

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HYPERICUM MONTBRETII SPACH. BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN RUTİN,
KUERSİTRİN VE MİRİSİTRİN FLAVANOİDLERİNİN DNA İLE
ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU ATABEY ÖZDEMİR

HAZİRAN 2019

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HYPERICUM MONTBRETII SPACH. BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN RUTİN,
KUERSİTRİN VE MİRİSİTRİN FLAVANOİDLERİNİN DNA İLE
ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Burcu ATABEY ÖZDEMİR

DANIŞMAN: Doç. Dr. Burak ÇOBAN

ZONGULDAK
Haziran 2019

KABUL:

Burcu tarafından hazırlanan “*Hypericum Montbretii* Spach. Bitkisinden Elde Edilen Rutin, Kuersitrin ve Mirisitrin Flavanoidlerinin DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir.
31/05/2019

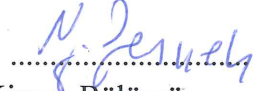
Danışman: Doç. Dr. Burak ÇOBAN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü



Üye : Doç. Dr. Zühal GERÇEK

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Senem AKKOÇ

Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../..../2019



Prof. Dr. Ahmet ÖZARSLAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”



Burcu ATABEY ÖZDEMİR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HYPERICUM MONTBRETII SPACH. BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN RUTİN, KUERSİTRİN VE MİRİSİTRİN FLAVANOİDLERİNİN DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Burcu ATABEY ÖZDEMİR

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Burak ÇOBAN

Haziran 2019, 107 sayfa

Hypericum Montbretii bitkisinden izole edilen rutin, kuersitrin ve mirisitrin flavonoidleri ve bunların metal komplekslerinin DNA ile etkileşim yolları UV spektroskopisi, floresans spektroskopisi, agaroz jel elektroforezi ve viskozimetri yöntemleri kullanılarak incelendi. Flavonoidlerin tek başlarına DNA ile etkileştiği ancak bu etkileşimin oldukça düşük seviyede olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlar, flavonoidlerin DNA ile interkalasyon ya da kısmi interkalasyon şeklinde etkileştiğini gösterdi. Flavonoidlerin DNA ile bağlanma kuvvetleri sırasıyla mirisitrin > kuersitrin > rutin şeklinde UV titrasyon ve floresans spektroskopisinde belirlendi. Ayrıca flavonoidlerin, DNA’da meydana gelen herhangi bir hasarı önleyici etki gösterebildiği agaroz jel elektroforezi sonuçlarında açıkça görüldü. DNA’da meydana gelen peroksit kaynaklı hasarı, her üç flavonoidin de giderdiği gözlemlendi.

ÖZET (devam ediyor)

Metallerle kompleks oluşturması sağlanan flavonoidler ise, serbest flavonoidlere oranla DNA ile çok daha iyi bir şekilde etkileşti. Hem UV spektroskopisi hem de floresans spektroskopisi denemelerinden elde ettiğimiz sonuçlar, bu etkileşimlerin interkalasyon ve metallerden kaynaklı olarak elektrostatik dış bağlanma şeklinde olduğunu gösterdi. En yüksek bağlanma sabitine mirisitrin-Cu⁺² kompleksinde ulaşıldı. Bu kompleksin yapısının DNA’da baz dizilerinin arasına girmeye daha müsait olması ilave hidroksil grubundan kaynaklanabilir. Flavonoidlerden farklı olarak komplekslerin, DNA’da meydana gelen hasar üzerinde herhangi bir iyileştirici etkileri olmadığı aksine bazı durumlarda hasarı arttırdıkları jel elektroforez sonuçlarında gözlemlendi.

Elde edilen sonuçlar ışığında her üç flavonoidin de DNA ile interkalasyon yoluyla etkileştiği ancak flavonoid-metal komplekslerinin DNA ile çok daha güçlü şekilde etkileştiği belirlenmiştir. Flavonoidlerin, DNA’da oluşan hasarı giderici etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Flavonoid, Rutin, mirisitrin, kuersitrin, flavonoid-kompleks, interkalasyon

Bilim Kodu: 405.05.00

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE INTERACTIONS OF RUTIN, QUERCITRIN AND MYRICITRIN FLAVANOIDES FROM THE PLANT *HYPERICUM MONTBRETII* SPACH. WITH DNA

Burcu ATABEY ÖZDEMİR

**Zonguldak Bülent Ecevit University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Burak ÇOBAN

June 2019, 107 Pages

Interactions of rutin, quercitrin and myricitrin flavonoids isolated from the *Hypericum montbretii* plant and their metal complexes with DNA were examined using UV-vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, agarose gel electrophoresis and viscometry. The results showed that the flavonoids interact with DNA in the form of intercalation or partial intercalation. The binding of the flavonoids with DNA were determined by UV titration and fluorescence spectroscopy as follows myricitrin> quercitrin> rutin. In addition, agarose gel electrophoresis results clearly showed that flavonoids could prevent any damage to DNA. It was observed that all three flavonoids inhibited the peroxide induced damage in DNA.

Flavonoids in the presence of metals interacted with DNA much better than free flavonoids. The results we obtained from both UV spectroscopy and fluorescence spectroscopy experiments showed that these interactions were caused by intercalation and

ABSTRACT (continued)

electrostatic external binding by cationic metals. The highest binding constant was reached in the Myricitrin-Cu⁺² complex. The fact that the structure of this complex is more suitable to enter between the base pairs of the DNA may result from the additional hydroxyl group. Unlike flavonoids, the complexes were observed in the gel electrophoresis results in which they did not have any curative effects on DNA damage but in some cases increased damage.

In the light of the results obtained, it was determined that all three flavonoids interacted with DNA by intercalation but flavonoid-metal complexes interacted more strongly with DNA. Flavonoids have been observed to have inhibitory effects on DNA damage.

Key Words: Flavonoid, rutin, myricitrin, quercitrin, flavonoid-metal complexes, intercalation.

Science Code: 405.05.00

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde, bilgi birikimini, teşvik ve hoşgörüsünü esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Burak ÇOBAN'a, laboratuvar çalışmalarım süresince yardımını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Ufuk YILDIZ'a şükranlarımı sunar, teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışmaya maddi kaynak sağlayan Z.B.E.Ü Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL:	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
 BÖLÜM 1 GİRİŞ	 1
1.1 FLAVONOİDLER	1
1.1.1 Flavonoid-Metal Kompleksleri	5
1.1.2 Flavonoidlerin Yapısı.....	8
1.1.3 Flavonollar	10
1.1.3.1 Kuersetin	10
1.1.3.2 Rutin	15
1.1.3.3 Mirisetin	16
1.2 DNA	19
1.2.1 DNA'nın yapısı	20
1.2.2 DNA'nın farklı şekilleri	22
1.3 KÜÇÜK MOLEKÜLLERİN DNA İLE ETKİLEŞİM YOLLARI	25
1.3.1 Elektrostatik Etkileşim.....	26
1.3.2 İnterkalasyon.....	27
1.3.3 Oluk Bağlayıcılar	30
1.3.4 Geçiş Metali ve Geçiş Metali Komplekslerinin DNA İle Etkileşim Yolları	34
1.4 ANALİTİK YÖNTEMLER	35
1.4.1 UV Titrasyon Yöntemi	35

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	Sayfa
1.4.2 Floresans Spektroskopisi	40
1.4.3 Elektroforez.....	44
1.4.4 Viskozimetri.....	47
 BÖLÜM 2 MATERYAL VE METOD.....	 51
2.1 MATERYALLER	51
2.1.1 Çözücü Kimyasallar.....	51
2.1.2 Kullanılan Cihazlar	52
2.2 UV TİTRASYONU	52
2.3 FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ	55
2.3.1 Komplekslerin Floresans Spektroskopisi.....	55
2.3.2 EtBr ile Yarışmalı Floresans	56
2.4 VİSKOZİTE ÇALIŞMALARI.....	57
2.5 AGAROS JEL ELEKTROFOREZ	57
 BÖLÜM 3 SONUÇLAR.....	 59
3.1 UV TİTRASYON SONUÇLARI.....	59
3.2 YARIŞMALI FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ SONUÇLARI	68
3.3 ELEKTROFOREZ ÇALIŞMA SONUÇLARI	73
3.3.1 Rutin ve Rutin-Cu ²⁺ komplekslerinin Jel Elektroforez Sonuçları.....	73
3.3.2 Kuersitrin ve Kuersitrin-Cu ²⁺ Komplekslerinin Jel Elektroforez Sonuçları.....	76
3.3.3 Mirisitrin ve Mirisitrin-Cu ²⁺ komplekslerinin jel elektroforez sonuçları.....	78
3.4 VİSKOZİTE ÇALIŞMA SONUÇLARI	80
 BÖLÜM 4 TARTIŞMA VE SONUÇ	 83
4.1 UV-vis SPEKTROSKOPİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	83
4.2 FLORESANS SPEKTROSKOPİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	86
4.3 ELEKTROFOREZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	88

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
4.4 VİSKOZİTE ÇALIŞMA SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	90
4.5 SONUÇ.....	92
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ	107





ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Metallerin flavonoidlere bağlanma noktaları.....	7
Şekil 1.2 Flavonoid İskeleti.....	8
Şekil 1.3 Flavonol iskeleti.....	10
Şekil 1.4 Kuersetin.....	11
Şekil 1.5 Kuersetin Metal Komplekslerinin Yapısı.....	12
Şekil 1.6 Kuersetin -Zn kompleksi oluşum şeması.....	12
Şekil 1.7 Kuersetin-Zn kompleksinin DNA'yı parçalama mekanizması.....	13
Şekil 1.8 Kuersetin-Cu kompleksinin DNA'yı parçalama mekanizması.....	14
Şekil 1.9 Kuersitrin (Kuersetin-3-O-glukoz) yapısı.....	15
Şekil 1.10 Rutin Yapısı.....	15
Şekil 1.11 Rutinin DNA ile etkileşim bölgesi.....	16
Şekil 1.12 Mirisitrin Yapısı.....	17
Şekil 1.13 <i>Hypericum perforatum</i>	18
Şekil 1.14 DNA da bulunan bazların yapıları.....	19
Şekil 1.15 DNA daki majör ve minör oluklar.....	21
Şekil 1.16 DNA'daki baz eşleşmeleri.....	21
Şekil 1.17 DNA'nın yapısı.....	22
Şekil 1.18 DNA türleri.....	23
Şekil 1.19 DNA'nın Replikasyonu.....	24
Şekil 1.20 DNA'nın Transkripsiyonu.....	24
Şekil 1.21 DNA'ya bağlanma çeşitleri.....	25
Şekil 1.22 Elektrostatik Dış Bağlanma.....	26
Şekil 1.23 Elektrostatik Dış Bağlanma.....	26
Şekil 1.24 İnterkalasyon.....	27
Şekil 1.25 İnterkalasyon.....	27
Şekil 1.26 Et-Br'nin yapısı ve DNA'ya bağlanma şekli.....	28
Şekil 1.27 Proflavinin Yapısı.....	29
Şekil 1.28 Proflavinin DNA ya Bağlanma şekli.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.29 Doksorubisin ve Daunorubisin yapıları	29
Şekil 1.30 Daunorubisin DNA'ya bağlanma şekli	30
Şekil 1.31 Aktinomisin yapısı ve DNA'ya bağlanma şekli	30
Şekil 1.32 DNA üzerindeki Majör ve Minör oluklar	31
Şekil 1.33 Oluk bağlayıcılar	31
Şekil 1.34 Netropsin ve Distamin yapısı	32
Şekil 1.35 Netropsinin DNA'ya bağlanma şekli	32
Şekil 1.36 Hoechst Boyasının yapısı	33
Şekil 1.37 DNA'ya oluk bağlanma şekli	33
Şekil 1.38 Dinemisinin yapısı	33
Şekil 1.39 Dinemisinin DNA üzerindeki etkisi	34
Şekil 1.40 a-Hiperkromizm b-Hipokromizm	36
Şekil 1.41 Sabit madde derişimi üzerine DNA konsantrasyonu artırılarak absorbsiyon grafiğinde meydana gelen değişimler	37
Şekil 1.42 $[\text{Co}(\text{itpy})]^{2+}$ ve $[\text{Co}(\text{itpy})]^{3+}$ komplekslerinin yapısı	37
Şekil 1.43 Kobalt kompleksinin DNA titrasyonu UV spektrumunda meydana gelen değişimler	38
Şekil 1.44 Co, Cu ve Zn komplekslerinin artan DNA derişimiyle UV spektrumunda meydana gelen değişimler	39
Şekil 1.45 $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{2+}$ kompleksinin yapısı ve kompleksin üzerine DNA eklenmesiyle absorbsiyon spektrumunda meydana gelen değişimler	40
Şekil 1.46 10 μM $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{dmhbt})]^{3+}$ kompleksi üzerine 0-120 μM ct-DNA eklenmesi durumunda floresans şiddetindeki değişim	41
Şekil 1.47 EtBr'nin molekül yapısı	42
Şekil 1.48 EtBr'nin tek başına (a) ve DNA varlığında (b) floresans spektrumu	42
Şekil 1.49 $[\text{DNA}]/[\text{Et-Br}] = 2,5$ çözeltisi üzerine 0-50 μM $[\text{Co}(\text{itpy})_2]^{3+}$ kompleksi eklendiğinde floresans spektrumundaki değişimler	43
Şekil 1.50 Zn kompleks ($\text{C}_{78}\text{H}_{62}\text{N}_{26}\text{O}_{28}\text{Zn}_2$) Et-Br/DNA'ya karşı floresans spektrumu (Sirajuddin et al. 2013)	44
Şekil 1.51 Elektroforez düzeneği	45
Şekil 1.52 Plasmit-DNA	45
Şekil 1.53 Plasmid DNA'nın farklı formları	46
Şekil 1.54 NiL kompleksinin kimyasal yapısı	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 1.55 Agoroz jel elektroforez görüntüsü: sütun 1’de 0,2 mM H ₂ L+ 0,4 µM DNA; sütun 2’de 0,2 mM NiL + 0,4 µM DNA; sütun 3’te 0,4 µM DNA	47
Şekil 1.56 Ubbelohde viskozimetresi	48
Şekil 1.57 Ru komplekslerinin ve EtBr’nin DNA viskozitesine etkisi	48
Şekil 1.58 Dihidromirisitrin-manganez kompleksinin DNA viskozitesine etkisi.....	49
Şekil 3.1 Flavonoidlerin artan DNA konsantrasyonuyla UV absorpsiyonundaki değişimler..	60
Şekil 3.2 Flavonoidlerin artan Cu ²⁺ konsantrasyonu sırasındaki UV absorpsiyonundaki değişimler	61
Şekil 3.3 Flavonoid-Cu ²⁺ komplekslerinin artan DNA konsantrasyonu ile UV absorpsiyonundaki değişimler	62
Şekil 3.4 (a) Rutin üzerine çinko eklemesi sırasında meydana gelen değişimler (b) Rutin-Zn kompleksinin üzerine DNA eklenmesi sırasında UV absorpsiyonundaki değişimler	63
Şekil 3.5 DNA Cu ²⁺ etkileşim grafiği	64
Şekil 3.6 Flavonoidler için [DNA] değerine karşı [DNA]/(ε _A -ε _f) grafiği.....	66
Şekil 3.7 Flavonoid-Cu ²⁺ kompleksleri için [DNA] değerine karşı [DNA]/(ε _A -ε _f) grafikleri ..	67
Şekil 3.8 (a) 20 µM EtBr (b) DNA/ EtBr karışımı üzerine rutin eklenmesi	69
Şekil 3.9 DNA–EtBr karışımı üzerine artan R-Cu konsantrasyonunun etkisi	70
Şekil 3.10 DNA–EtBr karışımı üzerine artan M-Cu konsantrasyonunun etkisi	70
Şekil 3.11 DNA–EtBr karışımı üzerine artan Q-Cu konsantrasyonunun etkisi.....	71
Şekil 3.12 R-Cu kompleksinin Stern Volmer eşitliği.....	72
Şekil 3.13 M-Cu kompleksinin Stern-Volmer Eşitliği.....	72
Şekil 3.14 Q-Cu bileşiğinin Stern Volmer eşitliği	72
Şekil 3.15 1 saat inkübasyon sonrası Rutine ait elektroforez sonuçları	73
Şekil 3.16 1 saat inkübasyon sonrası Rutin ve H ₂ O ₂ ’e ait elektroforez sonuçları	74
Şekil 3.17 1 saat inkübasyon sonrası R-Cu ²⁺ kompleksine ait elektroforez sonuçları.....	74
Şekil 3.18 1 saat inkübasyon sonrası peroksit varlığında R-Cu ²⁺ kompleksinin elektroforez sonuçları.....	75
Şekil 3.19 1 saat inkübasyon sonrası kuersitrine ait elektroforez sonuçları.....	76
Şekil 3.20 1 saat inkübasyon sonrası kuersitrin-Cu ²⁺ ve kuersitrin-Zn ²⁺ komplekslerine ait elektroforez sonuçları	77
Şekil 3.21 1 saat inkübasyon sonrası Cu ²⁺ ve Zn ²⁺ iyonlarına ait elektroforez sonuçları	78
Şekil 3.22 Mirisitrine ait elektroforez sonuçları.....	78
Şekil 3.23 M-Cu ²⁺ kompleksine ait elektroforez sonuçları	79
Şekil 3.24 Flavonoid-metal komplekslerinin viskozite grafiği	81



