkat çeken bir yönüdür [24].

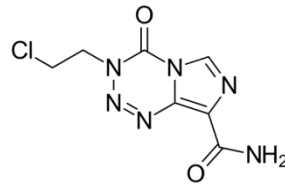
Farmakokinetik özellikleri: TMZ'in biyoyararlanımı %100'e yakındır ve kan beyin bariyerini kolayca geçerek, plazmada gözlenenin yaklaşık %40'ı düzeylerinde merkezi sinir sistemi konsantrasyonuna ulaşır. Bu durum esas olarak ajanın asitler karşısında kararlı olması ve lipofilik özelliğine bağlıdır. Plazma yarı ömrü yaklaşık 1,8 saattir. Eliminasyon esas olarak böbreklerde gerçekleşir. Oral uygulamayı takiben dozun ortalama %5-10'u 24 saat içinde idrarla değişmeden ve geriye kalanı ise 5-aminoimidazol-4- karboksamid veya tayin edilemeyen polar metabolitler şeklinde atılır [24].

Yapılan ön-klinik çalışmalarda TMZ molekülünün yüksek antitümör aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. TMZ, DNA iplikleri ile çapraz bağ olmadan DNA, RNA ve protein sentezini inhibe edebilir [25,26].

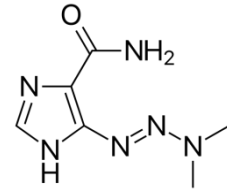
TMZ, mitozolomid'in (8-karbamoil-3-(2-kloroetil)-imidazo-[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4-(3H)on) 3-metil analogudur ve dakarbazin'e (5-(3-dimetiltriazen-1-il)-imidazo-4-karboksamid, DTIC) alternatif olarak sentezlenmiştir (Şekil 2.2).



Temozolomid



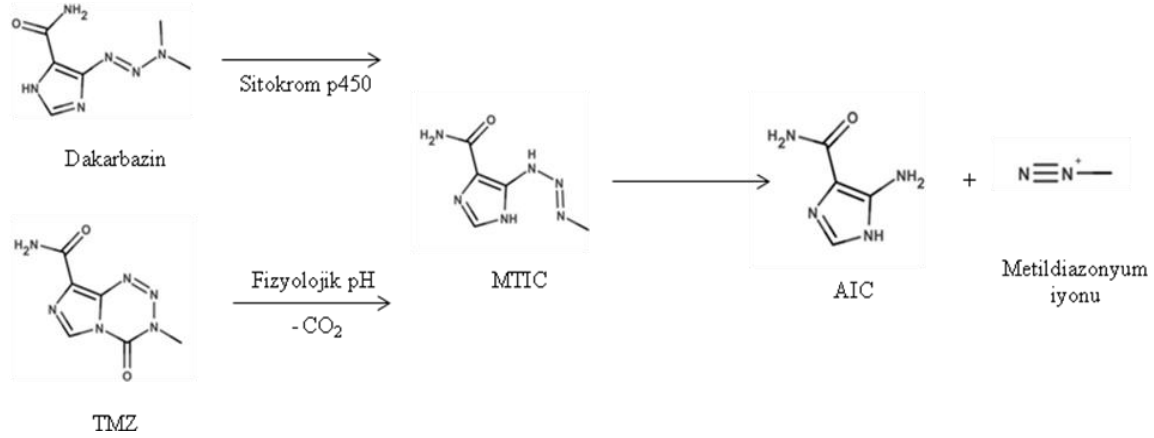
Mitozolomid



Dakarbazin

Şekil 2.2. TMZ, Mitozolomid ve Dakarbazin moleküllerinin kimyasal yapısı

TMZ ve DTIC sitotoksik etki göstermektedir. Bu antitümör aktiviteyi yapılarındaki lineer triazin, 5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazo-4-karboksamid, MTIC) grubu ile göstermektedir. DTIC, karaciğerde sitokrom p450 enzimi ile metabolik yolakla MTIC'e dönerken TMZ fizyolojik pH'da (pH 6-7) hem *in-vivo* hem de *in-vitro* ortamda kimyasal olarak MTIC'e bozunur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. TMZ ve Dakarbazin'in bozunma reaksiyonu mekanizması

Bozunma ürünü olan MTIC, Guaninin O6 ve N7 pozisyonundan alkilasyonla sitotoksik etki göstermektedir. MTIC'nin yarılanma ömrü oldukça kısa olduğu için hemen 5(4)-aminoimidazol-4(5)-karboksiamid (AIC) ve metildiazonyum katyonuna dönüşür. AIC, pürin sentezinde görevli olan ara bir moleküldür. Gerçekleşen bu indirgenme reaksiyonu tersinmez ve pH değerine bağlı bir reaksiyondur.

MTIC fizyolojik pH'da oda sıcaklığında kararlı değilken AIC kararlıdır. Ancak TMZ pH<5 olduğu ortamda kararlıdır ve herhangi bir bozunma reaksiyonu göstermez.

2.6. TMZ ile Yapılmış Elektrokimyasal, Spektroskopik ve Kromatografik Çalışmalar

2.6.1. TMZ ile yapılmış elektrokimyasal çalışmalar

Literatürlerde TMZ için yapılan elektrokimyasal çalışmalar Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bu çalışmalar, TMZ'in ve bozunma ürünlerinin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesine ve DNA ile etkileşiminin belirlenmesine yöneliktir.

Çizelge 2.1. Elektrokimyasal yöntemlerle TMZ tayini

Yöntem	Destek elektrolit	Çalışma Elektrodu	Referans Elektrot	Analiz	Doğrusal Aralık	TS	Kaynak
Dönüşümlü Voltametri							
Doğrusal Taramalı Voltametri	pH 4,1- pH7,0 ve pH 9,1 tampon	Camsı karbon elektrot	Ag/AgCl (3M KCl)	Kimyasal bozunma ürünü	250-600 μ M	-	Lopes ve ark, 2013 [27]
Kare Dalga Voltametri							
Doğrusal Taramalı Voltametri	pH 7,0 fosfat tamponu	Camsı karbon elektrot	Ag/AgCl (3M KCl)	DNA etkileşim			Lopes ve ark, 2013 [27]
Dönüşümlü Voltametri							
Doğrusal Taramalı Voltametri	pH 7,4 fosfat tamponu	Kalem grafit elektrot	Ag/AgCl (3M KCl)	DNA etkileşim	20-100 μ g/mL	6.1 μ g/mL	Altay ve ark, 2015 [28]
Dönüşümlü Voltametri							
Doğrusal Taramalı Voltametri	pH 7,1 fosfat tamponu	Camsı karbon elektrot	Ag/AgCl (3M KCl)	Elektrokimyasal davranış	-	-	Ghalkhani ve ark, 2010 [29]
Kare Dalga Voltametri							

2.6.2. TMZ ile yapılmış spektroskopik çalışmalar

TMZ'in farmasötik formlarından miktar tayini için yapılan spektroskopik çalışmalar Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Spektroskopik yöntemlerle TMZ tayini

Yöntem	Çözücü Sistemi	Doğrusal Aralık (μ g/ml)	Korelasyon Katsayısı (r)	TS (μ g/ml)	TAS (μ g/ml)	Doğruluk (%)	Kaynak
UV-GB	0,1N HCl	1-17	0,999	0,216	0,6545	98,8	Madhu ve ark, 2014 [30]
UV-GB	0,1N HCl	2-25	0,999	0,527	1,6454	99,1	Razak ve ark, 2013 [31]
UV-GB	pH 2,0 Fosfat tamponu	1-19	0,999	0,1058	0,3207	99,58	Ishaq ve ark, 2014 [32]
UV-GB	Distile su	4-20	0,9999	-	-	-	Sankar ve ark 2007 [33]

2.6.3. TMZ ile yapılmış kromatografik çalışmalar

TMZ ve metabolitlerinin, farmasötik formlarından ve biyolojik numunelerden miktar tayini için yapılan kromatografik çalışmalar Çizelge 2.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Kromatografik yöntemlerle TMZ tayini

Yöntem ve Dedektör	Kolon	Hareketli Faz	Doğrusal Aralık (µg/ml)	TAS	Kaynak
Ters Faz Sıvı Kromatografisi (UV Dedektör)	C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	%0,25 asetik asit içeren su: metanol (70:30, h/h)	10- 100	-	Khan ve ark, 2016 [34]
Ters Faz Sıvı Kromatografisi (Kütle Dedektör)	Ters Faz SynChropak SCD 100 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	%0,1 formik asit içerisinde 1 mM amonyum asetat: metanol (70:30, h/h)	-	-	Chowdhury ve ark, 1999 [35]
Ters Faz Sıvı Kromatografisi (UV Dedektör)	C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm)	%0,5 asetik asit içeren su: metanol (80:20, h/h)	0,1- 20	-	Gilant ve ark, 2012 [36]
Ters Faz Sıvı Kromatografisi (UV Dedektör)	C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	Asetat tamponu: metanol (75:25, h/h)	50- 300	-	Rao ve ark, 2010 [37]
Ters Faz Sıvı Kromatografisi (UV Dedektör)	C18 (100 mm x 4,6 mm x 5 µm)	Metanol-%0,5Asetik Asit (10:90 h/h)	0,4-20	0,2 µg/ml	Shen ve ark, 1995 [38]
Ters Faz Sıvı Kromatografisi (UV Dedektör)	C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	0,02 M Amonyum asetat-asetonitril (92:8 h/h)	10-2000 ng/mL	10 ng/mL	Kim ve ark, 1997 [39]

2.7. Deoksiribonükleik Asit (DNA) Yapısı

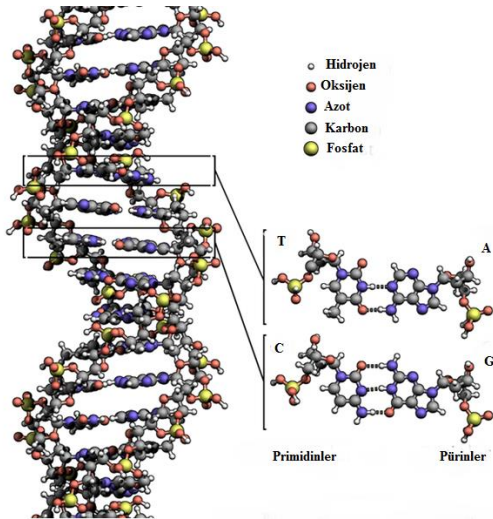
Nükleotit adı verilen basit birimleri içeren iki uzun polimer zincirinden oluşan DNA, tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli genetik bilgiyi taşıyan bir nükleik asittir. DNA'nın en önemli görevi genetik bilginin saklanmasıdır [40].

Nükleotitleri içeren polimer omurgaları, ester bağları ile birbirine bağlanmış şeker ve fosfat gruplarından oluşmaktadır. Bu iki iplik birbirlerine zıt yönlü olarak yönlenmişlerdir. Her bir şeker grubuna baz adı verilen dört tip molekülden biri bağlıdır [40]. Genetik bilgi, DNA omurgası boyunca bu bazların oluşturduğu dizi tarafından kodlanır ve protein sentezi sırasında genetik kod aracılığıyla okunarak proteinlerin amino asit dizilimi belirlenir. Bu süreç sırasında DNA'daki bilgi, DNA'ya benzer yapıya sahip başka bir nükleik asit olan RNA'ya kopyalanır. Bu işleme transkripsiyon denir [41].

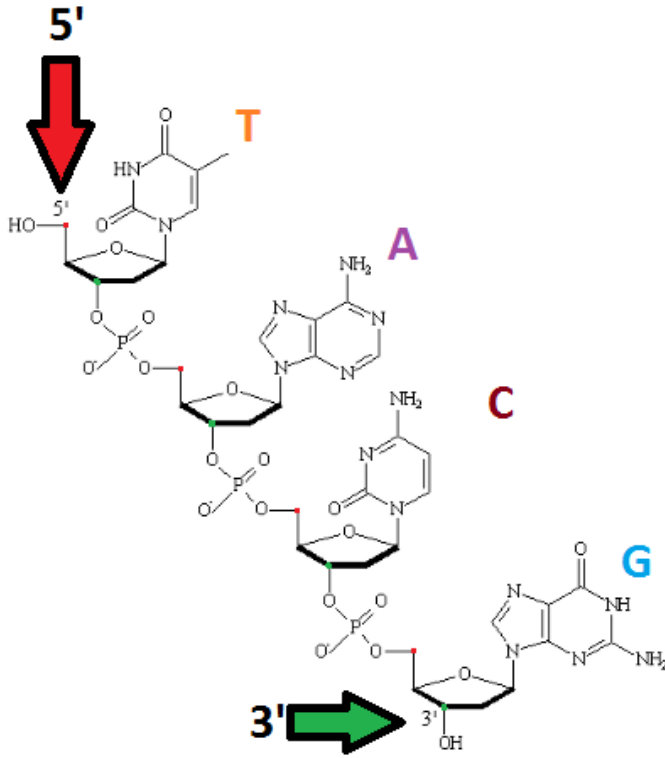
DNA hücrede, kromozomların içinde bulunur. Bitki, hayvan ve mantar gibi ökaryot canlılarda DNA hücre çekirdeği içinde bulunurken, bakteri gibi prokaryot canlılarda DNA, hücre sitoplazmasında yer alır [42].

Watson, Crick ve Wilkins tarafından, DNA yapısı için çift zincirli *heliks* şeklindeki yapı modeli önerilmiştir ve DNA hücre içerisinde çift sarmal formda bulunur. Her bir sarmalda Adenin, Timin, Sitozin ve Guanin olmak üzere dört nükleotit yer alır (Şekil 2.5). Bir fosfat, beş karbonlu bir şeker ve bir azotlu organik bazdan oluşan nükleotitler, birbirine 3' 5' fosfodiester bağlarıyla bağlıdır [40]. Deoksiriboz, 5 karbon ile fosforik aside ve 1 karbon ile organik baza bağlıdır. Organik bazlar, Adenin ve Guaninden oluşan purin bazları ile Timin (RNA'da Urasil) ve Sitozinden oluşan pirimidin bazları olmak üzere ikiye ayrılır [4].

Çift sarmallı DNA molekülünün iki zinciri, bazlar arasında bulunan H-bağları tarafından bir arada tutulmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmalın iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısmında yer aldığı için sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özellik gösterir [43]. Pürin ve pirimidin nükleotitleri arasındaki eşleşmelerin (A-T ve G-C) spesifik olması nedeniyle, DNA yapısında yer alan bir polinükleotid zinciri daima ikinci zincirin tamamlayıcısıdır.



Şekil 2.4. DNA bazları



Şekil 2.5. DNA sarmalında birbirine zıt yönlü zincirler

DNA sarmalı, birbirine anti-paralel uzanan iki polinükleotit zincirinden oluşur. C-5' ucundan C-3' ucuna doğru olan yönleri birbirine göre ters konumda bulunan bu iki zincir, bir merkez eksen etrafında kıvrılarak sağ-el ikili sarmal yapısını oluşturur. Her iki zincire ait bazlar düzlemsel yapıdadır ve düzlemleri eksene diktir. Bağlar arasında 3,4 Å mesafe bulunur ve karşı zincirlerdeki azotlu bazlar hidrojen bağları ile bağlanarak birbirleri ile eşleşirler. Sarmalın her bir tam dönüşü 34 Å'dur yani her dönüşte 10 tane baz yer almaktadır. DNA'daki baz eşleşmesi modelin genetik açıdan en önemli özelliğidir. Bu yerleşim nedeniyle eksen boyunca büyük ve küçük oluklar ortaya çıkar. Sarmalın çapı 20 Å'dur. DNA çift sarmalını bir arada tutan kuvvetler; bazlar arasındaki hidrojen bağları ve sarmalın içindeki korunmuş kısım ile sarmalın dışında ve polar özellik gösteren kısım arasındaki hidrofobik etkileşimdir [44,45].

DNA bir halat gibi burulabilir, bu duruma süper burulma adı verilir ve DNA burulursa daha sıkı veya gevşek sarılı olabilir. Eğer DNA'nın burulma yönü sarılma yönünde ise pozitif süperburulma, tersi yönde ise negatif süperburulma adını alır. Pozitif yönde bazlar birbirine daha sıkı sarılırken tersi durumda daha kolay ayrışır.

DNA'nın farklı biçimleri mevcuttur. Ancak canlılarda A-, B-, ve Z-DNA formu gözlenmiştir. Hangi formda bulunacağı süperburulmanın yönü ve şiddetine, bazlardaki kimyasal değişikliğe

ve çevresel etkenlere bağlıdır. Hücrenin normal şartlarında bu üç şekilden sağa yönelik B formu en sık görülendir. Dehidrate edildiği zaman, yapısal değişikliğe uğrayarak A-DNA adını almaktadır. A-DNA'da sağa doğru yöneliktir ancak daha geniş sarmal şeklindedir ve her dönüşünde 11 nükleotid bulunmaktadır. Çift sarmalın çapı, pentoz gruplarının yapılanmasıyla genişlemektedir. Bu durumun bir sonucu olarak DNA'nın boyu kısalmaktadır [46]. Z formu, metilasyonla kimyasal değişime uğrayan DNA sarmalında gözlenir. Diğer iki formdan farklı olarak sola dönüşlüdür.

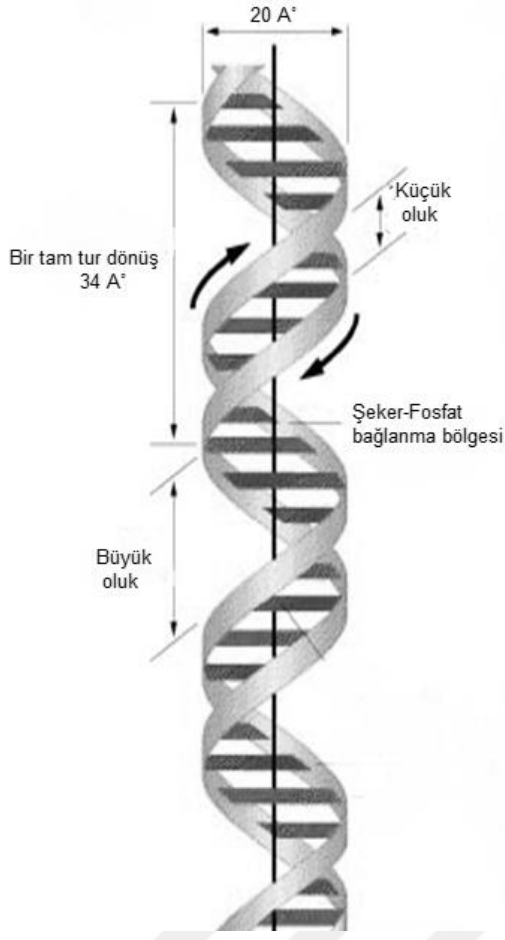
Çift sarmallı DNA molekülünde yapıyı bir arada tutan hidrojen bağları pH 4,0 ile 11,0 arasında kararlı bir yapı gösterdiği için, bu pH limitleri dışında DNA kararsız hale gelmekte ve çift sarmal açılmaktadır [44]. Ayrıca, DNA ısıtıldığında, heliks yapısı bozularak ikiye ayrılır. DNA sarmalının bozulması, 260 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülerek gözlemlenebilmektedir. G ve C arasında üç hidrojen bağı ($G \equiv C$) bulunduğundan yüksek konsantrasyonda G ve C taşıyan DNA, iki hidrojen bağı taşıyan A ve T ($A = T$) bulunduran DNA yapısına göre daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır [2, 4].

Nükleotit yapısının bazik olmasına rağmen omurgada bulunan fosforik asit grubu, nükleotit zincirlerinin asidik özellik göstermesine neden olur [46].

Çift sarmallı DNA molekülünü oluşturan zincirlerin birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilir ve yeniden bir araya gelebilir yapıda olması, protein sentezi ve DNA replikasyonuna olanak tanır [47].

Çift sarmallı DNA'da bulunan H bağları ve hidrofobik etkileşimler, nükleotitler arasındaki kovalent bağların kopmadan çözülebilmesini sağlar (*denatürasyon*) [48]. Benzer biçimde, çözülmüş molekülün zincirleri tamamlayıcı bazları arasında H bağlarının oluşumu ile birleşip sarmal yapıyı yeniden oluşturabilir (*renatürasyon*) [49].

DNA sarmallarının birbirine en yakın olduğu noktaya *küçük oluk* ve birbirlerinden en uzak oldukları noktaya da *büyük oluk* adı verilir (Şekil 2.6). DNA sarmalının büyük ve küçük olukları ile etkileşen moleküller genellikle bu oyukları tamamlayacak şekilde hilal formundadır ve DNA'ya Van Der Waals bağları ile bağlanırlar. Küçük moleküller DNA'ya bağlanarak DNA fonksiyonlarını bozarlar. Hastalığın kontrol veya tedavi aşamasında bir ilaç gibi davranırlar [44].



Şekil 2.6. DNA sarmalı, büyük ve küçük oluklar

2.8. İlaç-DNA Etkileşimi

Yeni sentezlenen küçük moleküllerin DNA'ya bağlanması ve onunla etkileşmesi, yeni ilaçların tasarımında olduğu kadar, DNA'yı algılama yöntemlerinin geliştirilmesinde de önemlidir. İlaç molekülleriyle DNA'nın etkileşmesi, özellikle de antikanserojen özelliğe sahip ilaç molekülleri ile olan etkileşim ve bu etkileşmenin geliştirilen yeni yöntemlerle tayin edilmesi, hedef odaklı yeni ilaç tasarımları için oldukça önemlidir [50,51].

DNA-ilaç etkileşimleri temel olarak üç şekilde gerçekleşir.

- Transkripsiyon faktörleri ve polimerazlar vasıtası ile
- RNA-DNA etkileşimi ile oluşan üçlü sarmal vasıtası ile
- Küçük aromatik moleküllerin DNA çift sarmalı ile etkileşmesi

2.8.1. İlaç-DNA etkileşim türleri

İlaç molekülleri ile DNA arasındaki etkileşimin incelendiği çalışmalar hem etkileşimin mekanizmasını anlamada hem de yeni ilaç tasarımlarında oldukça önemli bir aşamadır. İlaç molekülleri DNA ile kovalent ve kovalent olmayan bağlanmalar olarak temelde iki şekilde etkileşebilir.

Kovalent bağlanmalarda; molekül, DNA ile tersinmez şekilde etkileşerek DNA'nın yürüttüğü süreçlerin inhibisyonuna ve sonuçta hücre ölümüne neden olur. Cis-platin bu grubun temsilcilerindendir ve yapısındaki klorür gruplarının DNA bazlarındaki azot grupları ile etkileşimi ile etkisini gösterir. Kovalent bağlanan moleküller, kanser tedavisinde DNA yapısına alkil grupları bağlayarak görev aldığı için alkilleyici ajanlar olarak da adlandırılmaktadır. Alkilleyici ajanlar DNA yapısındaki Guanin ile etkileşirken bazı alkilasyon ajanları en güçlü etkiyi çapraz bağlardaki diğer pozisyonlarda alkilasyon yaparak gösterirler [52,53].

Alkilasyon ajanları üç mekanizma üzerinden etki ederler:

- i) DNA bazlarına alkil gruplarını bağlayarak DNA'yı parçalar.
- ii) DNA çift sarmalını ve atomları arasındaki bağları parçalar. Bu şekilde DNA'nın bağlanma bölgelerine sahip olan alkilleyici ajan iki bazın yeniden birbirine bağlanmasına neden olur. Kimyasal bileşiklerin büyük bir kısmı fizyolojik şartlar altında alkilleyici ajan olarak davranırlar ve bu şekilde antitümör aktivite gösterirler.
- iii) Yanlış eşleşen nükleotitler mutasyona neden olur [52].

Alkilasyon ajanları kimyasal etkileşimlerle DNA'ya kovalent olarak bağlanır. Bunun sonucunda da yanlış eşleşmiş bazlar, yer değiştirmeler ya da yapıdan ayrılan gruplar nedeniyle DNA sentezi durur ya da apoptozis gerçekleşir. Alkilasyon ajanları, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır ve TMZ gibi monofonksiyonel metilasyon, siklofosamid gibi bifonksiyonel alkilasyon ya da nimustun gibi kloroetilasyon ajanı olarak görev yapmaktadır [54].

Kovalent olmayan bağlanmalar; tersinir bağlanmalardır. DNA konformasyonunu ve burulma gerginliğini değiştirirler, protein-DNA etkileşimini inhibe eder ve DNA sarmallarını kırarlar. Bu şekilde gen yapılarında deformasyona neden olurlar [55].

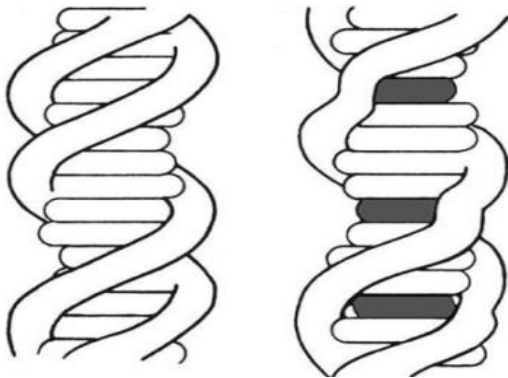
Kovalent olmayan bağlanmalar kendi içinde üç grupta toplanır:

- DNA çift sarmal yapısındaki büyük ve küçük oluklara bağlanması
- Elektrostatik etkileşimler
- DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yapması

1) DNA çift sarmal yapısındaki büyük ve küçük oluklara bağlanması: DNA sarmalının büyük ve küçük olukları ile etkileşen moleküller genellikle bu oyukları tamamlayacak şekilde hilal formundadır ve DNA'ya Van Der Waals bağları ile bağlanırlar. Ayrıca Adenin N3 ve Timinin O2 atomları ile hidrojen bağları da oluştururlar. Bazı sentetik leksitropin ve imidazol-pirol poliamit türevleri bu tür etki gösteren gruplar içinde yer alırlar [56].

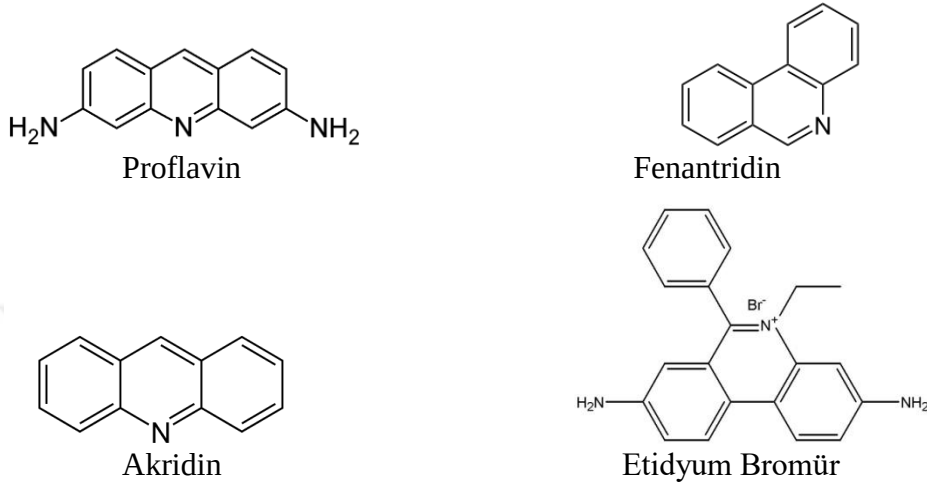
2) Elektrostatik etkileşimler: Molekülün, nükleik asitin negatif yüklü şeker-fosfat omurgasına elektrostatik olarak bağlanmasıdır. Rutenyum (II) gibi bazı metal kompleksleri DNA'ya bu şekilde bağlanırlar [54,57]. Bağlanma genelde spesifik değildir.

3) DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yapması: İnterkalasyon, bir molekülün ya da grubun iki molekül ya da grup arasına tersinir şekilde girmesidir. İnterkalasyon, DNA' da zincir kırılmasına yol açarak, DNA senteziyle DNA'ya bağımlı RNA sentezini bozmaktadır. Eğer molekülün şekli ve kimyasal yapısı uygunsa, DNA'daki baz çiftleri arasına girebilir (Şekil 2.7). Bu tür moleküller tersinir bağlandıkları için ligand olarak adlandırılırlar.



Şekil 2.7. Ligandın DNA sarmalına interkalasyonu

İnterkalasyon yapan ligandlar çoğunlukla çok halkalı, aromatik ve düzlemseldir ve bu yüzden nükleik asitlerin boyanmasında sıklıkla kullanılırlar. Üzerlerinde çok çalışılmış olan DNA interkalatörleri arasında etidyum bromür, proflavin, akridin, fenantridin (Şekil 2.8) sayılabilir [56].



Şekil 2.8. Polisiklik aromatik halkalardan oluşan bazı DNA interkalatörleri

İnterkalasyon ilk kez, 1961 yılında Leonard Lerman tarafından katyonik, düzlemsel ve çok halkalı aromatik sistemler arasında etkileşimin mekanizması olarak önerilmiştir. Katyonik bir interkalatör sulu çözelti içerisinde elektrostatik olarak polianyonik olan DNA tarafından çekilir. İnterkalatör iyon, DNA'ya her zaman bağlı durumda olan bir sodyum veya magnezyum katyonu ile yer değiştirir ve DNA'nın dış yüzeyi ile zayıf bir elektrostatik bağ kurar. Ligand, bu hidrofilik konumdan baz çiftleri arasındaki hidrofobik ortamın içine kayabilir. DNA molekülünün çözeltideki moleküllerle çarpışmalardan absorpladığı enerji, baz çiftlerinin kısa süreli olarak açılmalarını sağlar, geçici bir aralanma sırasında interkalatör oluşan bu boşluğa girebilir [54]. Bir interkalatörün baz çiftleri arasına girebilmesi için DNA'nın kısmen çözülerek baz çiftleri arasında yer açması gerekir. Çözülmenin derecesi interkalatöre bağlıdır, örneğin etidyum katyonu (sulu çözeltide etidyum bromürün iyonik şekli) DNA'yı 26° burarak açarken proflavin 17°'lik bir açıyla burguyu açar. Bu açılma baz çiftlerinin ayrılmalarına veya bir baz çiftinin diğerine göreceli olarak "yükselmesine" neden olur, öyle ki DNA'da 3,4 Å'luk bir aralık oluşur. Bu açılma DNA molekülünde DNA ikili sarmalının uzaması veya baz çiftlerinin burulması gibi yerel yapısal değişikliklere neden olur [56,57].

İki tür interkalasyon vardır:

- i) Klasik interkalasyon: Benzoapiren gibi klasik interkalatörler DNA çift sarmalına, alt ve üst interkalasyon noktalarından bağlanırlar.
- ii) Threading interkalasyon: Threading interkalatörler, DNA'nın büyük ve küçük oluklarına eş zamanlı olarak bağlanırlar [52].

Son yıllarda, sentezlenen interkalatörler tasarlanırken, genellikle kemoterapide kullanılan mevcut interkalatörler temel alınmakta ve onların ana iskeleti korunarak onlara bir takım yan zincirler (halkalı veya düz zincirli aminoalkil grupları) takılmakta veya hetero / karbosiklik halkalar yapıya dahil edilmektedir [58]. Ayrıca interkalatörlerin, interkalasyon bölgesine ilgisini ve orada geçireceği süreyi artırmak için tek bir molekülde iki veya daha fazla aynı (örn: bisakridinler, diterkelinyum) veya farklı (örn: metallo interkalatörler, akridine alkil zincirleriyle bağlı cis platin) yapıda interkalatör özelliği taşıyan grupların bağlı olduğu sinerjetik interkalatörler de sentezlenmektedir [59].

İnterkalatörler ile biyomakromoleküllerin etkileşimi sonucunda ortaya çıkan bir takım fiziksel değişimlerin UV-GB, NMR, CD ve floresans gibi spektroskopik yöntemlerle kolaylıkla görüntülenmesi, bu moleküllerin yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle DNA'ya interkalasyonla bağlanan organik floresans interkalatörler DNA'yı görüntülemekte ve interkalatör temelli ilaç tasarımında daha çok tercih edilmekte olan bileşiklerdir. Kovalent olmayan etkileşimlerle DNA'ya bağlanan floresans interkalatörler tümör hücrelerinin etrafında seçici olarak toplanıp tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir [60].

2.8.2. İlaç-DNA etkileşim türlerinin belirlenmesinde kullanılan teknikler

İlaçlar ve DNA arasındaki etkileşimin belirlenebilmesi için, NMR, X-ray kristalografisi, elektroforez, lüminesans, kuartz kristal mikrogravimetri, UV-GB absorpsiyon spektroskopisi ve elektrokimyasal metotlar gibi farklı teknikler kullanılmıştır [61,62].

Lee'nin yürüttüğü bir çalışmada, TMZ'nin DNA ile reaksiyonunun, Adenin bazı üzerindeki N3 ve Guanin bazı üzerindeki N7 ve O3 bölgelerine metil gruplarının katılmasıyla oluştuğunu ve böylece hücre ölümünün gerçekleştiğini belirtmiştir [14]. TMZ'nin DNA ile etkileşiminde,

metilasyon sonucu DNA'daki çift sarmalın kırıldığı ve TMZ'nbin hızlı bir şekilde metabolitlere dönüştüğü bildirilmiştir [15].

Altay ve ark., TMZ'in elektrokimyasal davranışının belirlenmesi için doğrusal taramalı voltametri ve dönüşümlü voltametri tekniklerini kullanmışlardır. TMZ molekülü ile DNA etkileşimi kalem grafit elektrot kullanılarak elektrokimyasal olarak incelenmiştir [28].

Temerk ve ark. yaptığı çalışmada; sitotoksik bir ajan olan Formestan molekülü ile çift sarmallı ve tek sarmallı DNA'nın farklı sıcaklıklar ile pH 7,4 ve pH 4,7 ortamlarındaki etkileşimlerini göstermişlerdir. pH 4,7 ve pH 7,4'de yapılan spektral ve elektrokimyasal çalışmalarda, formestan molekülünün çift sarmal DNA ile interkalasyon yaptığı gözlenmiştir. Gerçekleşen reaksiyon endotermik bir reaksiyondur. 37°C sıcaklığın, formestan ve çift sarmal DNA'nın interkalasyonu için en ideal konformasyonu sağladığı bildirilmiştir. Formestan molekülü, tek sarmallı DNA'nın dış yüzeydeki negatif fosfat gruplarıyla elektrostatik olarak etkileşmiştir. Elde edilen sonuçlar, ilaç-DNA etkileşiminin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmuştur [63].