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Flavonoid-Metal komplekslerinin biyolojik aktiviteleri.	8
Çizelge 1.2 Flavonoidlerin sınıflandırılması.	9
Çizelge 1.3 Kuersetin ve bazı glikozitleri.	10
Çizelge 2.1 Rutin için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler.....	53
Çizelge 2.2 Kuersitrin için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler	53
Çizelge 2.3 Mirisitrin için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler	54
Çizelge 2.4 Rutin-Cu ²⁺ kompleksi için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler	54
Çizelge 2.5 Kuersitrin-Cu ²⁺ kompleksi için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler.....	55
Çizelge 2.6 Mirisitrin-Cu ²⁺ kompleksi için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler.....	55
Çizelge 2.7 Rutin-Cu ²⁺ kompleksinin yarışmalı floresans hesaplamalarında kullanılan veriler.....	56
Çizelge 2.8 Kuersitrin-Cu ²⁺ kompleksinin yarışmalı-floresans hesaplamalarında kullanılan veriler	56
Çizelge 2.9 Mirisitrin-Cu ²⁺ kompleksinin yarışmalı floresans hesaplamalarında kullanılan veriler	57



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Santigrat derece
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
L	: Litre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
λ	: Dalga boyu

KISALTMALAR

EtBr	: Etidyumbromür
UV	: Ultraviyole
TBE	: Tris-Borikasit-EDTA tamponu
NR	: Nötr kırmızısı
MeOH	: Metil alkol
UV	: Görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi
IR	: Kızılötesi spektroskopisi
NMR	: Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi
DAPI	: 4,6-diamidin-2-fenil indol dihidroklorür
TO	: Tiyazol oranj homodimeri



BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 FLAVONOİDLER

Flavonoidler bitkilerde kök, gövde ve yapraklarda bulunduğu bilinen polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidler ilk başlarda bazı sebze ve meyvelere verdikleri canlı renklerden ötürü dikkat çekmiş bir madde sınıfıdır. Öyle ki isimlerini Latince sarı anlamına gelen “flavus” kelimesinden almışlardır. Bitkilerde bulunan ve yapay olarak elde edilemeyen bu bileşiklerin bitkilere sarıdan laciverte kadar renk veren pigmentler olduğu kabul edilir. Yeşil çay, soğan, elma, fındık, domates, baklagiller, fasulye ve özellikle kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır. İlk başlarda dikkat çekici ve canlı renkleriyle dikkat çeken flavonoidlerin zaman içerisinde insan sağlığı açısından yararlı etkileri olabileceği düşünülmüş ve flavonoidler bilimsel araştırmaların ana konularından biri haline gelmiştir.

Çalışmaların pek çoğu flavonoidlerin antioksidan etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu antioksidan özellikleri sayesinde yağların zararlı bileşiklere dönüşmesini engelleyerek koroner kalp hastalıklarına karşı koruma sağladıkları, hücreye zarar veren serbest radikalleri yakalayarak zararsız hale getirdikleri düşünülmektedir. Flavonoidlerin bağışıklık sistemini destekledikleri, histamin adı verilen maddeden kaynaklanan alerjik reaksiyonları önledikleri, enzim aktiviteleri üzerinde etkili oldukları, virüs ve bakterilere karşı koruma sağladıkları, kan damarlarını korudukları, C vitamininin gücünü arttırdıkları ve kanserli hücrelerin çoğalmasını engelledikleri yönünde çalışmalar mevcuttur. Flavonoidlerin aynı zamanda doğal boyar maddeler olduğu bilinmektedir. Antiinflamatuvar (García-Lafuente et al. 2009), antiproliferasyon yani hücre büyümesini engelleyici (Wang et al. 2008), antioksidan (Terao 2009), antikanserojen (Hertog et al. 1993b), antimikrobiyal (Mandalari et al. 2007), antiallerjen (Kawai et al. 2007) etki gösterdiği belirtilen flavonoidlerin, bu olaylardaki etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılabilmiş değildir.

Son yıllarda laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin antioksidan özelliği üzerinde durulmuş ve kimyasal yapılarıyla antioksidan özellikleri açıklanmaya çalışılmış ancak yaşayan organizmalardaki antioksidan özellikleri ile ilgili bilgilerin daha sınırlı olduğu görülmüştür (Pietta 2000). Rice ve arkadaşları tarafından yapay ortamlarda yapılan çalışmalarda flavonoidlerin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği yargısına ulaşılmıştır (Rice-Evans et al. 1997). Flavonoidlerin antioksidan potansiyelleri üzerine yapılan çalışmalarda, antioksidan potansiyelinin fenolik hidroksil grubu sayısı ile beraber arttığı görülmüştür (Wätjen et al. 2005). Antioksidanlar gıdalarımızın içinde bulunan, hem direk hem de dolaylı olarak vücudumuzu oksidatif hasara karşı koruyan ya da hasarı yavaşlatan maddeler ya da besinlerdir. Hücrelerimizde oksijen kullanılarak gerçekleşen tepkimeler sonucunda yan ürün olarak, vücudumuzda hasara sebep olabilecek serbest radikaller meydana gelir. Antioksidanlar serbest radikal oluşumunu azaltarak vücuda verdiği zararı en aza indirmektedir. Ayrıca antioksidanların vücudun bağışıklık gücünü arttırdığı da bilinmektedir. Dolayısıyla radikal aracılı hasar sonucu oluşması muhtemel pek çok hastalıktan korunmada etkin rol oynayabilecekleri düşünülmektedir (Çimen 1999). Kırmızı şarap tüketimi ve yüksek yağlı diyetle beslenme (Fransız paradoksu) üzerine yapılan bir çalışmada oldukça yağlı yeme alışkanlığı bulunan kişilerde kalp damar hastalıklarının beklenenden çok daha az görüldüğü anlaşılmış ve bunun bu kişilerin aynı zamanda yüksek flavonoid içeriği bilinen kırmızı şarap tüketiminden kaynaklandığı savunulmuştur (Frankel et al. 1993). Yaşlılar üzerinde yapılan bir çalışmada flavonoid içeriği bilinen (çay, elma, soğan) yiyecek tüketiminin koroner kalp hastalıkları riskini azalttığı savunulmaktadır (Hertog et al. 1993a).

Hypericum perforatum çok yıllık otsu bir bitkidir ve geleneksel olarak antidepresan olarak kullanılmıştır. Ancak fitokimyasal analizinde şaşırtıcı derecede flavonoid içeriğine rastlanılmış fakat daha çok antidepresan özelliği üzerinde durulduğu görülmüştür. Bu bitkiden elde edilen flavonoid açısından zengin özlerin koruyucu etkileri, sıçanlarda PC12 hücrelerinde peroksit kaynaklı hasar üzerinde incelenmiş ve bitki özütünün hücrelerde koruyucu etki gösterdiği görülmüştür (Zou et al. 2010). Farklı türlerden elde edilen flavonoid içeriği yüksek bitki ekstratlarının antibakteriyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalardan birinde naringenin ve soforaflavanone flavonoidlerinin, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Streptococci* sp. bakterilerine karşı yoğun antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Tsuchiya and Inuma 2000). Flavonoid ailesinin üyelerinden olan kateşinler de

kuvvetli antibakteriyel özelliklerinden dolayı bu konudaki çalışmaların ilgi alanları içerisinde.

Bazı flavonoidlerin, insanlardaki bağışıklık sistemi hücrelerinin fonksiyonlarını önemli ölçüde değiştirdiği rapor edilmiştir (Middleton Jr and Kandaswami 1992). Yine flavonoidlerin çeşitli kanser türlerini önleyebileceği düşünülmektedir. Ren ve ark. tarafından yapılan epidemiyolojik araştırmalar ve insan klinik denemeleri flavonoidlerin kanser kemoterapisine önemli etkilerinin olduğunu göstermiştir (Ren et al. 2003). Bu etkilerin birçok eylem mekanizması vardır. Bu etki mekanizmaları karsinojen inaktivasyonu (kanseri yapıcı maddenin etkisizleştirilmesi), kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleme, anjiyogenezin aktive edilmesi, antioksidan aktivite, hücre döngüsünün ayarlanması, apoptozun durdurulması ya da bu mekanizmaların kombinasyonu olarak düşünülmektedir. Bunların sonucunda flavonoidler umut verici kanser ajanları olarak nitelendirilir. Flavonoidlerce zengin diyet programı uygulayan bir grupta yapılan çalışmada, flavonoid alımının pankreas kanseri riskini düşürdüğü görülmüştür (Rossi et al. 2012). Flavonoid alımı ile akciğer kanseri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise sigara içmeyen kişilerde flavonoid alımı ile akciğer kanseri görülme oranı arasında ters orantı olduğu görülmüştür (Knekt et al. 1997). Erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden biri olan prostat kanserine karşı mirisetin ve mirisitrin etkisinin ve etki mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada, bu flavonoidlerin prostat kanserine karşı etkili inhibitörler olduğunu göstermiştir. Özellikle mirisetin ve mirisitrin karışımının kanser hücrelerinin canlılığının azaltılması ve hücre çoğalmasının önlenmesinde etkili olduğu görülmüştür (Xu et al. 2013). Aynı çalışmada açıklanmaya çalışılan etki mekanizmasının başka kanser türleri ve flavonoidler için de düşünülebileceği belirtilmiştir. Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri ve ilaçlarla gösterdikleri etkileşimler, flavonoidleri alternatif kanser tedavileri için ideal adaylar haline getirmektedir (Kale et al. 2008). 1930’lardan beri incelenen flavonoidler birçok ülkede geleneksel tıpta kullanılmıştır. Izoflavonoid kaynakları olan soya ürünleriyle yapılan epidemiyolojik çalışmalar, Singapur ve Çin gibi Asya ülkelerindeki vaka kontrol çalışmaları yüksek soya tüketimi ile meme kanseri görülme riskinin azaldığını göstermektedir. Yüksek miktarda tofu tüketen Asya Amerikalı kadınlarda da meme kanseri riski azalmıştır. Ancak bu ilişkinin Asya’da doğmuş kadınlarla sınırlı olduğu görülmüştür. Bu durum soya tüketiminin erken yaşlarda beslenmeye katılmasının önemli olabileceğini ya da Asya diyetinin diğer bileşenlerine ve soya alımı ile ilgili diğer yaşamsal faktörlere bağlı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Le Marchand 2002).

Ancak flavonoidlerce zengin besinlerle beslenen bir grup kadın üzerinde yapılan başka bir çalışmada da kanserin önlenmesi ile flavonoid alımı arasında kayda değer bir ilişkinin olmadığı açıklanmıştır (Wang et al. 2009). Flavonoidlerin düşük konsantrasyonları sıçan H4IIE hücrelerindeki hasara karşı koruyucu olurken, yüksek konsantrasyonu bu hücrelerde DNA hasarına ve hücre ölümüne sebep olmuştur (Wätjen et al. 2005). Ayrıca bu çalışmada flavonoidlerin hücre laboratuvar ortamında antioksidan karakterlerinin şüpheye yer bırakmayacak şekilde izlenebildiği ancak hücre içinde etki mekanizmalarının aydınlatılamadığı bazı durumlarda hücreye zarar verebilecekleri belirtilmiştir. Aynı şekilde düşük flavonoid konsantrasyonunun DNA sarmalında stabilizasyona sebep olurken, yüksek derişimin heliksin açılmasına sebep olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Kanakakis et al. 2007).

Flavonoid olan mirisetinin antioksidan olarak bilinmesine rağmen birkaç çalışmada canlı organizma üzerinde zararlı özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Mirisetin lipidleri oksidatif zararlara karşı koruyabildiği, ancak karbonhidrat ve DNA gibi bileşenlerde verilen zararı arttırma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür (Ong and Khoo 1997). Rusak ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, flavonoid-DNA etkileşimlerinin, sitotoksik ve DNA'ya zarar veren ya da DNA hasarına karşı koruyucu özellik gösterebilen iki farklı etkiye neden olabileceği belirtilmiştir. Flavonoid konsantrasyonu ve inkübe süresi de bu etkileşimlerde önemli yer tutmaktadır (Rusak et al. 2010).

Günümüzde flavonoidlerin biyo-yararlılığı konusunda pek çok çalışma yapılmaktadır. Ancak bu çalışmalar besinin içerdiği flavonoid miktarı, emilimi ve flavonoidin insan vücudundaki metabolik dönüşümünün tam olarak bilinmiyor olmasının getirdiği zorluklarla beraber yürümektedir. Bitkilerdeki flavonoid miktarları konusundaki bilgilerin yetersiz ve çelişkili olması, flavonoidlerin antioksidan özellikleri konusunda yapılan çalışmalarda karşılaşılan zorluklardan biridir. Bitkide flavonoid oluşumunu etkileyen ışık, bitki genetiği, çevresel koşullar, çimlenme, olgunluk derecesi, işleme ve depolama gibi pek çok faktöre bağlıdır (Güven et al. 2010). Bu nedenle besinden alınan flavonoid miktarının tam olarak belirlenmesi mümkün değildir. Flavonoidlerin emilimi de alınan doza, alım şekline, beslenme ve cinsiyet farklılıklarına, bireyin genetik özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir (Šturdik 2008). Ayrıca flavonoidlerin emiliminin birlikte tüketildiği diğer gıdalara da bağlı olduğu bilinmektedir. Flavonoidlerin vücutta geçirdiği metabolik dönüşümlerin tam aydınlatılamamış

olması flavonoidlerin biyo-yararlılığı konusunda karşılaşılan güçlüklerin bir diğeridir. Örneğin flavonoid içerik taşıyan sarımsağın kan basıncını düşürücü etkisine ait kanıtların bulunmasına rağmen olayın mekanizması bilinmemektedir (Çimen 1999).

1.1.1 Flavonoid-Metal Kompleksleri

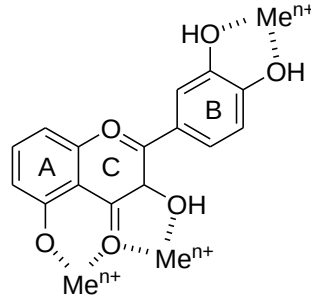
Flavonoidlerin metal iyonlarıyla kompleks oluşturabildiği bilinmektedir. Flavonoidlerin metal iyonlarıyla şelat yapma yetenekleri, daha geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesine sahip yeni bir molekül kategorisinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Flavonoid-metal komplekslerinin yapısı, kompleksin oluşma mekanizması, biyolojik aktivitesi gibi konularda çalışmalar devam etmektedir. Oluşan kompleksin biyolojik aktivitesi flavonoide ve metal iyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar flavonoid-metal komplekslerinin ana flavonoidten daha etkili özellikler gösterebildiğini kanıtlamıştır. Antioksidan etki gösterdiği bilinen bir flavonoid olan rutin ile rutinin bakır ve demir kompleksleri üzerine yapılan bir çalışmada, komplekslerin rutinin antioksidan özelliğini koruduğunu birçok durumda da artmış serbest radikal süpürücü aktivite sergilediğini göstermektedir (Afanas'eva et al. 2001). Kuersetinin La, Nd, Eu, Gd, Tb, Dy, Tm ve Y elementleri ile oluşturduğu kompleksleri ve bu komplekslerin özelliklerini inceleyen bir çalışmada da, komplekslerin tümör hücreleri üzerindeki etkisinin kuersetinden daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Zhou et al. 2001a). Rutin-Zn kompleksleri üzerine yapılan çalışmada rutin-Zn kompleksinin biyolojik aktivitesinin, rutine oranla çok daha yüksek olduğu görülmüştür (Ikeda et al. 2015). Flavonoidlerin Al(III) ve Zn(II) iyonlarıyla kompleks oluşturmalarının antioksidan karakterini arttırdığı görülmüştür (de Souza and de Giovani 2005). Flavonoid-metal kompleksleri gibi küçük moleküllerin DNA ile etkileşimine ilişkin pek çok kanıt mevcuttur (Wang et al. 2006). Kuersetin-lantan kompleksinin antikanser ilacı olarak kullanılabileceği üzerine hücresel düzeyde yapılan çalışmalardan olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Durgo et al. 2011). Yine kuersetin-bakır kompleksinin DNA ile etkileşimi çeşitli yöntemler kullanılarak araştırılmış, kompleksin DNA ile interkalasyon yaptığı ve plasmit-DNA'da hasara yol açtığı sonuçlarına ulaşılmıştır (Tan et al. 2009a). Hem rutin hem de rutin-Fe kompleksinin DNA'ya interkalasyon yaparak bağlandığı ancak demir kompleksinin DNA'ya çok daha kuvvetli bağlandığını gösteren ve bu yapıyı bir antikanser ajanı olarak tanımlayan çalışmalar da mevcuttur (Selvaraj et al. 2012). Flavonoidlerin alt sınıflarından biri olan izoflovanlar önemli biyolojik aktiviteler ve antitümör özellik gösterir. Birçok araştırmacı izoflovan-metal

komplekslerini incelemiş ve bu komplekslerin izoflovanlara göre DNA'ya daha güçlü şekilde bağlandığını belirtmiştir (Santini et al. 2013). Ligand 4'-metoksi-5,7-dihidroksi-izoflavon kullanılarak, Çinko, Mangan, Bakır, Kobalt, Nikel metalleri ile kompleksleri sentezlenmiş ve bu komplekslerin laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarla antitümör aktiviteleri test edilmiştir. Mangan ve nikel komplekslerinin antitümör etkisinin diğer komplekslere göre daha fazla olduğu görülmüştür (Chen et al. 2010). Narenciye flavanonu olan hesperetin, naringenin özellikle meme kanserine karşı antikanserojen etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Tripoli et al. 2007, So et al. 1996). Bu flavonoidlerin bazı metal komplekslerinin antioksidan ve antikanser özelliği gösterdiği bilinmektedir. Naringin-Cu kompleksinin serbest naringine oranla hücre canlılığını azaltmadan antioksidan, antitümör etkiler gösterdiği görülmüştür (Pereira et al. 2007). Meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan bir flavonoid olan apigeninin kansere karşı koruyucu ve tedavi edici özellik gösterdiği düşünülmektedir (Chiang et al 2006). Hesperetin, naringenin ve apigeninin özellikle bakır kompleksleri laboratuvar ortamında test edilmiş ve bu komplekslerin serbest flavonoidlere göre kanser hücrelerinin büyümesini daha iyi inhibe ettiği belirtilmiştir (Tan et al 2009). Son yıllarda sentezlenen kuersetin-Cu kompleksinin DNA ile etkileşimi çeşitli yöntemlerle incelenmiş ve kompleksin antitümör özellik gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada kompleksin antitümör mekanizmasının, sadece reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla gerçekleşen bir DNA hasarını önleyici etkisinden değil, aynı zamanda kompleksin DNA ile girdiği spesifik bir etkileşimden kaynaklandığı belirtilmiştir (Tan et al. 2009) Hücreler üzerinde yapılan sitotoksitite deneylerinde, kompleksin hücre ölümü üzerindeki etkisinin kuersetinden daha fazla olduğu görülmüştür (Santini et al. 2013).