Tian ve ark., sitotoksik bir ajan olan Berberin molekülü ile çift sarmallı ve tek sarmallı DNA'nın etkileşimi UV spektroskopisi ve Langmuir-BTSgett tekniğiyle hazırlanmış karbon elektrot kullanılarak elektrokimyasal teknikler ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, katyonik berberin molekülü ile polianyonik DNA molekülü arasındaki temel etkileşimin elektrostatik yapılarından kaynaklandığı belirtilmiştir [64].

Erdem ve Congur kanser tedavisinde antitümör ilaç olarak kullanılan bir ilaç olan Bleomisin'in tek ve çift sarmal DNA ile olan etkileşimini, elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniğini kullanarak araştırmıştır. Etkileşimin seçiciliği, mitomisin ve cis-platin gibi diğer antikanser ilaçların bulunduğu ve bulunmadığı ortamlarda yapılan analizlerle test edilmiştir [65].

Diculescu ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, sitotoksik ajan olan Danusertib molekülü ile çift sarmal DNA molekülünün etkileşimleri elektrokimyasal olarak incelenmiştir [66].

Agarwal ve ark. yürüttükleri bir çalışmada, kanser tedavisinde kullanılan Mitoksantron ile DNA arasındaki etkileşimler araştırılmıştır. Fizyolojik pH değeri olan pH 7,4'de fourier

dönüşümlü infrared (FTIR) ve UV spektroskopisi kullanılarak söz konusu etkileşim incelenmiştir. Fourier dönüşümlü infrared tekniği ile elde edilen sonuçlara göre etkileşimin DNA bazındaki fosfat-şeker bağları üzerinden gerçekleştiği belirtilmiştir [67].

Bhattacharyya ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, mitoksantron ile DNA arasındaki etkileşimler mikrokalorimetri kullanılarak araştırılmıştır [68].

Karikas ve ark. 2007 yılında yayınladıkları çalışmada antitümör özellik gösteren melfalan, bisülfan ve bisülfalan analoglarının DNA ile etkileşimi 37°C’de inkübasyon süreleri ve konsantrasyonları karşılaştırılarak incelenmiştir [69].

Schabana ve ark., antikanser aktiviteye sahip 2-aminobenzotiyazol kompleksleri ile yaptıkları çalışmalarda, döngüsel dikroizm spektroskopisini kullanarak, bu komplekslerin DNA ile olan etkileşimlerini incelemişlerdir [70].

Ertas ve Satana Kara L-sistein kaplanmış Mn doplanmış ZnS nanopartikülleri fosforesant prob olarak kullanarak antikanser ilaç olan İdarubisin ve DNA arasındaki etkileşimi incelemişlerdir [71].

2.9. Kromatografi

Kromatografi, bir karışım içerisindeki bileşiklerin biri hareketli diğeri sabit iki faz arasındaki farklı tutunma özelliklerine dayanarak yapılan ayırma işlemine dayanan tekniktir. Kromatografi yöntemi 20. yüzyılın başlarında Mikhail Tswett tarafından keşfedilmiştir. Tswett, klorofil ve ksantofil gibi çeşitli bitki pigmentlerini ayırmak için bu yöntemi kullanmıştır [72].

Kromatografik ayırma çalışmalarında analizi yapılacak madde veya maddeler, gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınmaktadır Hareketli faz, katı bir yüzey veya kolonda sabitleştirilmiş ve hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinde geçirmektedir. Bu iki fazın seçiminde, bileşenlerin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılması veya çözünmesi temel alınır [73].

2.9.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılmasında (Çizelge 2.4); ayırma mekanizması, sabit ve hareketli fazın polariteleri, kullanılan teknik gibi kriterler temel alınmaktadır [74].

Çizelge 2.4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Ayırma Mekanizmasına Göre	Adsorpsiyon Kromatografisi
	Dağılma (Partisyon) Kromatografisi
	İyon Değişimi Kromatografisi
	Jel Filtrasyon Kromatografisi
	Afinite Kromatografisi
	İyon Çifti Kromatografisi
Faz Tiplerine Göre	Sıvı Kromatografisi
	<i>Sıvı-Sıvı</i>
	<i>Sıvı-Katı</i>
	Gaz Kromatografisi
	<i>Gaz-Katı</i>
	<i>Gaz-Sıvı</i>
Kullanılan Tekniğe Göre	Düzlemsel
	<i>Kağıt Kromatografisi</i>
	<i>İnce Tabaka Kromatografisi</i>
	Kolon Kromatografisi
	<i>Gaz Kromatografisi</i>
	<i>Sıvı Kromatografisi</i>

Adsorpsiyon kromatografisi (sıvı-katı/gaz-katı kromatografisi): Ayrılacak bileşenlerin sıvı veya gaz hareketli faz kullanılarak sabit katı faz üzerinde tersinir olarak adsorblanmaları esasına dayanır. Adsorpsiyon kromatografisinde sabit faz olarak, alümina veya silikajel gibi adsorplama yapabilecek bir katı kullanılır [74].

Dağılma (Partisyon) kromatografisi (sıvı-sıvı/ gaz-sıvı kromatografisi): Ayırma işlemi, sıvı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan hareketli faz arasındaki farklı dağılma oranına göre gerçekleşir. Dağılma oranları farklı olan maddeler kromatografik sistem içerisinde farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar [75].

İyon değişimi kromatografisi: Sabit faz zayıf ya da kuvvetli katyon ya da anyon değiştirici bir reçinedir. Reçine negatif yüklü ise ‘*katyon değiştirici reçine*’, pozitif yüklü ise ‘*anyon değiştirici reçine*’ adı verilir [76].

Jel filtrasyon kromatografisi: Sabit faz, jel ya da gözenekli organik bir bileşiktir. Ayırma, numune bileşenlerinin molekül büyüklüklerine göre olur. İçteki gözeneklere ulaşabilen küçük

moleküllü bileşenler kolonda uzun süre kalırken, büyük moleküllüler daha kısa süre kalırlar [77].

Afinite kromatografisi: Enzim ya da hormon gibi spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır. Kolonun dolgu maddesine spesifik protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanır. Ligand ile kompleks yapan protein, katı desteğe bağlanarak kolonda tutulurken serbest proteinler kolonu terkederler. Bağlı protein daha sonra pH değişikliği, tuz çözeltileri veya ligand ilavesiyle kolondan elüe edilir [78].

İyon çifti kromatografisi: İyonlaşabilen asidik veya bazik maddelerin ters faz ilkesine göre çalışan kolonda ayrılmasına dayanır. Hareketli faza katyonik ya da anyonik karşıt iyon içeren organik tuzlar ilave edilerek analitin iyon çifti oluşturması sağlanır [77].

Normal faz kromatografisi: Sabit fazın hareketli fazdan daha polar olduğu kromatografi türüdür [60]. Hareketli faz bileşeni olarak genellikle eter, kloroform, hekzan gibi apolar çözücüler kullanılırken; sabit faz olarak en çok silika ve alümina tercih edilir [79].

Ters faz kromatografisi: Hareketli fazın sabit fazdan daha polar olduğu kromatografi türüdür [57]. Sabit faz olarak silikajel-polimer ve üzerine bağlanmış C18, oktil veya fenil grupları, metil, etil ve $-NH_2$ gruplu dolgu maddeleri kullanılırken; mobil faz olarak metanol, asetonitril, tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücüler ile sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımlar kullanılır. Uzun alkil zincirine sahip olan sabit fazlar (C18) daha apolar maddelerin ayrılmasında kullanılırken, kısa alkil zincirli olan sabit fazlar (C8, C2) ise polar maddelerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Polar analit apolar sabit fazla az etkileştiği için kolonda kısa süre tutunur [78].

Kağıt kromatografisi: Sabit faz özel süzgeç kağıtlarına absorbe edilmiş bir sıvıdır. Hareketli faz ise çözücü ya da çözücü karışımlarından oluşur. Kağıt kromatografisinin temeli, dağılım ilkesine dayanır [80].

İnce tabaka kromatografisi: Sabit faz olarak kullanılan adsorban, cam ya da alüminyum plakaların üzerine 0,1-5 mm kalınlığında kaplanarak kullanılır. Hareketli faz olarak çözücü ya

da çözücü karışımları kullanılır. Madde karışımı adsorbanın üzerine kapiler tüp yardımıyla damlatılır. Plaka, içinde hareketli faz olan tankın içine daldırılır ve kapiler etkisiyle hareketli fazın tabakanın yukarısına kadar ilerlemesi beklenir ve sonrasında noktalar görünür hale getirilerek değerlendirilir [81].

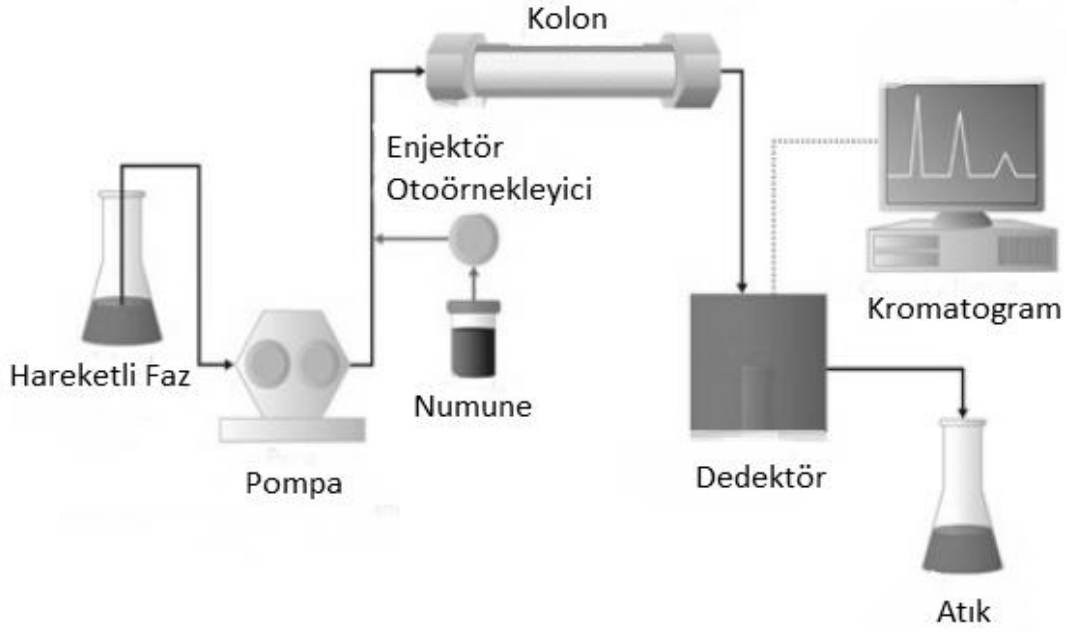
Kolon kromatografisi: Ayrılacak olan karışım, kolon içine doldurulmuş sabit bir faz (adsorban) üzerinden hareketli faz (elüent) aracılığıyla geçirilerek ayrılmaya çalışılır. En çok karşılaşılan uygulama şekli sıvı-katı kromatografisi şeklindedir. Sabit faz olarak silikajel, alümina, aktif kömür, kil, komposit gibi adsorban malzemeler kullanılabilir. Hareketli faz olarak ise uygun bir çözücü ya da çözücü karışımı kullanılabilir [82].

Gaz kromatografisi: Gaz kromatografide, uçucu hale getirilmiş numunenin bileşenleri hareketli faz ile bir kolona tutturulmuş bir sıvı veya bir katı faz arasında dağılması sonucunda ayrılır. Bu teknikte, numune buharlaştırılır ve kromatografi kolonunun girişine enjekte edilir. İnert bir gaz olan hareketli fazın akışıyla elüsyon gerçekleştirilir. Diğer birçok kromatografi türünün aksine, hareketli faz analit molekülleriyle etkileşime girmez, tek işlevi analiti kolon boyunca taşımaktır [83].

Sıvı kromatografisi: Modern sıvı kromatografisi sistemlerinde kullanılan kolonlar ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için oldukça yüksek pompa basınçlarına gerek duyulmaktadır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sistemleri geliştirilmiştir [83].

2.9.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK) yönteminde, sabit fazın parçacık boyutlarının küçültülmesiyle hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı artmakta ve kolon etkinliği arttırılmaktadır [84]. Hareketli fazın kolondan belirli bir hızla geçebilmesi için, basınç uygulanmalıdır [85]. Yüksek verimli kolonların ve yüksek basınçların kullanıldığı YBSK yöntemi, makro moleküllerin, iyonik karakterdeki moleküllerin, polimerik materyallerin ve büyük fonksiyonel grup içeren moleküllerin tayininde kullanılmaktadır [86]. YBSK'nın duyarlı ve hızlı olması, kullanılan kolonların uzun ömrü ve profesyonel kullanıcıya ihtiyaç olmaması yöntemin avantajları içerisinde yer almaktadır. Bir YBSK cihazı temel olarak; pompa, enjektör, kolon ve dedektörden oluşmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi cihazının şematik gösterimi

Hareketli faz: YBSK cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 ml çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Çözünmüş gazlar bant genişlemesine ve dedektör performansının düşmesine sebep olurlar. Hareketli faz, hazneye doldurulmadan önce vakum altında süzülerek süspansiyon halindeki maddeler uzaklaştırılmalıdır. YBSK ekipmanları, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. Bu da izokratik elüsyon yanında gradient elüsyona olanak sağlamaktadır. Analiti taşıyan çözeltidir; genellikle su ve sulu tampon çözeltiler, bunların metanol ve/veya asetronitril ile oluşturulan karışımları veya organik çözücülerden oluşur. Hareketli fazın bileşimi ve pH değeri ayırımı direkt etkiler. Kullanılan tekniğe, numune tipi ve kolona göre hareketli faz seçilmelidir. İzokratik elüsyonda, çözücü bileşimi sabit tutulurken; gradient elüsyonda çözücü bileşimi sürekli veya basamaklı olarak değiştirilmektedir [87].

Pompa sistemi: Kararlı akış hızı, pompalarda aranan bir özelliktir. YBSK sistemlerindeki pompalar, hareketli fazı oluşturan çözücü karışımlarının kolon ve dedektör içerisinden belirli, sabit veya değişken bir hızda, belirli basınç altında geçmesini sağlamaktadır. YBSK'da kullanılan pompalar genel olarak üçe ayrılmaktadır. Bunlar; pistonlu pompalar, şırınga veya sürgülü pompalar ve pnömatik veya sabit basınç pompalarıdır [84].

Numune enjeksiyon sistemi: Sıvı kromatografide en yaygın enjeksiyon yöntemi, numunenin kolona lup ile enjeksiyonudur. Sıvı kromatografi cihazları genellikle, 5–500 μ l'lik numune enjeksiyonuna uygun şekilde üretilirler. Kullanılan sıvı kromatografi cihazının türü (yüksek performanslı / ultra performanslı sıvı kromatografi), dedektörün hassasiyeti, kolon kapasitesi ve kullanılan çözücünün numuneye ait pik şekli üzerindeki etkisi gibi birçok etken, numune enjeksiyon hacminin belirlenmesinde dikkat edilmesi gereken noktalardır [78].

Kolon: Bir YBSK sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani doğru kolon tipi ve dolgu maddesinin verimiyle tayin edilir. Kolon verimliliğini doğrudan etkileyen parametreler ise kullanılan kolon dolgu maddesinin fiziksel özellikleri, parçacık boyutu ve kolonun uzunluğudur [85].

- Kolon uzunluğu: Kullanılan kolonun boyu doğrudan verimliliği etkilemektedir. Kolon boyundaki artış verimliliği arttırmaktadır. Fakat ayırımı arttırmak için kolon boyunu uzatmak iyi bir yol değildir. Kolon boyundaki artış analiz süresinin uzamasına neden olurken, sistem geri basıncını da artırır [81].
- Silika türü: Kolon dolgu maddesi olarak seçilen silika türü doğrudan alıkonma zamanı ve pik şekillerini etkilemektedir. Silikanın küçük gözenek hacimleri yüksek yüzey alanı sağlarken, silika yüzeyine ligandların daha kontrollü şekilde bağlanmasına olanak verir [86].
- Parçacık boyutu: Kolon dolgu maddesinin boyutu genel olarak mikrometre cinsinden ifade edilir. Parçacık boyutu ile kolon etkinliği arasında ters ilişki bulunmakta ve kullanılan dolgu maddesinin boyutu küçüldükçe ayırım etkinliği artmaktadır [87].
- Sabit fazın yapısı: YBSK cihazında kullanılan kolonlar, 10 cm, 15 cm, 25 cm veya 30 cm uzunluğunda, küçük boyutlu partikül içeren (3 μ m, 5 μ m veya 10 μ m) ve iç çapı 4mm, 4,6 mm ya da 7,8 mm olan yüksek basınca dayanıklı çelik kolonlardır. YBSK çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silikajel ve alümina kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler bazlık kuvvetlerine göre tutar. Alümina ise; bazik özellik taşıyan bir dolgu maddesidir ve asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlar [88]. Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile tayin edilir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir [89]. YBSK analizlerinde kullanılan sabit fazların bazıları Çizelge 2.5.'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. YBSK analizlerinde kullanılan sabit fazların grup ve formülleri

Grup	Formül	Grup	Formül
Oktadesil	$-(CH_2)_{17}CH_3$	Fenil	$-C_6H_5$
Oktil	$-(CH_2)_7CH_3$	Dimetilamino	$-N(CH_3)_2$
Hekzil	$-(CH_2)_5CH_3$	Aminopropil	$-CH_2CH_2CH_2NH_2$
Dimetil	$-Si(CH_3)_2$	Nitril	$-CN$
Trimetil	$-Si(CH_3)_3$	Alkilnitril	$-(CH_2)_nCN$
Sikloheksil	$-C_6H_{11}$	Propiyonitril	$-CH_2CH_2CN$

C18 olarak bilinen oktadesilsilan, apolar yapıya sahip ve yaygın olarak kullanılan silika bazlı bir YBSK kolonudur.

Dedektör: Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Yığın özelliği dedektörleri, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap veren dedektörlerdir. Analit özelliği dedektörleri ise analitin UV absorbansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir.

YBSK’de en sık kullanılan dedektörler şunlardır:

- Absorbans Dedektörleri
- Kütle Spektroskopisi Dedektörleri
- Floresans Dedektörleri
- Kırılma İndisi Dedektörleri
- Elektrokimyasal Dedektörleri
- İletkenlik Dedektörleri

Maddelerin çoğu UV-Görünür bölgede çeşitli dalga boylarında absorbansa sahiptirler. Bu yüzden UV dedektörler YBSK’da en çok tercih edilen dedektörlerdir [90].

2.9.3. YBSK’de temel parametreler ve sistem uygunluk testleri (SUT)

YBSK sisteminin analiz sonuçlarında gözle izlenebilen ilk parametreler; alıkonma zamanı, pik alanı, pik şekli gibi parametrelerdir. Numunenin kolona enjekte edilmesinden sonra dedektöre gelen cevap sinyali bir pik olarak görülür. İdeal pik şekli keskin, iki tarafı simetrik ve dar olmalıdır. Analit sinyalinin kolondan çıkış zamanı alıkonma zamanı (t_R) olarak

adlandırılır ve nitel analizlerin belirleyici faktörüdür. Kullanılan hareketli fazdan kaynaklanan piklerin çıktığı zaman ise ölü zaman veya ölü hacim (t_0) olarak adlandırılır [91].

Sistem uygunluk testleri kromatografik ve diğer ayırma yöntemlerinde, yöntemin yeterli doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirlemek için yapılmaktadır ve bu testlerin gerçekleştirilmesiyle kromatografik bir sistemin analize ne ölçüde uygun olduğu kanıtlanmış olur [92].

Bir kromatografik yöntemde analit pikinin alanının ve pik yüksekliğinin, belirlenen koşullardaki tekrar edilebilirliği yöntem kesinliğinin bir ifadesidir. Bu parametre, analizi yapılan maddenin sisteme en az ardışık 5 enjeksiyonundan elde edilen piklerin alanları ve pik yüksekliklerinin yüzde bağıl standart sapması (%BSS) olarak hesaplanır [90].

Amerikan Farmakopesi tarafından belirlenen sistem uygunluk parametreleri ve bu parametrelerin limit değerleri Çizelge 2.6'da belirtilmiştir.

Çizelge 2.6. Sistem uygunluk testlerine ait parametreler

SUT Parametresi	Limit Değerleri
Teorik Plaka Sayısı (N)	$N > 2000$
Kapasite (Alıkonma) Faktörü (k')	$1 \leq k' \leq 10$
Kuyruklanma Faktörü (T)	$T \leq 2$
Rezölüsyon (Ayırma) Gücü (R_s)	$R_s > 1.5$
Simetri Faktörü (A_s)	$0,95 \leq A_s \leq 1,2$
Enjeksiyon Kesinliği (BSS)	% BSS <1,5
Seçicilik Faktörü (α)	$\alpha > 1$

Teorik plaka sayısı: Kolonun içerisinde çok sayıda üst üste yerleşmiş kabul edilen ayırım tabakalarının olduğu varsayılır ve bunlar teorik tabaka olarak tanımlanır. Kromatografik bir kolonun ayırma sistemi olarak verimi, teorik plaka sayısı (N) ve teorik plaka yüksekliği (H) ile orantılıdır.

Bu iki terim arasında;

$$N = L/H$$

ile ifade edilen bir bağıntı bulunmaktadır. Bu eşitlikte L, kolon boyu olarak tanımlanır. Kolonun verimi tabaka sayısı arttıkça ve tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Deneysel olarak elde edilen kromatogramdan hareketle N değeri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır;

$$N = 16 (t_R/W)^2$$

Eşitlikte t_R alıkonma zamanını W ise pik taban genişliğini göstermektedir [72].

Kapasite (Alıkonma) faktörü: Kolonun performansı ve alıkonmanın tekrarlanabilirliği ile ilgilidir. Pikin alıkonmasının kolon geometrisi ve akış hızından bağımsız olarak ölçülmesini sağlayan parametredir.

$$k' = (V_R - V_0)/V_0 = (t_R - t_0)/t_0 \text{ formülü ile hesaplanır [73].}$$

Kuyruklanma faktörü: Kuyruklanma faktörü analit pikinin eğriliğini, herhangi bir yana dayalı olup olmadığını veya keskinliğini belirlemek için kullanılan faktördür. Pikin taban yüksekliğinin %5'i civarından ölçülür. Bu faktör kolonun yaşı ile orantılıdır, uzun süre kullanılmış kolonlarda bu değer yüksek çıkabilmektedir [79].

Rezolüsyon (Ayırma) gücü: Ayırma gücü, iki bant arasındaki uzaklığın bant genişliği cinsinden değeri demektir. Kullanılan kolon için ayırma gücü;

$$R_S = 2[(t_R)_B - (t_R)_A] / (W_A + W_B) \text{ eşitliği ile hesaplanır [83].}$$

Simetri faktörü: Pik omuzlanması veya kuyruklanmasını gösteren değerdir. Pikin taban yüksekliğinin %10'u civarından ölçülür [74].

Enjeksiyon kesinliği: Geliştirilen kromatografik yöntemde analizi yapılan maddenin enjeksiyonunun ve buna bağlı olarak pik alanı veya yüksekliğinin tekrarlanabilirliğinin bir göstergesidir. %BSS ile ifade edilir [83].

2.9.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisinde metot geliştirme ve validasyon

Metot geliştirme: Kullanılacak YBSK metodunun geliştirilmesi için öncelikli olarak analizin amacı belirlenmelidir. Bu bağlamda, analitin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenerek

kullanılacak olan dedektör, hareketli faz, sabit faz ve çalışılacak olan YBSK sistemi belirlemelidir [91]. Daha sonra, metodu geliştirmek için ayrılacak olan zaman, enjeksiyon başına maksimum analiz zamanı ve birim zamanda incelenecek olan numune sayısı öngörülmesi ve son olarak validasyonun gereği olarak tayin sınırı, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik parametreleri tespit edilmelidir [92]. Bu değerlendirmelerin yapılabilmesi için uygun bir miktar tayini yöntemi geliştirilmesi, yöntemin FDA ve ICH'nin belirlediği kurallara göre geçerliliğinin kanıtlanması yani valide edilmesi gerekmektedir [93].

Metot validasyonu: Analitik yöntem validasyonu çalışmalarının tarihi incelenecek olursa bu alandaki ilk yaklaşımların, 1990 yılında Belçika/ Brüksel'de toplanan Avrupa İlaç Endüstrileri ve Birlikleri Federasyonu (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations–EFPIA) tarafından düzenlenen İnsanlarda Kullanılan İlaçların Ruhsatlandırılması İçin Teknik Gerekliliklerin Belirlenmesi Uluslararası Konferansı (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use–ICH*) isimli kongrede sergilendiği görülmektedir. Bir yöntemin validasyonu, bir veya bir seri analitin, belirli bir matriks içindeki konsantrasyonunun tayini için kullanılan belirli bir yöntemin, amaçlanan uygulama bakımından güvenilirliğini göstermek için yapılması gereken bütün işlemleri kapsamaktadır [94].

Kullanılan analitik yöntemin yeterli duyarlılığa ve uygun kesinliğe sahip olarak, doğruluğunun deneysel olarak gösterilmesi gerekmektedir [95]. Analitik yöntemlerle bir analit, yeterli duyarlılık, özgünlük, doğrusallık, geri kazanım, doğruluk ve kesinlik (gün-içi ve günler-arası) bakımlarından tam olarak valide edilmiş, uygun bir yöntem kullanılarak tayin edilmelidir. Valide edilmiş bir yöntemin hedefi ise; bu yöntemle yapılmış sonuçlara güvenilirlik sağlamaktır [96].

Metot validasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan parametreler: Metot validasyonunda, analitik bir yöntemin kabul edilebilirliğini sağlayan ve *validasyon parametreleri* denilen belirli kabul kriterlerine uyulmalıdır (Çizelge 2.7). Validasyon parametreleri;

- Analitin belirli bir matriks içinde, saklama şartlarındaki kararlılığı
- Doğrusallık
- Kesinlik

- Doğruluk
- Tekrarlanabilirlik
- Duyarlılık, hassasiyet
- Özgünlük, seçicilik
- Tutarlılık, sağlamlık
- Teşhis sınırı ve tayin alt sınırıdır.

Metot validasyonu; analitik metot gelişimi ve dökümantasyonunu içerir. Ölçümü yapılacak her analit için validasyon yapılmalıdır [94]. FDA, ICH ve USP’de istenen validasyon parametreleri Çizelge 2.7’de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Validasyon için istenen parametreler

Özgünlük (<i>Specificity</i>) / Seçicilik (<i>Selectivity</i>)	IUPAC
Doğruluk (<i>Accuracy</i>)	FDA, USP, ICH
Kesinlik (<i>Precision</i>)	FDA, USP, ICH
Tekrarlanabilirlik (<i>Repeatability</i>)	ICH
•Ara kesinlik (<i>Intermediate precision</i>)	ICH
•Yenilenebilirlik (<i>Reproducibility</i>)	ICH*
Teşhis sınırı TS (<i>Limit of Detection LOD</i>)	USP, ICH
Tayin alt sınırı TAS (<i>Limit of Quantification LOQ</i>)	FDA, USP, ICH
Doğrusallık (<i>Linearity</i>)	FDA, USP, ICH
Aralık (<i>Range</i>)	USP, ICH
Tutarlılık (<i>Ruggedness</i>)	USP, ICH
Sağlamlık (<i>Robustness</i>)	FDA, USP, ICH*
Kararlılık (<i>Stability</i>)	FDA

(*): Mutlak gereklilik değildir.

FDA: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Birliği)

ICH: International Conference on Harmonization (Uluslararası Uyum Konseyi)

USP: United States Pharmacopia (Amerikan Farmakopesi)

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)

Özgünlük: Bir prosedüre göre gerçekleştirilen tayinde, diğer bileşenlerin analit üzerine girişimlerinin ölçüsüdür. Bu bağlamda spesifiklik en yüksek seçicilik yani girişimin olmadığı varsayıldığı durum olarak değerlendirilir [94].

Doğruluk: Bir analitik metodun doğruluğu, metot ile elde edilen ortalama test sonuçlarının analitin gerçek konsantrasyonuna yakınlığı ile tanımlanır. Üç yolla tayin edilir; sertifikalı referans standart madde ya da yöntemle karşılaştırma, kör matriks ortamına analizi yapılacak maddenin ilavesi ve daha önce analizi yapılmış numune çözeltisine saf standart ilavesi. Doğruluk her konsantrasyon için en az beş ölçüm ile belirlenir. Belirlenen aralıkta en az üç konsantrasyon gereklidir. Ortalama değerin gerçek değerden sapma oranı, doğruluk ölçütüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir [93,97].

Kesinlik: Analitik metodun kesinliği normal koşullar altında tekrarlanabilirliğin bir ölçüsüdür. Tekrarlanabilirlik (aynı yöntem, aynı analizci, aynı cihaz ve aynı laboratuvar koşulları), gün içi ve günler arası kesinlik, tekrar elde edilebilirlik (farklı laboratuvar şartlarında, farklı analizciler) olmak üzere sınıflanır. Her konsantrasyon için en az beş ölçüm ile belirlenir. Belirlenen aralıkta en az üç konsantrasyon gereklidir. Kesinlik sonuçları yüzde bağıl standart sapma (%BSS) ile ifade edilir [96,97].

Duyarlık: Bir cihazın veya yöntemin duyarlılığı, bir analit konsantrasyonundaki küçük farkları ayırt edebilme kabiliyetinin bir ölçüsü ya da analitik bir yöntemin düşük konsantrasyonları saptayabilme yeteneği de denilen standart kalibrasyon eğrisinin eğimidir [94,95].

Teşhis sınırı, gözlenebilirlik sınırı (TS): Analit sinyalinin belirlediği fakat kantitatif sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Zemin gürültüsünden istatistiksel olarak farklı fakat miktarı belirlenmeyen en küçük analit konsantrasyonudur. Kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olarak sinyal/gürültü oranından faydalanılır. Sinyal/gürültü oranının üç olduğu değer, teşhis sınırıdır [90]. Ancak bu değer, cihazlara, lambaya ve matrikse bağlı olarak değişir. Uluslararası Uyum Konferansı'nın da tanıdığı kurala göre, titrasyon gibi kromatografik olmayan miktar tayini yöntemlerinde alınan cevabın standart sapmasının (SD), kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 3 katı *teşhis sınırıdır* (TS) [93,95].

Tayin alt sınırı (TAS): Uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içerisinde kantitatif olarak tespit edilebilen numunedeki en düşük analit miktarı, *tayin alt sınırı* (TAS) olarak tanımlanır [90]. Tayin sınırı değerini belirlemek için, teşhis sınırı değerinde olduğu gibi sinyal/gürültü oranından faydalanılır. Pratik bir kural olarak sinyal/gürültü oranı kullanılıyor ise de tayin sınırı konsantrasyonunun doğruluk ve kesinlik sınırlarıyla uzlaşması gerekmektedir. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu değer, tayin alt sınırıdır. Uluslararası Uyum Konferansı'nın

da tanıdığı kurala göre kromatografik olmayan miktar tayini yöntemlerinde alınan cevabın standart sapmasının (SD), kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 10 katı *tayin alt sınırıdır* (TAS) [93,94].

Doğrusallık: Derişime karşı ölçülen analitik cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde veya yakınında yer almasıdır. Eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı (r), doğrusallığın içinde verilmesi gereken parametrelerdir [94].

Çalışma aralığı: Yeterli doğruluk, duyarlık ve doğrusallığa sahip yöntemin alt ve üst derişimlerinden oluşmaktadır. Derişim aralığı genellikle seçilen yöntemle göre değişir. En düşük noktası TAS değeridir [94,95].

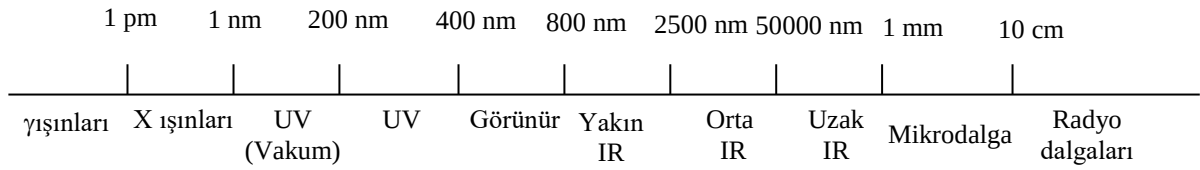
Sağlamlık: Sağlamlık parametresi, daha çok metot geliştirme aşamasında göz önünde bulundurulur. Bu durum metot parametrelerindeki olası hatalara göre analizin güvenilirliğini gösterir. Sağlamlığın değerlendirilmesinin tek amacı, sistem uygunluk parametrelerinin incelenerek analitik yöntem her uygulandığında valide olduğunun kanıtlanmasıdır. Sıvı kromatografide tipik varyasyon örnekleri, mobil faz bileşimi, pH etkisi, sıcaklık, akış hızı ve dalga boyudur [98].

Tutarlılık: Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın; aynı laboratuvarında farklı anaizciler tarafından, aynı laboratuvarında farklı cihazlarla ve farklı laboratuvarında gerçekleştirilmesi gerekir [95].

Kararlılık: Zorunlu bir validasyon parametresi olmamakla beraber yapılması önerilir. Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için numunelerin, standart maddelerin ve kullanılan çözücülerin uygun bir süre (1 gün, 1 ay vs.) kararlılığını koruması gereklidir [94].

2.10. Spektroskopi

Spektroskopi, en temel anlamıyla ışık ile maddenin etkileşiminin incelenmesidir. Spektroskopik analiz yöntemleri, moleküler ya da atomik türlerin absorpladığı, yaydığı, saçılan ve yansıtılan ışın miktarının ölçülmesine dayanır. Ölçmede kullanılan elektromanyetik spektrum (Şekil 2.10) bölgesine bakılarak spektroskopik yöntemler sınıflandırılır [83].



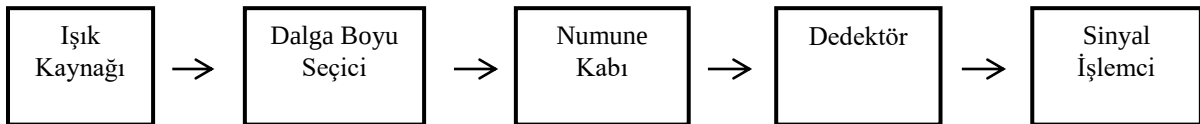
Şekil 2.10. Elektromanyetik spektrum

2.10.1. Ultraviyole-Görünür bölge spektroskopisi

UV-GB absorpsiyon spektroskopisi 200-800 nm dalga boyları arasındaki ışık tarafından uyarılma sonucu oluşan olayları kapsar. Bu dalga boyundaki ışığın enerjisi oldukça yüksek olduğundan titreşim ve dönme enerjileri gibi düşük enerjili geçişlerin yanı sıra elektronik enerji seviyesi gibi yüksek enerjili geçişler de sağlanır [83].

UV-GB spektroskopisinde dalga boyuna karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile bant spektrumları elde edilir. Bu spektrumlar, tüm elektronik ve diğer geçiş türlerine ait çizgilerin bir araya gelmesi ile meydana gelmiştir.

UV-GB spektrofotometresi Şekil 2.11’de gösterilen bileşenlerden meydana gelmektedir.



Şekil 2.11. UV-GB spektrofotometresinin şematik gösterimi

Cihazda ışık kaynağı olarak UV bölge için hidrojen ve döteryum lambalar (190-400 nm), görünür bölge için tungsten telli lambalar (350-2500 nm) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında ksenon ark lambaları (200-1000 nm) ve ışın yayıcı diyotlar (LED)’dan (300-1100 nm) ışık kaynağı olarak yararlanılmaktadır [99].

Spektroskopik çalışmalarda dar bantlı ve sürekli ışık kaynakları kullanılarak yöntemin duyarlılığı ve seçiciliği sağlanır. Bu nedenle numune üzerine gönderilen ışığın monokromatik olmasını sağlamak için dalga boyu seçicileri kullanılır. Bu amaçla filtreler ve monokromatörler kullanılır. Dalga boyu seçiminde absorpsiyon ve girişim olmak üzere iki tip filtre kullanılır. Absorpsiyon filtreleri spektrumun belli dalga boyundaki bölgelerini absorplarlar. Etkin bant genişlikleri 30-250 nm ve geçirgenlikleri %10 veya daha azdır.

Kesici filtreler GB'nin belli bir bölümünde %100 geçirgenliğe sahipken diğer bölümünde geçirgenlik sıfıra düşer. Girişim filtrelerinin çalışma mekanizması optik girişime dayanır ve oldukça dar bantlı ışık sağlanabilir. Bir girişim filtresi, iki yarı-geçirgen metalik film tabakası arasına yerleştirilen bir dielektrik tabakadan oluşur. Bu sistem cam veya benzeri bir geçirgen madde ile kaplanır. Dielektrik tabakanın kalınlığı kontrol edilerek istenilen dalga boyundaki ışığın geçişi sağlanır. Girişim filtreler ile absorpsiyon filtrelerine göre çok daha dar bantlar elde edilir. Monokromatik ışık elde etmek için kullanılan diğer sistemler monokromatörlerdir. Spektroskopik yöntemlerde ışınların dalga boylarının değiştirilmesi gerekir ve monokromatörler spektral taramaları yapabilecek şekilde tasarlanmışlardır. Bir monokromatör giriş ve çıkış silitleri, paralel ışın demeti oluşturan mercekler, prizma veya optik ağıdan meydana gelir. Bu bileşenler sistemi tozdan koruyan girişi ve çıkışı kapalı bir ortamda tutulur. Eski monokromatörlerde genellikle dalga boyu seçici olarak prizma sistemler kullanılmıştır. Ancak prizmalı sistemlerde kısa dalga boylu ışınlar, uzun dalgaboylu ışınlarla göre daha iyi ayrılırlar. Bu nedenle günümüzde geliştirilen sistemlerde optik ağı sistemler her dalga boyu aralığında aynı oranda ayırım sağlamasından dolayı tercih edilmektedir [83].

Numune kaplarının materyali çalışılan spektrum bölgesinde ışığı absorblamayan maddelerden seçilmelidir. UV bölgede kuvars ve erimiş silisden yapılan hücreler kullanılırken silikat camları ve iyi kalite plastiklerden yapılan hücreler GB'de kullanılabilir. Kullanılan hücreler genellikle 1×1 cm boyutunda, kübik ve ışının yansımaları engellemek için ışın geliş yönüne dik şekildedir. Bu hücrelerin dışında çalışma amacına yönelik olarak daha küçük veya daha büyük boyutlarda ve silindirik şekilli numune hücreleri de ticari olarak bulunmaktadır [99].

UV-GB spektrofotometrelerinde kullanılan dedektörler geniş bir dalga boyu aralığında cevap verebilmeli, yüksek duyarlılık göstermeli, sinyal/gürültü oranı yüksek olmalı, derişim ile orantılı cevap verebilmeli ve hızlı olmalıdır. UV-GB spektrofotometrelerde dedektör olarak fototüp, fotoçoğaltıcı ve silisyum fotodiyot sistemler kullanılır. Fototüpler, yarı silindirik bir katot ve tel şeklindeki anotun havası boşaltılmış bir silindirik hücre içerisine yerleştirilmesi ile oluşturulur. Elektrodun iç yüzeyi fotonlara duyarlı bir madde ile kaplanmış ve bu tabaka ışık ile uyarıldığında elektron verir. Salınan elektronlar, iki elektrot arasına bir potansiyel uygulandığında anoda doğru hareket ederek bir akım oluşturlar ve oluşan akım, ışın şiddeti ile doğru orantılıdır. Düşük ışık şiddetlerinin ölçümü için fotoçoğaltıcı tüpler fototüplere göre avantaj sağlarlar. Fotoçoğaltıcı tüplerde de fototüplerdeki katoda benzer ve dinot olarak adlandırılan yüzeylerden dokuz adet bulunur. Her bir dinot bir öncekine göre 90 V daha

pozitifdir ve böylece dinoda çarpan fotoelektron ilave elektronların oluşmasını sağlar. Bu işlem sonucunda her bir foton için 10^6 - 10^7 elektron oluşur ve sonuçta oluşan akım elektronik olarak yükseltilir [83].

UV-GB spektrofotometrik yöntemin kantitatif amaçla kullanılabilmesi için ışığın b ışın yoluna sahip bir hücredeki çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorbansının (A) ölçümü gerekir. [95].

Beer-Lambert yasası: Bir çözeltiden geçen ışık miktarı, ışığın çözelti içinde kat ettiği yol ve çözelti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılı, absorbe edilen ışık miktarı ise doğru orantılıdır ve aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir [95].

$$A = \log P_0/P = \varepsilon \times b \times C$$

A: Absorbans

P_0 ve P: Gelen ve çıkan ışın gücü

C: Çözelti konsantrasyonu (mol/L)

b: Işığın çözelti içinde kat ettiği yol (cm)

ε : Molar absorpsiyon katsayısı (L/mol.cm)'dir.

Beer-Lambert yasası yardımı ile molekülün yapısı hakkında bilgi edinilebilir, derişimi hesaplanabilir ve bir kimyasal reaksiyonun davranışı izlenebilir. Yasanın geçerli olabilmesi için düşük derişimde analit derişiminde çalışılmalı, monokromatik ışık kullanılmalı, çalışılan dalga boyuna uygun küvetler kullanılmalı, ışığın saçılması ve yansımından kaçınılmalıdır.

UV-GB spektroskopi ile DNA-ilâç etkileşimlerinin belirlenmesi: UV-GB spektrofotometrik yöntemler nükleik asitlerin küçük moleküllerle etkileşiminin belirlenmesi için kullanılan en yaygın ve basit yöntemlerden biridir. Ancak bu yöntemin kullanılabilmesi için DNA ve ilaca ait spektrumların çakışmaması yani çalışılan ilâçların GB dalga boyu aralığında absorpsiyon bantlarının bulunması gerekir. Etkileşimin belirlenmesi için kullanılan en kolay yöntem ilâç

molekülüne ait bantların etkileşim öncesi ve sonrasındaki değişikliğinin izlenmesidir. Değişikliğin büyüklüğü DNA ve ilaç arasındaki etkileşimin kuvvetini göstermektedir.

DNA'nın UV-GB spektrumu 220-300 nm arasında geniş bir bant spektrumuna sahiptir ve 260 nm'de pürin ve pirimidin bazlarında yer alan kromofor gruplar nedeni maksimum absorpsiyon değeri gösterir. Bu moleküllere ait geçişlerin olasılığı yüksektir ve molar absorptivite (ϵ) değeri $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'dir. Ayrıca 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri oranı DNA'nın saflığı hakkında bilgi verir. Bu değer 1,8-1,9 arasında olması DNA'nın proteinlerden saf olduğunu göstermektedir [52].

İlaç-DNA etkileşimlerinin belirlenmesinde serbest ilacın ve DNA-ilacın kompleksinin spektrumları karşılaştırılır. İlacın DNA ile etkileşim türüne göre farklı davranışlar gözlenmektedir. İlaç interkalasyon yoluyla etkileşiyorsa, ilaca ait aromatik kromofor gruplar ile DNA'ya ait baz grupları arasındaki bağlanma nedeniyle, ilacın spektrumunda hipokromik (absorbans değerinde azalma) ve batokromik (kırmızıya kayma) etki gözlenir. Bu etkileşimin gücü kromofor ve DNA bazlarının arasındaki uzaklığa bağlıdır. İki molekül arasındaki uzaklık azaldıkça her iki türe ait π elektronları arasındaki etkileşim artar ve π - π^* geçişlerinin enerji seviyesi azalır [101]. Bu durum ise batokromik etkiye neden olur. Eğer etkileşim elektrostatik ise etkileşim sonrası DNA'nın yapısal bozunmasından dolayı hiperkromik (absorbans değerinde artma) etki gözlenir [100]. Çift sarmal DNA, bazlar arasındaki hidrojen bağları ve etkileşimler ile bir arada bulunmaktadır. Hidrojen bağları aromatik halkalardaki rezonansı sınırladığı için absorbans değerinin de azalmasına neden olur. Ancak DNA, sarmal yapısını bozan bir tür ile etkileştiğinde çift sarmalı bir arada tutan bağlar kırılarak ikili sarmal açılır ve tek sarmal şekline döner. Bu durumda bazlar serbest hale geçtiğinden aralarındaki etkileşim azalır ve UV absorbansı artar. Genel olarak tek sarmallı DNA'ya ait absorbans değeri aynı derişimdeki çift sarmal DNA'ya göre %40 daha fazladır [102].

Absorbanstaki değişimlere bağlı olarak ilaç-DNA arasındaki bağlanma katsayısı Benesi-Hildebrand eşitliği kullanılarak hesaplanabilir (Eşitlik 2.1).

$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\epsilon}{\epsilon - \epsilon_0} + \frac{\epsilon}{\epsilon - \epsilon_0} \times \frac{1}{K [\text{DNA}]}$$

(Eş. 2.1)

Eşitlikte;

A_0 : İlacın tek başına absorbans değeri

A : İlacın DNA ilavesi ile absorbans değeri

ϵ_0 : İlacın seçilen dalga boyundaki absorptivite katsayısı

ϵ : İlacın DNA ilavesi ile seçilen dalga boyundaki absorptivite katsayısı

K : Bağlanma katsayısı

Bu eşitlikten hareketle $1/[DNA] - [A_0/(A-A_0)]$ grafiği oluşturularak eğim değerinden bağlanma katsayısı (K) hesaplanmaktadır.

2.10.2. Floresans spektroskopisi

Lüminesans olayı atom ya da molekülün farklı yollarla uyarılması sonucu yapmış olduğu ışınımı ifade eder. Floresans, atom veya moleküllerin elektromanyetik ışınları absorplayarak uyarıldığı bir fotolüminesans olayıdır. Moleküler floresans yönteminde numune, kendi absorpsiyon dalga boyunda (uyarma dalga boyu) uyarılır ve bundan daha uzun bir dalga boyunda (emisyon ya da floresans dalga boyu) yayılan ışın ölçülür.

Singlet/triplet uyarılmış haller: Bütün elektron spinlerinin eşleşmiş olduğu bir moleküler elektronik hal singlet hal olarak adlandırılır ve manyetik alana maruz kaldığında elektronik enerji seviyelerinde yarıma meydana gelmez. Eğer bir foton tarafından uyarılırsa elektronlardan biri bir üst enerji seviyesine çıkar ve bu duruma uyarılmış singlet hal adı verilir. Uyarılmış singlet haldeki elektron hala temel haldeki elektron ile eşleşmiş durumdadır. Buna karşılık triplet halde iki elektronun spinleri birbiri ile eşleşmemiş durumdadır. Uyarılmış triplet hal ve uyarılmış singlet halinden farklıdır; (i) singlet halde diamanyetik olan molekül triplet halde paramanyetikdir. (ii) triplet hale geçişler, singlet hale geçişlere göre daha düşük ihtimallidir. (iii) triplet halden yapılan emisyon singlet halden yapılan emisyonu göre daha uzun dalga boylarında gerçekleşir. (iv) singlet halin ortalama ömrü 10^{-8} s kadarken triplet halin ortalama ömrü 10^{-4} s'den birkaç saniyeye kadar uzayabilir [103].

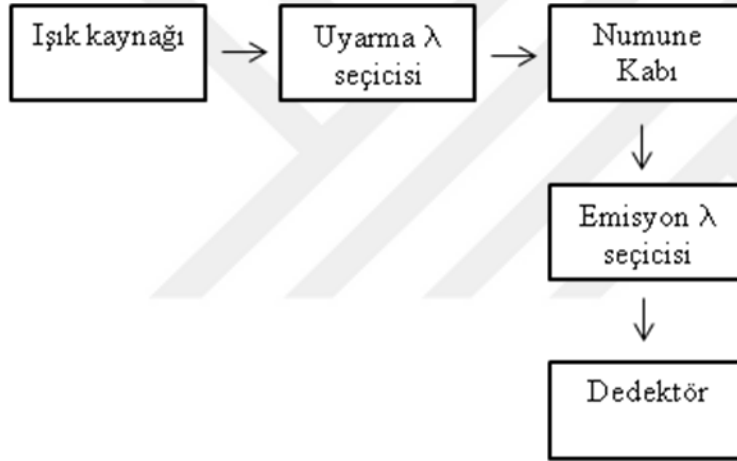
Foton ile uyarılmış bir molekülün temel haldeki enerji seviyesindeki elektron uyarılmış enerji seviyesinin birçok titreşim seviyesinden herhangi birine uyarılabilir. Titreşim enerjisi, uyarılmış türlerin birbiri ve çözücü molekülleri ile çarpışması sonucu kaybedilir. Bunun sonucunda analizi yapılan çözeltide ısınma meydana gelir. Titreşim enerji düzeyleri bakımından uyarılmış bir molekülün ortalama ömrü 10^{-12} s'dir. Molekül temel hale geri dönerken elektron önce temel halin en yüksek enerjili titreşim seviyesine iner ve buradan titreşimsel durulma ile temel hale geçer. Bu sırada UV-GB'de herhangi bir emisyon gözlenmez. Bu olaylara *titreşimsel durulma* adı verilir. *İç dönüşüm* terimi yine uyarılmış bir molekülün ısıma yapmadan elektronik enerji seviyeleri arasındaki geçişi ve temel hale dönmesini ifade eder. İç dönüşüm, iki elektronik halin titreşim enerji seviyeleri birbiri ile örtüşecek kadar yakınsa gerçekleşir. İç dönüşüm *ön ayrışma* denen olaya da neden olabilir. Burada elektron yüksek bir elektronik halden, titreşim enerjisinin bir bağı koparmaya neden olacak kadar büyük olduğu, daha düşük bir elektronik halin daha yüksek enerji seviyesine iner. Önayırışma ile absorplanmış ışının bir elektronu doğrudan bağın kırılmasına sebep olacak kadar yüksek bir titreşim düzeyine uyarıldığı *ayrışma* ile karıştırılmamalıdır. Uyarılmış molekül absorplanmış olduğu enerjiyi, diğer uyarılmış moleküller ve çözücü molekülleri ile etkileşimi sonucunda da ışımasız olarak kaybedebilir. Bu olaya ise *dış dönüşüm* adı verilir. *Sistemler arası geçiş*, uyarılmış bir elektronun spininin ters dönerek triplet hale geçmesi sonucu meydana gelir. Eğer bir molekül uyarılmış halden temel hale dönerken ısıma yapıyorsa bu olay *floresans*, eğer triplet halden temel hale dönerken ısıma yapıyorsa *fosforesans* olarak adlandırılır [83].

Bir molekülün emisyon yapıp yapmayacağı molekülün yapısına ve çevresine bağlıdır. Moleküllerde $\delta^* \rightarrow \delta$ geçişleri ile floresans nadir olarak gözlenir. Çünkü bu geçişlerin sağlanabilmesi için gereken enerji moleküldeki bağların kırılmasına neden olabilecek kadar yüksektir. Bunun yerine, daha az enerjili $\pi^* \rightarrow \pi$ ve $\pi^* \rightarrow n$ geçişleri ile emisyon daha sık gözlenir [102].

Floresans şiddeti en yüksek $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine sahip aromatik fonksiyonel grupları içeren bileşiklerde gözlenmektedir. Bunun nedeni bu geçişlerin molar absorptivite değerlerinin yüksek olması ve sistemler arası geçiş ihtimalinin daha düşük olmasıdır. Sübstitüe olmamış birçok aromatik hidrokarbon çözeltide floresans yapar. Ancak yapıya O, S ve N gibi sübstitüsyonlar rezonansı bozacağı için floresans şiddetini azaltacak etki gösterir [83, 103].

Bazı durumlarda ise süstitüsyon uyarma dalga boylarında değışmelere neden olarak emisyon dalga boyunu değıştirebilir. Rijit moleküllerde iç dönüşüm hızının azalması nedeniyle floresans özellik artar. Moleküllerin yapısal özelliklerinin yanında çevresel faktörlerde floresans şiddeti üzerinde değışikliğe neden olur. Birçok molekül için sıcaklığın artması moleküllerin çarpışma hızını dolayısı ile dış dönüşüm yolu ile deaktivasyonu arttıracak için floresansı olumsuz yönde etkiler. Benzer etki çözücü viskozitesinin azalmasıyla da gözlenmektedir. Bu etkilerin yanında çalışılan çözeltileri pH'ı da molekülün iyonik formunu değıştireceğinden dolayı floresans üzerine etki eder [83].

Floresans ölçümleri için kullanılan cihazlar Şekil 2.12'de gösterilen bileşenlerden meydana gelmektedir.



Şekil 2.12. Spektroflorometrenin bileşenleri

Cihazda ışık kaynağı olarak düşük basınçlı civa lambası (254, 302, 313,546, 578, 691 ve 773 nm), ksenon ark lambası (190-1300 nm), LED lambalar ve lazerler kullanılmaktadır.

Hem uyarma hem de emisyon dalga boylarının seçimi için filtreler ve optik ağı monokromatör sistemleri kullanılmaktadır.

Floresans ölçümlerinde kuvarstan yapılmış dikdörtgen prizması şeklindeki hücreler kullanılır. Kullanılan hücreler genellikle 1×1 cm boyutunda olmakla birlikte çalışma amacına yönelik olarak daha küçük hacimlerde hücreler de ticari olarak bulunmaktadır.

Floresans çalışmalarında elde edilen emisyon sinyalleri oldukça düşük olduğundan dolayı ölçümler için yükseltilmeleri gerekir. Bu nedenle fotoçoğaltıcı tüpler en yaygın kullanılan dedektör sistemleridir.

Floresans emisyon gücü, molekül tarafından absorplanan ışığın gücü ile orantılıdır ve aşağıdaki (Eşitlik 2.2) eşitlikle ifade edilebilir;

$$F = 2,303 K' \epsilon b c P_0 \quad (\text{Eş. 2.2})$$

Eşitlikte de görüldüğü gibi emisyon şiddeti derişim ile doğru orantılı olarak değişmektedir.

Floresans sönümleme: Floresans sönümleme, çarpışmayla sönümleme, moleküler düzenlenme, enerji transferi, yük transfer reaksiyonları, fotokimya ya da temel halde kompleks oluşumundan kaynaklanabilen pek çok faktör nedeniyle moleküllerin floresans şiddetindeki azalma olarak tanımlanır. Sönümlenme olayının iki önemli sebebi, dinamik (çarpışma) ve statik (kompleks oluşumu) sönümlemelerdir [103]. Statik ve dinamik sönümlemenin gerçekleşebilmesi için florofofor ve sönümleyici türün etkileşmesi gerekir.

Dinamik sönümleme (çarpışma): Çarpışma ile sönümlemede, sönümleyici molekül uyarılmış haldeki florofofor ile etkileşir ve temel hale geçiş ışımasız yol ile sağlanır. Çarpışmayla sönümleme *Stern-Volmer eşitliği* (Eşitlik 2.3) ile verilir [104].

$$F_0 / F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{Eş. 2.3})$$

F_0 ve F : Sönümleyici yokluğunda ve varlığında florofoforun floresans şiddeti

k_q : Bimoleküler sönümleme hız sabiti

τ_0 : Baskılayıcının yokluğunda uyarılmış hal hal ömrü

K_{SV} : Stern-Volmer sönümleme sabiti

Q : Sönümleyici derişimi

Eğer sönümleme işlemi dinamik ise eşitlikte yer alan K_{SV} terimi K_D olarak isimlendirilir.

Elde edilen veriler yardımı ile $[Q] - F_0 / F$ grafiği çizilir. Grafikte kesim değeri 1'e ve eğim değeri K_D 'ye eşittir (Şekil 2.13).

Statik sönmleme (kompleks oluşumu): Bazı durumlarda, temel haldeki florofofor diğer bir molekülle floresans olmayan kararlı kompleks oluşturabilir. Oluşan bileşik ışık ile uyarıldığında temel hale ışınmasız olarak döner [105]. Böyle bir durumda, sönmleyicinin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak floresansa bağlılık Eşitlik 2.4 ile verilir:

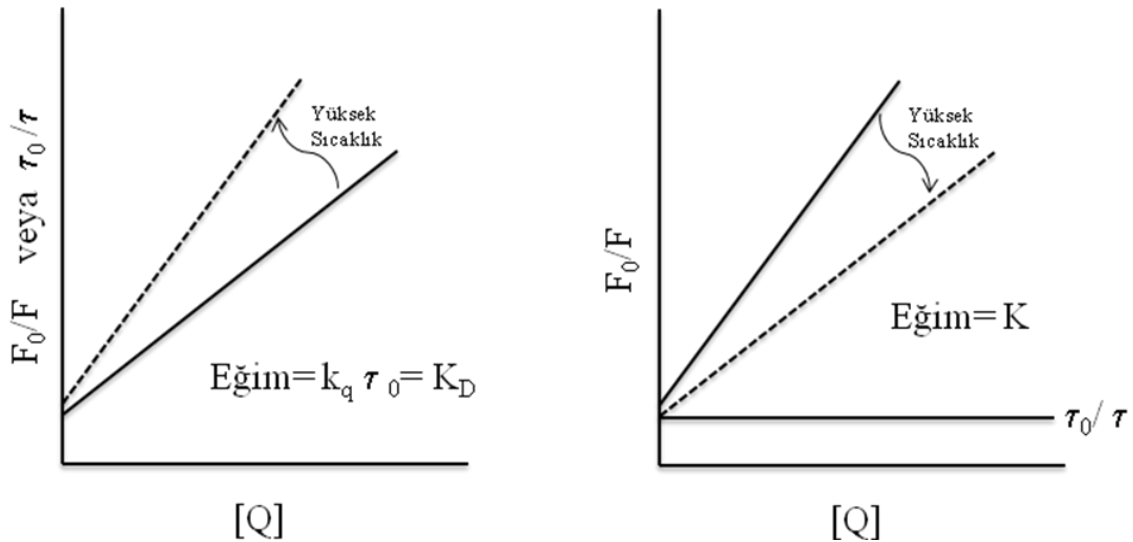
$$F_0 / F = 1 + K_S [Q] \quad (\text{Eş. 2.4})$$

F_0 ve F : Sönmleyici yokluğunda ve varlığında florofoforun floresans şiddeti

K_S : Statik sönmleme sabiti

Q : Sönmleyici derişimi

Dinamik sönmlemeye benzer şekilde $[Q] - F_0 / F$ grafiği çizilerek eğim değerinden K_S hesaplanır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Dinamik ve statik sönmlemeye ait Stern-Volmer grafiği

Statik ve dinamik sönmleme birbirlerinden, sıcaklığa ve viskoziteye gösterdikleri değişimlerden veya tercihen yarı ömür ölçümleri ile farklıdır. Yüksek sıcaklıklarda difüzyon hızı artacağı için moleküllerin çarpışma oranı da artar. Bu nedenle dinamik

sönümlemede elde edilen grafiğin eğimi artar [103]. Buna karşılık statik sönümlemede kompleks bileşikler oluşturarak zayıf bağların kırılması nedeni ile eğimde azalma gözlenir. Bunu yanı sıra, dinamik sönümlemede uyarılmış haldeki türlerin etkileşimi söz konusu olduğundan floroforun yarı ömrü değişirken, statik sönümlemede gözlenen floresans emisyonu komplekse girmeyen yani türü değişmeyen florofordan kaynaklandığı için yarı ömürde değişiklik olmayacaktır. Bu nedenle dinamik sönümlemede $F_0 / F = \tau_0 / \tau$ ve statik sönümlemede $\tau_0 / \tau = 1$ 'dir. Statik ve dinamik sönümlemenin ayırt edilmesi için kullanılan bir diğer yöntem ise absorpsiyon spektrofotometresidir. Dinamik sönümleme sadece uyarılmış haldeki türü etkilediği için absorpsiyon spektrumunda herhangi bir değişiklik beklenmez. Ancak statik sönümlemede, temel haldeki türün kompleks oluşumu söz konusu olduğundan spektrumda değişiklikler gözlenebilir [105].

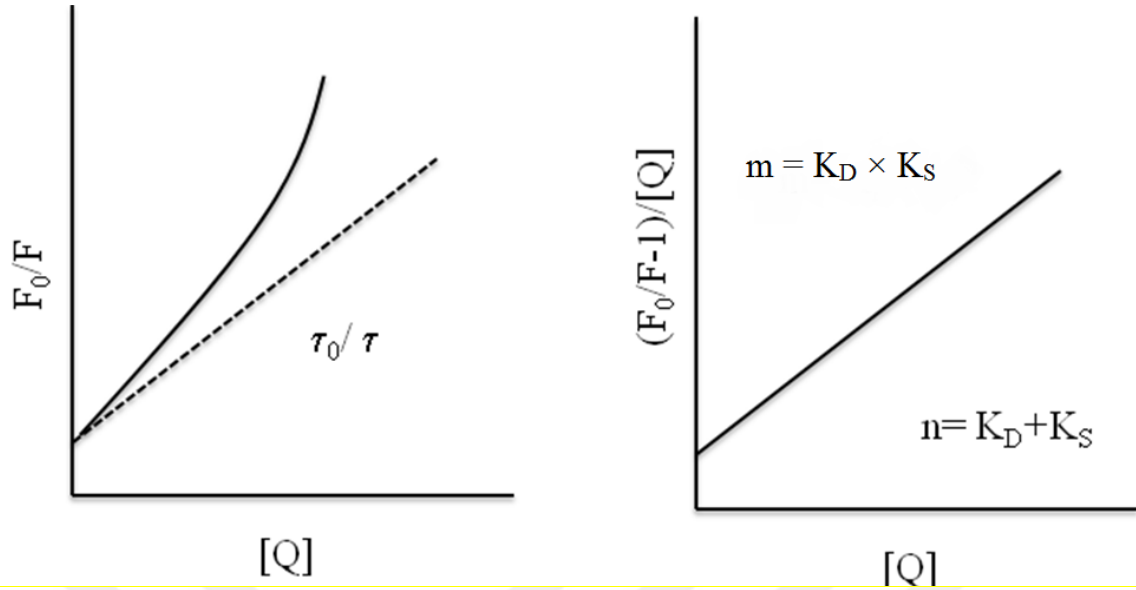
Bazı durumlarda florofor aynı sönümleyici tarafından aynı zamanda hem statik hem de dinamik sönümlemeye uğrayabilir. Bu durumda Stern-Volmer grafiğinin doğrusallığı yukarı doğru artan bir eğri halini alır (Şekil 2.14). İki sönümlemenin söz konusu olduğu durumda Stern-Volmer eşitliği modifiye edilir ve Eşitlik 2.5'de gösterilen şekilde kullanılır.

$$F_0 / F = 1 + K_{app} [Q] \quad (\text{Eş. 2.5})$$

Bu eşitlikten hareketle Eşitlik 2.6 elde edilir.

$$K_{app} = [(F_0 / F) - 1] / [Q] = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q] \quad (\text{Eş. 2.6})$$

Eşitlik 2.6 kullanılarak $[Q] - K_{app}$ grafiği oluşturulur. Bu doğrunun eğim değeri $K_D \times K_S$ ve kesişim değeri $K_D + K_S$ 'dir. Buradan iki bilinmeyenli denklem yardımı ile her bir sönümlemeye ait sönümleme sabitleri hesaplanır [106].

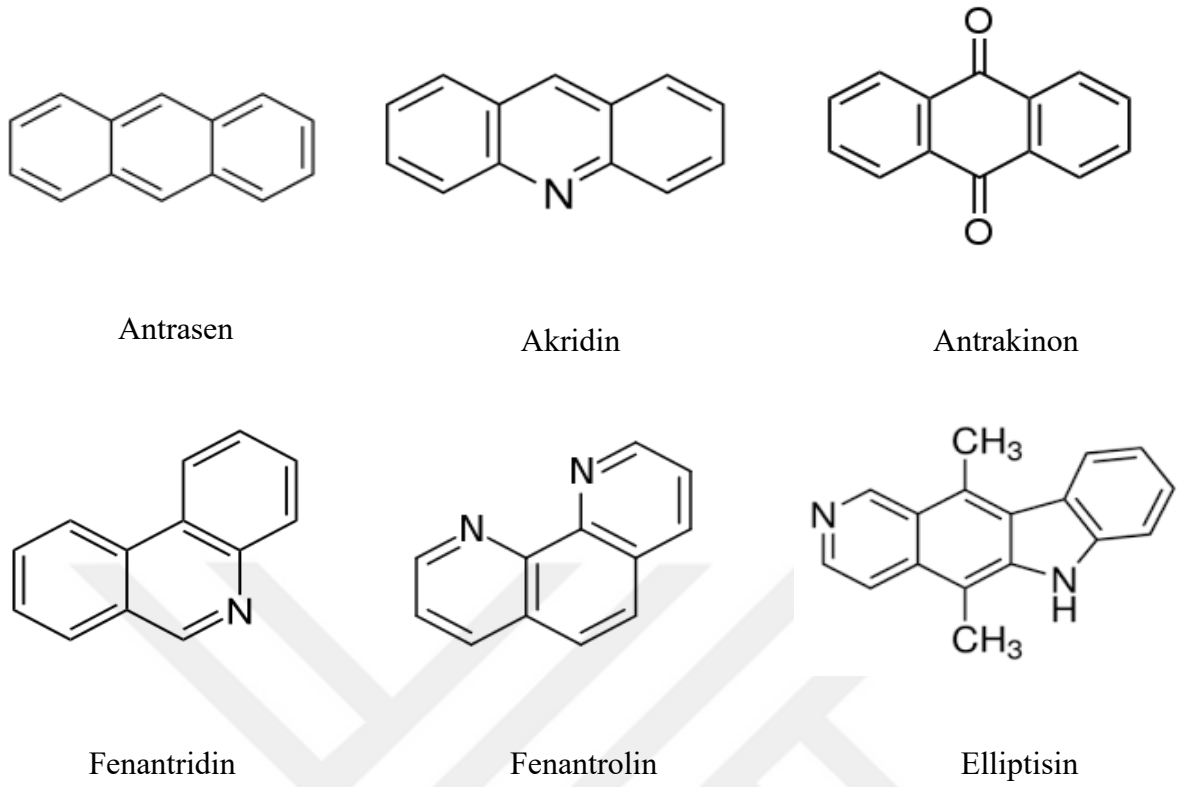


Şekil 2.14. Statik ve dinamik sönmleme bir arada iken Stern-Volmer grafiği

2.10.3. Spektroflorimetrik yöntemler ile DNA-ilaç etkileşimlerinin belirlenmesi

Floresans spektrometri, ilaç ve DNA arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Florofor ligantların yapısal özellikleri ve DNA bazları ile etkileşimleri floresans anizotropi ve floresans rezonans enerji transfer teknikleri ile incelenebilir. Ayrıca, floresans sönmleme çalışmaları bağlanma şekilleri hakkında bilgi vermektedir. İnterkalasyon yolu ile etkileşimlerde floresans şiddetinde artış gözlenebilir. Bunun nedeni, serbest durumdaki moleküllerin bağ etrafındaki dönme hareketleri ışımasız deaktivasyona neden olurken, DNA ile etkileşimleri sonucunda sarmal içerisinde bu dönme hareketi kısıtlandığı için floresans ile deaktivasyonun tercih edilen yolak olmasıdır. Buna karşılık, oyuk bağlanma, elektrostatik, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler varlığında moleküllerin şeker-fosfat omurgasına yakın olmasından dolayı emisyon şiddetinde azalma görülür [103].

İlaç-DNA etkileşimlerinin spektroflorimetrik çalışmalarında DNA'nın floresans özelliği olmadığından ilaca ait emisyon şiddetindeki değişimler incelenir. Ancak ilacın da floresans özelliği olmadığı durumlarda florofor boya maddeleri kullanılarak dolaylı yol ile tayinler yapılabilir. Bu boyalar genellikle antrasen, antrakınon, akridinler, antrasenler, fenantridin, fenantrolin ve elliptisin yapısındadır (Şekil 2.15) [102].



Şekil 2.15. Bazı florofofor boya maddelerinin yapıları

Bu boyaların içerisinde DNA prob olarak en sık kullanılanlar etidyum bromür, metilen mavisi ve akridin turuncusudur.

i)Çift iplikli nükleik asitleri tespit etmek için en sık kullanılan molekül, bir DNA interkalasyon ajanı olan *etidyum bromürdür* (Şekil 2.16) [107].