Genellikle antikanser ilaçlarının birincil hedefi hücre içidir. Küçük moleküllerle DNA arasındaki etkileşim DNA hasarına neden olup, hücre bölünmesini bloke eder ve kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabilir. Flavonoid-metal komplekslerinin DNA'ya bağlanma modu ve bağlanma sabiti, yeni kanser ilaçlarının tasarımı ve bağlanma mekanizmaları hakkında bilgi sağlayacaktır (Guo et al. 2012). Bu nedenle bu etkileşimlerdeki mekanizmanın belirlenmesi, yeni ilaç tasarımları için büyük önem taşımaktadır.

Flavonoidler metallerle genellikle üzerlerindeki hidroksil ya da okso grupları üzerinden bağlanırlar. Bir flavonoid-metal kompleksinin yapısı, metal iyonunun koordinasyon sayısı, oksidasyon durumu, flavonoiddeki elektron vericilerin sayısı, sıcaklık, pH, flavonoiddeki halka sayısı gibi faktörlere bağlıdır (Malešev and Kuntić 2007). Elektron kütle spektroskopisi

kullanılarak bazı flavonoid bileşiklerinin demir ve bakır iyonlarıyla kompleksleri incelendiğinde 1:1, 1:2, 2:2, 2:3 metal/flavonoid oranları gözlemlenmiştir. Ancak 1:2 birleşme oranı genel bir tercih olduğu anlaşılmıştır (Fernandez et al. 2002). Metallerin flavonoidlere bağlanarak kompleks oluşturma noktaları Şekil 1.1’de gösterilmiştir (Elik et al. 2007).



Şekil 1.1 Metallerin flavonoidlere bağlanma noktaları.

Flavonoid-metal komplekslerinin oluşumunda metal iyonunun yapısı ve durumu da önem arz etmektedir. Örneğin Kuersetinin Fe^{2+} iyonlarına bağlanma aktivitesinin Fe^{3+} iyonlarından çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Ren et al. 2008). Kobaltın Co^{+2} ve Co^{+3} katyonları kullanılarak sentezlenen terpiridin komplekslerinin DNA’ya bağlanma yüzdeleri incelendiğinde, Co(III) kompleksinin çok daha etkin olduğu görülmüştür. Co(III) kompleksinin bağlanma yüzdesinin büyük olması, bu komplekslerin DNA’ya bağlanmasında elektrostatik unsurların önemli rol oynadığını göstermektedir (Indumathy et al. 2007).

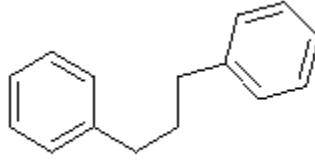
Flavonoid-metal kompleksleri, antioksidan, antimikrobiyal, antitümör, antidiyabetik, antiinflamatuvar gibi biyolojik aktiviteler göstermektedir (Çizelge 1.1). Bu biyolojik aktiviteler genellikle komplekslerde ana flavonoide göre daha üstündür. Flavonoid-metal komplekslerinin biyolojik aktivitelerinin, kompleksi oluşturan flavonoidin yapısına bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Daha fazla hidrosit grubu bulunduran flavanollerin, diğer flavonoidlere oranla daha iyi bir biyolojik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Kompleksin düzlemselliğindeki artışta farmakolojik aktiviteleri olumlu yönde etkilemektedir (Selvaraj et al. 2014).

Çizelge 1.1 Flavonoid-Metal Komplekslerinin Biyolojik Aktiviteleri.

Flavanol	Metal iyon	Metal-Ligand oranı	Biyolojik Aktivite
Rutin	Cu(II).4H ₂ O	2:1	Antioksidan (De Souza and De Giovani 2004)
	Fe(II).6H ₂ O	3:2	Antioksidan (De Souza and De Giovani 2004)
	Al(III)	1:2	Antikoagülan (Kuntić et al. 2011)
	Cu(II)	1:2	Antikoagülan (Kuntić et al. 2011) Oksidatif stres bazlı yaralanmaların azaltılması (Malešev and Kuntić 2007)
	Fe(II)	1:2	Membran sınılaşması (Ska-Kordala et al. 2001)
Kuersetin	Cu(II)	1:2	Antioksidan (Bukhari et al. 2009) DNA'ya bağlanma (Ni et al. 2007)
	Fe(III)	1:2	Antioksidan (Sungur and Uzar 2008)
Mirisetin	Fe(III)	1:2	Antioksidan (Sungur and Uzar 2008)
	Cu(II)	1:2	Antioksidan (Mira et al. 2002)

1.1.2 Flavonoidlerin Yapısı

Flavonoid bileşikleri, benzon- γ -piron türevlerinden meydana gelen geniş heterojen grupları içeren polifenol bileşiklerdir (Gibellini et al. 2011). İki fenil halkası ve bir propan zinciri flavonoidlerin iskeletini oluşturur (Şekil 1.2). 15 C atomundan oluşan iskelet C₆-C₃-C₆ dizilimine sahip difenilpropandır. Bu yapılarından ötürü polifenolik bileşikler olarak adlandırılırlar.



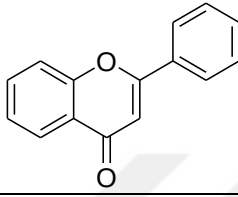
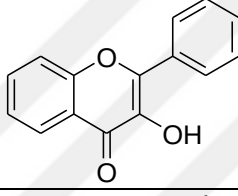
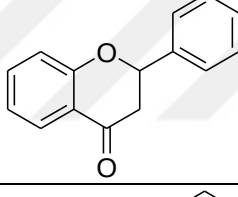
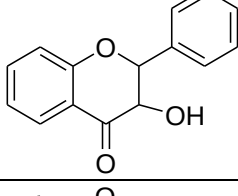
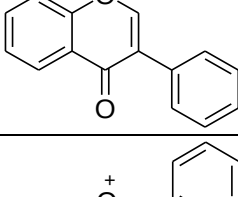
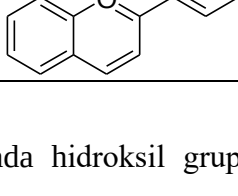
Şekil 1.2 Flavonoid İskeleti.

Bu iskelette (Şekil 1.2) fenil grupları propan zincirine farklı noktalardan bağlanabilir. Bağlanma noktalarına göre flavonoidler flavonoid, izoflavonoid ve neoflavonoid olmak üzere üç gruba ayrılır. Bu gruplarda kendi içlerinde farklı alt sınıflara ayrılır.

Flavonoidlerin biyoyararlanımı, metabolizması ve biyolojik aktivitesi, flavonoidin konfigürasyonuna, toplam hidroksil grubu sayısına ve fonksiyonel gruplarına bağlıdır. İskelete bağlı hidroksil gruplarının sayısının ve yerinin farklı olması, molekülün doymamışlık

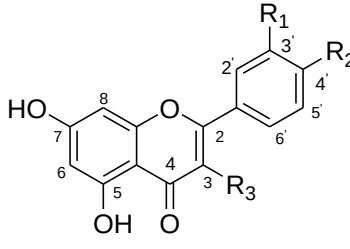
derecesi, üç karbonlu heterohalkanın değişik yükseltgenme basamaklarında bulunabilmesi farklı flavonoid türlerinin oluşmasına yol açar. Flavonoidler çizelge 1.2’de gösterilen başlıca 6 gruba ayrılır (Šturdik 2008). Flavonoidlerin tüm alt sınıfları arasında izoflavonların en yüksek biyoyararlanıma sahip olduğu bilinmektedir (Spencer et al. 2000).

Çizelge 1.2 Flavonoidlerin sınıflandırılması.

FLAVONOİD SINIFI	FLAVONOİD İSKELETİ	ÖRNEKLER	FLAVONOİD İÇEREN BESİNLER
Flavonlar		Apigenin Luteolin	Kereviz Maydanoz
Flavonoller		Myricetin Quercetin	Soğan Sarımsak Brokoli
Flavanonlar		Didymin Eriocitrin	Narenciye
Flavanoller (Kateşin)		Fussin Takifolin	Çay
İzoflavon		Biochanin Daidzein	Soya sütü Soya peyniri
Antosiyanidin		Siyanidin Delphinidin	Şarap Çilek Kiraz

Doğal flavonoidlerin yapılarında hidroksil grupları bulunur. Reaktif özellik gösteren bu hidroksil grupları kolaylıkla alkillenir ve glikozillenir. Bu nedenle flavonoidler bitkilerde serbest formda değil glikozitleri şeklinde bulunur. Aşağıda Çizelge 1.3’de bir flavanol olan kuersetin ve bazı glikozitleri verilmiştir (Erlund 2004).

Çizelge 1.3 Kuersetin ve bazı glikozitleri.



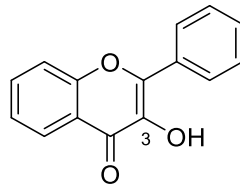
	R ₁	R ₂	R ₃
Kuersetin	OH	OH	OH
Rutin	OH	OH	rutinoz
Spiraeoside	OH	O-β-D-glikoz	H

Flavonoid glikozitlerinin şeker kısmı biyoyararlılıklarının önemli bir belirleyici olduğu dimerizasyonun ise biyoyararlanımı azalttığı bulunmuştur (Kumar and Pandey 2013).

Bu çalışmada özelliklerini inceleyeceğimiz rutin, kuersitrin ve mirisitrin flavonoidlerin flavonol sınıfına ait olan glikozit bileşiklerdir.

1.1.3 Flavonollar

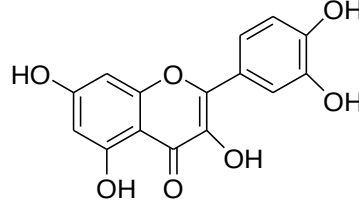
Flavanoller, flavonoidlerin en sık rastlanan ve yapı çeşidi en fazla olan sınıfıdır. 3-Hidroksiflavon olarak da adlandırılan flavonoller C-3 karbonunda hidroksil grubu bulundurur (Şekil 1.3). C halkasının en fazla yükseltgendiği flavonoid sınıfı olan flavoneller bitki ve sebzelerde sıklıkla bulunan flavonoid çeşididir. Açık sarı ya da sarı renkli olan flavonollar amorf ve kristal yapılıdır. Brokoli, soğan ve sarımsakta bol miktarda bulunur.



Şekil 1.3 Flavonol iskeleti.

1.1.3.1 Kuersetin

Doğada en çok bulunan flavonoidlerden biri olan kuersetin, suda çözünen ve antioksidan etki gösterdiği düşünülen bir flavonoldur (Şekil 1.4). En yaygın flavonollardan biri olan kuersetin en yüksek konsantrasyonda soğanda bulunur (Erlund 2004). Elma, kırmızı şarap, kiraz, brokoli, greyfurt, siyah çay ve yeşil yapraklı sebzelerin kuersetin içerdiği bilinmektedir.

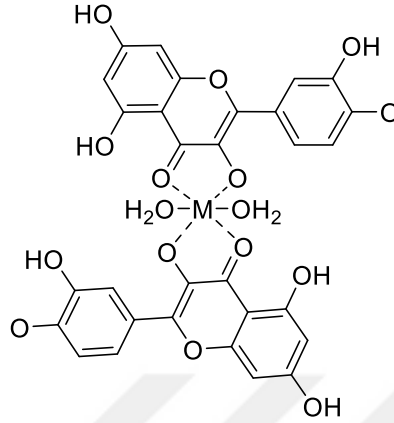


Şekil 1.4 Kuersetin.

Kuersetin açısından zengin elma ve soğan tüketiminin koroner hastalıkların azaldığına dair çalışmalar mevcuttur (Knekt et al. 1996). Bu durumun kuersetinin antioksidan etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Polonya da 2001 yılında yapılan bir çalışmada, yaygın bir çevre kirleticisi, mutajen ve kanserojen olan kadmiyum metali kullanılmıştır. İnsan lenfosit hücrelerindeki DNA’da kadmiyumun yarattığı hasarın kuersetin kullanılarak azaltıldığı görülmüştür (Błasiak 2001). Ancak bu çalışmada kuersetinin hasarlı DNA’ya etki mekanizması üzerinde durulmamış sadece hasarı azalttığı belirtilmiştir. Diğer flavonoidler gibi metal iyonlarıyla kenetlenme özelliği gösteren kuersetinin, kadmiyumu şelatlayarak DNA ile etkileşimini engelleyebileceği düşünülmüştür. Alvi ve arkadaşları tarafından yapılan kuersetin-DNA etkileşimini inceleyen bir çalışmada kuersetinin DNA ile ilk etkileşiminin DNA yapısı üzerinde stabilize edici bir etkiye sahip olabileceğini, ancak uzun süreli tedavinin çift sarmalda büyük bir bozulmaya yol açtığını göstermektedir (Alvi et al. 1986). Muthukumaran ve ark. deneysel sıçanların nükleus, akciğer, karaciğer ve böbreklerinde nikotin kaynaklı pro-oksidant ve antioksidan dengesizliklerine karşı kuersetinin koruyucu etkisini karşılaştırmış ve DNA hasarına karşı koruyucu etkisini gösterdiğine inanmışlardır (Muthukumaran et al. 2008). Kuersetinin oksidatif stresin sebep olduğu sitotoksik etki üzerindeki koruyucu mekanizmadaki etkisinin incelendiği çalışmada, düşük dozlarda koruyucu etki gösterirken yüksek dozlarda tam tersi etki gösterebileceği belirtilmiş ve çift taraflı bıçak olarak tanımlanmıştır (Chow et al. 2005).

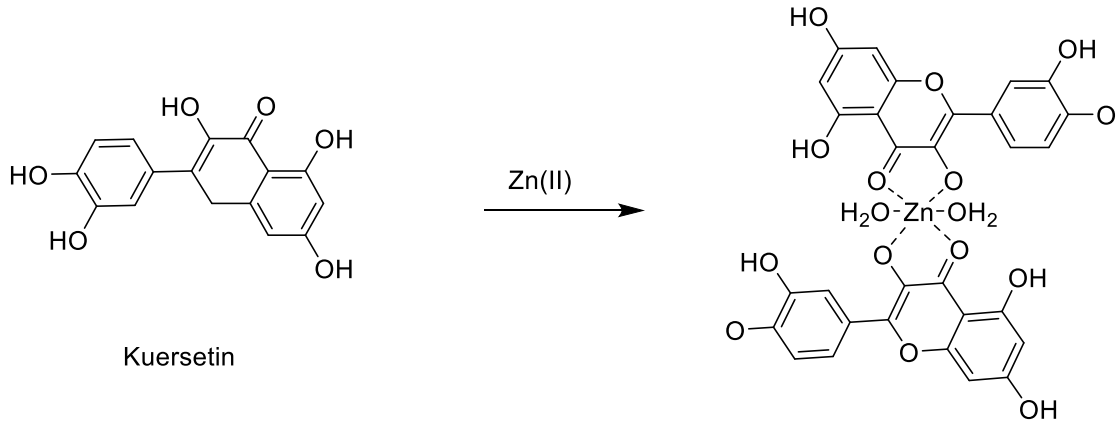
Diğer flavonoidlerde olduğu gibi kuersetin de metal iyonlarıyla kompleksler oluşturabilmektedir (Şekil 1.5). Hatta bu komplekslerin DNA ile saf kuersetine oranla daha iyi etkileştiğine dair çalışmalar da mevcuttur. Yapılan bir çalışmada Cu-kuersetin kompleksinin saf kuersetinle karşılaştırıldığında daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür (Bukhari et al. 2009). Kuersetinin Zn(II) ve Cu(II) komplekslerinin tümör hücrelerine karşı baskılama oranlarının kuersetinden üstün olduğu bulunmuştur (Zhou et al. 2001b).