Yapısı	
Kapalı Formülü	$C_{21}H_{20}BrN_3$
Sistemik Adı	5-etil-6-fenil-fenantridin-3,8-diamin bromür
Molekül Ağırlığı	394,294 g/mol

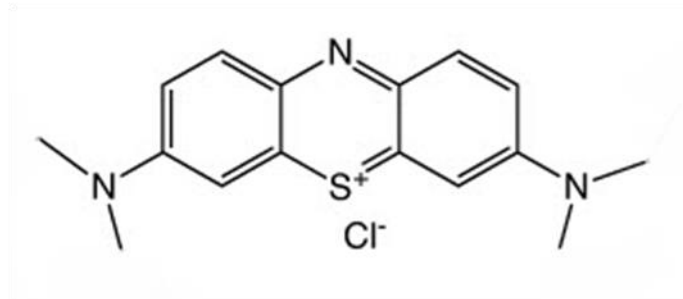
Şekil 2.16. Etidyum bromür kimyasal özellikleri

Etidyum bromür (EtBr), zayıf floresans emisyonu sahiptir. Ancak DNA'ya bağlı olması halinde floresans emisyon şiddetinde artma gözlenir. Bunun nedeni, etidyum bromürün arasına sıkıştığı bazlar arasındaki hidrofobik ortamdır. Bu hidrofobik ortam içine giren etidyum katyonu kendisine bağlı tüm su moleküllerinden ayrılır. Su molekülünün, etkili bir floresans sönmüleyici olması nedeniyle, su moleküllerin ayrışması etidyumun daha fazla emisyon yapmasına yol açar [53]. Eğer ortamda DNA ile bağlanan başka bir molekül bulunursa, bu molekül EtBr ile yarışmalı olarak DNA ile etkileşir ve sonuçta EtBr-DNA kompleksini bozarak EtBr'ün emisyon şiddetinde sönmülemeye neden olur [107].

Etidyum bromür DNA sarmalına interkale olarak sarmalın şeklini bozar ve DNA onarımını engeller. Kanserojen etki gösterdiği tahmin edilmekte ve yüksek konsantrasyonda göz, cilt ve üst solunum yolunu tahrip etmektedir [102].

ii) Nükleik asitleri tespit etmek için kullanılan diğer bir molekül, *metilen mavisi (MM)* 'dir. Metilen mavisi (Şekil 2.17), fenotiyazin sınıfına ait düzlemsel bir aromatik halka içeren katyonik yüklü bir moleküldür. ssDNA'da Guanin bazlarına özgül olarak bağlanır ve dsDNA ile etkileşimi interkalasyon şeklindedir. MM, floresans özelliğe sahip bir moleküldür ve DNA ile etkileştiğinde emisyon şiddetinde sönmüleme gözlenir [102].

Yapısı



Kapalı Formülü

$C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$

Sistemik Adı

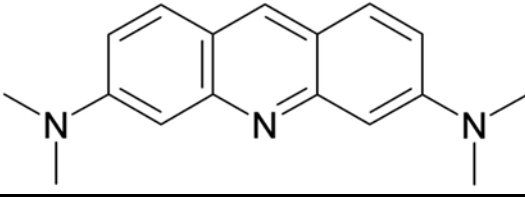
3,7- Bis(dimetilamino)-5-fenotiyazinyum klorür

Molekül Ağırlığı

319,85 g/mol

Şekil 2.17. Metilen mavisi kimyasal özellikleri

iii) Akridin turuncusu (3,6-dimetilaminoakridin) (Şekil 2.18), nükleik asitlerin belirlenmesinde kullanılan diğer bir interkalatör ajandır. Nükleik asitlere özgü metakromatik bir boyadır ve hücre döngüsünün aşamalarını belirlemek için kullanılır [108].

Yapısı	
Kapalı Formülü	$C_{17}H_{19}N_3$
Sistemik Adı	<i>N, N, N', N'</i> -Tetrametilakridin-3,6-diamin
Molekül Ağırlığı	265,36 g/mol

Şekil 2.18. Akridin turuncusu kimyasal yapısı

Bu tez çalışması kapsamında, etkileşim çalışmalarının kromatografik olarak belirlenmesinden sonra TMZ-DNA etkileşiminin hangi türde olduğunun anlaşılabilmesi için UV-GB spektroskopisi ve floresans spektroskopisi kullanılmıştır.

TMZ ile etkileşiminin incelenmesi için hazırlanan ilaç çözeltisinin tek başına ve DNA çözeltisi ilavesinden sonra UV-GB spektrumları alınarak değişiklikler izlenmiştir. Elde edilen spektrumlarda TMZ'ye ait piklerin absorban değerlerinin DNA ilavesi ile azaldığı belirlenmiştir.

Floresans çalışmalarında ise ilacın ve DNA'nın floresans özellik göstermemesi nedeniyle dolaylı yolla tayin için metilen mavisi (MM) kullanılmıştır. Çalışmada, DNA molekülü MM ile etkileştirilerek MM'nin floresans sinyalindeki azalma gözlenmiştir. Daha sonra oluşan MM-DNA kompleksi üzerine TMZ ilavesi ile TMZ ve MM, DNA ile yarışmalı olarak etkileşmiş ve yeni TMZ-DNA kompleksi oluşarak MM'nin serbest kalması sağlanmıştır. Böylelikle MM'ne ait emisyon şiddetinin tekrar geri kazanıldığı görülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasal malzemeler

Yapılan deneylerde kullanılan kimyasal maddelerden ileri gelebilecek safsızlıkların deney sonuçlarına yansımaması için kromatografik/analitik saflıkta kimyasal maddeler ve deiyonize su kullanılmıştır.

- Sığır timüsünden elde edilen DNA sodyum tuzu (ds-DNA) (SIGMA-ALDRICH)
- Temozolomid (TMZ) (SIGMA-ALDRICH)
- Sodyum Asetat ($C_2H_3NaO_2$) (MERCK)
- Sodyum Hidroksit (NaOH) (MERCK)
- Asetonitril (C_2H_3N) (MERCK)
- Asetik Asit (CH_3COOH) (MERCK)
- Temodal® (5 mg) (MSD)

3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler

- Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi: The Agilent 1260 serisi, Drogan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Laboratuvarında kullanılmıştır.
- DAD Dedektör: The Agilent 1260 Diode Array Dedektör, Drogan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Laboratuvarında kullanılmıştır.
- Analitik Kolon: ACE 5µm, C18, 150 x 4.6mm, Drogan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Laboratuvarında kullanılmıştır.
- UV-Visible Spektrofotometre: Specord 50 Plus, Analytik Jena., 1×1 cm kuvarz hücre
- Floresans Spektrofotometre: Agilent Carry Eclipse Spektrofotometre, 1×1 cm kuvarz hücre
- pH Metre: Mettler Toledo marka S20 Seven Easy model pH metre, Drogan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Laboratuvarında kullanılmıştır.
- Saf Su Cihazı: Millipore Q Advanage System A10 ultra saf su sistemi, Drogan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Laboratuvarında kullanılmıştır.

- Manyetik Karıştırıcı: Heidolph marka manyetik karıştırıcı, Drogan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Laboratuvarında kullanılmıştır.
- Analitik Terazisi: Mettler Toledo XSE104 model, Drogan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Laboratuvarında kullanılmıştır.
- Çeşitli hacimlerde balon joje, hacmi belirli deney tüpleri, cam havan, beherler, çeşitli ölçülerde mikropipetler.

3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. Tampon çözeltiler

Tüm YBSK analizlerinde hareketli faz olarak 0,02 M pH 4,5 asetat tamponu kullanılmıştır. Bunun için gerekli miktarda asetik asit 1L'lik balonjojeye aktararak deiyonize su ile seyreltilmiş, pH değeri 5 M NaOH ile ayarlanmış ve yine deiyonize su ile hacme tamamlanmıştır.

3.2.2. TMZ-DNA etkileşim çalışmaları için kullanılan çözeltiler

Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözeltiler: 40,12 mg DNA tartılmış, 100 ml'lik balonjojeye alınarak deiyonize su ile hacme tamamlanmış ve +4°C'de 1 gece buzdolabında bekletilmiştir. Hazırlanan DNA çözeltisinin UV spektrumundan hareketle derişimi $8,13 \times 10^{-5}$ M olarak hesaplanmıştır.

20,23 mg TMZ tartılmış ve 50 ml'lik balonjojeye aktararak deiyonize su ile hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin derişimi $2,08 \times 10^{-3}$ M'dır. Bu stok çözeltiden hareketle pH 4,5 asetat tamponu kullanılarak gerekli seyreltmeler yapılmış ve TMZ-DNA etkileşim çalışmalarında kullanılacak çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin son derişimleri $5,20 \times 10^{-5}$ M; $1,30 \times 10^{-4}$ M; $2,60 \times 10^{-4}$ M; $3,90 \times 10^{-4}$ M ve $5,20 \times 10^{-4}$ M'dır.

İlaç-DNA etkileşiminin inceleneceği YBSK analizleri için 2 farklı çözelti grubu oluşturulmuştur (Çizelge 3.1). Birinci çözelti grubunda $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA derişimi sabit tutularak üzerine 5 farklı derişimde TMZ çözeltisi eklenmiştir. İkinci çözelti grubunda ise $2,60 \times 10^{-4}$ M TMZ derişimi sabit tutularak üzerine 5 farklı derişimde DNA çözeltisi eklenmiştir. Kullanılan tüm çözeltiler üçer paralel olacak şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. İlaç-DNA etkileşiminin incelenmesinde kullanılacak çözelti grupları

	DNA derişimi	TMZ derişimi
Birinci grup	$1,02 \times 10^{-5} \text{ M}$	$5,2 \times 10^{-5} \text{ M}$
		$1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$
		$2,6 \times 10^{-4} \text{ M}$
		$3,9 \times 10^{-4} \text{ M}$
		$5,2 \times 10^{-4} \text{ M}$
İkinci grup	DNA derişimi	TMZ derişimi
	$2,03 \times 10^{-6} \text{ M}$	$2,60 \times 10^{-4} \text{ M}$
	$5,08 \times 10^{-6} \text{ M}$	
	$1,02 \times 10^{-5} \text{ M}$	
	$1,52 \times 10^{-5} \text{ M}$	
	$2,03 \times 10^{-5} \text{ M}$	

UV-GB çalışmalarında kullanılan çözeltiler: Kromatografik çalışmalarda anlatıldığı gibi $8,13 \times 10^{-5} \text{ M}$ DNA ve $2,08 \times 10^{-5} \text{ M}$ TMZ çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden hareketle pH 4,5 asetat tamponu kullanılarak gerekli seyreltmeler yapılmış ve etkileşim çalışmalarında kullanılacak çözeltiler hazırlanmıştır.

İlaç-DNA etkileşiminin belirlenmesi için spektrofotometrik titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için sabit derişimdeki ilaç çözeltisi üzerine belli hacimde DNA çözeltisi ilave edilmiştir. İlaç çözeltisinin tek başına ve her DNA çözeltisi ilavesinden sonra UV-GB spektrumları alınmıştır. Bu yöntemin uygulamasında, $8,32 \times 10^{-5} \text{ M}$ TMZ çözeltisi üzerine son derişimleri $1,66 \times 10^{-6} \text{ M}$; $3,32 \times 10^{-6} \text{ M}$; $4,98 \times 10^{-6} \text{ M}$; $6,64 \times 10^{-6} \text{ M}$ ve $8,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ olacak şekilde DNA çözeltisi ilave edilmiş ve spektrumlar kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlarda TMZ'nin 330 nm'deki absorbans değerindeki değişimler izlenmiştir.

MM-DNA etkileşiminin belirlenmesi için öncelikle son derişimi $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ olan MM çözeltisi üzerine $8,13 \times 10^{-5} \text{ M}$ DNA çözeltisinden artan hacimlerde (50 μl , 100 μl , 150 μl , 200 μl , 250 μl) eklenerek UV-GB spektrumları kaydedilmiştir.

Floresans çalışmalarında kullanılan çözeltiler: Metilen mavisi (MM) çözeltisinin hazırlanması için 8 mg MM tartılarak 25,0 ml'ye deiyonize su ile seyreltilmiştir. Elde edilen çözeltinin derişimi 10^{-3} M 'dir.

TMZ çözeltisi için 9,7 mg etken madde tartılarak 25 ml'ye deiyonize su ile seyreltilmiştir. Elde edilen çözeltinin derişimi $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ 'dir.

DNA çözeltisini hazırlamak için 40,12 mg DNA tartılarak 100 ml'lik balon jojeye aktarılmış ve deiyonize su ile hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan DNA çözeltisinin UV spektrumundan hareketle derişimi $8,13 \times 10^{-5}$ M olarak hesaplanmıştır.

İlaç-DNA etkileşiminin belirlenmesi için öncelikle son derişimi 5×10^{-6} M olan MM çözeltisi üzerine $8,13 \times 10^{-5}$ M DNA çözeltisinden artan hacimlerde (25 µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl) eklenerek floresans spektrumları alınmıştır. Daha sonra yeni hazırlanan 5×10^{-6} M MM ve $8,13 \times 10^{-5}$ M DNA çözeltisi karışımı üzerine 10^{-3} M TMZ çözeltisinden artan hacimlerde (50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl) ilave edilerek floresans ölçümleri yapılmıştır.

3.2.3. Miktar tayini çalışmaları için kullanılan çözeltiler

Validasyon çalışmaları için kullanılan TMZ çözeltileri: 20,04 mg TMZ tartılarak 100 ml'lik balon jojeye aktarılmış ve deiyonize su ile hacme tamamlanmıştır. Validasyon çalışmaları için kullanılan tüm çözeltiler; 200,4 µg/ml TMZ stok çözeltisinden pH 4,5 asetat tamponu ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin derişimleri 5,01; 10,02; 20,04; 25,05; 30,06; 50,10 ve 100,20 µg/ml'dir.

Farmasötik formdan miktar tayini çalışmaları için kullanılan çözeltiler: Miktar tayini çalışmaları için, TEMODAL® kapsül numunesinden 10 kapsül alınarak tartımı yapılmıştır. Daha sonra kapsül içindeki toz madde temiz bir behere boşaltılarak boş kapsüllerin tartımı alınmış ve dolu kapsül ile boş kapsül tartımları arasındaki fark hesaplanarak bir kapsül içerisindeki ilaç miktarı belirlenmiştir.

Homojen hale getirilen kapsül içeriğinden gerekli miktarda toz numune tartılarak 250 ml'lik balon jojeye aktarılmış ve pH 4,5 asetat tamponu ile hacme tamamlanmıştır. Miktar tayini çalışmaları için 5 paralel numune hazırlanmıştır.

Geri kazanım çalışmaları için kullanılan çözeltiler: Geri kazanım çalışmaları için daha önceden miktar tayini yapılmış kapsül numunesi çözeltisi üzerine bilinen miktarda standart TMZ çözeltisi (%50- %100- %150) eklenmiştir. Çözeltiler üç paralel olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon doğrusu yardımı ile geri kazanım sonuçları hesaplanmıştır.

3.3. TMZ-DNA Etkileşimi ve TMZ Miktar Tayini İçin Kullanılan YBSK Yöntemi

Bu çalışmada yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK) yöntemi ile kanser tedavisinde kullanılan TMZ etken maddesinin farmasötik formundan miktar tayini yapılmış ve DNA ile etkileşimi kromatografik olarak belirlenmiştir.

İlk aşamada TMZ-DNA etkileşimini belirleyebilmek için ayırma koşulları optimize edilmiştir. Bunun için sabit faz, hareketli faz, sıcaklık, dalga boyu, akış hızı ve inkübasyon süresi parametreleri incelenmiştir.

Etkileşim çalışması için ayrı ayrı hazırlanan DNA ve TMZ çözeltileri YBSK sistemine enjekte edilmiştir. Her iki molekül için de alıkonma süreleri ve alan değerleri belirlenmiştir. Daha sonra, belirlenen konsantrasyonlarda DNA ve TMZ çözeltileri karışım halinde sisteme enjekte edilmiş ve her iki moleküle ait alıkonma süreleri ve alan değerleri belirlenmiştir. Her molekülün ayrı ayrı YBSK sistemine enjekte edilmesiyle alınan kromatogramlara ait alan değerleri ile karışımdan elde edilen alan değerleri karşılaştırılmıştır.

TMZ'nin farmasötik formundan miktar tayini ise valide edilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. YBSK sistem optimizasyonu

Hareketli faz: Hareketli faz bileşimi belirlenirken analizi yapılacak olan moleküllerin kimyasal özelliklerine bağlı olarak hareketli faz bileşenleri denenmiş ve 0,02 M pH 4,5 asetat tamponu-asetonitril (90:10, h/h) karışımı kullanılmıştır.

Sabit faz: Sabit faz seçimi için C8 ve C18 olmak üzere iki farklı kolonla deneme yapılmıştır. En uygun sonuçlar ACE C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm) kolonu ile elde edilmiştir.

Sıcaklık ve akış hızı: TMZ ve DNA için yapılan çalışmalarda 15 °C ve 40 °C arasındaki sıcaklık değerleri 5 °C lik artışlarla taranmıştır ve analizlerin 30 °C'de çalışılması uygun bulunmuştur.

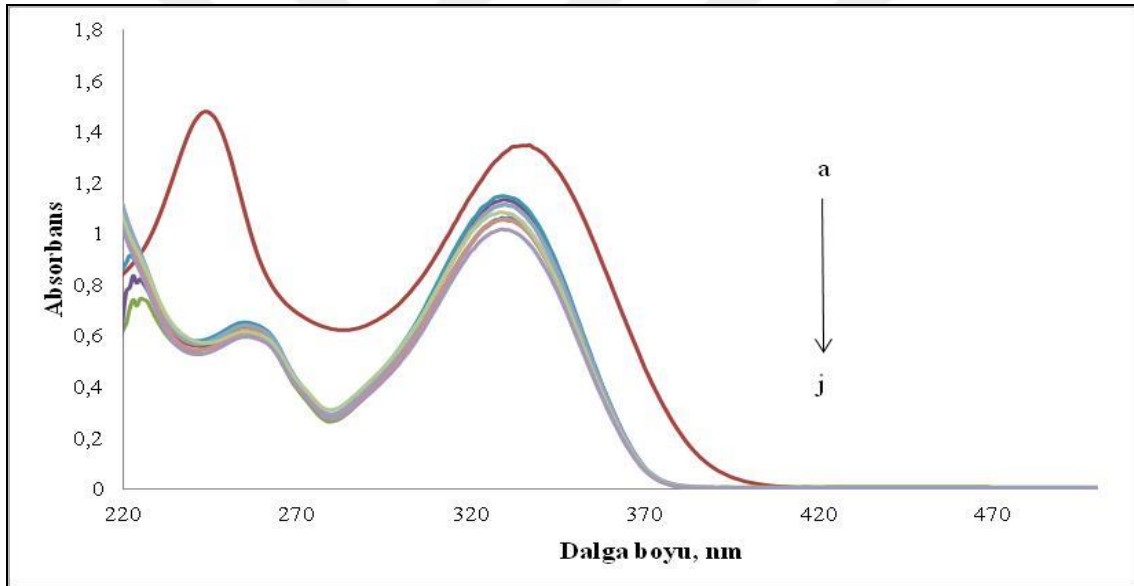
Akış hızı 0,8 ml/dk; 1 ml/dk ve 1,3 ml/dk olarak denenmiş ve 0,8 ml/dk olarak belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1. pH Taraması Çalışmaları

Kullanılacak hareketli fazın pH değerinin belirlenmesi için 0,1 M HCl, 0,1 M NaOH, asetat tamponu (pH 3,5-5,5), fosfat tamponu (pH 6,0-8,0), pH 9,0 borat tamponu ve deiyonize su ile pH taramaları (Şekil 4.1) yapılmıştır. Şekil 4.1 de gösterilen spektrumlarda en yüksek absorbans değeri asetat tamponu kullanıldığında elde edilmiştir. Bunun yanı sıra literatür bilgilerinde TMZ'nin pH<5 olduğu ortamda stabil olduğu bildirilmektedir. Ayrıca DNA'nın en stabil olduğu çözeltinin de pH 4,5 asetat tamponu olmasından dolayı kromatografik çalışmalarda bu tampon sistemi kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Hareketli fazın belirlenmesi için yapılan pH taraması verilerine ait spektrum; 0,1 M NaOH (a), pH 4,5 asetat (b), pH 5,5 asetat (c), pH 3,5 asetat (d), pH 6,0 fosfat (e), pH 7,0 fosfat (f), pH 8,0 fosfat (h), pH 9,0 borat (g), 0,1 M HCl (i) ve deiyonize su (j)

4.2. YBSK Optimizasyon Çalışmaları

Hem literatür araştırmalarıyla hem de yapılan analizlerle, TMZ ve DNA analizi için en uygun hareketli fazın 0,02 M pH 4,5 asetat tamponu olduğu belirlenmiştir. Organik faz olarak metanol ve asetonitril ile denemeler yapılmıştır. Hareketli fazda metanol kullanıldığı zaman DNA ve TMZ piklerinde yarımlama gözlenmiştir. Ayrıca kuyruklanma faktörünün her iki molekül için de 2'den büyük olduğu ($T_{DNA}=3,43$ ve $T_{TMZ}=2,86$) gözlenmiştir. Metanol yerine

asetonitril denendiğinde ise uygun pik simetrisine (DNA için 0,97 ve TMZ için 1,02) ve ayırma ($R_s=4,48$) sahip pikler elde edilmiştir. Organik faz oranının optimizasyonu için %10, %20 ve %30 asetonitril oranları denenmiştir. Organik faz oranı %10'un üzerine çıkarıldığında alıkonma süresi, DNA ve TMZ piklerinde ayırmanın yeterli olamayacağı kadar kısalmış (alıkonma süreleri DNA ve TMZ için sırasıyla 0,72 ve 0,93) ve piklerde kuyruklanma ($T_{DNA}=3,2$ ve $T_{TMZ}=2,9$) gözlenmiştir. Asetonitril oranı %10 olduğunda ise ayırmanın iyileştiği ($R_s=4,59$) ve pik simetrilerinin (DNA için 0,98 ve TMZ için 1,06) düzeldiği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda hareketli faz olarak 0,02 M pH 4,5 asetat tamponu ve asetonitril (90:10, h/h) ile çalışılması uygun görülmüştür.

Sabit faz seçimi için sıcaklık, akış hızı ve dalga boyu parametreleri sabit tutularak, optimize edilen hareketli faz ile literatür çalışmalarına dayanarak C8 ve C18 olmak üzere iki farklı kolonla deneme yapılmıştır. C8 kolonla yapılan çalışmalarda uygun ayırım elde edilememiştir ($R_s=1,16$). En uygun sonuçlar ACE C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm) kolonu ($R_s=4,96$; DNA ve TMZ için simetri değerleri sırasıyla 0,98 ve 1,03) ile sağlanmıştır.

Sıcaklığın etkisini incelemek için 15 °C ve 40 °C arasındaki sıcaklık değerleri taranmıştır. Sıcaklığın hem ayırımı hem de pik simetrilerini büyük oranda etkilediği gözlenmiştir. 25 °C'nin altında yapılan analizlerde ayırmanın ($R_s=1,11$) yeterli olmadığı ve pik simetrilerinin bozulduğu (DNA ve TMZ için simetri değerleri sırasıyla 1,85 ve 1,63), 35 °C'nin üzerinde yapılan çalışmalarda ise DNA pikinin yarıldığı ve ayırmanın ($R_s=1,32$) kötüleştiği görülmüştür. 30 °C'de yapılan analizlerde ise $R_s=4,97$ ve pik simetrileri DNA ve TMZ için sırasıyla 0,97 ve 1,04 olarak belirlenmiştir. Uygun değerlerin elde edilmesi nedeniyle çalışma sıcaklığı olarak 30 °C seçilmiştir.

Akış hızının rezolüsyonu çok fazla etkilemediği ancak alıkonma süresini büyük ölçüde değiştirdiği gözlenmiştir. Akış hızı olarak 0,8 ml/dk; 1 ml/dk ve 1,3 ml/dk denenmiş ve optimum sonuçlar 0,8 ml/dk'da elde edilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen parametreler Çizelge 4.1 'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. YBSK analizinde kullanılan kromatografik şartlar

Cihaz	Agilent 1260 YBSK-(DAD)
Kolon	C18 150 x 4,6 mm, 5 µm (ACE)
Dalga Boyu	260 nm
Akış Hızı	0,8 ml/dakika
Enjeksiyon Hacmi	30 µl
Kolon Sıcaklığı	30°C
Hareketli Faz	0,02 M pH 4.5 asetat tamponu-Asetonitril (90:10, h/h)
	DNA ≈ 1,1 dk
Alıkonma Zamanı (RT)	Bilinmeyen ≈ 2,3 dk
	TMZ ≈ 3,5 dk

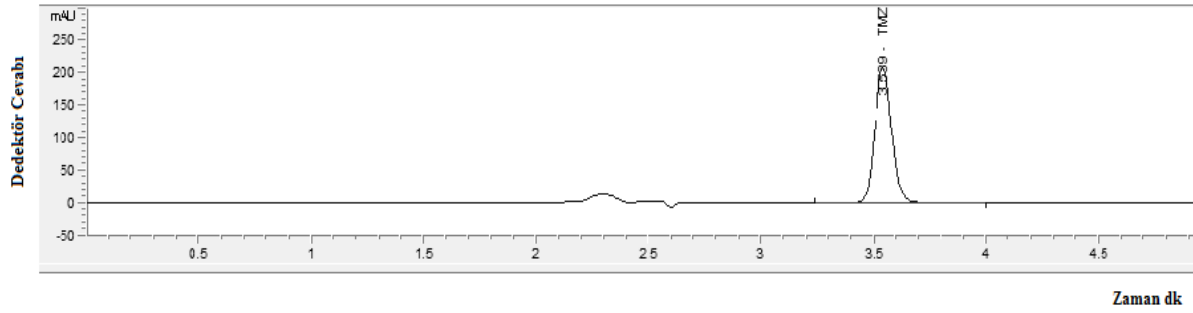
4.3. Sistem Uygunluk Parametreleri

Sistem uygunluk testleri, geliştirilen kromatografik yöntemin yeterli doğruluk ve kesinlikte olup olmadığını belirlemek ve analize ne ölçüde uygun olduğunu kanıtlamak için yapılmıştır.

Sistem uygunluk testleri, enjeksiyon kesinliği, kapasite faktörü, ayırıcılık, asimetri faktörü ve teorik plaka sayısı parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Sistem uygunluğu çalışmalarında elde edilen alan ve standart sapma değerleri (Çizelge 4.2) ve 20,04 µg/ml TMZ kullanılarak hazırlanan sistem uygunluğu çözeltisine ait örnek kromatogram (Şekil 4.2) aşağıda verilmektedir.

Çizelge 4.2. Sistem uygunluğu çalışmalarında elde edilen alan ve standart sapma değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Alan-1	Alan-2	X _{ort}	SS	%BSS
20,04	1083,3	1084,3	1083,8	0,71	0,07
20,04	1086,1	1085,7	1085,9	0,28	0,03
20,04	1085,6	1083,3	1084,5	1,63	0,15
20,04	1087,1	1086,1	1086,6	0,71	0,07
20,04	1085,2	1085,6	1085,4	0,28	0,03
20,04	1084,9	1083,7	1084,3	0,85	0,08
20,04	1085,1	1085,7	1085,4	0,42	0,04
20,04	1085,9	1085,0	1085,5	0,64	0,06
20,04	1086,3	1085,8	1086,1	0,35	0,03
20,04	1084,7	1084,9	1084,8	0,14	0,01



Şekil 4.2. 20,04 µg/ml TMZ ile hazırlanan sistem uygunluğu çözeltisine ait kromatogram

Sistem uygunluk testleri için aynı çözeltinin on tekrarlı enjeksiyonu sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır (Çizelge 4.3).

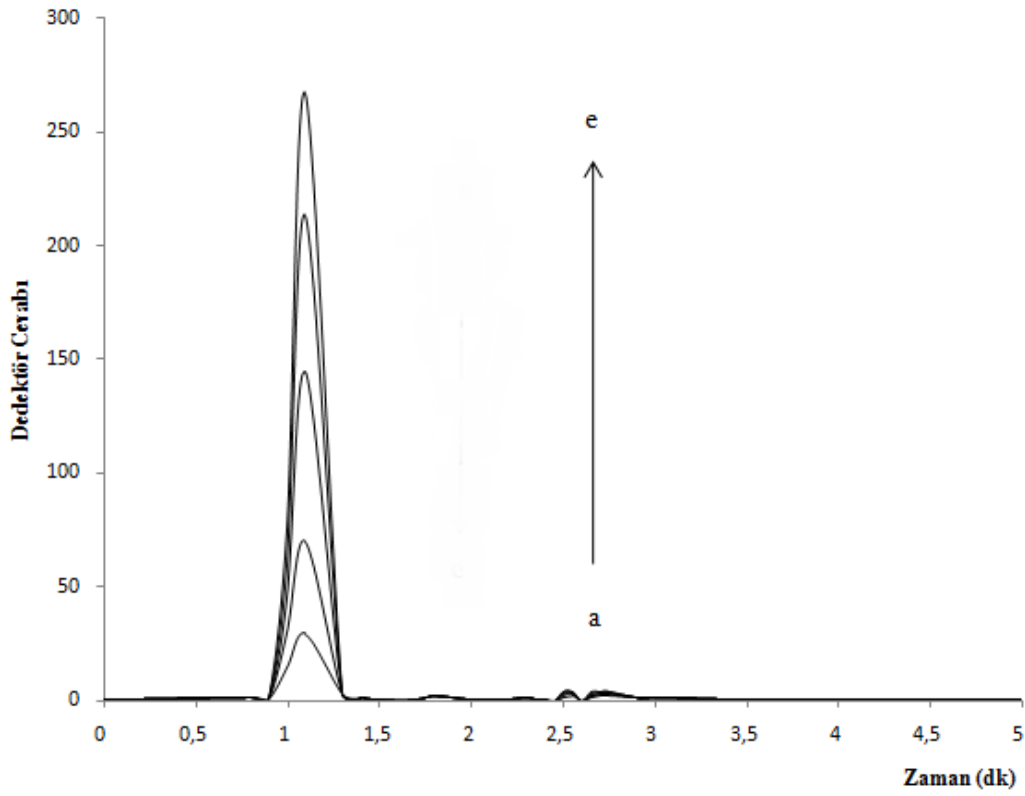
Çizelge 4.3. Sistem uygunluğu analizleri sonucunda elde edilen parametrelerin değerlendirilmesi

SUT Parametresi	Hesaplanan Değerler
Teorik Plaka Sayısı (N)	7964
Kapasite Faktörü (k')	1,393
Kuyruklanma Faktörü (T)	1,055
Rezölüsyon (R _s)	5,05
Pik asimetrisi	0,99
Enjeksiyon Kesinliği (BSS)	0,08
Ölü Hacim (t ₀)	0,65

4.4. İlaç-DNA Etkileşim Çalışmaları

4.4.1. Kromatografik çalışmalar

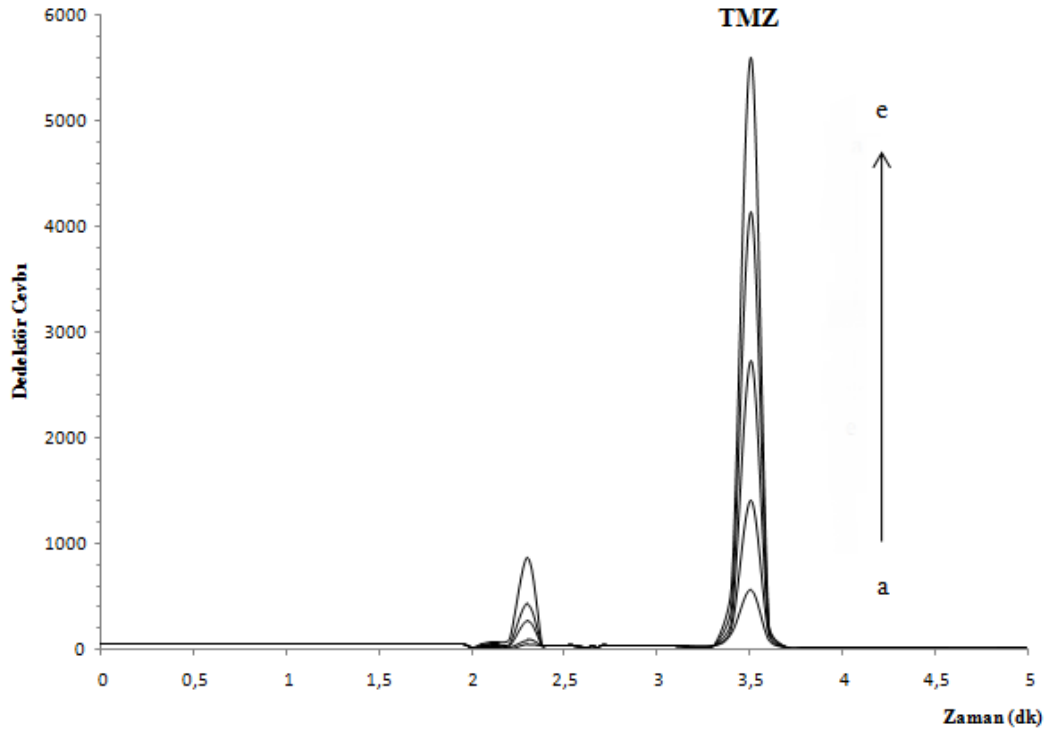
İlaç-DNA etkileşiminin kromatografik olarak belirlenmesi için yapılan çalışmalarda ilk aşamada, beş farklı konsantrasyonda hazırlanan DNA ve TMZ çözeltileri YBSK sistemine enjekte edilmiştir (Şekil 4.3; 4.4 ve 4.5). Hazırlanan çözeltilerin konsantrasyon ve alan değerleri Çizelge 4.4; 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.3. DNA çözeltilerine ait kromatogramlar; $2,03 \times 10^{-6}$ M (a); $5,08 \times 10^{-6}$ M (b); $1,02 \times 10^{-5}$ M (c); $1,52 \times 10^{-5}$ M (d); $2,03 \times 10^{-5}$ M (e)

Çizelge 4.4. DNA çözeltilerine ait alan değerleri

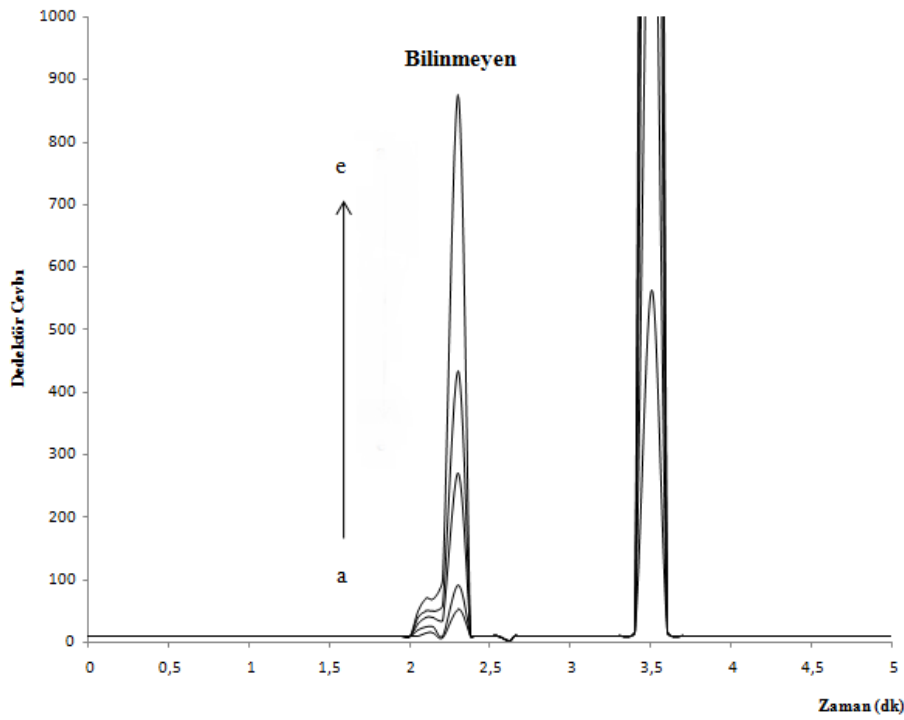
Molarite (M)	Alan DNA- 1	Alan DNA- 2	Alan DNA- 3	X_{ort}	SS	BSS (%)
$2,03 \times 10^{-6}$	29,3	31,3	30,6	30,4	1,01	3,34
$5,08 \times 10^{-6}$	69,8	64,3	66,3	66,8	2,78	4,17
$1,02 \times 10^{-5}$	144,4	135,9	144,6	141,6	4,97	3,51
$1,52 \times 10^{-5}$	213,1	220,9	219,5	217,8	4,16	1,91
$2,03 \times 10^{-5}$	266,8	271,7	263,8	267,4	3,99	1,49



Şekil 4.4. TMZ çözeltilerine ait kromatogramlar $5,2 \times 10^{-5}$ M (a); $1,3 \times 10^{-4}$ M (b); $2,6 \times 10^{-4}$ M (c); $3,9 \times 10^{-4}$ M (d); $5,2 \times 10^{-4}$ M (e)

Çizelge 4.5. TMZ çözeltilerine ait alan değerleri

Molarite (M)	Alan TMZ- 1	Alan TMZ- 2	Alan TMZ- 3	X_{ort}	SS	BSS (%)
$5,2 \times 10^{-5}$	584,5	554,2	544,9	561,2	20,71	3,69
$1,3 \times 10^{-4}$	1412,0	1430,5	1400,5	1414,3	15,14	1,07
$2,6 \times 10^{-4}$	2730,1	2734,8	2713,8	2726,2	11,02	0,40
$3,9 \times 10^{-4}$	4116,4	4149,0	4129,9	4131,8	16,38	0,41
$5,2 \times 10^{-4}$	5572,6	5549,1	5676,1	5599,3	67,57	1,21



Şekil 4.5. TMZ bilinmeyenine ait kromatogramlar $5,2 \times 10^{-5}$ M (a); $1,3 \times 10^{-4}$ M (b); $2,6 \times 10^{-4}$ M (c); $3,9 \times 10^{-4}$ M (d); $5,2 \times 10^{-4}$ M (e)

Çizelge 4.6. TMZ çözeltilerindeki bilinmeyen pikine ait alan değerleri

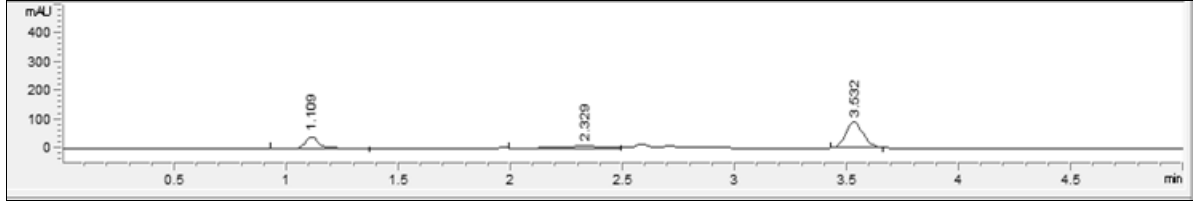
Molarite (M)	Alan Bilinmeyen- 1	Alan Bilinmeyen- 2	Alan Bilinmeyen- 3	X_{ort}	SS	BSS (%)
$5,2 \times 10^{-5}$	46,7	55,1	56,3	52,7	5,23	9,93
$1,3 \times 10^{-4}$	90,7	90,9	94,6	92,1	2,20	2,39
$2,6 \times 10^{-4}$	271,9	266,2	270,0	269,4	2,91	1,08
$3,9 \times 10^{-4}$	432,4	422,6	442,4	432,5	9,92	2,29
$5,2 \times 10^{-4}$	899,1	878,3	843,5	873,6	28,08	3,22

İlaç-DNA etkileşiminin kromatografik olarak belirlenmesi için yapılan çalışmalarda ikinci aşamada ise, ilk aşamada hazırlanan DNA ve TMZ çözeltileri ile iki farklı çözelti grubu hazırlanmıştır.

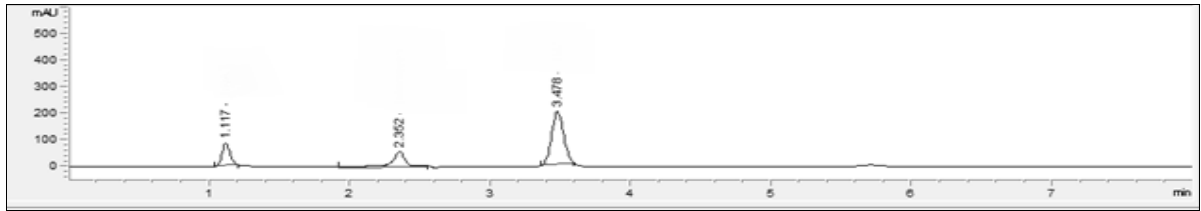
İlk çözelti grubunda; $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA çözeltisi üzerine, artan derişimlerde TMZ çözeltisi eklenmiştir. İkinci çözelti grubunda ise; $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ çözeltisi üzerine, artan derişimlerde DNA çözeltisi eklenmiştir.

Her bir çözelti grubundaki karışımlardan üçer paralel hazırlanmıştır. Bu iki çözelti grubuna (Bkz. Çizelge 3.1) ait süre optimizasyonu çalışmaları için etkileşimin 1, 2, 3 ve 6. saat

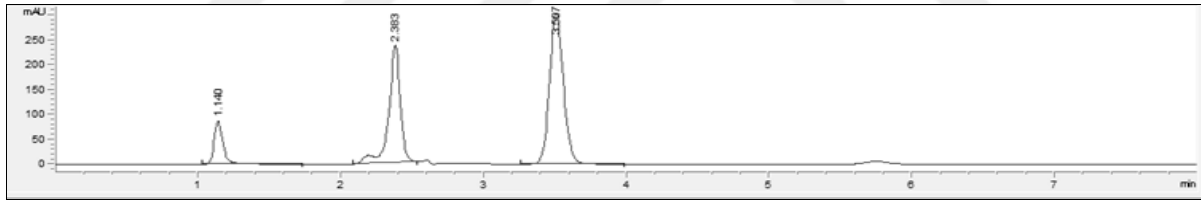
sonundaki kromatogramları (Şekil 4.6 – 4.15) incelenmiş ve DNA, bilinmeyen pik ve TMZ için alıkonma süreleri sırasıyla 1,1; 2,3 ve 3,4 dakika olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara ait çizelgeler Çizelge 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10’da verilmiştir.



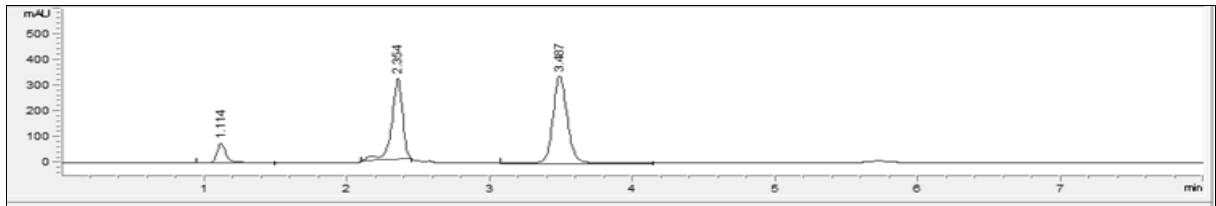
Şekil 4.6. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $5,2 \times 10^{-5}$ M TMZ karışımına ait kromatogram



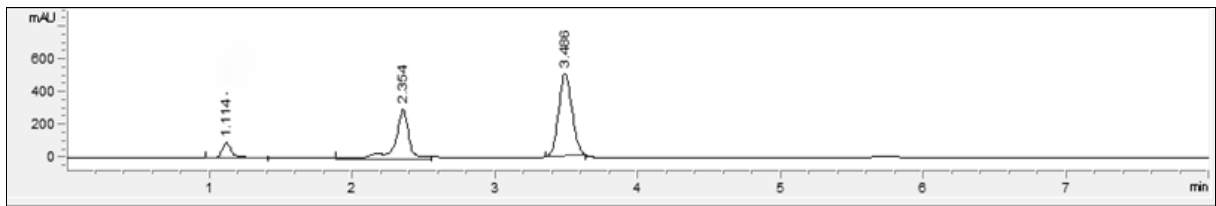
Şekil 4.7. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $1,3 \times 10^{-4}$ M TMZ karışımına ait kromatogram



Şekil 4.8. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ karışımına ait kromatogram



Şekil 4.9. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $3,9 \times 10^{-4}$ M TMZ karışımına ait kromatogram



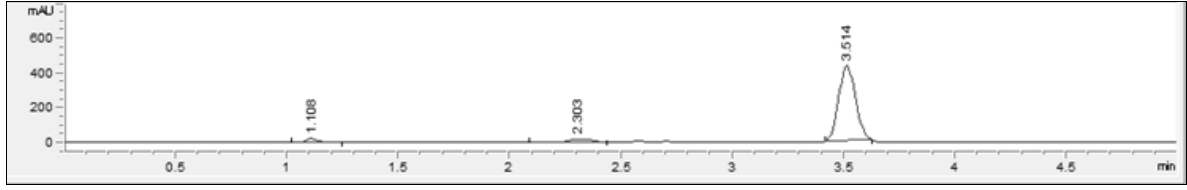
Şekil 4.10. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve $5,2 \times 10^{-4}$ M TMZ karışımına ait kromatogram

Çizelge 4.7. $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve artan derişimde TMZ çözeltilerinin alan değerleri

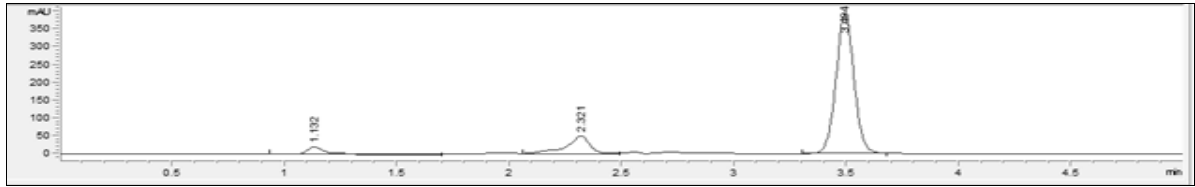
	$1,02 \times 10^{-5}$ M DNA Alanı (Xort)	TMZ (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	TMZ Alanı (Xort)
Etkileşimden önce	141,6	$5,2 \times 10^{-5}$	52,7	561,2
		$1,3 \times 10^{-4}$	92,1	1414,3
		$2,6 \times 10^{-4}$	269,4	2726,2
		$3,9 \times 10^{-4}$	432,5	4131,8
		$5,2 \times 10^{-4}$	873,6	5599,3
	$1,02 \times 10^{-5}$ M DNA Alanı (Xort)	TMZ (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	TMZ Alanı (Xort)
Etkileşim 1.saat	141,6	$5,2 \times 10^{-5}$	68,3	533,14
		$1,3 \times 10^{-4}$	118,4	1325,8
		$2,6 \times 10^{-4}$	274,7	2701,8
		$3,9 \times 10^{-4}$	414,6	3992,2
		$5,2 \times 10^{-4}$	839,0	5437,6
	$1,02 \times 10^{-5}$ M DNA Alanı (Xort)	TMZ (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	TMZ Alanı (Xort)
Etkileşim 2.saat	141,6	$5,2 \times 10^{-5}$	76,5	504,8
		$1,3 \times 10^{-4}$	130,9	1290,8
		$2,6 \times 10^{-4}$	307,2	2636,9
		$3,9 \times 10^{-4}$	430,8	3896,0
		$5,2 \times 10^{-4}$	894,6	5324,4
	$1,02 \times 10^{-5}$ M DNA Alanı (Xort)	TMZ (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	TMZ Alanı (Xort)
Etkileşim 3.saat	141,6	$5,2 \times 10^{-5}$	87,9	496,3
		$1,3 \times 10^{-4}$	138,0	1217,8
		$2,6 \times 10^{-4}$	292,3	2450,3
		$3,9 \times 10^{-4}$	464,9	3590,5
		$5,2 \times 10^{-4}$	656,1	4957,6
	$1,02 \times 10^{-5}$ M DNA Alanı (Xort)	TMZ Molarite (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	TMZ Alanı (Xort)
Etkileşim 6.saat	141,6	$5,2 \times 10^{-5}$	209,4	484,7
		$1,3 \times 10^{-4}$	543,7	1176,1
		$2,6 \times 10^{-4}$	1319,1	2053,8
		$3,9 \times 10^{-4}$	1673,4	2735,4
		$5,2 \times 10^{-4}$	2275,1	3272,4

Çizelge 4.8 $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA ve artan derişimde TMZ çözeltilerinin 6. saat sonunda elde edilen alan değışimleri

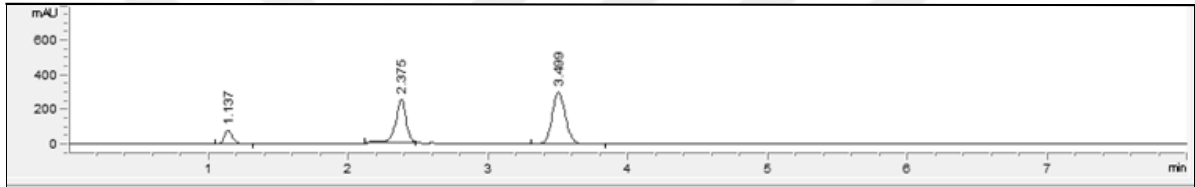
$1,02 \times 10^{-5}$ M DNA Alanı (Xort)	TMZ (M)	DNA Alan Değişimi	Bilinmeyen Alan Değişimi	TMZ Alan Değişimi
141,6	$5,2 \times 10^{-5}$	156,0	156,7	-76,5
	$1,3 \times 10^{-4}$	189,2	451,6	-238,2
	$2,6 \times 10^{-4}$	233,3	1049,7	-672,4
	$3,9 \times 10^{-4}$	305,3	1240,9	-1396,4
	$5,2 \times 10^{-4}$	393,9	1401,5	-2326,9



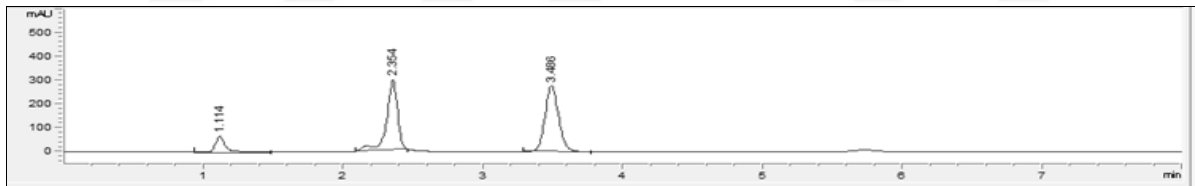
Şekil 4.11. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $2,3 \times 10^{-6}$ M DNA karışımına ait kromatogram



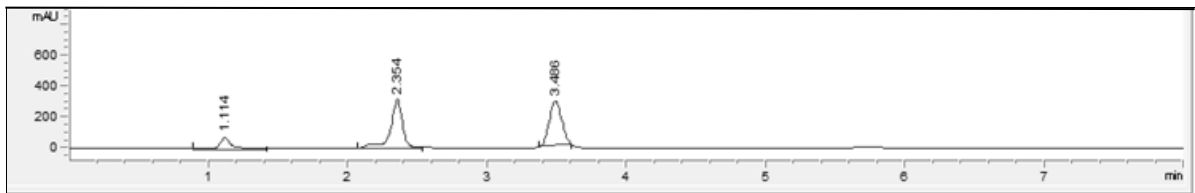
Şekil 4.12. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $5,08 \times 10^{-6}$ M DNA karışımına ait kromatogram



Şekil 4.13. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA karışımına ait kromatogram



Şekil 4.14. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $1,52 \times 10^{-5}$ M DNA karışımına ait kromatogram



Şekil 4.15. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve $2,03 \times 10^{-5}$ M DNA karışımına ait kromatogram

Çizelge 4.9. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve artan derişimlerde DNA çözeltilerinin alan değeri

Etkileşimden önce	$2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ Alanı (Xort)	DNA (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	DNA Alanı (Xort)
		$2,03 \times 10^{-6}$	52,7	30,4
		$5,08 \times 10^{-6}$	92,1	66,8
	2726,2	$1,02 \times 10^{-5}$	269,4	141,6
		$1,52 \times 10^{-5}$	432,5	217,8
		$2,03 \times 10^{-5}$	873,6	267,4
Etkileşim 1.saat	$2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ Alanı (Xort)	DNA (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	DNA Alanı (Xort)
	2653,9	$2,03 \times 10^{-6}$	156,2	40,2
	2710,9	$5,08 \times 10^{-6}$	281,3	86,7
	2701,8	$1,02 \times 10^{-5}$	274,7	164,2
	2627,3	$1,52 \times 10^{-5}$	295,9	343,3
	2527,8	$2,03 \times 10^{-5}$	983,5	456,9
Etkileşim 2.saat	$2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ Alanı (Xort)	DNA (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	DNA Alanı (Xort)
	2486	$2,03 \times 10^{-6}$	183,9	45,3
	2654	$5,08 \times 10^{-6}$	271,5	96,3
	2636,9	$1,02 \times 10^{-5}$	307,2	174,9
	2540	$1,52 \times 10^{-5}$	307,8	389,6
	2443,5	$2,03 \times 10^{-5}$	1167,0	534,0
Etkileşim 3.saat	$2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ Alanı (Xort)	DNA (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	DNA Alanı (Xort)
	2413,7	$2,03 \times 10^{-6}$	197,6	58,8
	2488,1	$5,08 \times 10^{-6}$	280,3	124,7
	2450,3	$1,02 \times 10^{-5}$	292,3	217,6
	2357,3	$1,52 \times 10^{-5}$	339,3	459,0
	2267,1	$2,03 \times 10^{-5}$	1668,9	636,0
Etkileşim 6.saat	$2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ Alanı (Xort)	DNA (M)	Bilinmeyen Alanı (Xort)	DNA Alanı (Xort)
	2322	$2,03 \times 10^{-6}$	216,1	117,0
	2185,3	$5,08 \times 10^{-6}$	418,3	259,9
	2053,8	$1,02 \times 10^{-5}$	1332,6	374,9
	1921,4	$1,52 \times 10^{-5}$	1634,7	539,8
	1844,1	$2,03 \times 10^{-5}$	2114,6	749,9

Çizelge 4.10. $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ ve artan derişimde DNA çözeltilerinin 6. saat sonunda elde edilen alan değeri

$2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ Alanı (Xort)	DNA (M)	DNA Alan Değişimi	Bilinmeyen Alan Değişimi	TMZ Alan Değişimi
	$2,03 \times 10^{-6}$	86,6	163,4	-404,2
	$5,08 \times 10^{-6}$	193,1	326,2	-540,9
2726,2	$1,02 \times 10^{-5}$	233,3	1049,7	-672,4
	$1,52 \times 10^{-5}$	322,0	1202,2	-804,8
	$2,03 \times 10^{-5}$	482,5	1241,0	-882,1

TMZ-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için kromatografik yöntem ile elde edilen veriler, Çizelge 4.11’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.11. TMZ-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için kromatografik yöntem ile elde edilen veriler

2,6x10 ⁻⁴ M TMZ Alanı (A ₀)	Artan DNAderişiminde TMZ Alanı (A)	C _{DNA} , M
2726,2	2322,0	2,08 x 10 ⁻⁵
	2185,3	5,19 x 10 ⁻⁵
	2033,9	1,04 x 10 ⁻⁴
	1921,4	1,56 x 10 ⁻⁴
	1844,1	2,08 x 10 ⁻⁴

Absorbans spektroskopisinde bağlanma katsayısını hesaplanması için kullanılan Benesi-Hildebrand eşitliğinden (Eşitlik 2.1) kromatografik deneylerde de TMZ-DNA arasındaki bağlanma katsayısının hesaplanması için yararlanılmıştır. Denklemden A ile gösterilen absorbans değerleri kromatografik deneylerde alan değerleri olarak kullanılmıştır.

$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\epsilon}{\epsilon - \epsilon_0} + \frac{\epsilon}{\epsilon - \epsilon_0} \times \frac{1}{K [DNA]}$$

Eşitlikte;

A₀: TMZ'nin tek başına alan değeri

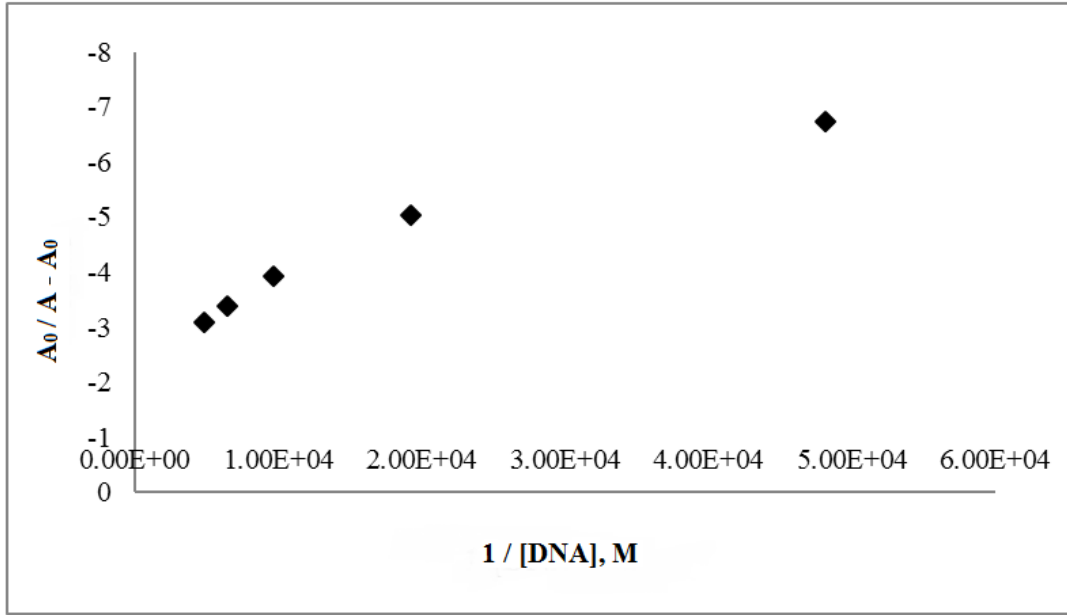
A: TMZ'nin DNA ilavesi ile elde edilen alan değeri

ε₀: TMZ'nin 260 nm'deki tek başına absorptivite değeri

ε: TMZ'nin DNA ilavesi ile 260 nm'deki absorptivite değeri

K: Bağlanma katsayısı

Bu eşitlikten hareketle 1/[DNA] - A₀/(A-A₀) grafiği oluşturulmuş (Şekil 4.16) ve doğru denklemi y= -8,1×10⁻⁵ x - 3,08 (r²= 0,9964) olarak bulunmuştur. Elde edilen denklemden hareketle kromatografi çalışmaları için bağlanma katsayısı K= 3,7×10⁴ M⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

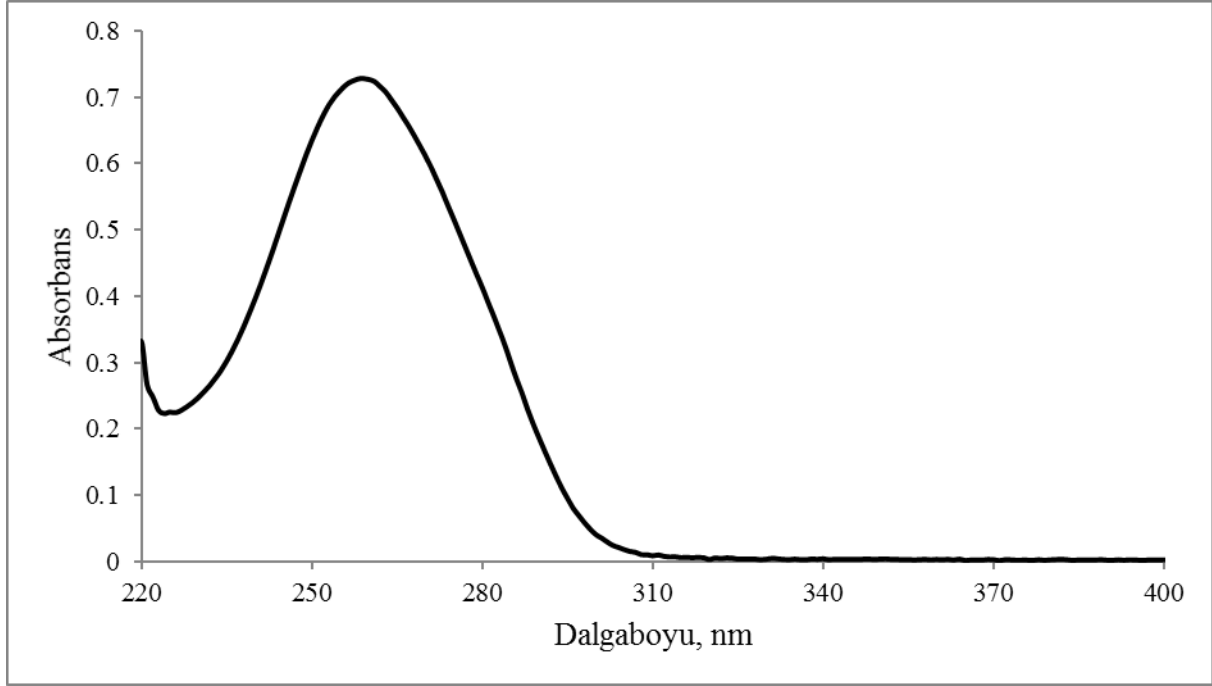


Şekil 4.16. TMZ-DNA için kromatografi çalışmaları bağlanma katsayısının hesaplanması için kullanılan grafik

4.4.2. Spektroskopik çalışmalar

UV-GB çalışmaları: UV-GB absorpsiyon spektroskopi yöntemi DNA stabilitesinin ve küçük moleküllerle etkileşiminin belirlenmesinde yaygın kullanım alanına sahiptir.

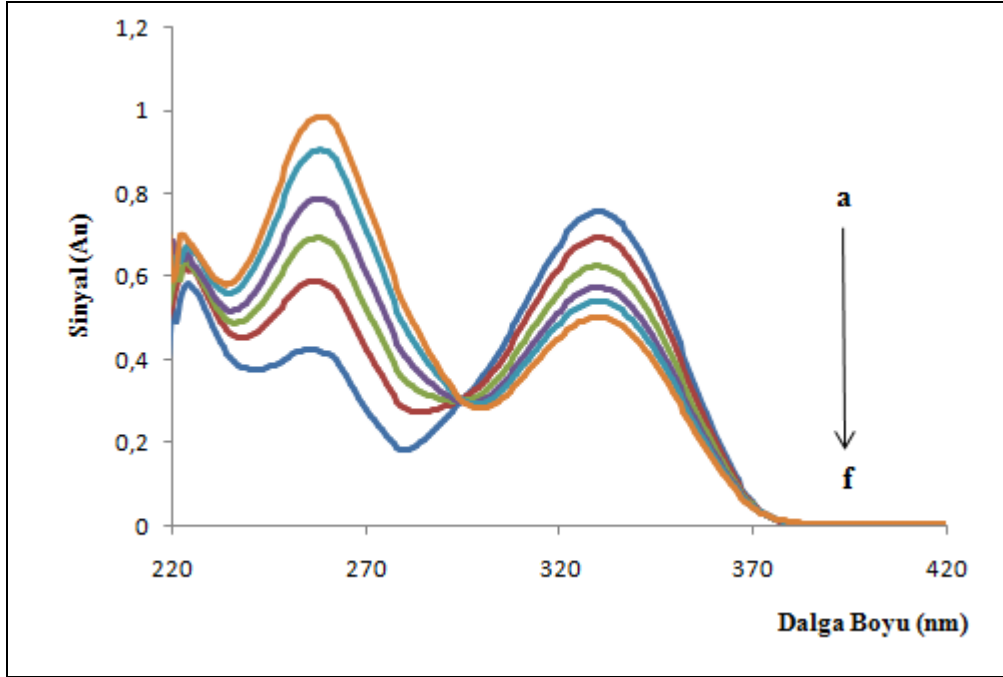
DNA'nın UV-GB spektrumu Şekil 4.17'de görüldüğü gibi 200-350 nm arasında geniş bir bant spektrumuna sahiptir ve 260 nm'de pürin ve pirimidin bazlarında yer alan kromofor gruplar nedeni maksimum absorpsiyon değeri gösterir. DNA'nın bu dalga boyundaki molar absorptivite değeri $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'dir. Belirtilen dalga boyundaki absorbans değerinden hareketle Beer-Lambert yasasından yararlanılarak DNA çözeltisinin derişim değeri $8,13 \times 10^{-5} \text{ M}$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri oranının 1,8-1,9 arasında olması DNA'nın saflığı hakkında bilgi vermektedir. Hazırlanan çözeltinin absorpsiyon spektrumundan hareketle bu oran değeri 1,82 olarak hesaplanmış ve deneysel olarak kullanım için uygun görülmüştür.



Şekil 4.17. DNA spektrumu

TMZ-DNA etkileşiminin belirlenmesi için spektrofotometrik titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için sabit derişimdeki ilaç çözeltisi üzerine belli hacimlerde DNA çözeltisi ilave edilmiştir. İlaç çözeltisinin tek başına ve her DNA çözeltisi ilavesinden sonra UV-GB spektrumları alınmıştır. Bu yöntemin uygulamasında, $8,32 \times 10^{-5}$ M TMZ çözeltisi üzerine son derişimleri $1,66 \times 10^{-6}$ M; $3,32 \times 10^{-6}$ M; $4,98 \times 10^{-6}$ M; $6,64 \times 10^{-6}$ M ve $8,3 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde DNA çözeltisi ilave edilmiş ve spektrumlar kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlarda TMZ'nin, 255 nm'deki absorbans spektrumuna DNA'nın girişim yapmasından dolayı sadece 330 nm'deki absorbans değerindeki derişimler izlenmiştir.

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi TMZ 255 ve 330 nm'de iki maksimum dalga boyuna sahiptir. DNA ilavesi ile 330 nm'deki absorbans değerinde azalma gözlenmiştir. Bu çalışmaya ek olarak DNA çözeltisinin ilavesi ile oluşabilecek seyrelmenin etkisini incelemek için aynı derişimde TMZ çözeltisi sadece tampon çözelti ile titre edilmiştir. Elde edilen spektrumlardan hareketle TMZ'ye ait pik değerlerindeki azalmanın seyrelmeden değil DNA ile etkileşiminden kaynaklı olduğu görülmüştür. TMZ-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için UV-GB spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler, Çizelge 4.12'de gösterilmektedir.



Şekil 4.18. $8,32 \times 10^{-5}$ M TMZ çözeltisi (a) üzerine $1,66 \times 10^{-6}$ M (b), $3,32 \times 10^{-6}$ M (c), $4,98 \times 10^{-6}$ M (d), $6,64 \times 10^{-6}$ M (e) ve $8,3 \times 10^{-6}$ M (f) DNA ilavesi ile elde edilen spektrum

Çizelge 4.12. TMZ-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için UV-GB spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler

A_0	A	C_{DNA}, M
0,7558	0,6931	$1,66 \times 10^{-6}$
	0,6256	$3,32 \times 10^{-6}$
	0,5726	$4,98 \times 10^{-6}$
	0,5416	$6,64 \times 10^{-6}$
	0,502	$8,30 \times 10^{-6}$

Eşitlik 2.1’de gösterilen Benesi-Hildebrand eşitliği TMZ-DNA arasındaki bağlanma katsayısının hesaplanması için kullanılmıştır.