Deneyisel ve teorik çalışmalar, flavonoidler için ideal kompleks oluşturma bölgelerinin üçüncü ve beşinci karbonlara bağlı hidroksil grupları ve dördüncü karbon atomu üzerindeki hidroksil grubu olduğunu göstermiştir (Dolatabadi 2011).



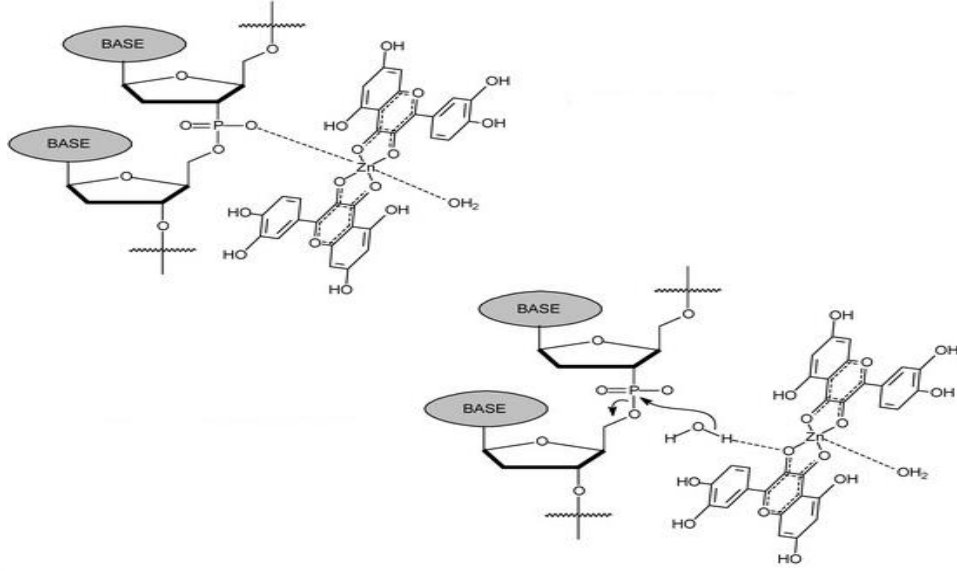
Şekil 1.5 Kuersetin Metal Komplekslerinin Yapısı.

Kuersetinin çinko kompleks sentezinin kolay olduğunu belirtildiği bir çalışmada, kompleksin tümör hücrelerinin büyüme ve çoğalmasına etkisinin doza ve zamana bağlı olarak kuersetinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Neto and Lapis 2009). Şekil 1.6’da kuersetinden yola çıkarak kuersetin-çinko kompleks oluşum reaksiyonu şematize edilmiştir.



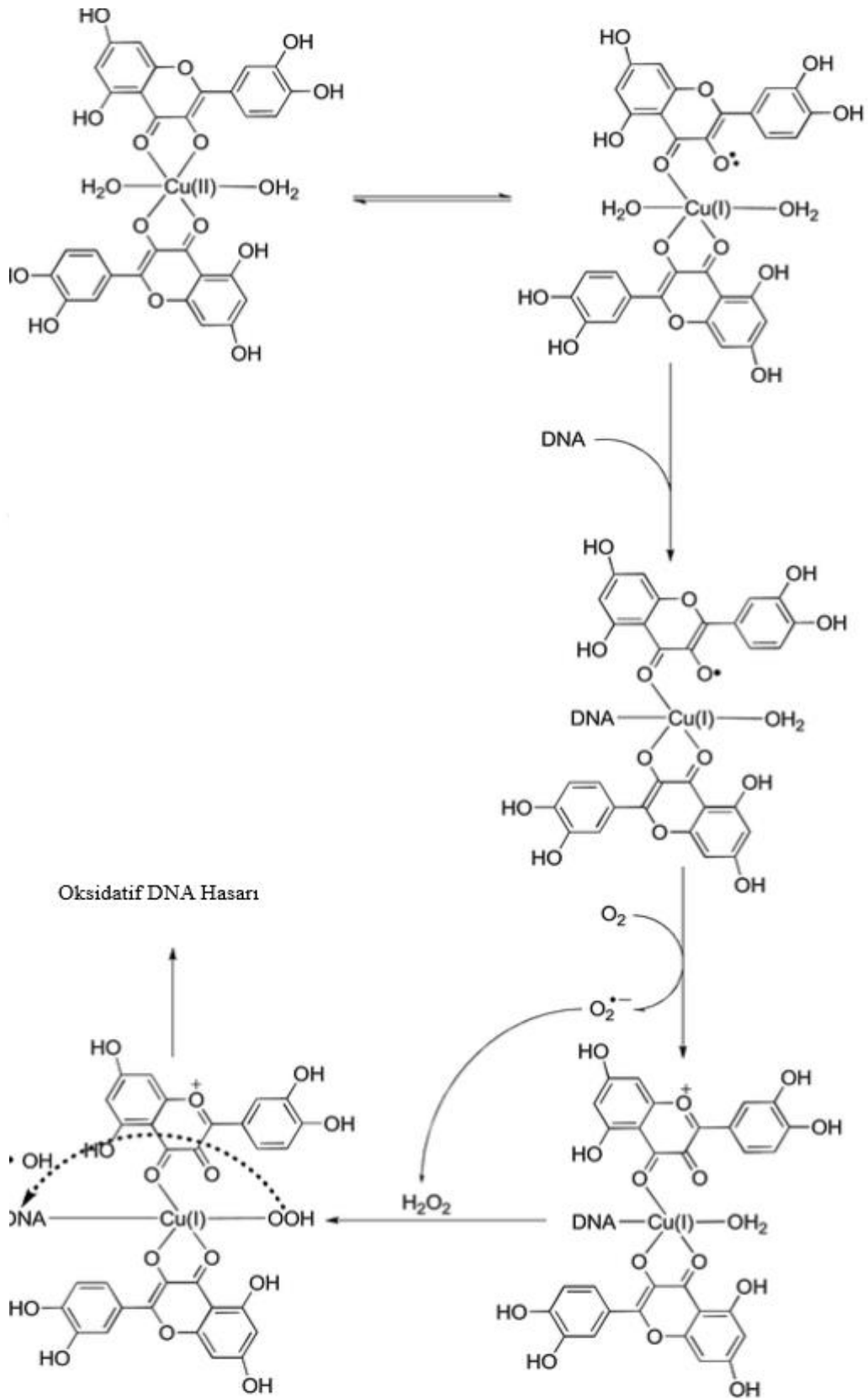
Şekil 1.6 Kuersetin -Zn kompleksi oluşum şeması

Ayrıca yapılan bir modelde, kompleksin DNA’ya muhtemelen Guanin Sitozin bölgesinden bağlandığı belirtilmiştir (Neto and Lapis 2009). Kuersetin-Zn kompleksinin DNA’ya bağlanma ve DNA’yı parçalaması üzerine bir mekanizma önermiştir (Neto and Lapis 2009). Şekil 1.7’de de önerilen hidroliz mekanizması görülmektedir.



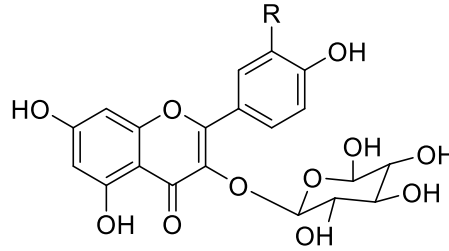
Şekil 1.7 Kuersetin-Zn kompleksinin DNA'yı parçalama mekanizması

Tan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Kuersetin-Cu kompleksinin DNA üzerinde yıkıcı etkisinin olduğu belirtilmiş (Tan et al. 2009) ve bu etki için bir mekanizma (Şekil 1.8) önerilmiştir. Mekanizmada kuersetin-Cu(II) kompleksinin DNA'ya verdiği hasar, kompleksteki Cu^{+2} iyonlarının Cu^{+1} haline dönüşmesi sırasında oluşan radikaller sebebiyle gerçekleşmektedir.



Şekil 1.8 Kuerstein-Cu kompleksinin DNA'yı parçalama mekanizması (Tan et al. 2009)

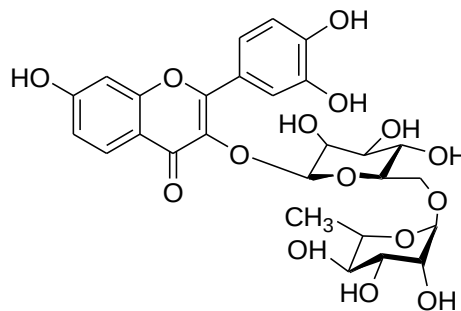
Kuersetin bitkilerde 4. karbonundaki OH grubunun hidrojeni ile sakkaritin yer değiştirmesi sonucu oluşan kuersitrin glikoziti şeklinde bulunur (Yalçın 2013).



şekil 1.9 Kuersitrin (Kuersetin-3-O-glukoz) yapısı.

1.1.3.2 Rutin

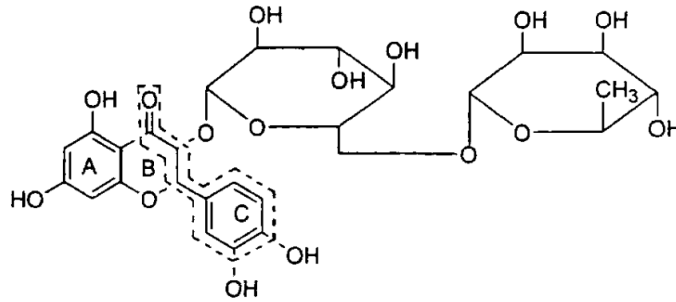
Rutin kuersetin'in 3. karbon atomuna bağlı -OH grubuna rutinozun bağlanmasıyla oluşan, kuersetinin glikoziti olan bir flavonoldur (şekil 1.10). Kayısı, kiraz, üzüm, karabuğday, greylfurt, erik ve portakal gibi birçok gıdada doğal olarak bulunur. Flavonoidlerin önemli temsilcilerinden biri olan rutin, vitamin P olarak da bilinir. Antialerjik, antikanserojen, antienflamatuar özellikler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. İnsan göbek ve endotel hücrelerinde peroksit kaynaklı sitotoksitite ve hücre ölümlerini önlediği görölmüştür. Rutinin bu işlemi nasıl yaptığı ile ilgili farklı düşünceler öne sürölmüştür. Damar endotel hücrelerinde meydana gelen ölümler kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle rutinin kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde rol oynayabileceği düşünölmektedir (Gong et al. 2010). Aynı zamanda yüksek bir radikal süpürücü aktivitesi ve antioksidan kapasitesi (Korkmaz ve Kolankaya 2010) olan rutinin, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) peroksidasyonu inhibe etmede etkili olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Jiang et al. 2007) Bütün bunlarla birlikte, rutinin *in vitro* (canlı hücre) ortamlardaki etki mekanizmaları üzerine az bilgi mevcuttur.



şekil 1.10 Rutin Yapısı

Diğer flavonoidlerde olduğu gibi rutin de farklı metallerle sentezlenmiş kompleks bileşikleridir. Bu komplekslerin biyolojik aktivitelerinin rutinden daha farklı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Ikeda ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada rutin-Zn kompleksi sentezlenmiş ve bu kompleksin biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Rutin-Zn(II) kompleksinin lösemi, melanom kanser hücrelerine karşı laboratuvar ortamında sitotoksik etki gösterdiği görülmüş, aynı konsantrasyondaki rutin ise bu etkiyi göstermemiştir. Ayrıca kompleksin antioksidan aktivitesinin çok daha fazla olduğu görülmüştür (Ikeda et al. 2015).

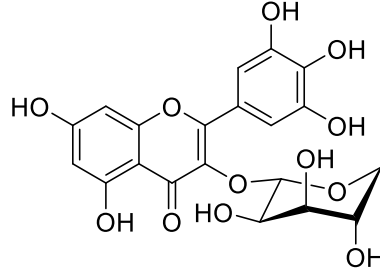
Rutin DNA arasındaki etkileşim mekanizmasını ortaya çıkarmak için yapılan çalışmada rutin tek başına iken ve siklodekstrin varlığında spektroskopik yöntemlerle çalışmalar yapılmıştır. UV-görünür ve floresans spektroskopileri kullanılarak yapılan çalışmalarda her iki şekilde de DNA ile etkileşim görülmüş ve rutin DNA ile sinamoil kısmından etkileştiği sonucuna varılmıştır (Yang et al. 2004). Şekil 1.11’de rutin DNA ile etkileşen bölgesi gösterilmiştir.



Şekil 1.11 Rutin DNA ile etkileşim bölgesi

1.1.3.3 Mirisetin

Mirisetin flavonoid iskeletinde 3, 5, 7, 3', 4' ve 5' karbonlara hidroksil gruplarının bağlı olduğu flavanoldur. Mirisitrin, mirisetinin 3. karbon atomuna bağlı -OH grubuna ramnozun bağlanmasıyla oluşan, mirisetin glikoziti olan bir flavonoldur (Şekil 1.12). Çay, çilek ve pek çok bitkide bulunan doğal bir flavonoiddir. Mirisetin üzerinde son yıllarda yapılan çalışmalarda antioksidan, anti-enflamatuar, antikanserojen ve antiviral aktiviteler gösterdiği görülmüştür.



Şekil 1.12 Mirisitrin Yapısı

Şeker hastası hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, mirisetinin olumlu etkileri görülmüştür. Ancak çalışmanın *in vivo* ortamlarda yapılan çalışmalarla desteklenmesi gerektiği belirtilerek, şeker hastalarının diyetlerinde mirisetin içeren besinler bulundurması üzerine çalışmalar yapılması önerilmiştir (Li and Ding 2012). Mirisetinin, glutamatın sebep olduğu nöronal hücre ölümünü inhibe ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Shimmyo et al. 2008). Kang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma mirisetinin melanoma için ümit verici bir kemoterapötik madde olduğunu göstermiştir (Kang et al. 2011). Diğer flavonoidler gibi mirisetin de metallerle kompleks bileşikler oluşturmaktadır. Mirisetinin bakır ve demir iyonlarıyla oluşturduğu kompleksler farklı biyolojik aktiviteler göstermiştir (Mira et al. 2002).

Bu çalışmada incelenecek olan flavonoller kuersitrin, rutin ve mirisitrin Doç. Dr Özlem DEMİRKIRAN ve arkadaşları tarafından *Hypericum montbretii* bitkisinden izole edilmiştir. Son yıllarda *Hypericum montbretii* bitkisinden elde edilen ürünler katlanarak artmış ve bu ürünler en çok incelenen maddeler sınıfına girmiştir. Antitümör ve Antimikrobiyel dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri olan bazı umut verici bileşiklerin kaynağı olarak görülen *Hypericum* ailesi büyük ilgi görmektedir. Demirkıran ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada *Hypericum montbretii* bitkisi kurutularak öğütülmüş ve 15 gün boyunca oda sıcaklığında metil alkol (MeOH) ile ekstre edilmiştir. Daha sonra ekstre vakumda konsantre edilmiş ve farklı çözücüler kullanılarak çeşitli kolon kromatografik yöntemler kullanılarak bileşikler izole edilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerin yapıları Görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi (UV), Kızılötesi spektroskopisi (IR), Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (NMR) ve çeşitli 2 boyutlu NMR spektroskopik tekniklerle aydınlatılmıştır. Kuersetin, kaempferol, kuersitrin, hayperin, mirisitrin, rutin, metil klorogenat, 5-*O-p*-kumarilkuinik asit, klorogenik asit (5-*O*-kafeoil kuinik asit), mangiferin, şikimik asit bu maddeden izole edilen maddelerdir (Demirkıran vd. 2013).



Şekil 1.13 *Hypericum perforatum*.

Flavonoidler, insan sağlığı açısından pek çok yararlı özellikle anılan bileşik sınıfıdır. Pek çok yararlı etkisinden bahsedilse bile, bazı araştırmalar zararlı etkilerinden ya da etkisizliklerinden de bahsetmiştir. Flavonoidler üzerine yapılan çalışmalar genellikle laboratuvar ortamında yapıldığından, canlı vücudunda da aynı özellikleri gösterip göstermeyeceği bilinmemektedir. Flavonoidler üzerine yapılan araştırmaların pek çoğu flavonoid-DNA ilişkisi üzerine odaklanmıştır. DNA ile etkileşebilen doğal moleküllerin, insan sağlığı açısından önemli sonuçlar yarabileceği düşünülmektedir. DNA ile etkileşen bu moleküllerin, DNA' nın yapısını bozması, kendini eşlemesinin önüne geçmesi, antitümör ilaçlarının geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Flavonoidler üzerine araştırmalar çoğunlukla kuersetin ve özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır. Doğada en sık bulunan flavonoidlerden biri olması bunun en önemli sebeplerinden biridir.