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon}{\varepsilon - \varepsilon_0} + \frac{\varepsilon}{\varepsilon - \varepsilon_0} \times \frac{1}{K [DNA]}$$

Eşitlikte;

A_0 : TMZ’nin 330 nm’deki tek başına absorbans değeri

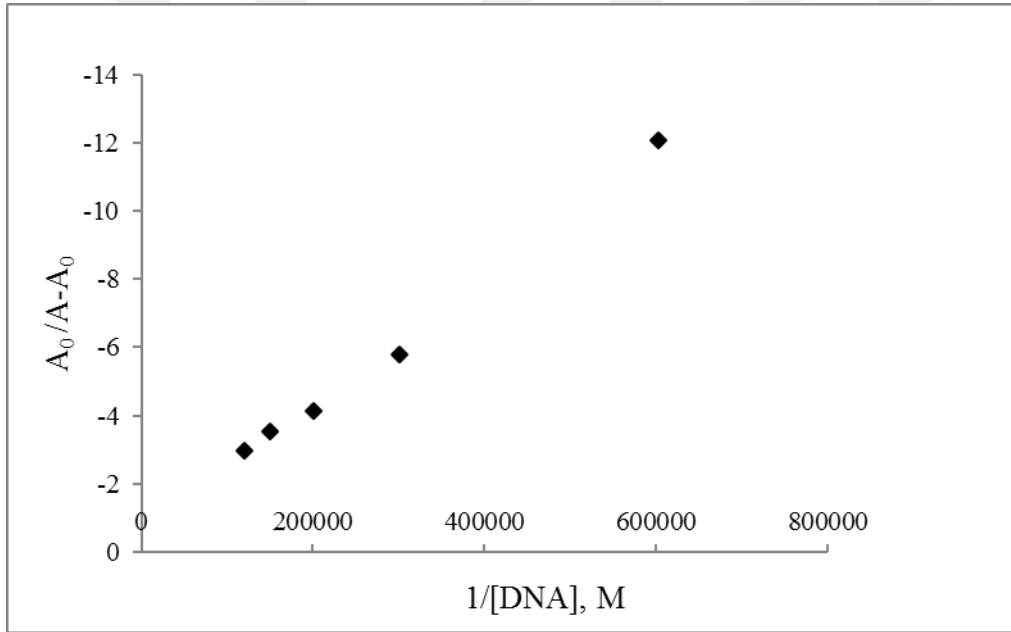
A: TMZ’nin DNA ilavesi ile 330 nm’deki absorbans değeri

ϵ_0 : TMZ'nin 330 nm'deki tek başına absorptivite değeri

ϵ : TMZ'nin DNA ilavesi ile 330 nm'deki absorptivite değeri

K: Bağlanma katsayısı

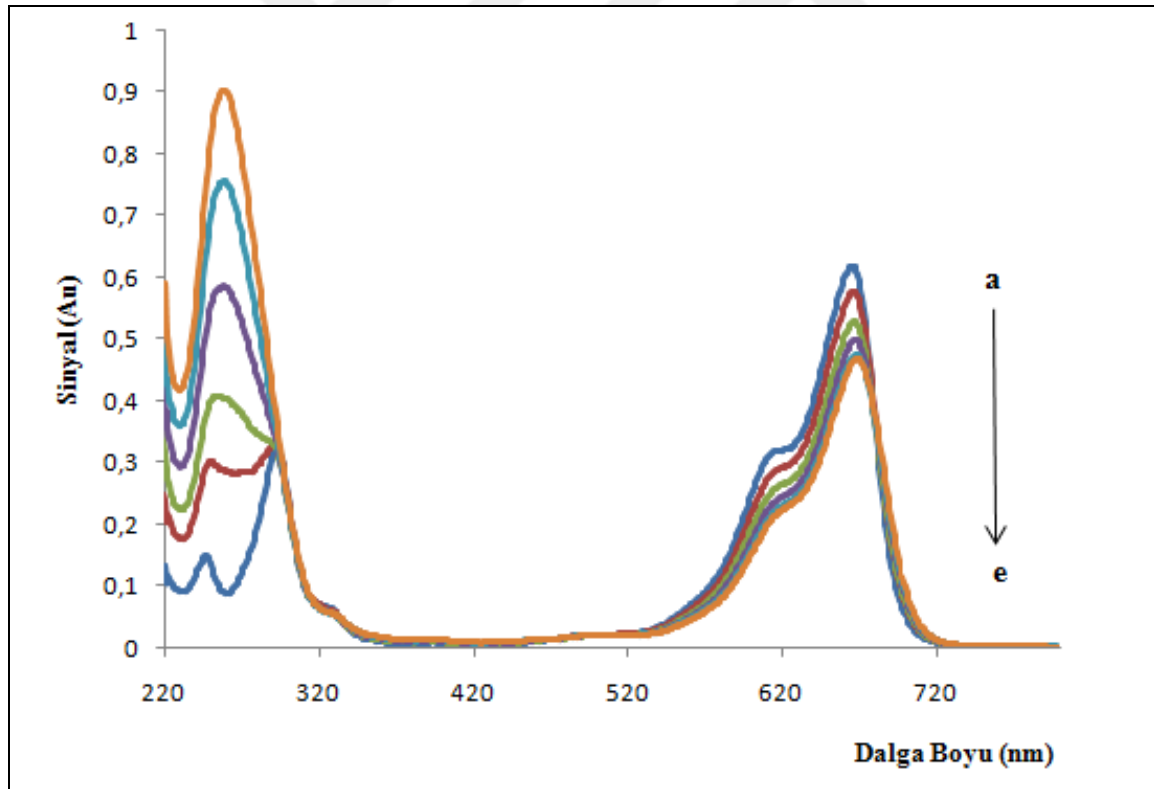
Bu eşitlikten hareketle $1/[\text{DNA}] - A_0/(A-A_0)$ grafiği oluşturulmuş (Şekil 4.19) ve doğru denklemi $y = -1,93 \times 10^{-5} x - 0,4870$ ($r^2=0,9949$) olarak bulunmuştur. Elde edilen denklemden hareketle bağlanma katsayısı $K = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer kromatografik çalışmalar sonucu elde edilen değer ($3,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) ile uyumludur.



Şekil 4.19. TMZ-DNA için UV-GB çalışmalarında bağlanma katsayısının hesaplanması için kullanılan grafik

Floresans çalışmaları: DNA-TMZ etkileşiminin belirlenmesi için yapılması planlanan floresans çalışmasında hem DNA hem de TMZ'nin floresans özellik göstermemesi nedeniyle, dolayı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem MM ve TMZ'nin DNA ile yarışmalı olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Çalışmada öncelikle MM'nin floresans spektrumu kaydedilmiştir. Uyarma dalga boyu olarak 665 nm kullanılarak 686 nm'deki emisyon şiddeti ölçülmüştür.

TMZ-DNA etkileşim çalışmalarından önce ilk aşamada MM'nin DNA ile bağlanma katsayısı UV-GB spektroskopik yöntem kullanılarak hesaplanmıştır. Bu çalışma MM ve TMZ'nin DNA ile bağlanma katsayılarını karşılaştırmak için yapılmıştır. MM-DNA kompleksinin bağlanma katsayısının hesaplanması için son derişimi 1×10^{-5} M olan MM çözeltisi üzerine $8,13 \times 10^{-5}$ M DNA çözeltisinden artan hacimlerde (50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 200 μ l, 250 μ l) eklenerek UV-GB spektrumları kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlarda MM'ye ait 247, 293 ve 665 nm'de pikler ve 329 ile 613 nm'lerde omuzlar görülmüştür. DNA'nın, 247 ve 293 nm'lerdeki absorbands pikine girişim yapmasından dolayı sadece 665 nm'deki absorbands değerindeki değişimler izlenmiştir. Şekil 4.20'de görüldüğü gibi DNA ilavesi ile bu dalga boyunda absorbands şiddetinde azalma ve daha uzun dalgaboylarına kayma (kırmızıya kayma) gözlemlenmiştir. Bu olay MM'nin DNA ile interkalatif olarak etkileştiğini göstermektedir. MM-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için UV-GB spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler, Çizelge 4.13'de gösterilmektedir.

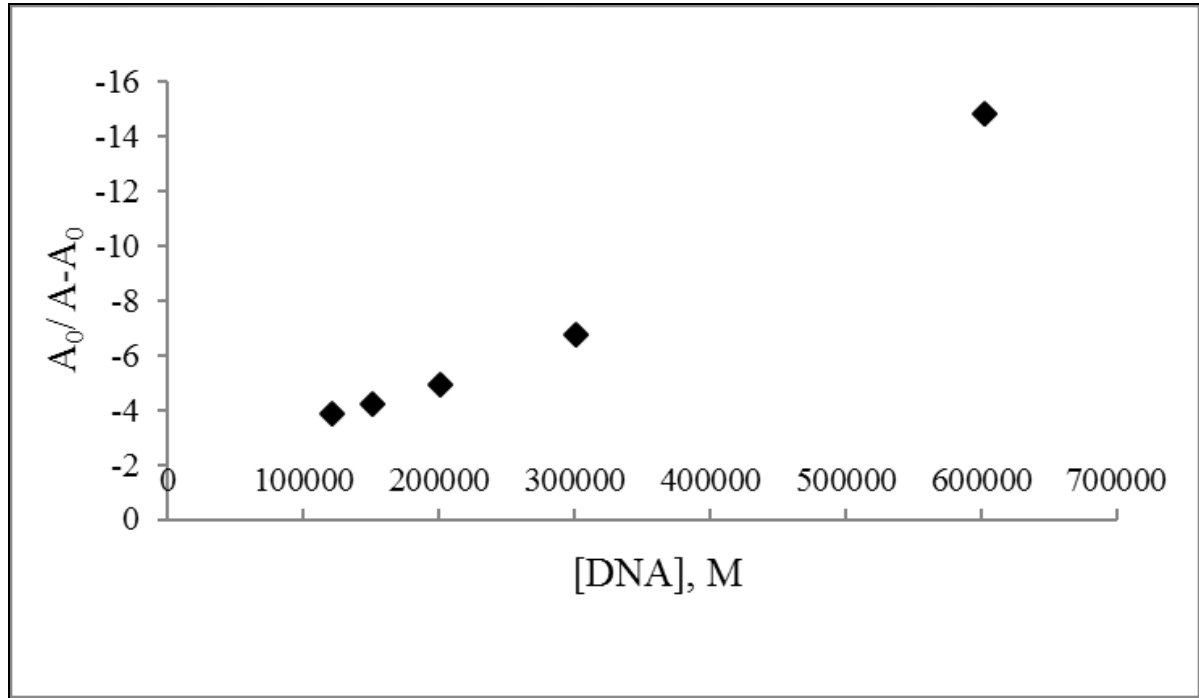


Şekil 4.20. 1×10^{-5} M MM çözeltisi (a) üzerine $1,66 \times 10^{-6}$ M (b), $3,32 \times 10^{-6}$ M (c), $4,98 \times 10^{-6}$ M (d), $6,64 \times 10^{-6}$ M (e) ve $8,3 \times 10^{-6}$ M (f) DNA ilavesi ile elde edilen spektrum

Çizelge 4.13. MM-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için UV-GB spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler

A_0	A	C_{DNA}, M
0,618	0,5763	$1,66 \times 10^{-6}$
	0,5264	$3,32 \times 10^{-6}$
	0,4919	$4,98 \times 10^{-6}$
	0,4709	$6,64 \times 10^{-6}$
	0,4583	$8,30 \times 10^{-6}$

Elde edilen verilerden hareketle Benesi-Hildebrand eşitliği kullanılarak $1/[DNA] - A_0/(A-A_0)$ grafiği oluşturulmuş (Şekil 4.21) ve doğru denklemi $y = -2,3 \times 10^{-5} x - 0,5298$ ($r^2=0,9868$) olarak bulunmuştur. MM-DNA için bağlanma katsayısı $2,2 \times 10^4 M^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

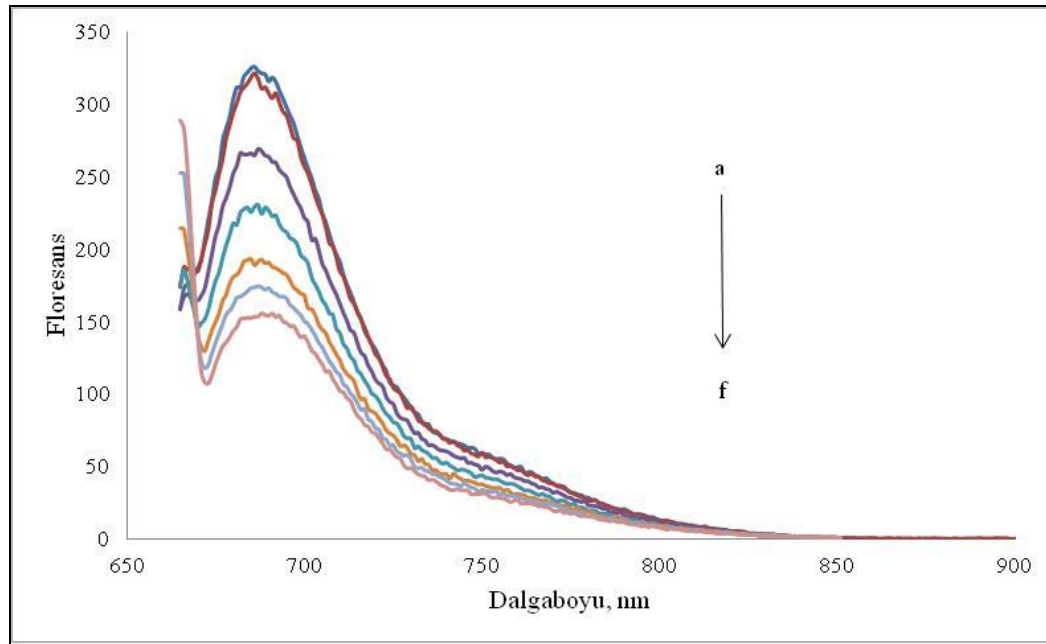


Şekil 4.21. MM-DNA için bağlanma katsayısının hesaplanması için kullanılan grafik

Floresans çalışması için $10^{-3} M$ MM çözeltisinden 12,5 μl küvete alınarak pH 4,5 asetat tamponuyla 2,5 ml'ye seyreltilmiş ve bu çözeltisinin floresans spektrumu alınmıştır. Daha sonra bu çözelti üzerine $8,13 \times 10^{-5} M$ DNA çözeltisinden artan hacimlerde (25 μl , 50 μl , 100 μl , 150 μl , 200 μl , 250 μl) eklenerek floresans spektrumlarındaki değişim gözlemlenmiştir. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi artan DNA derişiminde MM'ye ait floresans şiddetinde azalma gözlenmiştir.

Çizelge 4.14. MM-DNA baskılama katsayısının hesaplanması için floresans spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler

F_0	F	C_{DNA}, M
326,045	312,703	$8,13 \times 10^{-7}$
	264,195	$1,62 \times 10^{-6}$
	229,111	$3,25 \times 10^{-6}$
	188,541	$4,87 \times 10^{-6}$
	173,561	$6,50 \times 10^{-6}$
	153,108	$8,13 \times 10^{-6}$



Şekil 4.22. MM çözeltisi üzerine artan hacimlerde $8,13 \times 10^{-5} M$ DNA çözeltisinin; 25 µl DNA (a), 50 µl DNA (b), 100 µl DNA (c), 150 µl DNA (d), 200 µl DNA (e), 250 µl DNA (f) eklenmesiyle elde edilen floresans sinyalleri

DNA'nın MM'nin floresans emisyonunu sönmüleme katsayısını hesaplamak için elde edilen veriler Stern-Volmer eşitliği (Eşitlik 4.2) kullanılarak değerlendirilmiştir.

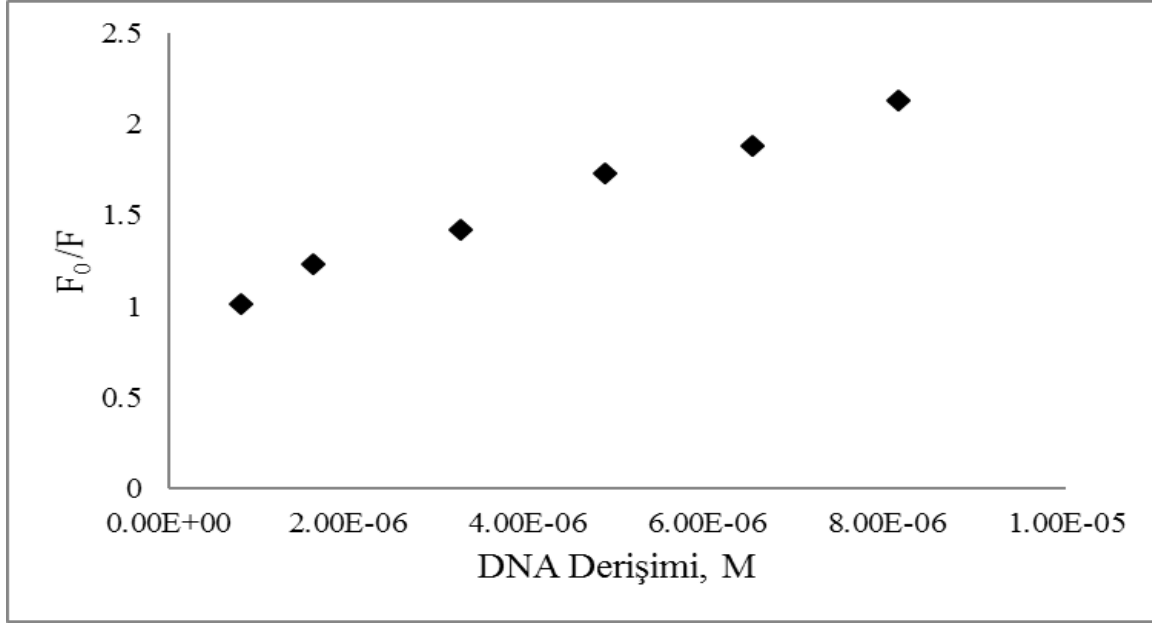
$$F_0/F = 1 + K_{app} [Q] \quad \text{Eş (4.2)}$$

F_0 : MM'nin tek başına floresans emisyon şiddeti

F: MM'nin DNA varlığında floresans emisyon şiddeti

K_{app} : Sönmüleme katsayısı

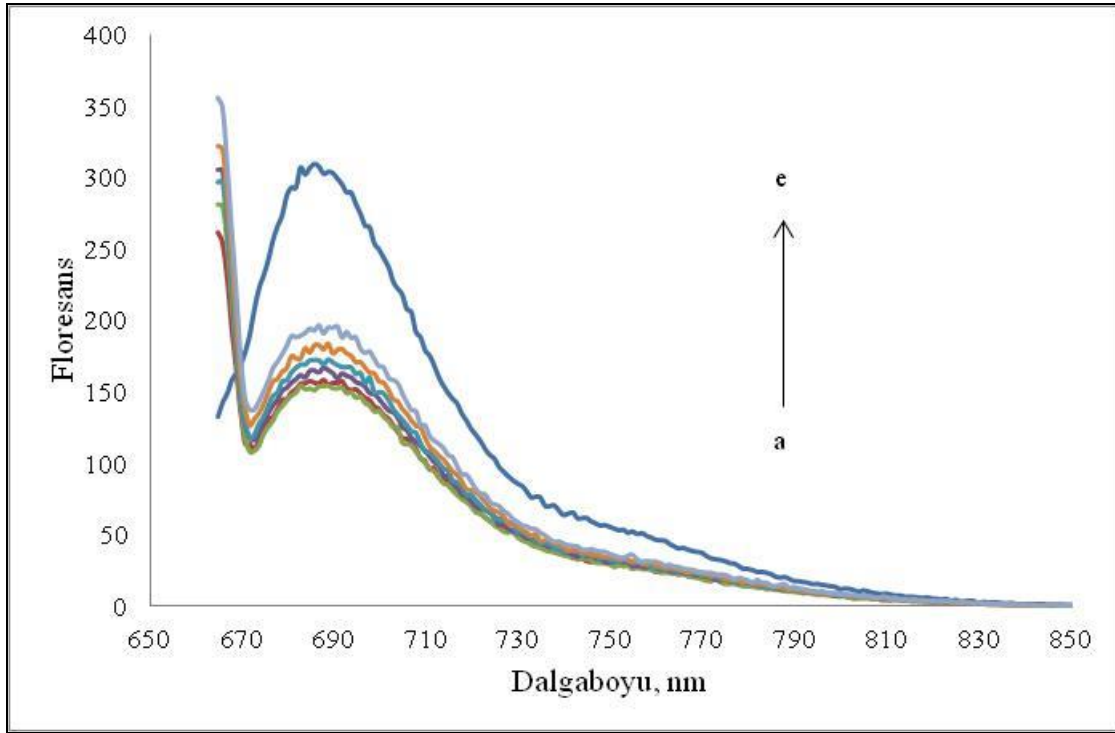
[Q]: DNA derişimi (M)



Şekil 4.23. MM-DNA etkileşiminin belirlenmesi için kullanılan Stern-Volmer grafiği

Elde edilen floresans spektrumlarından hareketle çizilen Stern-Volmer grafiğinin (Şekil 4.23) denklemi $y = 1,47 \times 10^5 + 0,953$ olarak bulunmuş ve sönmüleme katsayısı $1,47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. UV-GB spektrumlardaki absorbans değerlerindeki azalmanın yanı sıra pik tepe değerlerinin daha uzun dalga boylarına kaymalarının gözlenmesi ve Stern-Volmer grafiğinin doğrusal olmasından dolayı ($r^2 = 0,9943$) sönmülemenin statik olduğuna karar verilmiştir.

TMZ-DNA etkileşim çalışmaları için en düşük sinyali veren MM-DNA karışım çözeltisi yeniden hazırlanmış ve üzerine 10^{-3} M 'lık TMZ çözeltisinden artan hacimlerde (50 μl , 100 μl , 150 μl , 200 μl , 250 μl) eklenerek floresans ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.24). MM-DNA kompleksinin üzerine TMZ çözeltisi ilavesi ile TMZ-DNA kompleksi oluşmasından dolayı serbest kalan MM molekülleri nedeniyle floresans şiddeti tekrar geri kazanılmıştır. Gözlenen bu etkinin TMZ-MM etkileşiminden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi için MM çözeltisi üzerine TMZ çözeltisi ilave edilmiş ancak MM'nin emisyon piki üzerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir. Bu durum TMZ'nin MM ile direkt olarak etkileşmediğini, MM-DNA kompleksi ile etkileşerek TMZ-DNA kompleksini meydana getirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.24. MM-DNA karışımı üzerine artan hacimlerde 10^{-3} M TMZ çözeltisinin; 50 µl TMZ (a), 100 µl TMZ (b), 150 µl TMZ (c), 200 µl TMZ (d), 250 µl TMZ (e) eklenmesiyle elde edilen floresans sinyalleri

4.5. Temozolomid Bilinmeyen Türünün Analizi İçin Yapılan Çalışmalar

TMZ'nin fizyolojik pH'da (pH 6-7) hem *in-vivo* hem de *in-vitro* ortamda kimyasal olarak MTIC'ye bozunduğu literatürlerde gösterilmiştir. Bozunma ürünü MTIC ise Şekil 2.4'de gösterildiği gibi metildiazonyum iyonu ve AIC oluşturarak parçalanmaktadır. TMZ pH<5 olduğu ortamda stabildir ve herhangi bir bozunma reaksiyonu göstermez. Buna karşılık MTIC fizyolojik pH'da oda sıcaklığında stabil değilken AIC stabildir. TMZ'ye ait kromatogramlarda $\approx 2,3$ dk'da gözlenen türün herhangi bir kirlilik nedeniyle mi yoksa bozunma ürünü mü olduğunu belirlemek için stok TMZ çözeltisi deiyonize su içerisinde hazırlanmış ve gereken seyreltmeler yine deiyonize su ile yapılmıştır. Seyreltmelerin asetat tamponu ile yapıldığı ikinci çözelti ise kontrol çözeltisi olarak kullanılmıştır. Hazırlanan sulu stok çözeltinin pH değeri yaklaşık 8,5 olarak ölçülmüştür. Bu değer TMZ'nin bozunmasına neden olmaktadır. Kromatografik çalışmalar için 6 saatlik, UV-GB için ise bir saatlik stabilite testi yapılmıştır. Deiyonize su ile seyreltmenin yapıldığı çözeltinin kromatogramları incelendiğinde her iki türe ait alıkonma zamanlarında değişme olmaksızın TMZ'ye ait pik alanının zamanla azaldığı, bilinmeyen türe ait pikin arttığı görülmüştür (Çizelge 4.15). Buna karşılık seyreltmenin pH

4,5 asetat tamponu kullanılarak yapıldığı çözeltide ise TMZ ve bilinmeyen türe ait piklerin alan değerlerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır (Çizelge 4.16).

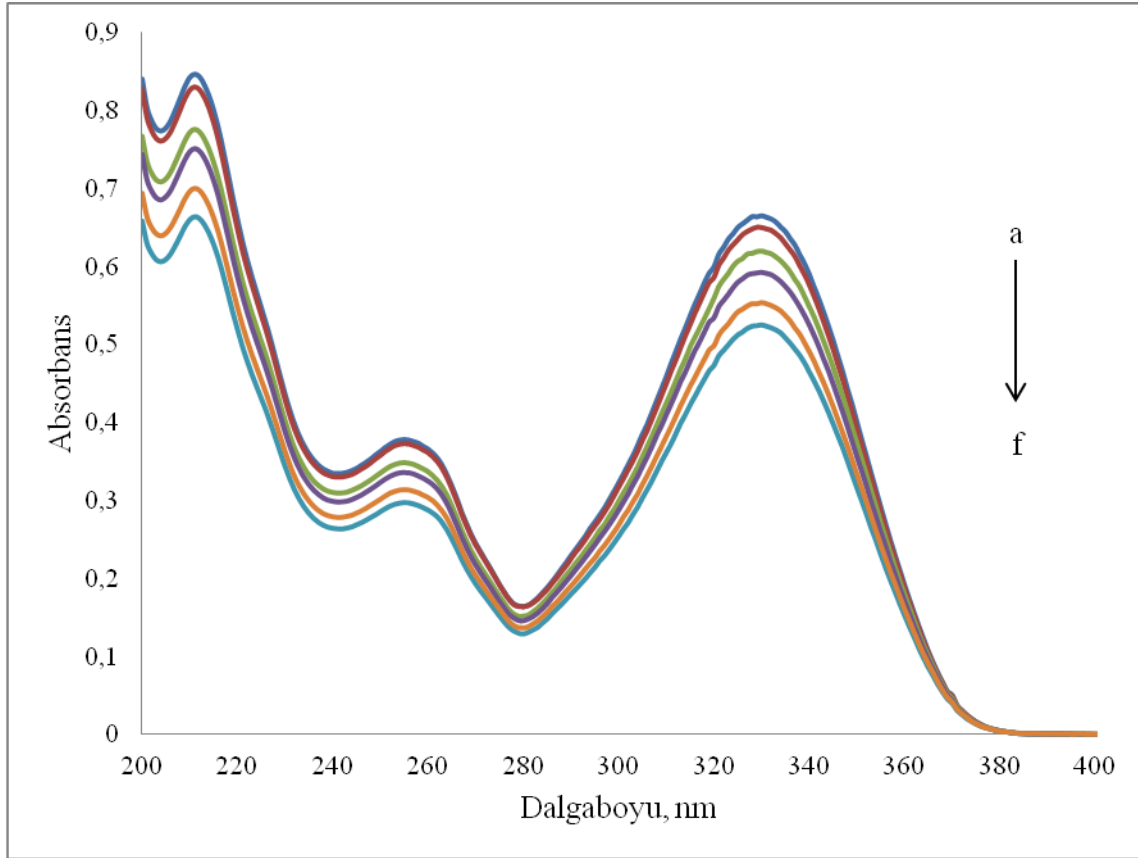
Çizelge 4.15. Stok ve son seyreltmesi su ile hazırlanan 20 ppm TMZ çözeltisine ait pik alanı değişimi

Süre (dk)	Bilinmeyen Alan	Bilinmeyen RT	TMZ Alan	TMZ RT
0	99,1	2,3	1084,6	3,5
30	110,6	2,3	1084,3	3,5
60	133,1	2,3	1076,0	3,5
90	232,4	2,3	1075,9	3,5
120	463,7	2,3	905,0	3,5
180	1133,8	2,3	729,4	3,5
240	1314,4	2,3	358,5	3,5
300	1695,0	2,3	314,8	3,5
315	1686,8	2,3	314,1	3,5
345	1692,5	2,3	310,8	3,5
360	1692,0	2,3	311,2	3,5

Çizelge 4.16. Stok ve son seyreltmesi pH 4,5 asetat tamponu ile hazırlanan 20 ppm TMZ çözeltisine ait pik alanı değişimi

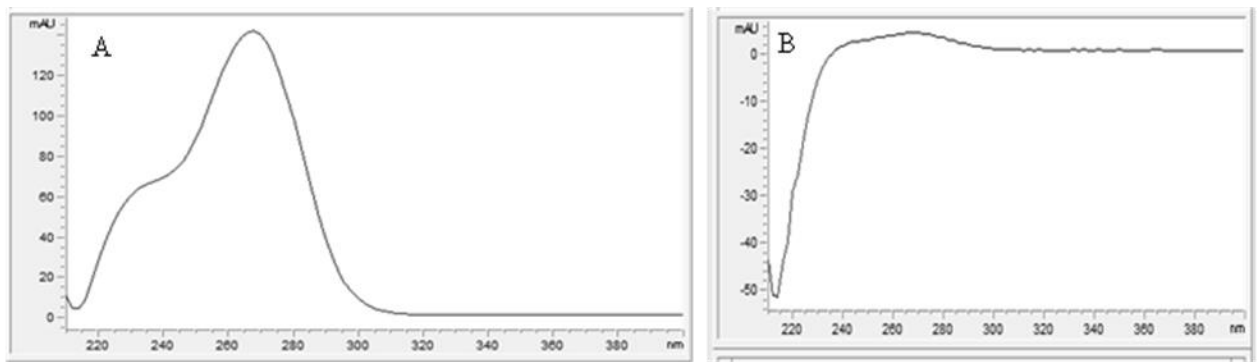
Süre (dk)	Bilinmeyen Alan	Bilinmeyen RT	TMZ Alan	TMZ RT
0	19,9	2,3	1126,3	3,7
30	20,8	2,3	1123,5	3,7
60	20,5	2,3	1125,7	3,7
120	20,1	2,3	1124,1	3,7
180	20,2	2,3	1126,8	3,7
240	20,6	2,3	1124,2	3,7
300	20,4	2,3	1124,9	3,7
360	20,4	2,3	1121,7	3,7

Benzer sonuçlar UV-GB deneyleri ile de desteklenmiştir. Deiyonize su ile hazırlanan TMZ çözeltisinin spektrumunda pik şiddetinde zamana bağlı olarak azalma gözlenmiştir (Şekil 4.25).



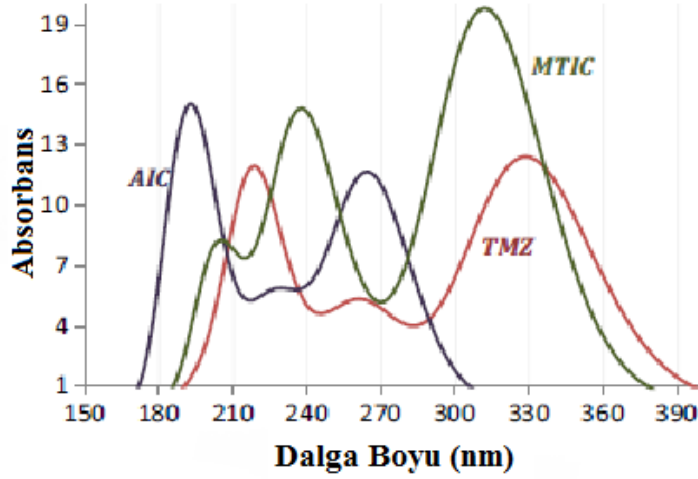
Şekil 4.25. Stok ve son seyreltmesi su ile hazırlanan $8,3 \times 10^{-5}$ M TMZ çözeltisine ait UV-GB spektrumu 0 (a), 10 (b), 20 (c), 30 (d), 40 (e), 50 (f) dk.

Bilinmeyen türün belirlenmesi için kromatografik ayırım sırasında DAD sisteminden elde edilen spektrumlar incelenmiştir. Sadece su kullanılarak hazırlanan çözelti spektrumunda (A) bilinmeyen türe ait 230 nm’de omuz ve 265 nm’de maksimum absorbands piki gözlenirken pH 4,5 asetat tamponu kullanılan çözeltiye ait spektrumda (B) herhangi bir pik görülmemiştir (Şekil 4.26).

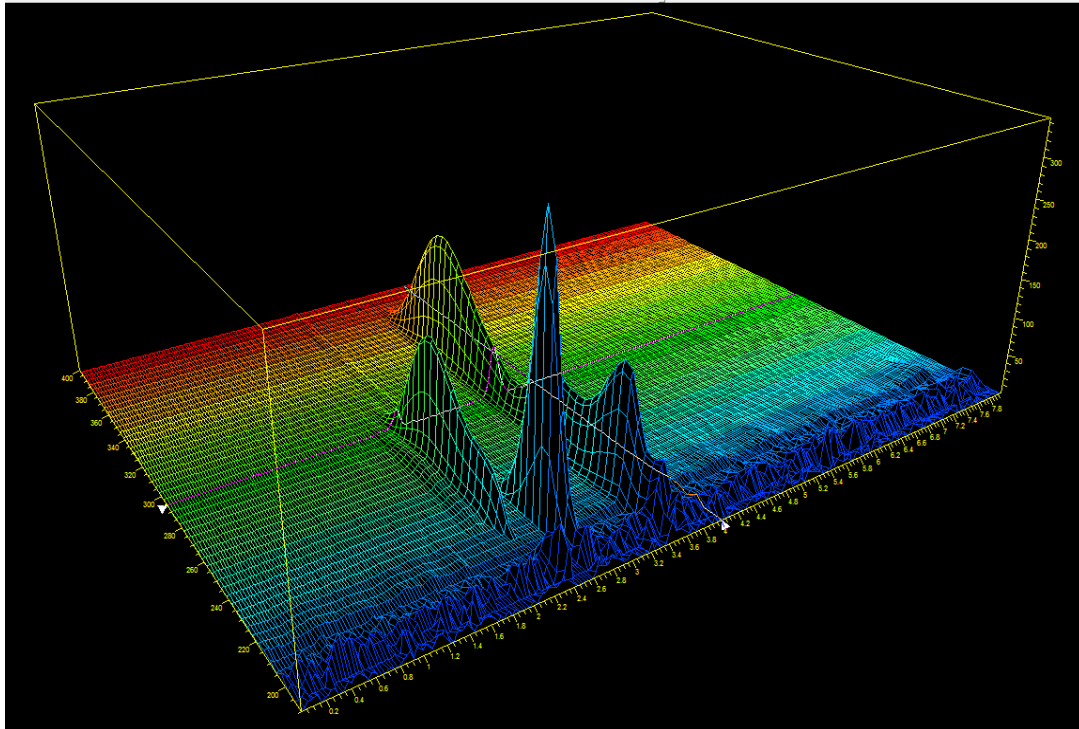


Şekil 4.26. DAD dedektörden elde edilen bilinmeyen türe ait su ile hazırlanan çözelti spektrumu (A) ve pH 4,5 asetat tamponu ile hazırlanan çözelti spektrumu (B)

Literatür bilgilerinden elde edilen [109] TMZ, MTIC ve AIC türlerine ait spektrumlar (Şekil 4.27) ve DAD dedektörden elde edilen üç boyutlu spektrum ile karşılaştırıldığında bilinmeyen türün AIC'ye ait olduğu görülmektedir (Şekil 4.28).