Bu çalışmada kuersitrin ile beraber rutin ve mirisitrinin DNA ile etkileşimi spektrofotometrik yöntemler kullanılarak incelenecektir. Bu konuda yapılan diğer çalışmalardan hareketle bu flavonoidlerin yalnız başına DNA ile nasıl etkileştiği, bu etkileşimin hangi şekilde olabileceği ve etkileşim kuvvetleri arasındaki farklar incelenmeye çalışılacaktır. Aynı şekilde bu flavonoidlerin, Cu(II) ve Zn(II) iyonlarıyla kompleks oluşturup oluşturmadığı, oluşturuyor ise bu kompleksin ana flavonoidten farklı özellik gösterip göstermediği araştırılacaktır. Yapılan çalışmalar flavonoid-metal komplekslerinin, ana flavonoidten farklı özellikler gösterebileceğini göstermektedir. Kompleksin DNA ile etkileşimi, bu etkileşimi hangi

yöntemlerle yaptığı, etkileşimin ana flavonoidin yaptığı etkileşimden farkı araştırılmaya çalışılacaktır.

1.2 DNA

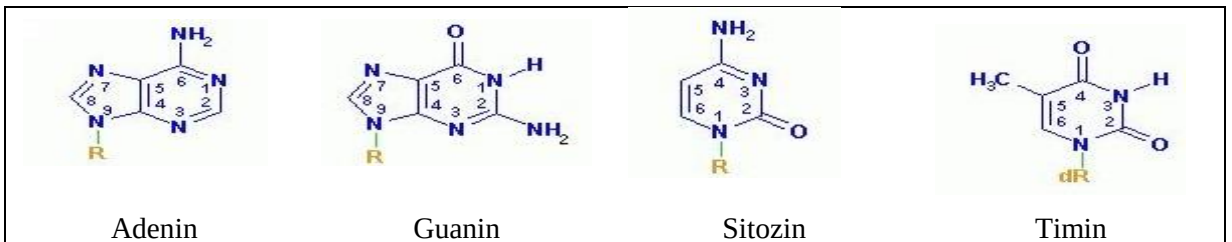
Deoksiribonükleik asit veya kısaca DNA tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik talimatları taşıyan bir makro moleküldür. DNA aslında nükleotid polimeridir.

DNA öncelikle canlıların genetik bilgilerini depolamak için işlevsel birim olarak hizmet veren polimer zinciridir. Canlının vücut şekli, her organına ait iş bölümü ve bu organların çalışma düzenleri, hücre içinde üretilmesi gereken proteinlerin genetik kodları, üretilecek proteinlerin miktar kontrolleri (gen regülasyonu) gibi canlının hayatını devam ettirmesi için gereken şeyler DNA üzerinde planlanmış ve kodlanmıştır.

DNA'nın yapı taşı olan nükleotidler üç ana kısımdan meydana gelir. Bunlar;

- Heterosiklik halka yapısı gösteren beş karbonlu şeker (Pentoz)
- Azot atomları içeren organik bir baz (pürin ya da pirimidin)
- Bir fosfat grubu

DNA'da dört çeşit nükleotit bulunur. Nükleotitlerin yapılarındaki bazların farklı olması birbirlerinden ayrılmasını sağlar. DNA'nın yapısında Pürin bazları olarak Adenin (A) ve Guanin (G), pirimidin bazları olarak da Sitozin (S) ve Timin (T) bulunur. Bir nükleotit yapısına katılan baz çeşidine göre isimlendirilir. Örneğin, adenin bazı ile 5 karbonlu bir şeker birleştiğinde adenozin meydana gelir. Adenozin fosforik asitle birleştiğinde ise adenin nükleotidi oluşmuş olur.



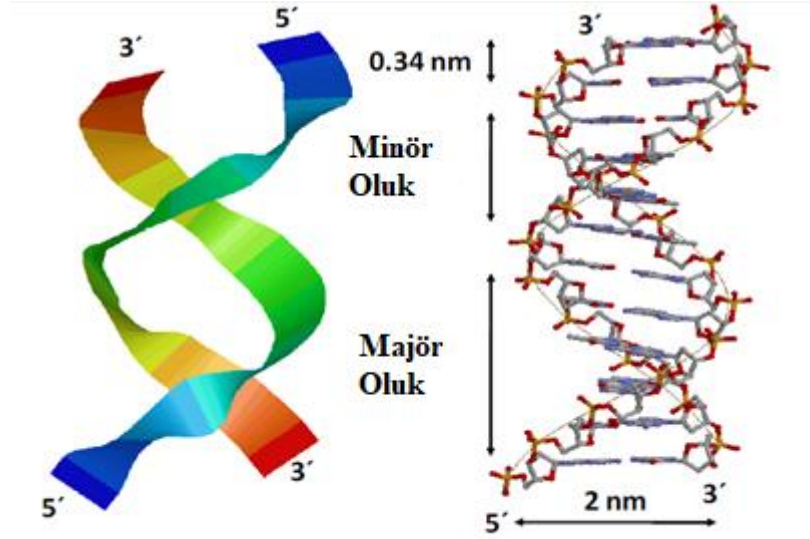
Şekil 1.14 DNA da bulunan bazların yapıları.

Nükleotitlerin yapısındaki baz ve şeker birbirine glikozit bağıyla bağlanarak nükleosit adı verilen yapıyı oluşturur. Fosfat grubu da nükleositteki şeker kısmıyla ester bağları oluşturarak nükleotiti oluşturur. Nükleotitler birinin şeker grubunda bulunan 3-OH (3') grubu ile onu izleyen nükleotitin 5-PO₄ (5') grubu arasında kurulan fosfodiester bağıyla birbirine bağlanan bir omurgaya sahip bir zincir oluşturur. Bu zincirin oluşumundaki fosfodiester bağları oldukça kuvvetlidir. Bu zincirler DNA'nın ana yapısını meydana getirir. Polinükleotit zincirleri 3'-5' fosfodiester bağları ile oluştuğundan, zincirin iki ucu birbirinden farklıdır. Bu durum polinükleotit zincirde bir kutupluluk oluşmasına neden olur. Bazı virüsler dışında bütün canlılarda DNA hep çift zincirden oluşur.

1.2.1 DNA'nın yapısı

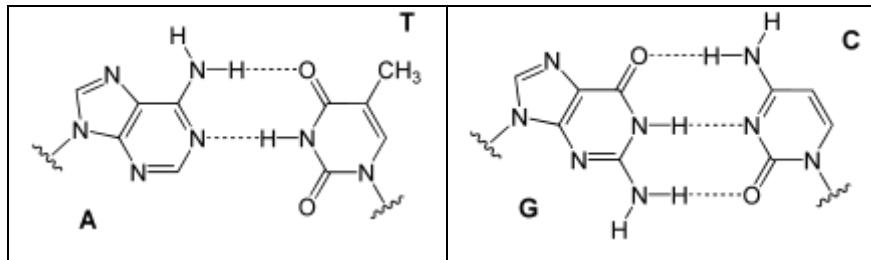
DNA'nın hücre içerisindeki yapısı 1953 yılında Watson ve Crick'in DNA'nın çift sarmal yapı halinde bulunduğunu açıklayan modeli ortaya koymalarıyla kanıtlandı. Watson ve Crick'in ortaya koydukları model o döneme kadar bu konu üzerinde çalışan başka araştırmacıların buldukları bilgilere dayanır. Wilkins ve Franklin DNA molekülünün birden fazla polinükleotit zincirinin birbiri etrafında dönmesiyle meydana geldiğini ve bu dönüşlerin zincirlerdeki bazların sırasına bağlı olmadığını belirtmiştir. Chargaff çeşitli türlere ait DNA'ları incelemiş, DNA'yı nükleotitlerine parçaladığında Adenin miktarının Timine, Guanin miktarının da Sitozine daima eşit olduğunu belirlemiştir. Watson ve Crick bu bulgulara ek olarak DNA'nın biyokimyasal özelliklerini değerlendirmiş ve DNA'nın üç boyutlu yapısına ait bir model geliştirmişlerdir.

Polinükleotit zincirler ortak bir eksen etrafında sağa doğru dönen heliks yapıdadırlar. Bu dönüşler sırasında zincirlerdeki bazlarla şeker halkalarını birbirine bağlayan glikozit bağları tam olarak karşı karşıya gelmezler. Bu durumda, çift sarmalın şeker-fosfat omurgaları eksen boyunca eşit aralıklı yer kaplamazlar ve omurgalar arasında oluklar oluşur. Bu olukların boyutları eşit değildir. Biri geniş (majör) diğeri ise dar (minör) oluk olarak adlandırılır.



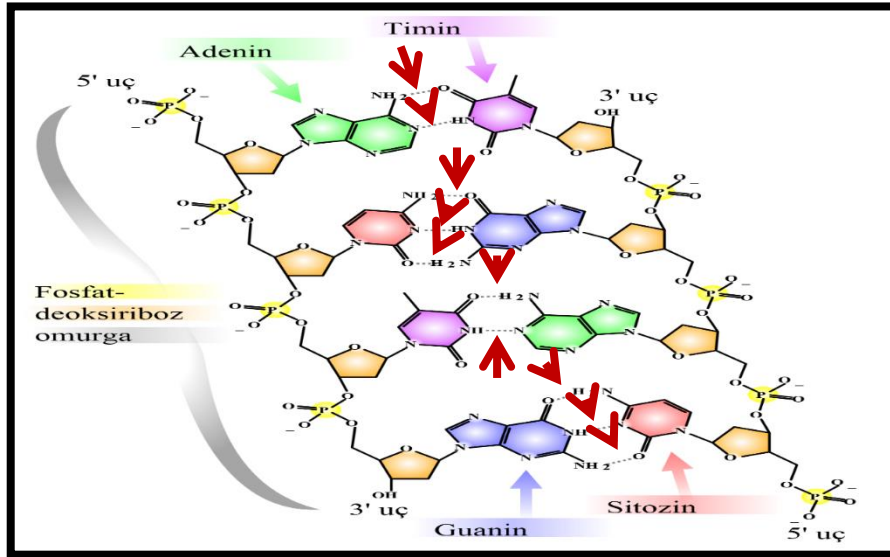
Şekil 1.15 DNA'daki majör ve minör oluklar

Şeker-fosfat omurgası çift zincirin dışında kalır ve negatif yüklüdür. Nükleotidlerin bazıları molekülün omurgasının iç kısmında ve DNA sarmalının eksenine dik konumdadır. Birbirine komşu baz çiftleri arasındaki uzaklık 3,4 Å'dır. İki polinükleotid zinciri nükleotid bazları arasında oluşan Hidrojen bağlarıyla birbirine bağlanır. Bu hidrojen bağları her zaman bir pürin ve bir pirimidin bazları arasında meydana gelir. Bazlar arasında sıkı bir etkileşim sağlanması için, hidrojen bağlarının yönelimi ve uzaklıkları Adenin ile Timin ve Guanin ile Sitozin arasında en uygun olmaktadır. Adenin ve Timin arasında iki, Guanin ve Sitozin arasında ise üç tane hidrojen bağı oluşur. Baz eşleşmesindeki bu yapı DNA'nın replikasyon, onarım, rekombinasyon gibi işlevlerinin mekanizmalarının açıklanmasında DNA'nın en önemli özelliklerindendir.



Şekil 1.16 DNA'daki baz eşleşmeleri

Bazlar arasında oluşan hidrojen bağlarının farklı olması polinükleotid zincirlerdeki ester bağlarının birbirine ters durumda olmasına yol açar. Bu nedenle DNA'da iki polinükleotid zinciri birbirine ters yönde uzanır.



Şekil 1.17 DNA'nın yapısı

Bu yapıda bazlar molekülün iç kısmında yer aldığından molekülün içi hidrofobik, fosfat-şeker omurgası ise molekül omurgasının dışında yer aldığından molekülün dışı hidrofilik özellik gösterir.

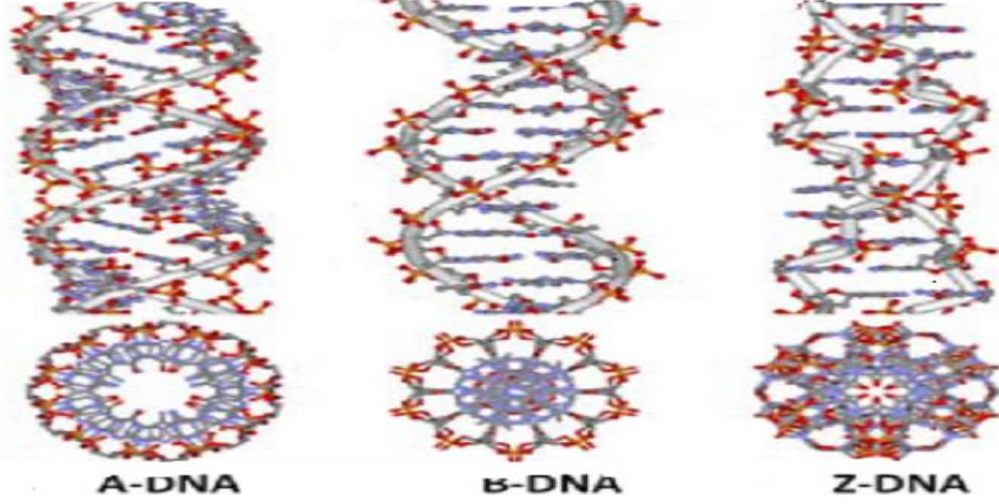
1.2.2 DNA'nın farklı şekilleri

1953 yılında Watson ve Click tarafından yapısı açıklanan DNA molekülünün daha sonra bazı koşullarda farklı yapılarda bulunabileceği ve bu yapıların birbirine dönüşebileceği belirlenmiştir. DNA'nın üç farklı şekli bulunmaktadır (Şekil 1.18). Bunlar;

B-DNA: DNA'ların çoğu B formundadır. Bu molekül sağa dönümlü bir sarmaldır. Hücrelerin içinde bulunduğu ortam gibi sulu ortamlarda baskındır. Çift zincirin bir tam dönüşünde yapıya 10 baz girmektedir. Baz çiftleri çift sarmal eksenine dikey olarak yer almış bulunmaktadır.

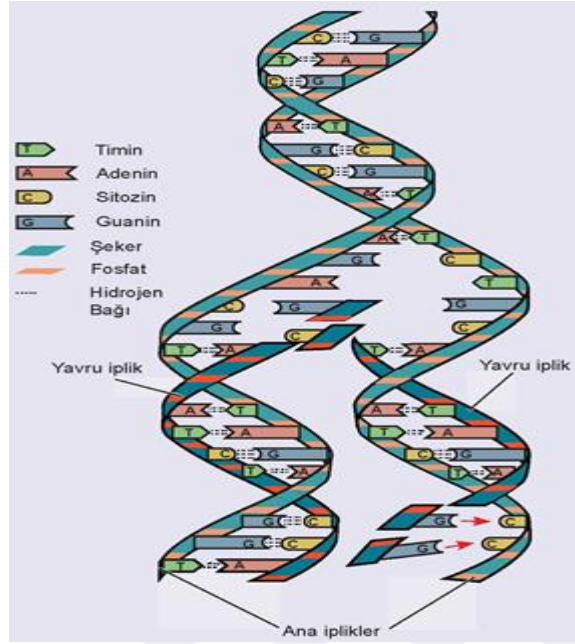
A-DNA: Sağ el çift sarmal yapı gösteren DNA molekülünün bir tam dönüş yapması için yapıya 11 baz girmiş, baz çiftleri çift sarmal eksenine 20 derecelik bir açıyla yerleşmiştir. Çapı 23 Å'dur (García-Ramos et al. 2013). DNA'nın su miktarının azaldığı ya da yüksek tuz koşullarındaki halidir. B DNA'ya oranla biraz daha sıkışık yapıdadır.

Z-DNA: Sola dönümlü bir sarmaldır. Z-DNA'nın bir tam dönüş yapmasında zincir yapısına 12 baz girmektedir. B DNA'ya benzeyen Z-DNA zig zag yapılıdır. Sarmalın çapı 18 Å'dur. Bu formda küçük oluk derin ve dardır, büyük oluk kaybolmuş gibidir (García-Ramos et al. 2013).



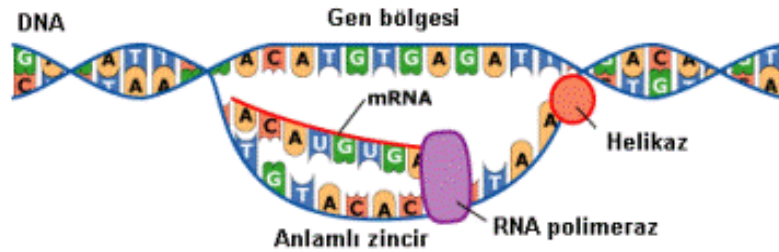
Şekil 1.18 DNA türleri

DNA canlılarda yaşamın devam edebilmesi için bütün genetik bilginin depolandığı bir polinükleotittir. Bu genetik bilginin nesilden nesile aktarılabilmesi DNA'nın kendini eşlemesi (Replikasyon) ve Transkripsiyonla mümkün olmaktadır. Replikasyon DNA'nın tamamen kendinin eşi yeni bir molekül oluşturma işlemidir. Böylece DNA'nın taşıdığı genetik bilgi nesilden nesile aktarılır. Replikasyonda DNA her bir ipliğini kalıp olarak kullanarak kendine eş bir DNA ipliği oluşturur. Böylece ana molekülden oluşan iki yavru molekül ana molekülün bir zincirini taşır.



Şekil 1.19 DNA'nın Replikasyonu

DNA'dan RNA'ya genetik bilginin aktarılması işlemine transkripsiyon denir. Transkripsiyon, hücre içi genetik bilgi akışının ilk basamağıdır. Transkripsiyonda DNA'nın bir dizisinin eşleneği olan mRNA molekülü sentezlenir. DNA kalıbı üzerinden RNA sentezi, RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir.



Şekil 1.20 DNA'nın Transkripsiyonu

Mesajcı RNA'nın (mRNA) görevi DNA molekülünde saklı olan genetik bilgiyi protein yapısına aktarmaktır. Bunun için mRNA sentezlenecek protein ile ilgili bilgiyi DNA'dan alıp çekirdek zarı deliklerinden geçerek sitoplazmadaki ribozomlara götürür. Böylece bu molekül DNA'dan aldığı özel şifreye bağlı kalarak, hücre tarafından sentezlenecek aminoasit sırasını belirler.

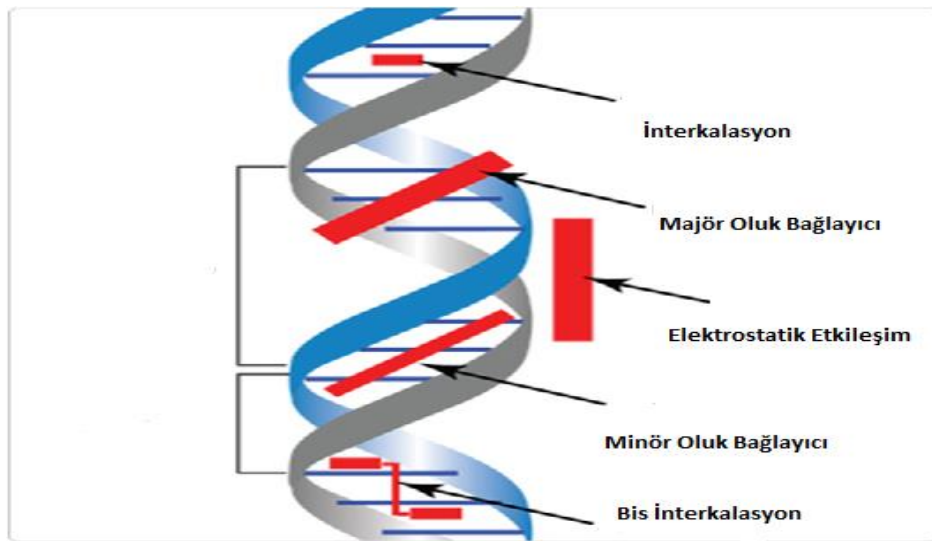
1.3 KÜÇÜK MOLEKÜLLERİN DNA İLE ETKİLEŞİM YOLLARI

Bir canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülü doğal veya çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. İnsan hücrelerinde metabolik aktiviteler ve çevresel faktörler (UV ışığı gibi) sonucu günde 1 milyon hücrenin zarar görmesi olasıdır. Bu etkenler, DNA'nın yapısını ve dahası diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilirler. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, kanser ve yaşlanmaya neden olur.

Yapılan araştırmalar kanser ilaçlarının kanser hücrelerine zarar verdiğini ve hücrelerin ölümüne sebep olduğunu göstermiştir. Bu nedenle kanser ilaçlarının ana hedefi DNA'dır. Moleküllerin DNA'ya nasıl bağlandığının mekanizmasını belirlemek hem yeni ilaçlar geliştirmek hem de bu ilaçlarda görülen yan etkilerin ortadan kaldırılması açısından oldukça önemlidir. Yeni sentezlenen küçük moleküllerin DNA'ya bağlanması ve onunla etkileşmesi yeni ilaçların tasarımında olduğu kadar DNA'yı algılama yöntemlerinin gelişmesinde ve çevreye zararlı maddelerin algılanmasında da önemlidir.

Küçük moleküllerin DNA'ya bağlanması ile ilgili çeşitli etkileşim türleri vardır.

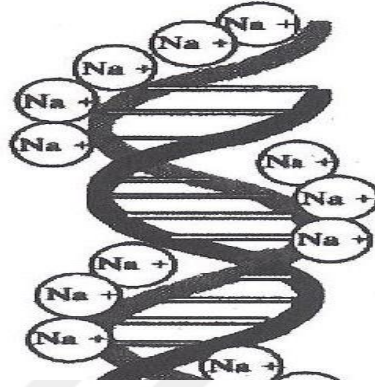
- Elektrostatik bağlanma
- Oluk bağlayıcılar
- İnterkalasyon



Şekil 1.21 DNA'ya bağlanma çeşitleri

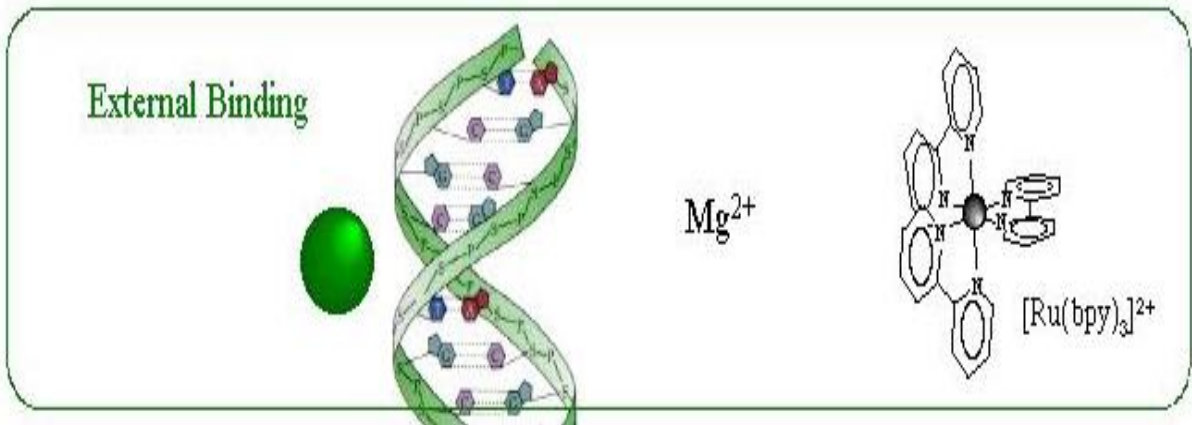
1.3.1 Elektrostatik Etkileşim

DNA sarmalı hem yapısını hem de fonksiyonlarını etkileyen negatif yüklü fosfat grupları içerir (Gökoğlu ve ark. 2009). Pozitif yüklü iyonlar negatif yüklü DNA omurgasına elektrostatik etkileşimle bağlanabilir. Metaller ile fosfat gruplarının bağlanması genellikle DNA'nın kararlılığını arttırabilir (Aslanoglu 1997). Elektrostatik etkileşimler diğer etkileşim türlerine göre daha zayıftır. Molekül çift sarmala dış bağlanma ile bağlandığında genellikle karşı iyonları uzaklaştırır. Bunun sonucunda DNA yapısında ayrılmalar gerçekleşebilir. Bu tür etkileşimler genellikle seçici değildir.



Şekil 1.22 Elektrostatik Dış Bağlanma

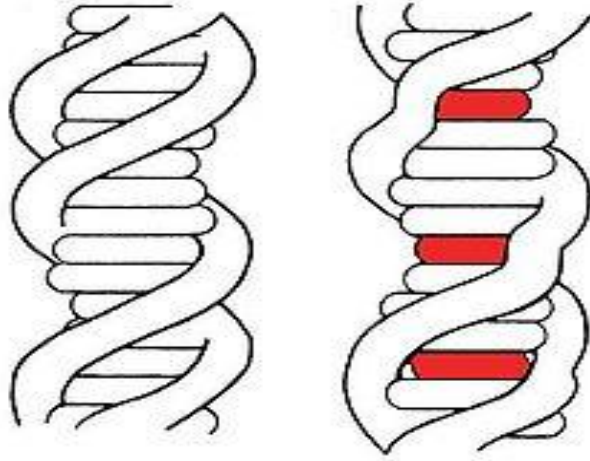
DNA ile etkileşen molekülün üzerindeki fonksiyonel grupların özelliklerine bağlı olarak interkalasyon ve oluk bağlayıcılar da elektrostatik etkileşimi bünyesinde barındırabilir.



Şekil 1.23 Elektrostatik Dış Bağlanma (Sirajuddin et al. 2013)

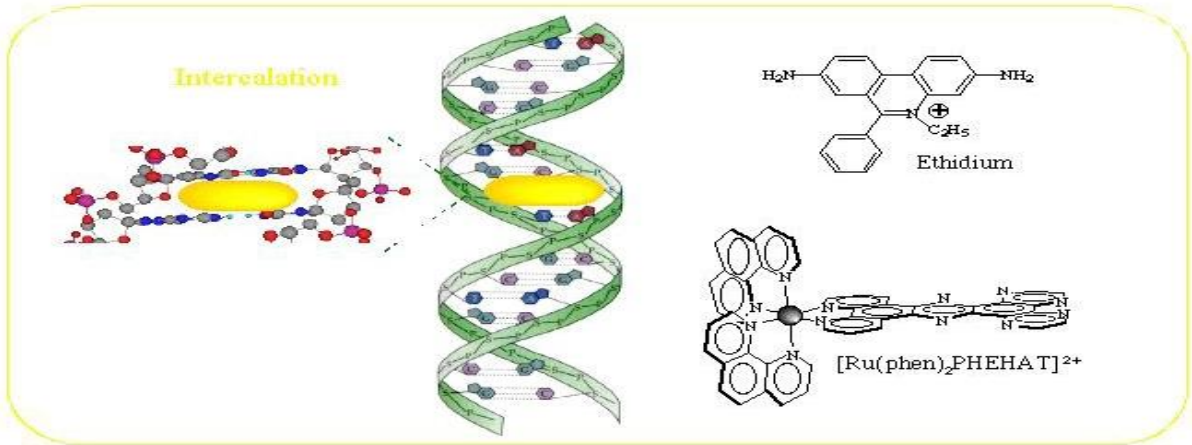
1.3.2 İnterkalasyon

Bir molekül ya da grubun başka bir molekül ya da grubun arasına tersinir şekilde girmesi interkalasyon olarak adlandırılır.



Şekil 1.24 İnterkalasyon

Molekül eğer uygun şekilde ve kimyasal yapıda olursa DNA'daki baz çiftleri arasına tersinir şekilde yerleşebilirler. İnterkalatörler çoğunlukla çok halkalı, aromatik ve düzlemseldir. İnterkalatör molekül ve baz çiftleri arasında van der Waals kuvvetleri etkindir. İnterkalatörler genellikle 5' pirimidin 3' pürin bazları arasına bağlanırlar.



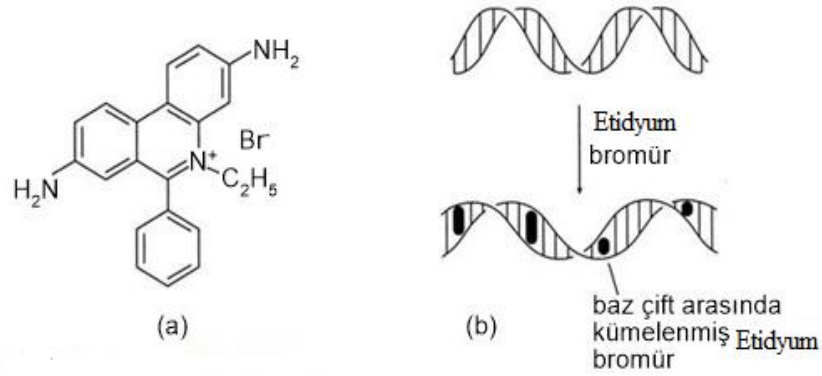
Şekil 1.25 İnterkalasyon (Sirajuddin et al. 2013).

İnterkalasyonda polisiklik aromatik bileşikler DNA baz çiftlerinin arasına yerleşerek, baz çiftlerinin arasının açılmasına, şeker fosfat omurgasının uzamasına ve DNA sarmalının bozulmasına sebep olur.

Metal kompleksleri DNA'ya bağlanırken, metal iyonları doğrudan DNA omurgasındaki fosforlarla koordine olur. Aromatik yan kollar veya aren ligandları DNA bazları arasına girerek interkalasyon yapar. Metal kompleksleri ile DNA arasındaki interkalatif etkileşimler biyolojik aktiviteyi etkileyebilecek yeni özelliklere sahiptir (Liu and Sadler 2011).

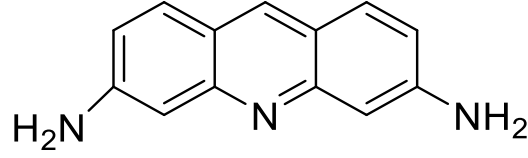
İnterkalatörler DNA'nın replikasyon, transkripsiyon ve onarım işlemlerini kesintiye uğratan ilaçlardır. Bu etkilerinden dolayı interkalatörler mutajendir. DNA interkaratörleri kanser tedavisinde hızlı büyüyen kanser hücrelerinde DNA'nın kendini eşlemesini engellemede kullanılır. Etidyum, daunomisin, ekinomisin, aktinomisin ve kuinakrin önemli interkalatörlerdir.

Üzerinde çok çalışılmış olan DNA interkalatörlerinden biri de etidyum bromürdür (EtBr).



Şekil 1.26 Et-Br'nin yapısı ve DNA'ya bağlanma şekli

Parlak renkli bir akridin türevi olan proflavin, II. Dünya Savaşı sırasında yara tedavi etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır (Şekil 1.27). Proflavin, etkinliğini bakteri DNA'sına bağlanıp DNA sentezini önleyerek gösterdiği bilinmektedir (Şekil 1.28).

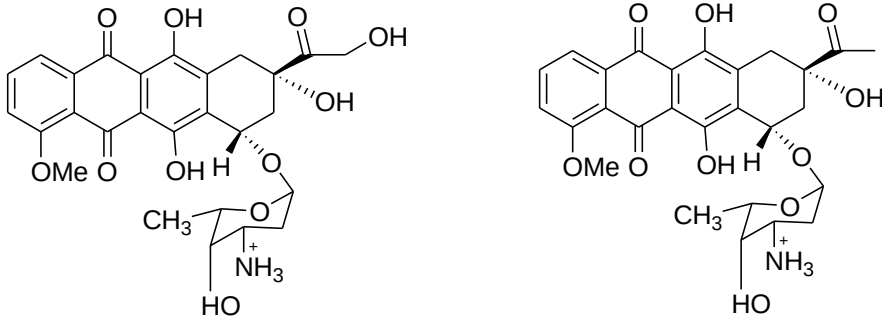


Şekil 1.27 Proflavinin Yapısı



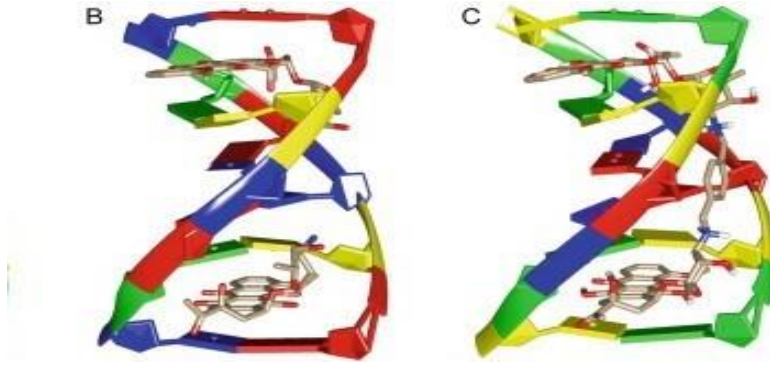
Şekil 1.28 Proflavinin DNA ya Bağlanma Şekli (Mukherjee and Sasikala 2013)

Antrasiklinler (Şekil 1.29) DNA ve RNA sentezine müdahale ederler. DNA ve RNA sentezini inhibe etmeleri (engellemeleri) replikasyonu önler ve böylece kanser hücrelerinin büyümesi durur.