Şekil 4.27. TMZ, MTIC ve AIC'ye ait UV-GB absorbans spektrumları[109]



Şekil 4.28. TMZ, MTIC ve AIC'ye ait 3 boyutlu UV-GB absorbans spektrumları

TMZ'nin bozunma ürünü olan AIC de DNA ile etkileşime girmektedir. Şekil 4.11-4.15'te gösterilen kromatogramlar ve Çizelge 4.9 ve 4.10 incelendiğinde ilaç derişiminin sabit tutulup

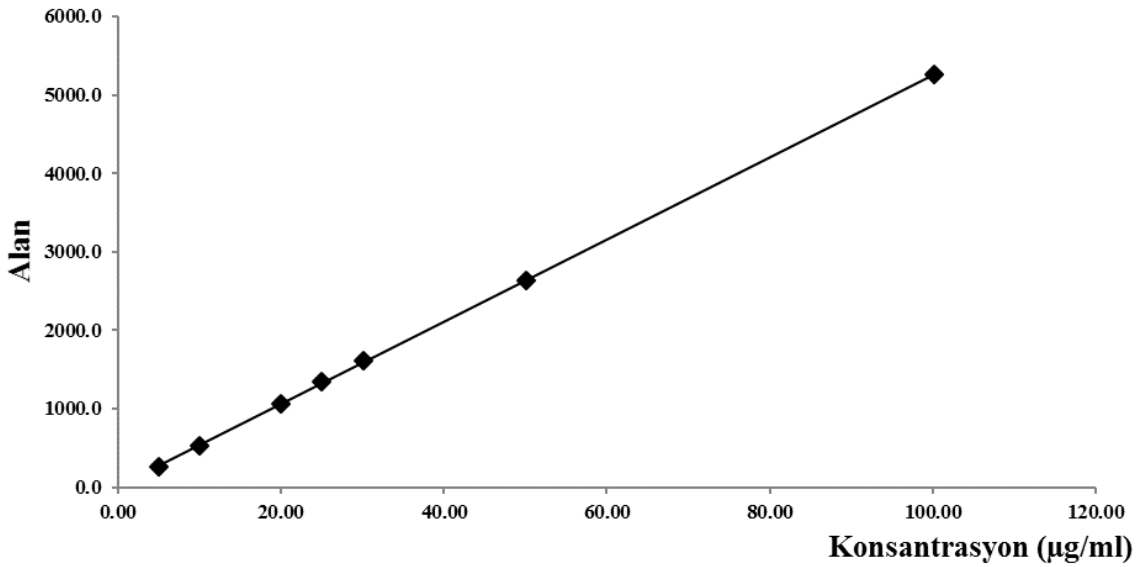
DNA derişiminin arttırıldığı çalışma koşullarında TMZ'ye ait pik alanında azalma görülürken AIC'ye ait pik alanları artmaktadır. Çalışılan çözeltinin pH değerinde TMZ'nin stabil olmasından dolayı ilacın pik alanının azalmasının ve AIC'nin pik alanının artmasının bozunma nedeni ile değil DNA ile etkileşimden kaynaklı olduğu söylenebilir.

4.6. TMZ Miktar Tayini Yöntem Validasyonu

TMZ için geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için özgünlük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, sağlamlık, tespit ve tayin sınırları parametreleri incelenmiştir.

4.6.1. Doğrusallık çalışmaları

Sistem optimizasyonu sonucu en uygun kromatografik şartlar belirlendikten sonra ilk olarak doğrusallık parametresi incelenmiştir. Bu aşamada TMZ artan derişimlerde hazırlanarak sisteme enjekte edilmiştir. Analiz sonuçları ile kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon grafiğı (Şekil 4.29) ve deneylerden elde edilen kantitatif parametreler (Çizelge 4.17 ve 4.18) aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 4.29. Doğrusallık parametresine ait kalibrasyon grafiğı

Çizelge 4.17. Doğrusallık parametresine ait YBSK sonuçları

Derişim ($\mu\text{g/ml}$)	Alan 1	Alan 2	X_{ort}	SS	%BSS
5,01	270,9	270,6	270,8	0,21	0,08
10,02	534,5	535,5	535,0	0,71	0,13
20,04	1073,3	1068,7	1071,0	3,25	0,3
25,05	1350,3	1349,3	1349,8	0,71	0,05
30,06	1606,7	1607,9	1607,3	0,85	0,05
50,10	2639,5	2637,5	2638,5	1,41	0,05
100,21	5259,9	5248,5	5254,2	8,06	0,15

Çizelge 4.18. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan validasyon parametreleri

Validasyon Parametresi	TMZ
Doğrusal aralık ($\mu\text{g/ml}$)	5-100
Eğim	52,27
Kesişim	22,31
Korelasyon katsayısı	0,9998
Eğimin standart hatası	0,16
Kesişimin standart hatası	7,52
Teşhis sınırı ($\mu\text{g/ml}$)	0,02
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g/ml}$)	0,06

4.6.2. Kesinlik çalışmaları

YBSK yönteminin kesinliğini belirleyebilmek için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları değerlendirilmiştir.

Gün içi çalışmalarında üç farklı derişimde TMZ çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiler altışar kez analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak (Çizelge 4.19) tekrarlanabilirlikleri kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.19. Gün içi kesinlik sonuçları

Derişim ($\mu\text{g/ml}$)	Alan	Xort	SS	%BSS
20,04	1084,3			
20,04	1085,7			
20,04	1083,3			
20,04	1086,1	1085,4	1,35	0,12
20,04	1085,6			
20,04	1087,1			
25,05	1351,2			
25,05	1351,9			
25,05	1350,7			
25,05	1351,1	1351,2	0,44	0,03
25,05	1350,8			
25,05	1351,4			
30,06	1610,1			
30,06	1608,8			
30,06	1608,3			
30,06	1609,4	1609,1	0,67	0,04
30,06	1609,1			
30,06	1608,3			

Günler arası yapılan çalışmada ise üç farklı derişimde TMZ çözeltisi üç gün analiz edilmiş, analiz sonuçlarının standart sapması hesaplanarak (Çizelge 4.20) tekrarlanabilirlik kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.20. Günler arası kesinlik sonuçları (20,04 $\mu\text{g/ml}$, 25,05 $\mu\text{g/ml}$ ve 30,06 $\mu\text{g/ml}$ TMZ çözeltileri)

Derişim ($\mu\text{g/ml}$)	Alan	Xort	SS	%BSS
20,04	1085,8			
20,04	1086,2			
20,04	1086,5			
20,04	1086,0	1086,1	0,92	0,08
20,04	1084,5			
20,04	1087,3			
25,05	1354,2			
25,05	1352,9			
25,05	1352,1			
25,05	1350,1	1352,4	1,44	0,11
25,05	1351,6			
25,05	1353,3			
30,06	1605,9			
30,06	1608,1			
30,06	1606,4			
30,06	1607,0	1606,6	1,23	0,08
30,06	1604,9			
30,06	1607,1			

Hem gün içi hem de günler arası yapılan kesinlik çalışmaları sonucunda BSS değerleri 0,03-0,12 arasında bulunmuş olup bu sonuçlar yöntemin kesin olduğunu göstermektedir.

4.6.3. Sağlamlık çalışmaları

YBSK yönteminin sağlamlığını belirleyebilmek için organik faz oranı, pH değeri, sıcaklık, akış hızı ve dalga boyu parametrelerinin sonuçları değerlendirilmiştir.

Organik faz oranının optimizasyon çalışmaları: Organik faz oranı çalışmalarında 20,04 µg/ml TMZ çözeltisi, %8, %10 ve %12 asetonitril kullanılarak altışar kez analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak (Çizelge 4.21) tekrarlanabilirlikleri kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.21. Sağlamlık parametresi organik faz oranı çalışma verileri

Organik Faz Oranı	Alan	Xort	SS	%BSS
8%	1101,6			
8%	1101,2			
8%	1104,8	1101,8	1,50	0,15
8%	1101,1			
8%	1100,7			
8%	1101,5			
10%	1099,9			
10%	1098,1			
10%	1101,2	1100,3	1,29	0,18
10%	1100,0			
10%	1100,7			
10%	1101,8			
12%	1101,3			
12%	1098,4			
12%	1102,2	1099,4	1,89	0,18
12%	1098,4			
12%	1097,8			
12%	1098,0			

Organik faz oranı çalışmalarında : %8 ve %12 asetonitril oranları ile hazırlanan hareketli fazların kullanılmasıyla elde edilen kromatogramların pik alan değerleri ile %10 oranında asetonitril kullanımı ile elde edilen alan değerleri arasında anlamlı bir fark yoktur.

pH etkisi: pH değeri çalışmalarında, 20,04 µg/ml TMZ çözeltileri, asetat tamponunun pH değeri 4,3, 4,5 ve 4,7'ye ayarlanarak altışar kez analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak (Çizelge 4.22) tekrarlanabilirlikleri kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.22. Sağlamlık parametresi pH değeri çalışma verileri

pH	Alan	Xort	SS	%BSS
4,3	1095,1			
4,3	1096,8			
4,3	1095,9	1096,4	1,3	0,15
4,3	1096,6			
4,3	1098,7			
4,3	1095,4			
4,5	1093,8			
4,5	1091,0			
4,5	1091,9	1092,2	1,01	0,18
4,5	1091,3			
4,5	1092,3			
4,5	1092,6			
4,7	1095,0			
4,7	1092,9			
4,7	1095,9	1094,4	1,85	0,18
4,7	1092,0			
4,7	1096,9			
4,7	1093,9			

pH değerleri 4.3 ve 4.7 olan hareketli fazların kullanılmasıyla elde edilen kromatogramların pik alan değerleri ile pH 4.5 asetat tamponu kullanılarak elde edilen pik alan değerleri arasında anlamlı bir fark yoktur.

Sıcaklık optimizasyon çalışmaları: Sıcaklık değeri çalışmalarında, 20,04 µg/ml TMZ çözeltileri kolon sıcaklığı 27°C, 30°C ve 33°C'ye ayarlanarak altışar kez analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak (Çizelge 4.23) tekrarlanabilirlikleri kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.23. Sağlamlık parametresi sıcaklık değeri çalışma verileri

Sıcaklık (°C)	Alan	Xort	SS	%BSS
27	1100,8			
27	1100,4			
27	1101,8			
27	1101,7	1101,1	0,81	0,07
27	1100,0			
27	1101,9			
30	1101,0			
30	1099,8			
30	1102,1			
30	1098,3	1100,3	1,36	0,12
30	1099,6			
30	1101,2			
33	1101,1			
33	1100,5			
33	1101,8			
33	1102,9	1101,8	1,05	0,09
33	1103,2			
33	1101,4			

Sıcaklık değeri olarak 27, 30 ve 33 °C için yapılan analizler sonucunda elde edilen kromatogramların alan değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Akış hızı optimizasyon çalışmaları: Akış hızı çalışmalarında, 20,04 µg/ml TMZ çözeltileri akış hızı 0,7 ml/dk, 0,8 ml/dk ve 0,9 ml/dk'ya ayarlanarak altışar kez analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak (Çizelge 4.24) tekrarlanabilirlikleri kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.24. Sağlamlık parametresi akış hızı çalışma verileri

Akış Hızı (ml/dk)	Alan	Xort	SS	%BSS
0,7	1103,4			
0,7	1101,9			
0,7	1105,8			
0,7	1101,3	1102,9	1,6	0,15
0,7	1102,2			
0,7	1102,6			
0,8	1101,7			
0,8	1100,7			
0,8	1098,2			
0,8	1098,3	1100,2	1,56	0,14
0,8	1100,5			
0,8	1101,6			
0,9	1101,9			
0,9	1097,7			
0,9	1102,5			
0,9	1099,2	1099,9	1,88	0,17
0,9	1099,1			
0,9	1098,9			

Test edilen üç farklı akış hızı karşılaştırıldığında kromatogramlardaki pik alanları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Dalga boyu çalışmaları: Dalga boyu çalışmalarında ise 20,04 µg/ml TMZ çözeltileri cihazın dalga boyu parametresi 258 nm, 260 nm ve 262 nm'ye ayarlanarak altışar kez analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak (Çizelge 4.25) tekrarlanabilirlikleri kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.25. Sağlamlık parametresi dalga boyu çalışma verileri

Dalga Boyu (nm)	Alan	Xort	SS	%BSS
258	1098,2			
258	1097,9			
258	1097,8			
258	1096,9	1098,1	1,25	0,11
258	1097,1			
258	1100,4			
260	1101,1			
260	1102,4			
260	1103,8			
260	1098,4	1101	1,94	0,18
260	1099,7			
260	1100,3			
262	1100,1			
262	1097,1			
262	1098,3			
262	1100,4	1098,8	1,25	0,11
262	1098,5			
262	1098,2			

İncelenen dalga boyları için elde edilen pik alanları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

4.6.4. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) çalışmaları

TS değerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada, doğrusallık analizinde hazırlanan en küçük derişim değeri olan 5,01 µg/ml TMZçözeltileri altışar kez analiz edilmiş ve ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanmıştır (Çizelge 4.26). Kalibrasyon grafiğinin eğimi (Şekil 4.28) kullanılarak;

$$TS = (3 \times \text{Std Sapma}) / \text{Eğim} \text{ ve } TAS = (10 \times \text{Std Sapma}) / \text{Eğim}$$

formülünden hesaplanmıştır (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26. TS ve TAS değerlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon (µg/ml)	Alan	Xort	SS	%BSS		
5,01	270,9					
5,01	270,6				Eğim (m)	52,27
5,01	271,0				Kesişim (n)	22,31
5,01	271,3	270,9	0,29	0,11	TS	0,02
5,01	270,5				TAS	0,06
5,01	271,0					

4.7. Miktar Tayini ve Geri Kazanım Çalışmaları

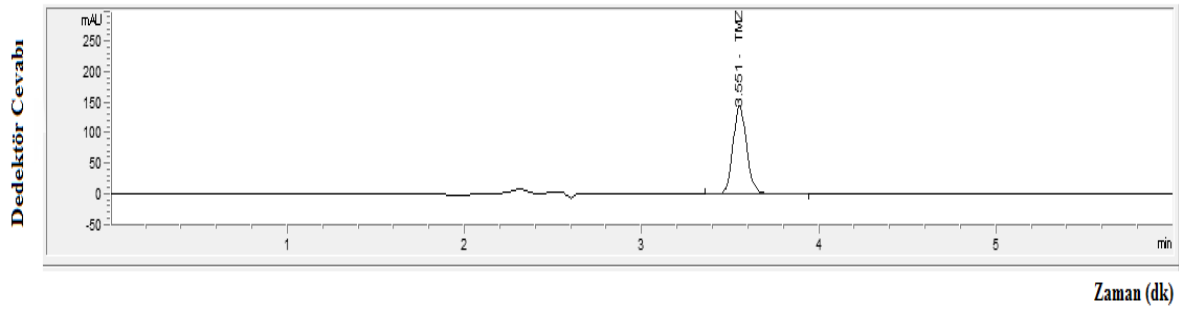
4.7.1. Miktar tayini çalışmaları

Miktar tayini çalışması için gerekli çözeltiler TMZ içeren kapsüllerden Bölüm 3.2.3’de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan benzer derişimdeki 5 farklı çözelti ikişer kez analiz edilmiştir.

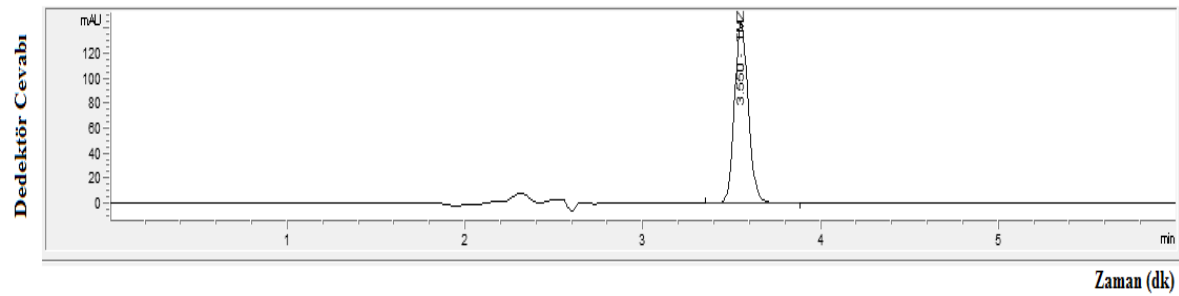
Doğrusallık çalışmasında elde edilen kalibrasyon grafiği yardımı ile kapsül içeriğindeki etken madde miktarı tayin edilmiştir. Çizelge 4.27’de hazırlanan numune çözeltilerine ait miktar tayini sonuçları ve Şekil 4.30 ve 4.31’de aynı derişimdeki standart ve numune çözeltilerine ait kromatogramlar gösterilmiştir.

Çizelge 4.27. Miktar tayini çalışmalarına ait sonuçlar

Miktar tayini çalışmaları	Tablette Bulunan Madde Miktarı (5 mg/tb)	Miktar Tayini (%)	Xort	SS	%BSS	% Bias
Numune- 1	4,99	99,96				
Numune- 2	5,02	100,44				
Numune- 3	5,02	100,46	5,00	0,01	0,30	0,00
Numune- 4	5,01	100,39				
Numune- 5	4,99	99,90				



Şekil 4.30. Miktar tayini standart çözeltisine ait kromatogram



Şekil 4.31. Miktar tayini numunesine ait kromatogram

4.7.2. Geri kazanım çalışmaları

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Geri kazanım çalışmaları için, daha önce analizi yapılmış kapsül numunesi çözeltisi üzerine artan miktarda (%50-100 ve 150) standart etken madde ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Her bir çözeltiden üçer paralel numune hazırlanmış ve sisteme ikişer kere enjekte edilmiştir. Geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar, standart maddenin kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.28. Geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Geri kazanım çalışmaları	Paralel- 1	Paralel- 2	Paralel- 3
Bilinen miktar (mg)	5,00	5,00	5,00
Bulunan miktar (mg)	4,92	4,99	4,97
Xort		4,96	
SS		0,04	
BSS (%)		0,73	
%50 Geri kazanım için eklenen miktar (mg)	2,32	2,46	2,49
%50 Geri kazanım için bulunan miktar (mg)	2,29	2,44	2,46
Geri kazanım (%)	98,71	99,19	98,79
%50 Geri kazanıma ait Xort (%)		98,90	
%50 Geri kazanıma ait SS (%)		0,26	
%50 Geri kazanıma ait BSS (%)		0,26	
%100 Geri kazanım için eklenen miktar (mg)	5,31	5,36	5,34
%100 Geri kazanım için bulunan miktar (mg)	5,34	5,38	5,35
Geri kazanım (%)	100,51	100,43	100,26
%100 Geri kazanıma ait Xort (%)		100,40	
%100 Geri kazanıma ait SS (%)		0,13	
%100 Geri kazanıma ait BSS (%)		0,13	
%150 Geri kazanım için eklenen miktar (mg)	7,57	7,52	7,60
%150 Geri kazanım için bulunan miktar (mg)	7,51	7,54	7,56
Geri kazanım (%)	99,17	100,25	99,53
%150 Geri kazanıma ait Xort (%)		99,65	
%150 Geri kazanıma ait SS (%)		0,55	
%150 Geri kazanıma ait BSS (%)		0,55	

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında, kanser tedavisinde kullanılan TMZ molekülünün DNA ile etkileşim türünün kromatografik olarak belirlenmesini sağlamak ve böylece ilaç-DNA etkileşim mekanizmalarının kolay, hızlı, daha seçimli ve güvenli bir şekilde tanımlanmasını sağlayabilmek amaçlanmıştır.

Çağımızın hastalığı olarak bilinen kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Doku tamiri ve yenilenmesi amacıyla gerçekleşen hücre bölünmesi sırasında hatalı DNA replikasyonu, kanserli hücre oluşumunun ana etmenidir.

Hücre merkezinde bulunan çekirdek içinde, hücrenin ve organizmanın bütün genetik bilgisini depolayan deoksiribonükleik asit (DNA) mevcuttur. DNA hücre içerisinde çift sarmal formda bulunur. Her bir sarmal, Adenin, Timin, Sitozin ve Guanin olmak üzere dört nükleotitten oluşur. Bir fosfat, beş karbonlu bir şeker ve bir azotlu organik bazdan oluşan nükleotitler, birbirine fosfodiester bağlarıyla bağlıdır.

DNA sarmallarının birbirine en yakın olduğu noktaya küçük oluk ve birbirlerinden en uzak oldukları noktaya da büyük oluk adı verilir. Bu oluklar ile etkileşime giren moleküller DNA'ya Van Der Waals bağları ile bağlanırlar. DNA konformasyonunu ve burulma gerginliğini değiştirerek protein-DNA etkileşimini inhibe eden ve DNA sarmallarını kırılmasına neden olan bu tür kovalent olmayan bağlanmaların bir türevi de DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yapmasıdır. İnterkalasyon, DNA'da zincir kırılmasına yol açarak DNA sentezi ve DNA'ya bağımlı RNA sentezini bozmaktadır.

İlaç molekülleriyle DNA'nın etkileşmesi, özellikle de antikanserojen özelliğe sahip ilaç molekülleri ile olan etkileşim ve bu etkileşimin geliştirilen yeni yöntemlerle tayin edilmesi, hedef odaklı yeni ilaç tasarımları için oldukça önemlidir.

Birçok kanser ilacı DNA molekülleri ile etkileşmektedir. Bu etkileşimin bir kısmı kovalent bağlar yardımı ile gerçekleşirken bir kısmı ise interkalasyonda olduğu gibi kovalent olmayan etkileşimler ile gerçekleşir ve bu şekilde DNA-ilaç kompleksleri oluşur.

DNA yapısında bulunan büyük ve küçük oluklardaki DNA bazlarının alkilasyonuna öncülük ederek antitümör aktivite gösteren interaktif bir ajan olan TMZ, yan yana bağlı üç azot atomuna sahip tetrazinon halka sistemiyle birleşmiş bir imidazol halkasından oluşur. Bir imidazotetrazinon türevi olan TMZ, $C_6H_6N_6O_2$ kapalı formülüne ve 194,151g/mol molekül ağırlığına sahiptir.

Yapılan in vivo ve in vitro klinik öncesi çalışmaların gösterdiği gibi, TMZ molekülünün farklı tümör türlerine karşı etkili olduğu bilinmektedir.

Glioblastoma Multiforme (GBM) yetişkinlerde en sık karşılaşılan beyin tümörüdür. Hücre içi fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak meydana gelen mutasyonlar, radyasyon, kimyasal etmenler ya da ultraviyole gibi kanserojen ajanlara maruz kalma sonucunda normal yaşam döngüsünün dışına çıkan hücreler, kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmaya başlar ve tümör oluşumuna sebep olabilir. En sık karşılaşılan kanser türlerinden biri olan beyin kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Yetişkinlerde en çok karşılaşılan beyin tümörü olan Glioblastoma Multiforme (GBM) tedavisinde özellikle son yıllarda etkinliği araştırılan sitotoksik ajanlardan biri olan TMZ kullanılmaktadır. TMZ ile yapılan bilimsel çalışmalarda artışın en önemli nedeni, diğer sitotoksik ajanlara göre kan-beyin bariyerinde daha hızlı (%20) penetre olmasıdır.

TMZ'nin biyoyararlanımı %100'e yakındır ve kan beyin bariyerini kolayca geçerek, plazmada gözlenenin yaklaşık %40'ı düzeylerinde merkezi sinir sistemi konsantrasyonuna ulaşır. Bu durum aslında molekülün asitler karşısında stabil olması ve lipofilik özelliğine dayanmaktadır. Plazma yarı ömrü yaklaşık 1,8 saattir ve eliminasyonu esas olarak böbreklerde gerçekleşir. Oral uygulamayı takiben dozun ortalama %5-10'u 24 saat içinde idrarla değişmeden ve geriye kalanı ise 5-aminoimidazol-4- karboksamid veya tayin edilemeyen polar metabolitler şeklinde vücuttan atılır.

Klinik olarak kullanılabilir, yan etkileri en alt düzeye indirgenmiş bir ilaç sentezleyebilmek için hem ilacın etki mekanizmasının aydınlatılması hem de hücre ve ona özgü özelliklerin bilinmesi gerekir.

İlaç-DNA etkileşimlerini araştırmak için yoğunlukla spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemler kullanılmakla beraber, kromatografik yöntemlerden de yararlanılmaktadır.

Literatürlerde TMZ için yapılan elektrokimyasal çalışmalarda TMZ'nin ve bozunma ürünlerinin elektrokimyasal davranışları ve DNA ile etkileşimi incelenmiştir. Farmasötik formlarından miktar tayini için çoğunlukla spektroskopik yöntemler kullanılmıştır. TMZ ve metabolitlerinin, farmasötik formlarından ve biyolojik numunelerden miktar tayini için yapılan çalışmalarda kromatografik teknikler kullanılmıştır.

Hazırlanan bu tez çalışması kapsamında, yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK) yöntemi ile kanser tedavisinde kullanılan TMZ etken maddesinin farmasötik formundan miktar tayini yapılması ve DNA ile etkileşiminin belirlenmesi hedeflenmiştir. Etkileşimin belirlenmesi çalışmaları için YBSK metodunun yanı sıra UV-GB ve floresans gibi spektroskopik metotlar kullanılmıştır. Spektroskopik teknikler ile elde edilen sonuçlar, kromatografik analiz sonuçları ile karşılaştırılmış ve ilacın DNA'ya bağlanma katsayısı ve etkileşim türü belirlenmiştir.

Tez çalışmaları sırasında TMZ-DNA etkileşim çalışmaları ile TMZ miktar tayini metot validasyonu için aynı kromatografik şartlarda çalışılmıştır (Çizelge 4.1).

Kromatografik çalışmalar için ilk olarak kullanılacak hareketli fazın pH değerinin belirlenmesi amacıyla pH taramaları yapılmıştır. Asetat tamponu (pH 3,5-5,5), fosfat tamponu (pH 6,0-8,0), pH 9,0 borat tamponu 0,1 M HCl, 0,1 M NaOH ve deiyonize su kullanılarak elde edilen spektrumlarda en yüksek absorpsiyon değerine asetat tamponu kullanıldığında ulaşılmıştır. Bunun yanı sıra literatür bilgilerine dayanarak DNA'nın en stabil olduğu çözeltinin pH 4,5 asetat tamponu ve TMZ'nin de asidik pH'da (<5) stabil olması nedeniyle kromatografik çalışmalar için ideal hareketli fazın pH 4,5 asetat olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).

Hareketli faz çalışmalarının ikinci kısmında organik çözücü oranları optimize edilmiştir. Metanol ve asetonitril ile yapılan çalışmalarda, hareketli fazda metanol kullanıldığı zaman piklerde yarımlama gözlenmiştir. Ayrıca kuyruklanma faktörünün her iki molekül için de 2'den büyük olduğu ($T_{DNA}=3,43$ ve $T_{TMZ}=2,86$) gözlenmiştir. Metanol yerine asetonitril denendiğinde ise uygun pik simetrisine (DNA için 0,97 ve TMZ için 1,02) ve ayırma ($R_s=4,48$) sahip pikler elde edilmiştir. Organik faz oranının optimizasyonu için %10, %20 ve %30 asetonitril oranları denenmiştir. Organik faz oranı %10'un üzerine çıkarıldığında alıkonma süresi, DNA ve TMZ piklerinde ayırmanın yeterli olamayacağı kadar kısalmış (alıkonma süreleri DNA ve TMZ için sırasıyla 0,72 ve 0,93) ve piklerde kuyruklanma

($T_{DNA}=3,2$ ve $T_{TMZ}=2,9$) gözlenmiştir. Asetonitril oranı %10 olduğunda ise ayırımın iyileştiği ($R_s=4,59$) ve pik simetrilerinin (DNA için 0,98 ve TMZ için 1,06) düzeldiği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda hareketli faz olarak 0,02 M pH 4,5 asetat tamponu ve asetonitril (90:10, h/h) ile çalışılması uygun görülmüştür.

Hareketli faza karar verildikten sonra sabit faz seçimi için sıcaklık, akış hızı ve dalga boyu parametreleri sabit tutularak, optimize edilen hareketli faz ile literatür çalışmalarına dayanarak C8 ve C18 olmak üzere iki farklı kolonla deneme yapılmıştır. C8 kolonla yapılan çalışmalarda uygun ayırım elde edilememiştir ($R_s=1,16$). En uygun sonuçlar ACE C18 ($150 \times 4,6$ mm, 5 μ m) kolonu ($R_s=4,96$; DNA ve TMZ için simetri değerleri sırasıyla 0,98 ve 1,03) ile sağlanmıştır.

Sıcaklığın etkisini incelemek için 15 °C ve 40 °C arasındaki sıcaklık değerleri taranmıştır. Sıcaklığın hem ayırımı hem de pik simetrilerini büyük oranda etkilediği gözlenmiştir. 25 °C'nin altında yapılan analizlerde ayırımın ($R_s=1,11$) yeterli olmadığı ve pik simetrilerinin bozulduğu (DNA ve TMZ için simetri değerleri sırasıyla 1,85 ve 1,63), 35 °C'nin üzerinde yapılan çalışmalarda ise DNA pikinin yarıldığı ve ayırımın ($R_s=1,32$) kötüleştiği görülmüştür. 30 °C'de yapılan analizlerde ise $R_s=4,97$ ve pik simetrileri DNA ve TMZ için sırasıyla 0,97 ve 1,04 olarak belirlenmiştir. Uygun değerlerin elde edilmesi nedeniyle çalışma sıcaklığı olarak 30 °C seçilmiştir.

Kolon, dalga boyu ve sıcaklık parametreleri sabit tutularak akış hızının optimizasyonu için yapılan çalışmalarda, akış hızının rezolüsyonu çok fazla etkilemediği ancak alıkonma süresini büyük ölçüde değiştirdiği gözlenmiştir. Akış hızı olarak 0,8 ml/dk; 1 ml/dk ve 1,3 ml/dk denenmiş ve optimum sonuçlar 0,8 ml/dk'da elde edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen parametreler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Kullanılacak kromatografik yöntem parametrelerinin belirlenmesinin ardından yöntemin uygunluğunu belirlemek amacıyla, teorik plaka sayısı (N), kapasite faktörü (k'), kuyruklanma faktörü (T), ayırma gücü (R_s), simetri faktörü ve enjeksiyon kesinliği (BSS) parametrelerinin değerlendirildiği sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Elde edilen sistem uygunluk testlerine ait sonuçlar Çizelge 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.

Kullanılacak YBSK metodunun doğruluğu ve kesinliği kanıtlandıktan sonra, DNA-TMZ etkileşiminin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır.

Kromatografik olarak DNA-TMZ etkileşiminin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda ilk basamak olarak; beş farklı derişimde hazırlanan DNA ve TMZ çözeltileri YBSK sistemine enjekte edilmiştir. Hazırlanan DNA çözeltilerinin derişimleri $2,03 \times 10^{-6}$ M; $5,08 \times 10^{-6}$ M; $1,02 \times 10^{-5}$ M; $1,52 \times 10^{-5}$ M; $2,03 \times 10^{-5}$ M ve TMZ çözeltilerinin derişimleri de $5,2 \times 10^{-5}$ M; $1,3 \times 10^{-4}$ M; $2,6 \times 10^{-4}$ M; $3,9 \times 10^{-4}$ M; $5,2 \times 10^{-4}$ M'dır.

İkinci basamakta ise, ilk basamakta hazırlanan DNA ve TMZ çözeltileri ile iki farklı çözelti grubu hazırlanmıştır. Birinci çözelti grubunda; $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA çözeltisi üzerine, artan derişimlerde TMZ çözeltisi eklenmiştir. İkinci çözelti grubunda ise; $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ çözeltisi üzerine, artan derişimlerde DNA çözeltisi eklenmiştir.

Her bir çözelti grubundaki karışımlardan üçer paralel hazırlanmıştır. Bu iki çözelti grubuna (Çizelge 3.1) ait süre optimizasyonu çalışmaları için etkileşimin 1, 2, 3 ve 6. saat sonundaki kromatogramları incelenmiş ve elde edilen sonuçlara ait çizelgeler Çizelge 4.7 ve 4.9'da verilmiştir.

Birinci Grup Çözeltiler: $1,02 \times 10^{-5}$ M DNA çözeltisinin derişimi sabit tutularak artan derişimde TMZ çözeltilerinin eklenmesiyle 6.saat sonunda;

- DNA pikinin alan değerleri, TMZ derişimi arttıkça artmıştır.
- TMZ pikinin alan değerleri, başlangıçta elde edilen TMZ alanlarıyla karşılaştırıldığında, DNA ile olan etkileşim süresinin artışına bağlı olarak azalmıştır.
- Bilinmeyen pikin alan değerleri, DNA ile etkileşen TMZ derişiminin artışına bağlı olarak artmıştır.

İkinci Grup Çözeltiler: $2,6 \times 10^{-4}$ M TMZ çözeltisinin derişimi sabit tutularak artan derişimde DNA çözeltilerinin eklenmesiyle 6.saat sonunda;

- TMZ pikinin alan değerleri, TMZ ile etkileşen DNA derişiminin artışına bağlı olarak azalmıştır.

- Bilinmeyen pikin alan değerleri, TMZ ile etkileşen DNA derişiminin artışına bağılı olarak artmıştır.

Bağlanma katsayısının hesaplanması için hem kromatografik hem de spektroskopik yöntemlerde Benesi-Hildebrand eşitliğinden yararlanılmıştır. Denklemden A ile gösterilen değerler; kromatografik deneylerde alan değerleri, spektroskopik çalışmalarda ise absorbens değerleri olarak kullanılmıştır (Eşitlik 2.1).

$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\epsilon}{\epsilon - \epsilon_0} + \frac{\epsilon}{\epsilon - \epsilon_0} \times \frac{1}{K [DNA]}$$

Eşitlikte;

A_0 : TMZ'nin tek başına alan / absorbens değeri

A : TMZ'nin DNA ilavesi ile elde edilen alan / absorbens değeri

ϵ_0 : TMZ'nin 260 nm'deki tek başına absorptivite değeri

ϵ : TMZ'nin DNA ilavesi ile 260 nm'deki absorptivite değeri

K : Bağlanma katsayısı

Bu eşitlikten hareketle $1/[DNA] - A_0/(A-A_0)$ grafiğı oluşturulmuş (Şekil 4.18) ve doğru denklemi $y = -8,1 \times 10^{-5} x - 3,08$ ($r^2=0,9964$) olarak bulunmuştur. Elde edilen denklemden hareketle bağlanma katsayısı kromatografik çalışmalarda için $K = 3,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır

Etkileşimin kromatografik olarak belirlenmesinden sonra UV-GB ve floresans spektroskopisi kullanılarak etkileşimin belirlenmesi için yapılan kromatografik çalışma desteklenmiş ve TMZ molekülünün DNA'ya bağlanma katsayıları ve etkileşim türü belirlenmiştir.