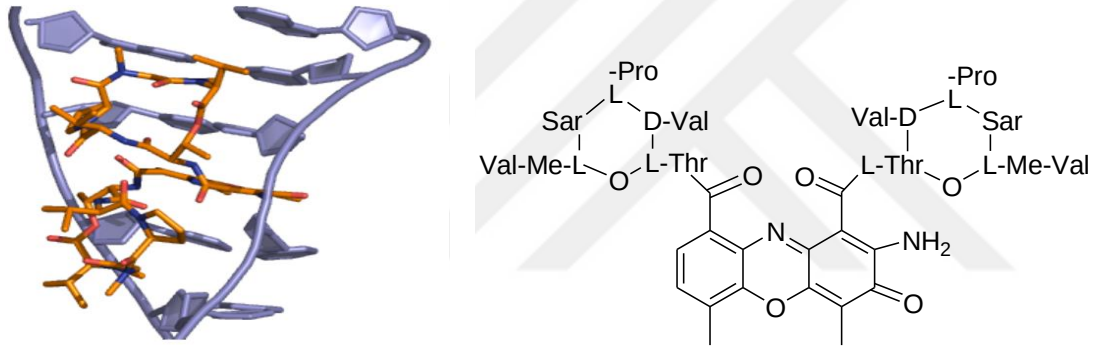
Şekil 1.29 Doksorubisin ve Daunorubisin Yapıları

Daunorubisin kanser tedavisinde kullanılan bir kemoterapötik ilaçtır. DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlanır (Şekil 1.30).



Şekil 1.30 Daunorubisin DNA'ya bağlanma şekli (Mukherjee and Sasikala 2013)

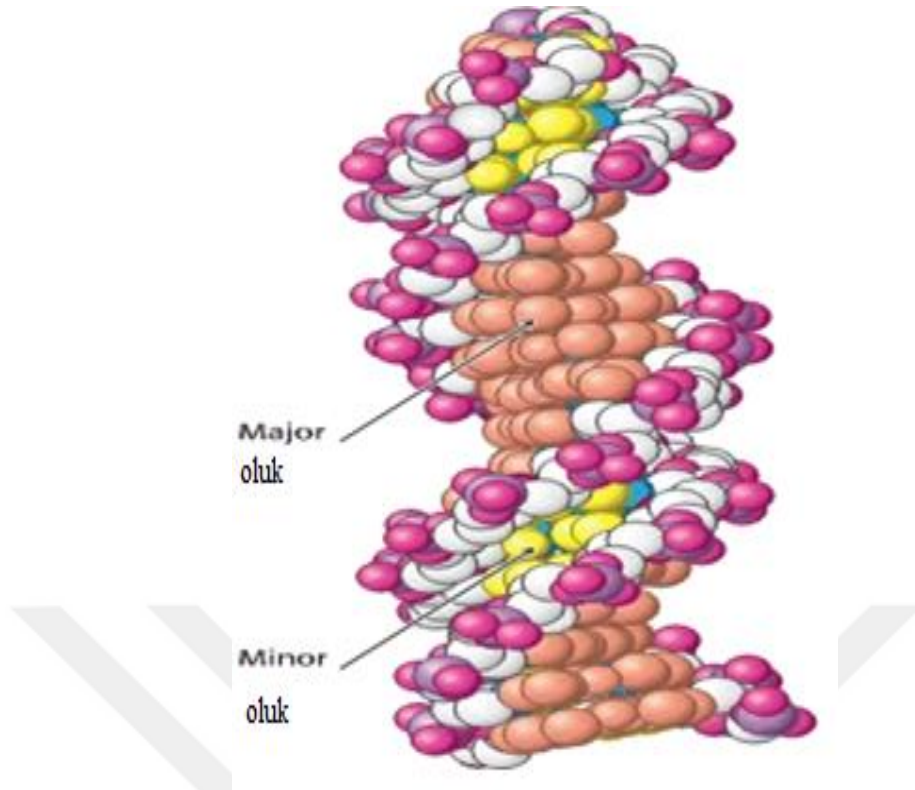
Aktinomisin DNA çift zinciri içine, komşu guanozin-sitozin baz çiftleri arasında enine yerleşerek DNA ve mRNA üretimini bozan ilaçtır (Şekil 1.31).



Şekil 1.31 Aktinomisin yapısı ve DNA'ya bağlanma şekli

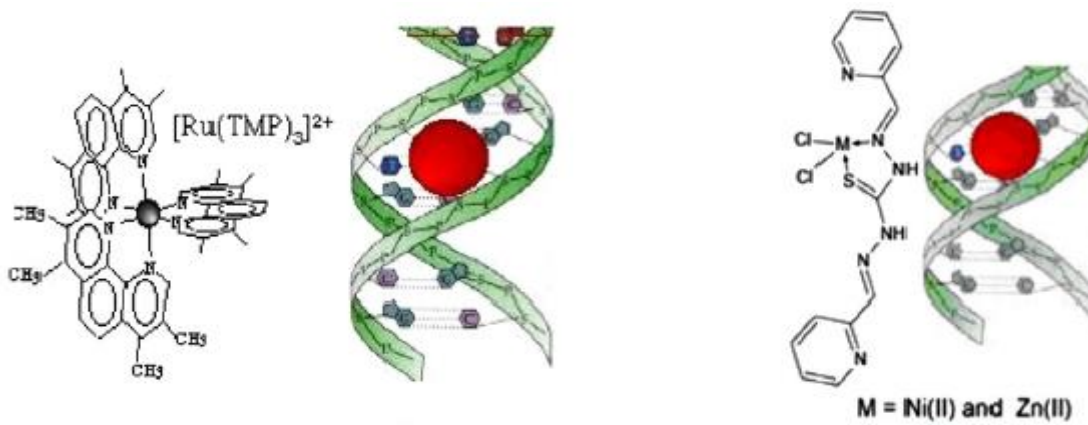
1.3.3 Oluk Bağlayıcılar

Bu bağlanma şekli, molekülün DNA sarmalının baz çiftlerinin arasına direk hidrojen-bağları ile bağlanmasıdır (Aslanoglu 1997). DNA'nın B-DNA formunda geniş bir majör yarı ve derin ve dar bir minör yarı bulunmaktadır (Şekil 1.32) (Seanger 1984).



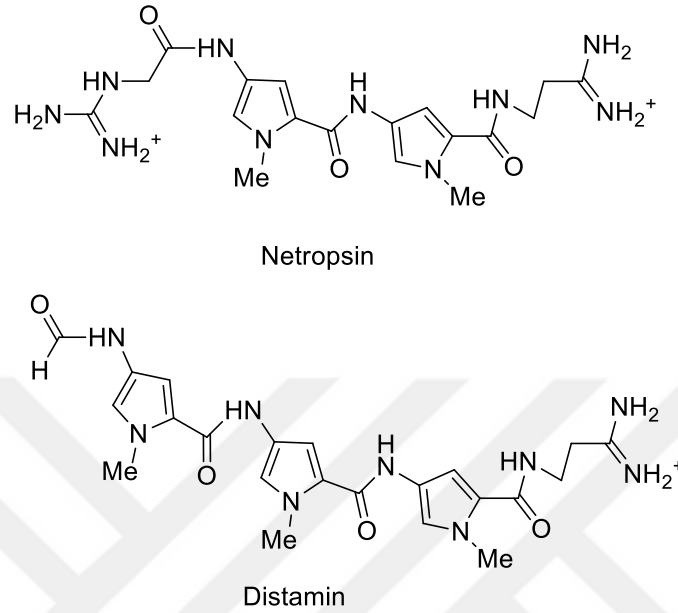
Şekil 1.32 DNA üzerindeki Majör ve Minör oluklar

Küçük moleküllerin minör oluklar üzerinden büyük moleküllerin ise majör oluklar üzerinden bağlandığı bilinmektedir (Aslanoglu 1997). Genellikle hilal şeklinde moleküller olan oluk bağlayıcıların iç kısmında hidrojen-bağı yapabilecek N-H grupları vardır. Bazı oluk bağlayıcılar katyonik ligandlardır (Şekil 1.33).

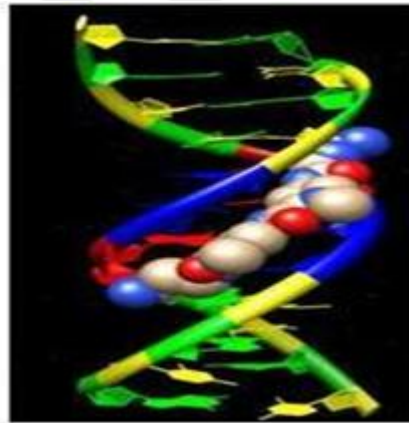


Şekil 1.33 Oluk bağlayıcılar (Sirajuddin et al. 2013)

Sterik engelin daha az olması ve elektrostatik potansiyelden ötürü oluk bağlayıcılar DNA üzerinde Adenin-Timin seçiciliği gösterir (Aslanoglu 1997). Distamin ve Netropsin bilinen minör oluk bağlayıcı ilaçlardır (Şekil 1.34).



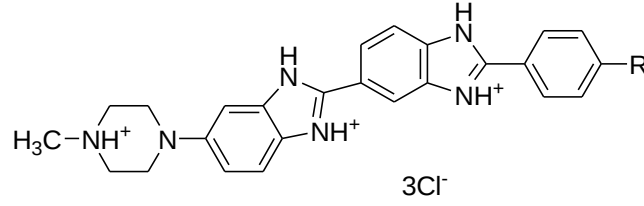
Şekil 1.34 Netropsin ve Distamin yapısı



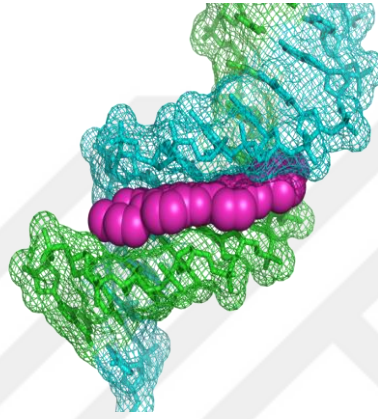
Şekil 1.35 Netropsinin DNA'ya bağlanma şekli (Sirajuddin et al. 2013)

Minör oluk ile bağlanan moleküller furan, pirol ya da benzen halkaları içerir. Bu moleküller hidrojen-bağları, elektrostatik etkileşim ve Van der Waals bağları yoluyla minör oluklara uyum sağlar hale gelir (Aslanoglu 1997). İnterkalasyon ile bağlanan moleküllerden farklı olarak oluk bağlayıcılar DNA'nın yapısında belirgin bir değişikliğe neden olmaz. Bu bağlanma şeklinde enzimlerinin DNA üzerinde bağlanabileceği boşluklar doldurulması esas alınmaktadır. Hoechst boyaları (Şekil 1.36) DNA'ya oyuklardan bağlandığı için hücre

bölünmesi sırasında DNA replikasyonunu bozabilirler. Dolayısıyla potansiyel olarak mutajenik ve kanserojeniktir. Şekil 1.37’de Hoechst boyalarının DNA ile etkileşim şekli görülmektedir.

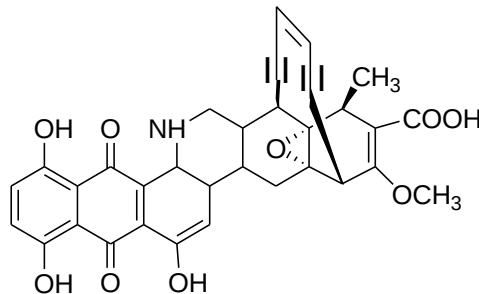


Şekil 1.36 Hoechst Boyasının Yapısı

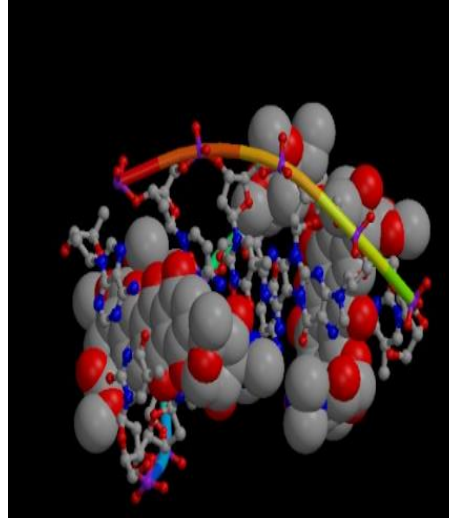


Şekil 1.37 DNA’ya oluk bağlanma şekli

Dinemisin, şekil 1.38’deki yapıdan da görüleceği üzere antrasiklik bir halka ile endimin yapılarını birlikte bulundundur. Dinemisin DNA’ya interkalasyon ve küçük olukların bağlanmasının bir kombinasyonu şeklinde bağlanır (Şekil 1.39). Yani hem interkalasyon hem de küçük oluklara bağlanma gözlenir. Dinemisin, NADPH, tiyol veya ışık ile aktive edilebilir ve önce DNA’ya bağlanır. Bunun sonucunda DNA sarmalının her ikisinde de standart bir kırılma meydana gelir.



Şekil 1.38 Dinemisinin yapısı



Şekil 1.39 Dinemisinin DNA üzerindeki etkisi

1.3.4 Geçiş Metali ve Geçiş Metali Komplekslerinin DNA İle Etkileşim Yolları

Metal iyonlarının nükleik asitlerle nasıl etkileştiği ve etkileşimin nükleik asitler üzerindeki etkisi uzun zamandır araştırma konusudur. Ağır metallerin canlılar üzerindeki zararlı etkilerinin bunların DNA'ya bazı bölgelerden bağlanması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Pozitif yüklü metal iyonları direk ya da dolaylı olarak DNA'nın negatif yüklü bölgeleriyle etkileşime girebilirler. DNA'nın bu bölgeleri negatif yüklü fosfat grupları, azot ya da oksijen gibi elektron verici atomlar olabilir. Metal iyonlarının bağlanması DNA'nın tek zincirinde ya da her iki zincirinde de kırılmalara yol açabilir (Anastassopoulou 2003).

Günümüzde antikanser ilaçlarının DNA'ya bir bağlanarak antitümör etkisi gösterdiği bilinmektedir. DNA'ya bağlanan molekül DNA'nın kendini eşlemesini önleyerek tümör hücrelerinin büyümesinin önüne geçmektedir. Bu nedenle geçiş metallerinin çeşitli ligandlarla oluşturacağı komplekslerin DNA ile etkileşip etkileşmediği, etkileşiyorsa bunun hangi şekilde olduğu ve etkileşimin DNA'ya verdiği hasar gibi konularda çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle, DNA ile interkalasyon yoluyla etkileşen moleküllere yönelik çalışmalar ilgi çekmektedir.

Geçiş metallerinin çeşitli ligandlarla oluşturduğu komplekslerin de DNA ile etkileşimlerine ilişkin pek çok çalışma mevcuttur. Geçiş metal kompleksleri DNA ile interkalasyon, kısmi interkalasyon, elektrostatik ya da kovalent bağlarla etkileşebilmektedir. Bu etkileşimler

kompleksin büyüklüğüne, geometrisine ya da yapısına bağlı olarak değişebilir (Vijayalakshmi et al. 2006).

İlaç endüstrisinde çok geniş kullanım alanı bulunan Schiff bazlarıyla oluşturulan pek çok kompleksin DNA ile etkileşimi incelenmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada 2,6 diaminopiridin ile elde edilen yeni Schiff bazı ile metal kompleksleri sentezlenmiş ve bu komplekslerin DNA ile etkileşimi çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada Cu(II) katyonu ile oluşturulan kompleksin DNA'ya bağlanma aktivitesinin çok yüksek oranda olduğu görülmüştür (Kurt and Temel 2013).

Yine bir Schiff bazı olan bis(salisiliden)-1,3-diaminopropanın Ni(II) kompleksi Aric ve arkadaşları tarafından sentezlenmiş ve bu kompleksin plazmid DNA ile etkileşimi çeşitli spektroskopik yöntemlerle incelenmiş ve kompleksin DNA ile kısmi interkalasyon ve elektrostatik dış bağlanma şeklinde etkileştiği belirlenmiştir (Aric and Nazir 2010).