Literatür çalışmalarında interkalasyon türü etkileşimlerde, aromatik düzlemsel moleküllerin kromofor grupları ile DNA'ya ait baz grupları arasındaki π - π etkileşimleri nedeniyle, ilacın

spektrumunda hipokromik (absorbans değerinde azalma) ve batokromik (kırmızıya kayma) etkinin gözlemlendiği gösterilmiştir. TMZ'nin düzlemsel yapısı nedeniyle DNA ile interkalatif olarak etkileştiği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan UV-GB çalışmalarında TMZ-DNA etkileşiminin belirlenmesi için spektrofotometrik titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için sabit derişimdeki TMZ çözeltisi üzerine belli hacimlerde DNA çözeltisi ilave edilmiştir. TMZ çözeltisinin tek başına ve her DNA çözeltisi ilavesinden sonra UV-GB spektrumları alınmıştır. Bu yöntemin uygulamasında, $8,32 \times 10^{-5}$ M TMZ çözeltisi üzerine son derişimleri $1,66 \times 10^{-6}$ M; $3,32 \times 10^{-6}$ M; $4,98 \times 10^{-6}$ M; $6,64 \times 10^{-6}$ M ve $8,3 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde DNA çözeltisi ilave edilmiş ve spektrumlar kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlarda TMZ'nin, 255 nm'deki absorbans pikine DNA'nın girişim yapmasından dolayı sadece 330 nm'deki absorbans değerindeki değişimler izlenmiştir.

TMZ molekülü 255 nm ve heterosiklik konjuge sistemin $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronik geçişine ait 330 nm'de iki maksimum dalgaboyuna sahiptir. DNA ilavesi ile 330 nm'deki pike ait absorbans değerinde azalma gözlenmesine rağmen batokromik kayma görülmemiştir. Bu durum etkileşimin interkalatif olduğunu ancak bağlanma yoğunluğunun orta düzeyde olduğunu düşündürmüştür. Bu çalışmaya ek olarak DNA çözeltisinin ilavesi ile oluşabilecek seyrelmenin etkisini incelemek için aynı derişimde TMZ çözeltisi sadece tampon çözelti ile titre edilmiştir. Elde edilen spektrumlardan hareketle TMZ'ye ait pik değerlerindeki azalmanın seyrelmeden değil DNA ile etkileşiminden kaynaklı olduğu görülmüştür. TMZ-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için UV-GB spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler, Çizelge 4.12'de gösterilmektedir.

Benesi-Hildebrand eşitiliği kullanılarak $1/[DNA] - A_0/(A-A_0)$ grafiği oluşturulmuş (Şekil 4.18) ve doğru denklemi $y = -1,93 \times 10^{-5} x - 0,4870$ ($r^2=0,9949$) olarak bulunmuştur. Elde edilen denklemden hareketle UV-GB çalışmaları için bağlanma katsayısı $K = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer TMZ-DNA etkileşiminin orta düzeyde interkalatif bağlanma olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak TMZ-DNA etkileşimi sadece interkalatif değil oyuk bağlanmanın da yer aldığı kompleks bir etkileşimdir.

DNA-TMZ etkileşiminin belirlenmesi için yapılması planlanan floresans çalışmasında hem DNA hem de TMZ'nin floresans özellik göstermemesi nedeniyle, dolaylı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem MM ve TMZ'nin DNA ile yarışmalı olarak bağlanmasına

dayanmaktadır. Çalışmada öncelikle MM'nin floresans spektrumu kaydedilmiştir. Uyarma dalga boyu olarak 665 nm kullanılarak 686 nm'deki emisyon şiddeti ölçülmüştür.

Floresans ölçümlerine geçmeden öncelikle MM'nin DNA ile bağlanma katsayısı UV-GB spektroskopik yöntem kullanılarak hesaplanılmıştır. Bu çalışma MM ve TMZ'nin DNA ile bağlanma katsayılarını karşılaştırmak için yapılmıştır. MM-DNA kompleksinin bağlanma katsayısının hesaplanması için son derişimi 1×10^{-5} M olan MM çözeltisi üzerine $8,13 \times 10^{-5}$ M DNA çözeltisinden artan hacimlerde eklenerek UV-GB spektrumları kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlarda MM'ye ait 247, 293 ve 665 nm'de pikler ve 329 nm ile 613 nm'lerde omuzlar görülmüştür. DNA'nın 247 ve 293 nm'lerdeki absorbans pikine girişim yapmasından dolayı sadece 665 nm'deki absorbans değerindeki değişimler izlenmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi DNA ilavesi ile bu dalga boyunda absorbans şiddetinde azalma ve daha uzun dalga boylarına kayma gözlemlenmiştir. Bu olay MM'nin DNA ile interkalatif olarak etkileştiğini göstermektedir. MM-DNA bağlanma katsayısının hesaplanması için UV-GB spektroskopi yöntemi ile elde edilen veriler, Çizelge 4.13'de gösterilmektedir.

Elde edilen verilerden hareketle Benesi-Hildebrand eşitliği kullanılarak MM-DNA için floresans çalışmalarından bağlanma katsayısı $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Floresans çalışması için 10^{-3} M MM çözeltisinden 12,5 µl küvete alınarak pH 4,5 asetat tamponuyla 2,5 ml'ye seyreltilmiş ve bu çözeltinin floresans spektrumu alınmıştır. Daha sonra bu çözelti üzerine $8,13 \times 10^{-5}$ M DNA çözeltisinden artan hacimlerde eklenerek floresans spektrumlarındaki değişim gözlemlenmiştir. Şekil 4.21'de görüldüğü gibi artan DNA derişiminde MM'ne ait floresans şiddetinde azalma gözlenmiştir.

Elde edilen floresans spektrumlarından hareketle çizilen Stern-Volmer grafiğinin (Şekil 4.23) denklemi $y = 1,47 \times 10^5 + 0,953$ olarak bulunmuş ve sönmüleme katsayısı $1,47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. UV-GB spektrumlardaki absorbans değerlerindeki azalmanın yanı sıra pik tepe değerlerinin daha uzun dalga boylarına kaymalarının gözlenmesi ve Stern-Volmer grafiğinin doğrusal olmasından dolayı ($r^2 = 0,9943$) sönmülemenin statik olduğuna karar verilmiştir.

TMZ-DNA etkileşim çalışmaları için en düşük sinyali veren MM-DNA karışım çözeltisi yeniden hazırlanmış ve üzerine 10^{-3} M'lık TMZ çözeltisinden artan hacimlerde eklenerek

floresans ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.24). MM-DNA kompleksinin üzerine TMZ çözeltisi ilavesi ile TMZ-DNA kompleksi oluşmasından dolayı serbest kalan MM molekülleri nedeniyle floresans şiddeti tekrar geri kazanılmıştır. Gözlenen bu etkinin TMZ-MM etkileşiminden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi için MM çözeltisi üzerine TMZ çözeltisi ilave edilmiş ancak MM'nin emisyon piki üzerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir. Bu durum TMZ'in MM ile direkt olarak etkileşmediğini, MM-DNA kompleksi ile etkileşerek TMZ-DNA kompleksini meydana getirdiğini göstermektedir.

TMZ, mitozolomid'in 3-metil analogudur ve Dakarbazin'e alternatif olarak sentezlenmiş ve yan etkilerinin daha az olmasından dolayı kullanılmaktadır. Her iki bileşikte sitotoksik etki göstermektedir. Bileşiklerin antitümör aktivitesi, yapılarındaki doğrusal triazin, 5-(3-metiltriazin-1-il)-imidazo-4-karboksamid, MTIC) grubundan kaynaklanmaktadır. DTIC, sitokrom p450 enzimi ile karaciğerde metabolik yolakla MTIC'ye dönerken TMZ fizyolojik pH'da (pH 6-7) hem *in-vivo* hem de *in-vitro* ortamda kimyasal olarak MTIC'e bozunur. Bozunma ürünü olan MTIC'de diğer iki molekül gibi Guaninin O6 ve N7 pozisyonundan alkilasyonla sitotoksik etki göstermektedir. Bu işlem sonucu MTIC kendisini 5(4)-aminoimidazol-4(5)-karboksiamid'e (AIC) dönüştürür. MTIC fizyolojik pH'da oda sıcaklığında stabil değilken AIC stabildir. Ancak TMZ pH<5 olduğu ortamda stabildir ve herhangi bir bozunma reaksiyonu göstermez. TMZ'nin kromatogramında gözlenen bilinmeyen pikinin bozunma ürünü olup olmadığını belirlemek için stok ilaç çözeltisi ve çalışma çözeltileri deiyonize su ile hazırlanmış ve altı saatlik süre boyunca yarım saatlik inkübasyon süreleri sonunda kromatogramları kaydedilmiştir. Bu çalışmanın yanı sıra yine benzer stok çözelti pH 4,5 asetat tamponu içerisinde hazırlanarak aynı süreler içerisinde kromatogramları alınmıştır. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde sulu çözeltilerde TMZ'nin bozunma ürünü oluşturduğu buna karşılık tampon çözeltisi içerisinde bu bozunmanın gerçekleşmediği görülmüştür. Su ile hazırlanan çözeltilerin kromatogramlarında her iki maddenin alıkonma sürelerinde değişiklik olmadan TMZ'ye ait pik alanında azalma olurken bilinmeyen türe ait pik alanında artma gözlenmiştir. Çalışma UV-GB spektroskopi yöntemi ile desteklenmiştir. Deiyonize su içerisinde hazırlanan ilaç çözeltisinin bir saatlik süre içerisinde spektrumları kaydedilmiş ve absorbans değerlerinde azalma olduğu görülmüştür. Literatür bilgilerinden ve DAD dedektörden elde edilen spektrumlar karşılaştırıldığında bilinmeyen türün TMZ'nin bozunma ürünü olan AIC olduğuna karar verilmiştir. İlaç-DNA etkileşim çalışmalarından elde edilen kromatogramlarda AIC'ye ait pik alanının etkileşim sonucu arttığı belirlenmiştir. İlaç derişimi sabit tutulup DNA derişiminin

arttırıldığı deney koşullarında TMZ'ye ait pik alanı azalırken AIC'ye ait pik alanı artmıştır (Şekil 4.11-4.15, Çizelge 4.9, 4.10). Kromatografik çalışma koşullarındaki pH değeri TMZ'in stabil olduğu ortamdır, bu nedenle ilaç pik alanındaki azalma ve AIC'ye ait pik alanındaki artma bozunma kaynaklı değil DNA ile etkileşim kaynaklıdır.

TMZ'nin farmasötik formundan miktar tayini de bu tezin kapsamı içerisinde yer almaktadır. Bu amaçla etkileşim çalışmaları sonucunda optimize edilen kromatografik şartlar kullanılarak etken maddenin kapsül formu içerisinde miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Öncelikle doğrusallık çalışması yapılmıştır. Artan derişimde enjekte edilen TMZ'nin elde edilen kromatogramlarından hareketle kalibrasyon grafiğı oluşturulmuş ve doğrusallık 5-100 µg/ml aralığında sağlanmıştır (Şekil 4.29). TS ve TAS değerleri 0,02 µg/mL ve 0,06 µg/ml'dir (Çizelge 4.26). Yöntemin kesinliğini belirlemek için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bunun için üç farklı derişimde TMZ çözeltisi hazırlanmış ve gün içi çalışmalarında art arda altı kez, günler arası çalışması için art arda üç gün yine altışar kez sisteme enjekte edilmiştir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarının bağıl standart sapma değerleri sırasıyla %0,12-0,03-0,04 ve %0,08-0,11-0,08 olarak bulunmuştur. Bu değerler geliştirilen yöntemin kesinliğini göstermektedir. Sağlamlık çalışmaları için organik faz oranları, pH, sıcaklık, akış hızı ve dalga boyundaki küçük değışikliklerin sinyale üzerindeki etkisi incelenmiştir. Organik faz optimizasyonunda %8-10-12 oranları, pH optimizasyonu için 4,3- 4,5- 4,7 değerleri, sıcaklık çalışması için 27- 30- 33 °C, akış hızı için 0,7- 0,8- 0,9 ml/dak değerleri denemiş ve tüm çalışmalarda alan değerleri arasında önemli farklılık gözlenmemiştir. Tüm çalışmalar için bağıl standart sapma değerleri %0,2'nin altındadır (Çizelge 4.19-4.25). Yöntem validasyonundan sonra TMZ'nin farmasötik formundan miktar tayini yapılmış ve sonuçlar %99,9 ile %100,5 arasında bulunmuş olup (Çizelge 4.27) etiket değeri ile uyumludur. Geliştirilen kromatografik yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Bunun için analizi yapılmış numune çözeltisi üzerine bilinen miktarlarda standart TMZ ilave edilmiş ve hazırlanan kalibrasyon doğrusu yardımı ile geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.28'de verildiğı gibi sonuçlar %98,9- 100,4- 99,7 olarak bulunmuştur. Bu değerler yöntemin doğru olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, DNA ile etkileşen çeşitli maddelerin özellikle kemoterapide kullanılan ilaçların etkileşim özelliklerinin belirlenmesi DNA'ya özgül olarak bağlanan moleküllerin dizaynı ve sentezi için büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla tez kapsamında geliştirilen kromatografik

ve spektroskopik yöntemler DNA ve TMZ'nin etkileşim mekanizmasının aydınlatılması için önemli rol oynamaktadır.





KAYNAKLAR

1. Can, G., (2005). Side effects of antineoplastic drugs and nursing approaches. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, 2(2), 8-15.
2. Suggitt, M., Bibby C. (2005). 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. *Clinical Cancer Research*, Vol. 11, 971–981.
3. Apetoh, L., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Kroemer, G., Zitvogel, L. (2008). A molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Research*, 68 (11), 4026-4030.
4. Brett, A.M.O., Diculescu, V., Piedade J.A.P. (2002). Electrochemical oxidation mechanism of Guanine and Adenine using a glassy carbon microelectrode. *Bioelectrochem.* 55, 61-62.
5. Krukiewicz, K., Jarosz, T., Zak, J., Lapowski, M., Ruszkowski, P., Kozłowska, T., Cwynar, B. (2015). Advancing the delivery of anticancer drugs: Conjugated polymer/triterpenoid composite. *Acta Biomaterialia*, 19, 158–165.
6. Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey S, J., Souverain, F. (2011). Analysis of anticancer drugs. *Talanta*, 85, 2265-2289.
7. Shewach, D. (2009). Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chemical Reviews*, Vol. 109 (7), 2859-2861.
8. Selimoğlu, M., Kasap, M., Akpınar, G, Karadenizli, A. (2016). Yesterday, today and the future of monoclonal antibody technology. *Journal of Health Sciences of Kocaeli University*, 2(1), 6-14.
9. Villarini, M., Gianfredi, V., Levorato, S., Vannini, S., Salvatori, T., Moretti, M., (2016). Occupational exposure to cytostatic/antineoplastic drugs and cytogenetic damage measured using the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Mutation Research*, 770(A), 35-45.
10. Qiao, B., Schymura, M., Kahn, A. (2016). Effects of the length of central cancer registry operations on identification of subsequent cancers and on survival estimates. *Cancer Epidemiology*, 44, 52-58.
11. Phoa, A., Browne, S., Gurgis, F., Akerfeldt, M., Döbber, A., Renn, C., Peifer, C., Stringer, B., Day, B., Wong, C., Chircop, M., Johns, T., Kassiou, M., Munoz, L. (2015). Pharmacology of novel small-molecule tubulin inhibitors in glioblastoma cells with enhanced EGFR signalling. *Biochemical Pharmacology* 98, 587-601.
12. Lasocki, A., Gaillard, F., Tacey, M., Drummond, K., Stuckey, S. (2016). Multifocal and multicentric glioblastoma: Improved characterisation with FLAIR imaging and prognostic implications. *Journal of Clinical Neuroscience* 31, 92-98.
13. Younis, S., Khedr, R., Shorbagy, S. (2016). Immunohistochemical analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression as prognostic

- marker in glioblastoma patients treated with radiation therapy with concomitant and adjuvant Temozolomide. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 28, 23-30.
14. Lee, S. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3(3), 198-210.
 15. Ma, W., An, Y., Zhou, C., Bo, C., Zhang, G. (2016). Effects of Temozolomide and radiotherapy on brain metastatic tumor. *World Neurosurgery*, 92, 197-205.
 16. Wang, Z., Hu, P., Tang, F., Lian, H., Chen, X., Zhang, Y., He, X., Liu, W., Xie, C. (2016). HDAC6 promotes cell proliferation and confers resistance to Temozolomide in glioblastoma. *Cancer Letters*, 379, 134-142.
 17. Wei, J., Zhou, R., Peng, Y., Liu, Y. (2013). Studies on the binding properties of Temozolomide with DNA. *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 25, No. 5, 2597-2600.
 18. Aroon, W., Ruangpornvisuti, V., Amornkitbamrung, V. (2016). Tautomeric transformation of Temozolomide, their proton affinities and chemical reactivities: A theoretical approach. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 66, 76-84.
 19. Newlands, E., Stevenst, M., Wedge, S., Wheelhouse, R., Brock, C. (1997). Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatments Reviews*, 23, 35-61.
 20. Denny, B., Wheelhouse, R., Stevens, M., Lincoln, L., Slack, J. (1994). NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug Temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry*, 33, 9045-9051.
 21. Lowe, R., Sansom, C., Schwalbe, C., Stevens, M., Clark, A. (1992). Antitumor Imidazotetrazines. 25.l crystal structure of 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3h)-one(temozolomide) and structural comparisons with the related drugs Mitozolomide and DTIC. *J. Med. Chem.*, 35, 3372-3382.
 22. Becker, J., Bröcker, E., Kampgen, E. (2000). Classical chemotherapy for metastatic melanoma. *Clin Exp Dermatol*, 25, 503-508.
 23. Etlin, O., Alnabari, M., Sery, Y., Danon, E., Arad, O., Kaspi, J. (2006). Process for preparing Temozolomide. *United States Patent Application Publication*, 0183898, 1-8.
 24. Darkes, M., Plosker, G., Jarvis, B. (2002). Temozolomide: A Review of its use in the treatment of Malignant Gliomas, Malignant Melanoma and other advanced cancers. *Am J. Cancer*, 1(1), 55-80.
 25. Kasende, O., Matondo, A., Muzomwe, M., Muya, J. (2014). Interaction between Temozolomide and water: Preferred binding sites. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1034, 26-31.
 26. Vorobiev, S., Gensler, Y., Movahed, H., Seetharaman, J., Su, M., Huang, J., Xiao, R., Kornhaber, G., Montelione, G., Tong, L., Ebright, R., Nickels, B. (2014). Structure of the DNA-binding and RNA polymerase-binding region of transcription antitermination factor λ Q. *NIH Public Access*, 22(3), 488-495.

27. Lopes, I., Oliveira, S., Brett, A. (2013). Temozolomide chemical degradation to 5-aminoimidazole-4-carboxamide – electrochemical study. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 704, 183-189.
28. Altay, C., Eksin, E., Congur, G., Erdem, A. (2015). Electrochemical monitoring of the interaction between Temozolamide and nucleic acids by using disposable pencil graphite electrodes. *Talanta*, 144, 809-815.
29. Ghalkhani, M., Fernandes, I., Shahrokhian, S., Shahrokhian, S., Oliveira-Brett, A. M. (2010). Electrochemical redox behaviour of Temozolomide using a glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 2633-2640.
30. Madhu, M., Raj, N., Swathi, V., Yasmeen, R., Ishaq, B. (2014). Development and validation of uv spectroscopic method for the estimation of Temozolomide in capsule dosage form. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 5(8), 701-705.
31. Razak, A., Omshanthi, B., Suresh, V., Obulamma, P. (2013). Development and validation of uv method of Temozolomide in bulk and capsule formulation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(4), 1419-1423.
32. Ishaq, B., Ahad, H., Muneer, S., Parveen, S., Fahmida, B. (2014). Analytical method development and validation for the estimation of Temozolomide in phosphate buffer in pH 2.0 as a solvent by UV spectroscopy. *International Research Journal of Pharmacy*, 5(1), 17-20.
33. Sankar, D., G., Latha, P. V. M., Kumar, B. A., Babu, P. J. (2007). UV spectrophotometric determination of Temozolomide and Gemcitabine. *Asian Journal of Chemistry*, 19 (2), 1605-1607.
34. Khan, A., Imam, S., Aqil, M., Sultana Y., Ali, A., Khan, K. (2016). Design of experiment based validated stability indicating RP-HPLC method of Temozolomide in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 402-408.
35. Chowdhury, S., Laudicina, D., Blumenkrantz, N., Wirth, M., Alton, K. (1999). An LC:MS:MS method for the quantitation of MTIC (5-(3-N-methyltriazene-1-yl)-imidazole-4-carboxamide), a bioconversion product of Temozolomide, in rat and dog plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19, 659-668.
36. Gilant, E., Kaza, M., Szlagovska, A., Byczak, K., Rudzki, P. (2012). Validated HPLC method for determination of Temozolomide in human plasma. *Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research*, 69 (6), 1347-1355.
37. Rao, A., Ramesh, G., Rao, J. (2010). RP-HPLC analysis of Temozolomide in pharmaceutical dosage forms. *Asian Journal of Chemistry*, 22(7), 5067-5071.
38. Shen, F., Decosterd, L.A., Gander, M., Leyvraz, S., Biollax, J., Lejeune, F. (1995). Determination of Temozolomide in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Appl.*, 19, 291-300.

39. Kim, H.K., Lin, C.C., Parker, D., Veals, J., Lim, J., Likhari, P., Statkevich, P., Marco, A., Nomeir, A.A. (1997). High-performance liquid chromatographic determination and stability of 5-(3-methyltriazene-1-yl)-imidazo-4-carboximide, the biologically active product of the antitumor agent temozolomide, in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* , 703(1-2), 225-233.
40. Swift, L., Golsteyn, R. (2014). Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 3403-3431.
41. Goud, E., Sivaramakrishna, A., Vijayakrishna, K., Rao, C., Khedkar, V., Jha, P. (2017). Synthesis, structure and DNA interaction studies of bisphosphoramides: Theoretical and experimental insights. *Inorganica Chimica Acta*, 461, 84-91.
42. Ng, H., Ng, M., Eng, C., Gao, Z. (2016). Deoxyribonucleic acid glycosylase assays: Progress and prospects. *Trends in Analytical Chemistry*, 83, 102-115.
43. Kamal, S., Ripon, S., Dey, N., Ashour, A., Santhi, V. (2016). A Map Reduce approach to diminish imbalance parameters for big deoxyribonucleic acid dataset. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 131, 191-206.
44. Zhu, K., Hu, X., Ge, Q., Sun, Q. (2014). 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*, 812, 199-205.
45. Chelton, E., Jones, A., Walker, R. (1968). The chemical composition of the nucleic acids and the proteins of some mycoplasma strains. *J. gen. Microbiol.*, 50, 305-312.
46. Lerman, L. (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.*, 3, 18-30.
47. Kamanetskii, M., Prakash, S. (2014). Fluctuations in the DNA double helix: A critical review. *Physics of Life Reviews* 11, 153-170.
48. Perez, S., Cabrera, E., Amoedo, H., Acebes, S., Koundrioukoff, S., Debatisse, M., Mendez, J., Freire, R. (2016). USP37 deubiquitinates CdTI and contributes to regulate DNA replication. *Molecular Oncology*, 10, 1196-1206.
49. Kuetch, V. (2016). An initio bubble-driven denaturation of double-stranded DNA: self-mechanical theory. *Journal of Theoretical Biology*, 401, 15-29.
50. Sammriski, E., Schwartz, D., Pablo, J. (2009). A mesoscale model of DNA and its renaturation. *Biophysical Journal*, Vol. 96, 1675-1690.
51. Lin, Y., Chan, K., Huang, C., Wei, K. (2016). Non-invasive focused ultrasound-based synergistic treatment of brain tumors. *Journal of Cancer Research and Practice*, 3, 63-68.
52. Yunus, G., Srivastava, S., Kuddus, M, Gupta, V. (2013). Drug DNA interaction: A theoretical study on the binding of thionine with DNAs of varying base composition. *Current Applied Physics*, 13, 322-326.

53. Sirajuddin, M., Ali, S., Badshah, A. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1-19.
54. Watson, J., Crick, W. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature Lond*, 171,737-738.
55. Alberti, E., Zampakou, M., Donghi, D. (2016). Covalent and non-covalent binding of metal complexes to RNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 163, 278-291.
56. Rajendiran, V., Palaniandavar, M., Periasamy, V., Akbarsha, M. (2012). New [Ru(5,6-dmp/3,4,7,8-tmp)2(diimine)]²⁺ complexes: Non-covalent DNA and protein binding, anticancer activity and fluorescent probes for nuclear and protein components. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 116, 151-162.
57. Karacan, P., Okay, O. (2013). Ethidium bromide binding to DNA cryogels. *Reactive & Functional Polymers*, 73, 442-450.
58. Mukherjee, A., Chaudhuri, T., Moulik, S., Banerjee, M. (2016). Internal charge transfer based ratiometric interaction of anionic surfactant with calf thymus DNA bound cationic surfactant: Study I. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 152, 1-7.
59. Hasanzadeh, M., Shadjou, N. (2016). Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug–DNA interaction. *Materials Science and Engineering*, C 61, 1002-1017.
60. Top, M., Er, O., Congur, G., Erdem, A., Lammrecht, F. (2016). Intracellular uptake study of radiolabeled anticancer drug and impedimetric detection of its interaction with DNA. *Talanta*, 160, 157-163.
61. Zareh, M., Gholami, S. (2014). Soft and hard multiway FRET-based investigation of interaction between drug and QD labeled DNA. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 139, 33-41.
62. Kara, H. (2014). Redox mechanism of anticancer drug idarubicin and in-situ evaluation of interaction with DNA using an electrochemical biosensor. *Bioelectrochemistry*, 99, 17-23.
63. Temerk, Y., İbrahim, M., İbrahim, H., Kotb, M. (2015). Interactions of an anticancer drug Formestane with single and double stranded DNA at physiological conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149, 27-36.
64. Tian, X., Song, Y., Dong, H., Ye, B. (2008). Interaction of anticancer herbal drug berberine with DNA immobilized on the glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 73, 18-22.
65. Erdem, A., Güngör, G. (2013). Impedimetric detection of in situ interaction between anti-cancer drug bleomycin and DNA. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 295-301.

66. Diculescu, V., Brett, A. (2016). In situ electrochemical evaluation of dsDNA interaction with the anticancer drug danusertib nitrenium radical product using the DNA-electrochemical biosensor. *Bioelectrochemistry*, 107, 50-57.
67. Agarwal, S., Jangir, D., Mehrotra, R. (2013). Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 120, 177-182.
68. Bhattacharyya, J., Basu, A., Kumar, G. (2014). Intercalative interaction of the anticancer drug mitoxantrone with double stranded DNA: A calorimetric characterization of the energetics. *J. Chem. Thermodynamics*, 75, 45-51.
69. Karikas, A., Kokotou, V., Magrioti, V., Kokotos, G. (2000). Study of DNA interactions with melphalan, busulphan, and analogues using an hplc method. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 23(12), 1859–1864.
70. Shabana, A., Butler, I., Gilson, D., Claude, B., Mouhri, Z., Mostafa, M., Mostafa, S. (2014). Synthesis, characterization, anticancer activity and DNA interaction studies of new 2-aminobenzothiazole complexes; crystal structure and DFT calculations of [Ag(Habt)₂]ClO₄. *Inorganica Chimica Acta*, 423, 242-255.
71. Ertaş, N., Kara H. E. (2015). L-cysteine capped Mn-doped ZnS quantum dots as a room temperature phosphorescence sensor for in-vitro binding assay of Idarubicin and DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, 70 (345-350).
72. Snyder, L., Dolan, J. (2013). *High performance liquid chromatography: advances and perspectives*, vol. 3. New York: Academic Press, 1983, 157.
73. Consden, R., Gordon, A. H., Martin, A. J. (1944). Introduction to chromatography. *Biochem. J.*, 38, 224.
74. Petryka, Z. (1983). High performance liquid chromatography of porphyrins. *Advances in Chromatography*, 22(215), 246.
75. Rao, B., Balke, S., Morey, T., Schunk, T. (1966). Methylcyclohexane as a new eluting solvent for the size exclusion chromatography of polyethylene and polypropylene at 90°C. *J. Chromatogr.*, 755, 27-35.
76. Cheruthazhekatt, S. Pasch, H. (2015). High temperature size exclusion liquid adsorption chromatography (HT-SECeLAC): Full isocratic separation of parent isotactic polypropylene homopolymer from ethylene-propylene copolymers. *Polymer*, 64, 1-7.
77. Nesterenko, E., Nesterenko, P., Paull B. (2008). Anion-exchange chromatography on short reversed-phase columns modified with amphoteric (N-dodecyl-N, N-dimethylammonio) alcanoates. *J Chromatogr A*, 1178, 60-70.
78. Zhang, B., Li, X., Yan, B. (2008). Advances in HPLC detection towards universal detection. *Anal Bioanal Chem*, 390, 299-301.
79. Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P., Sharma P.K. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5), 22-26.

80. Jeanes, A., Wise, C. S., Dimler, R. J. (1951). Paper chromatographic apparatus and techniques. *Anal, Chem.*, 23, 415.
81. Cerny, V., Joska, J., Labler, L. (1961). Thin layer chromatography. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 26, 1658.
82. Segura, T., Lapasio, J., Bolsico, O., Coque, G. (2016). Stationary phase modulation in liquid chromatography through the serial coupling of columns: A review. *Analytica Chimica Acta*, 923, 1-23.
83. Skoog, West, Holler, Crouch, (2004). *Analitik Kimya Temel İlkeler* (Çev. E. Kılıç ve H. Yılmaz). Ankara: Bilim Yayıncılık., 978.
84. Rieux, L., Sneekes, E., Swart R. (2011). Nano LC: Principles, evolution, and state-of-art of the technique. *LC-GC North America*, 29, 926-934.
85. Petritis, K., Chaimmault, P., Elfakir, C., Dreux, M. (2000). Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 896, 253-263.
86. Harris, D. (2006). *Quantitative Chemical Analysis*. 7 nd ed. New York: W. H. Freeman and Comp; 556-587.
87. Wang, M., Mallette, J., Parcher, J. (2008). Strategies for the determination of the volume and composition of the stationary phase in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1190, 1-7.
88. Zacharis, C., Tzanavaras, P. (2013). Liquid chromatography coupled to on-line post column derivatization for the determination of organic compounds: A review on instrumentation and chemistries. *Analytica Chimica Acta*, 798, 1-24.
89. Majors, R., Przybyciel, M. (2002). Columns for reverse-phase LC separations in highly aqueous mobile phases. *LC-GC North America*, 20, 584-593.
90. Hanekamp, H., Boss, P., Frei, R. (1982). Liquid chromatography detectors. *Trends in Anal. Chem*, 1(135), 20,22.
91. Rozet, E., Ceccato, A., Hubert, C., Ziemons, E., Oprean, R., Rudaz, S. (2007). Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A*, 1158, 111-125.
92. Shabir, G. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987, 57-66.
93. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (2015). *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. New Hampshire: U.S. FDA.
94. ICH Harmonised tripartite guideline. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).

95. Pelillo, M., Bonoli, M., Biguzzi, B., Bendini, A., Toschi, T., Lercker, G. (2004). An investigation in the use of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the quantification of tea catechins. *Food Chemistry*, 87, 465-470.
96. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (1996). *Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*.
97. Monks, K., Molna, I., Rieger, H., Bogati, B., Szabo, E. (2012). Quality by design: multidimensional exploration of the design space in high performance liquid chromatography method development for better robustness before validation. *J Chromatogr A*, 1232, 218-230.
98. U.S. Food and Drug Administration. (2001). *Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry. Bioanalytical method validation* Washington, DC: U.S. FDA.
99. Owen, T. (1996). *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*. (First Edition). Germany: Hewlett-Packard Company, 10-20.
100. Wheate, N.J., Brodie, C. R., Collins, J. G., Kemp, S., Aldrich-Wright J. R. (2007). DNA intercalators in cancer therapy: Organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 627-648.
101. Aleksic, M. M., Kapetanovic, V. (2014). An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA-drug interactions. *Acta Chim. Slov.*, 555-573.
102. Nafisi, S., Saboury, A. A., Keramat, N., Neault, J. F., Tajmir-Riahi, H. A. (2007). Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, 35-43.
103. Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Third Edition). USA: Springer, 1-10.
104. You, C., Garcia, I., Martinez, F., Colon, C. (2017). Luminescence properties of $\text{AgTb}(\text{WO}_4)_2$ doped with Ce^{3+} : Experimental determination of the Stern-Volmer quenching constant. *Ceramics International*, 43, 6163-6167.
105. Geethanjali, H., Nagaraja, D., Melavanki, R., Kusanur, R. (2015). Fluorescence quenching of boronic acid derivatives by aniline in alcohols – A Negative deviation from Stern–Volmer equation. *Journal of Luminescence*, 167, 216-221.
106. Friedl, F., Krah, N., Jahne, B. (2015). Optical sensing of oxygen using a modified Stern–Volmer equation for high laser irradiance. *Sensors and Actuators B*, 206, 336-342.
107. Kuypers, N., James, K., Enzmann, G., Magnuson, D., Whitteemore, S. (2013). Functional consequences of ethidium bromide demyelination of the mouse ventral spinal cord. *Experimental Neurology*, 247, 615-622.
108. Dhiman, N., Singh, A., Verma, N., Ajaria, N., Patnaik, S. (2017). Statistical optimization and artificial neural network modeling for acridine orange dye degradation using in-situ synthesized polymer capped ZnO nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 493, 295-306.

109. Khalilian, M., H., Mirzaei, S., Taherpour, A., A. (2016). The simulation of UV spectroscopy and electronic analysis of temozolomide and dacarbazine chemical decomposition to their metabolites. *J. Mol Model*, 22: 270.





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Kapçak, Evin
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 05.02.1983 / Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0544 564 6475
e-mail : evinkapcak@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı	2011
Lisans	Fen-Edebiyat Fakültesi	2007
Lise	Cumhuriyet Lisesi (3+1)	2001

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
4	Drogsan İlaçları A.Ş.	Ar-Ge Uzmanı

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