1.4 ANALİTİK YÖNTEMLER

1.4.1 UV Titrasyon Yöntemi

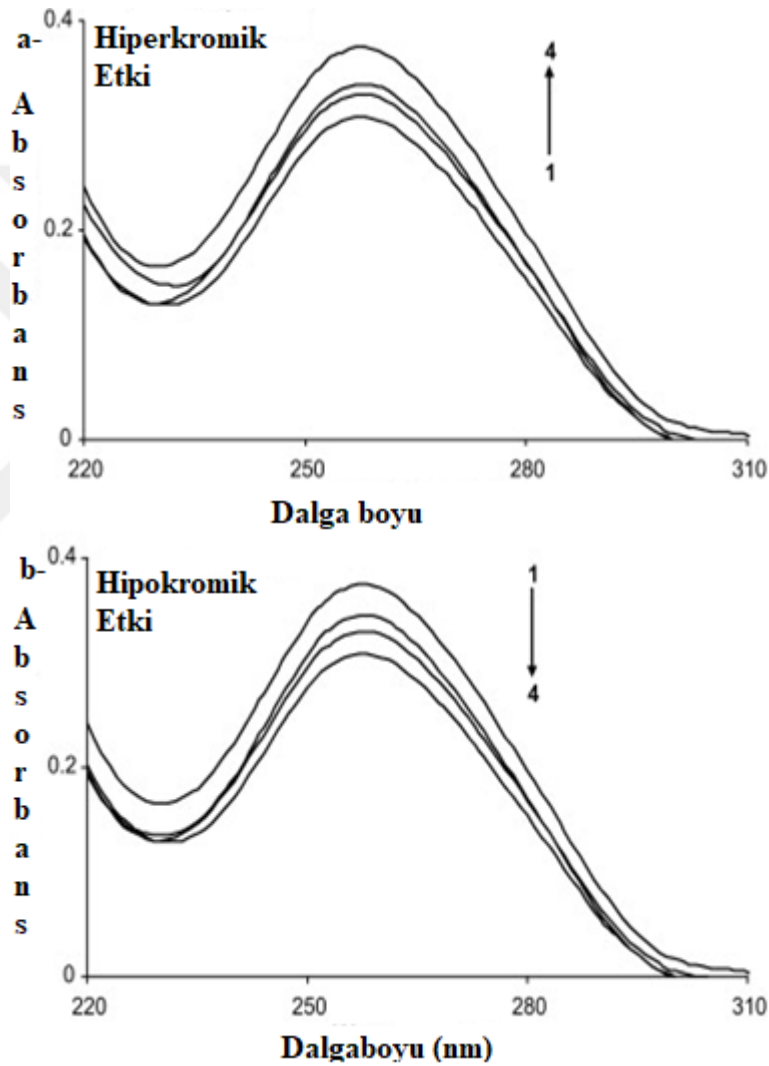
Herhangi bir maddenin DNA ile etkileşiminin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden biri absorpsiyon spektroskopisidir.

DNA çeşitli metal kompleksleri ya da küçük moleküllerle etkileştiğinde UV absorbansında değişiklikler görülür. Bu değişiklikler incelendiğinde DNA molekül etkileşiminin türü konusunda bilgi sahibi olunabilir. Bu yöntemde çalışılırken DNA'nın ya da maddenin derişimi sabit tutularak diğer maddenin derişimi küçük miktarlarda arttırılarak absorbans ölçümü yapılır. Genellikle çalışma sabit madde derişimi üzerine DNA eklenmesi şeklinde yapılır. Her eklenen DNA'nın ardından absorpsiyon ölçümleri yapılır. Spektrumda absorbans ve dalga boyundaki değişikliklerden DNA molekül etkileşiminin özelliği belirlenmeye çalışılır.

UV spektroskopisinde DNA'ya bağlanan moleküller maksimum emilim yoğunluğu değerinde değişime sebep olur. Maksimum emilim yoğunluğundaki artış hiperkromik, azalma ise

hipokromik etki olarak adlandırılır. Pik absorpsiyonunun daha büyük dalga boyuna kayması batokromik etki, daha kısa dalga boyuna kayması ise hipsokromik etki olarak adlandırılır.

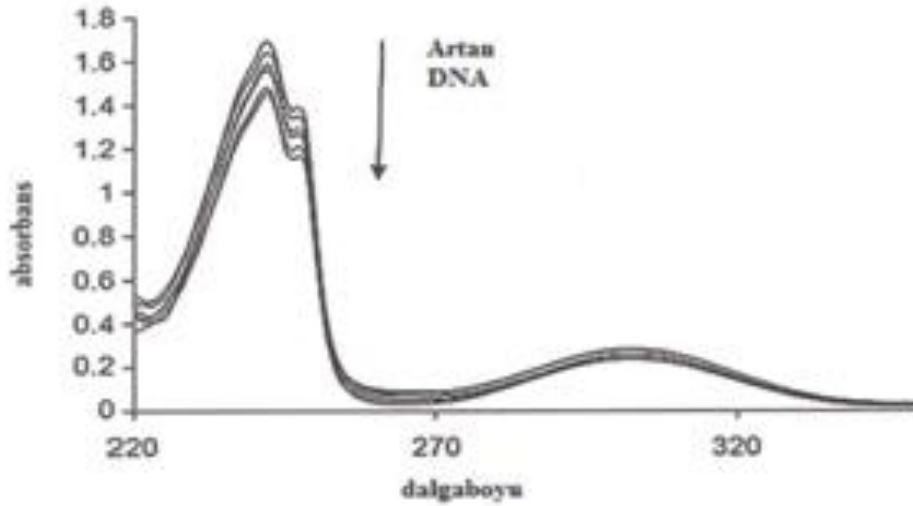
Küçük moleküllerin DNA'ya bağlanma şekilleri, absorpsiyon spektrumunda hiperkromik ve hipokromik etkiler ile karakterize edilir (Şekil 1.40). Sabit tutulan DNA miktarı üzerine küçük porsiyonlar halinde moleküller eklendiğinde gözlemlenen durum aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 1.40 a-Hiperkromizm b-Hipokromizm

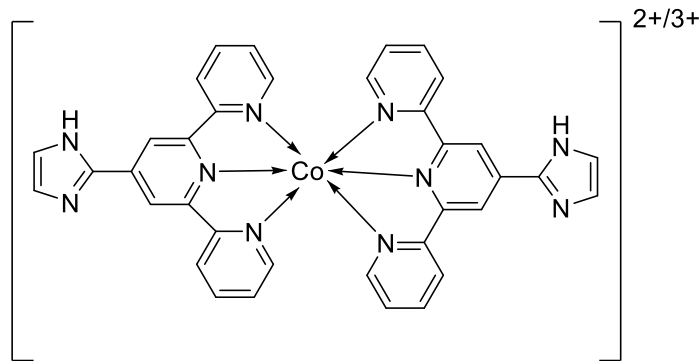
DNA-molekül absorpsiyon spektrumu incelendiğinde eğer absorbansta bir azalma (Şekil 1.41) (hipokromik etki) ve maksimum absorpsiyonda artış (kırmızıya kayma, batokromizm) varsa bu molekülün DNA ile interkalasyon yaptığını gösterir (Indumathy et al. 2007).

Etkileşim şekli kısmi interkalasyon ya da elektrostatik dış bağlanma durumunda ise absorbansta artış (hiperkromik etki) görülür (Arjmand and Aziz 2009).

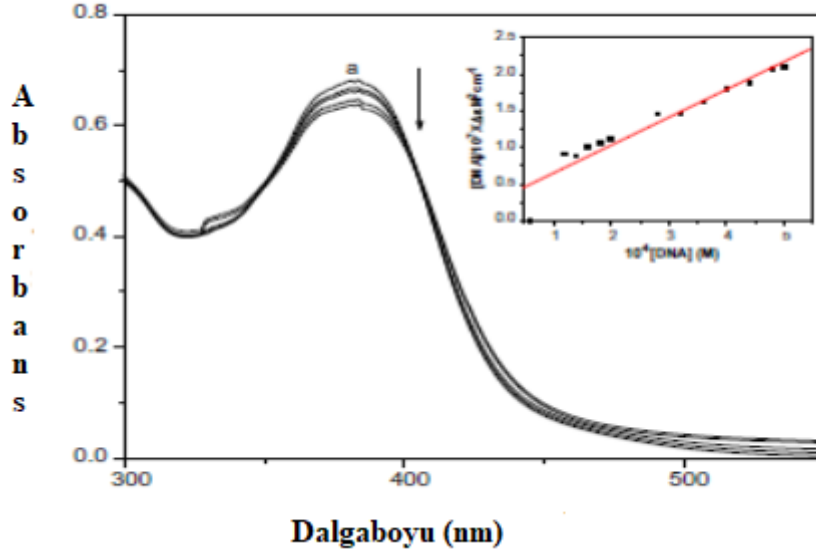


Şekil 1.41 Sabit madde derişimi üzerine DNA konsantrasyonu artırılarak absorpsiyon grafiğinde meydana gelen değişimler

Indumathy ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada iki kobalt kompleksi sentezlemiş ve bu komplekslerin DNA ile etkileşimlerini UV titrasyon yöntemiyle incelemiştir. Bu çalışmada $[\text{Co}(\text{itpy})_2]^{3+}$ (itpy: imidazoterpiridin) kompleksinin (Şekil 1.42) 20 μM çözeltisi üzerine 0-500 μM DNA eklenerek UV titrasyon yapılmış. Bunun sonunda görülen absorbanstaki düşme (Şekil 1.43) molekülün DNA ile interkalasyon yaptığına kanıt olarak sunulmuştur (Indumathy et al. 2008).



Şekil 1.42 $[\text{Co}(\text{itpy})]^{2+}$ ve $[\text{Co}(\text{itpy})]^{3+}$ komplekslerinin yapısı



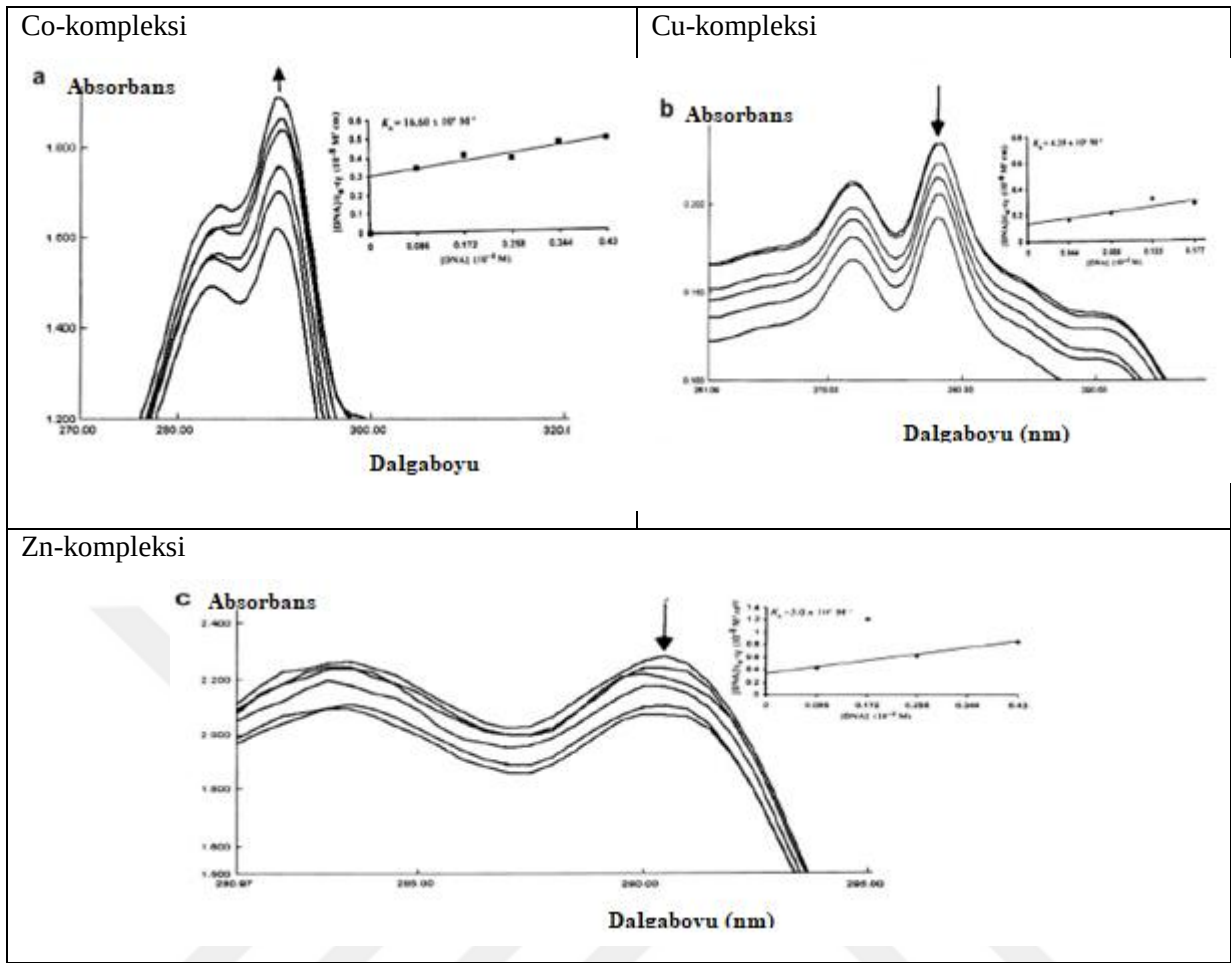
Şekil 1.43 Kobalt kompleksinin DNA titrasyonu ile UV spektrumunda meydana gelen değişimler (Indumathy et al. 2008)

Kompleksin DNA'ya hangi kuvvetle bağlandığını gösteren bağlanma sabiti değeri titrasyon sonucu elde edilen değerler kullanılarak hesaplanabilir. Bu sabitin hesaplanması için bir formül geliştirilmiştir (Pyle et al. 1989).

$$[DNA]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f) = [DNA]/(\varepsilon_B - \varepsilon_f) + 1/K_b (\varepsilon_B - \varepsilon_f)$$

Formülde ε_A ölçülen konsantrasyondaki sönüm katsayısı, ε_B ; DNA'ya tüm komplekslerin bağlanması sonrasındaki sönüm katsayısı ve ε_f serbest haldeki kompleksin sönüm katsayısı olarak açıklanır. Burada $[DNA]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f)$ karşı $[DNA]$ değerleri grafiğe geçirilir ve eğimden K_b değeri hesaplanır.

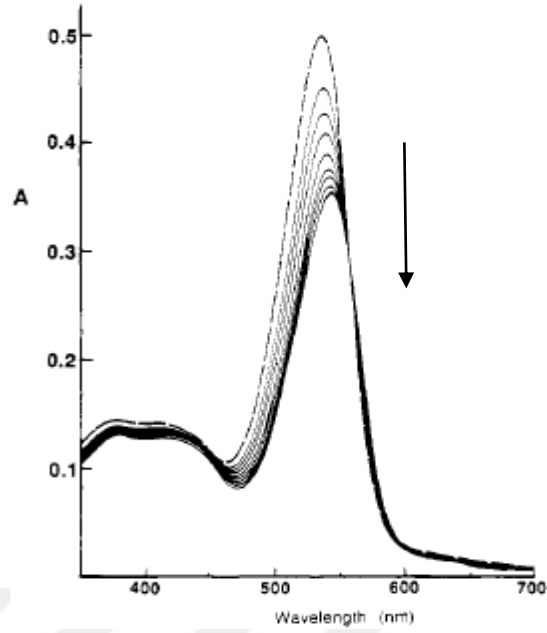
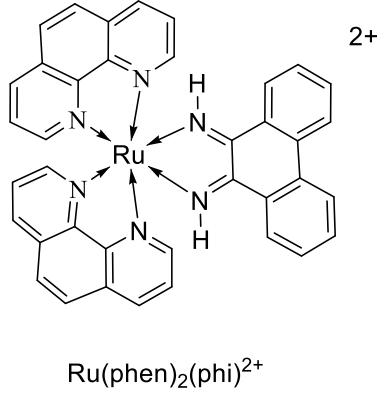
Arjman ve Aziz (2009) (2,2,2',2'-S,S[bis(bis-*N,N*-2-tiyobenzimidazolilokzalato-1,2-etan)'ın kobalt(II), bakır(II), çinko(II) ile üç farklı kompleksini sentezlemiş ve bu komplekslerin DNA'ya bağlanma durumlarını incelemiştir.



Şekil 1.44 Co, Cu ve Zn komplekslerinin artan DNA derişimiyle UV spektrumunda meydana gelen değişimler

Kobalt kompleksinin absorbsiyon grafiğinde hiperkromik etki bakır ve çinko komplekslerinin grafiklerinde ise hipokromik etki açıkça görölmektedir (Şekil 1.44). Ancak kırmızıya kayma batokromik etki görölmemektedir. Komplekslerin yapısı tam interkalasyonun önüne geçmiş olabileceği düşünölmüştür (Arjmand and Aziz 2009). Komplekslerin bağlanma sabitleri hesaplanmış ve bağlanma sabitlerinin DNA ile tam interkalasyon yapan moleküllerden çok daha küçük olduğu görölmüştür (Arjmand and Aziz 2009).

Pyle ve arkadaşları tarafından yapılan DNA molekül etkileşimlerinin incelendiği bir çalışmada Ru(III) komplekslerinden $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{+2}$ kompleksinin (1,10-phen: fenantrolin; phi: 1,10-fenantrolin-5,6-diamin) DNA ile etkileşimi incelenmiştir (Şekil 1.45). Kompleks üzerine DNA eklenip absorbsiyon spektrumu incelendiğinde hem hipokromik hem de batokromik etki açıkça görölmektedir (Pyle et al. 1989).



Şekil 1.45 $[\text{Ru(phen)}_2(\text{phi})]^{2+}$ kompleksinin yapısı ve kompleksin üzerine DNA eklenmesiyle absorpsiyon spektrumunda meydana gelen değişimler

Görüldüğü gibi UV titrasyonu DNA molekül etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Ancak UV titrasyonu ile elde edilen bulgular başka yöntemlerle de desteklenmelidir.

1.4.2 Floresans Spektroskopisi

Floresans spektroskopisi, DNA molekül ilişkilerinin belirlenmesinde gittikçe önemi artan yöntemlerden biridir. Moleküllerin DNA'ya nasıl bağlandığının anlaşılmasında çok önemli bilgiler verebilir.

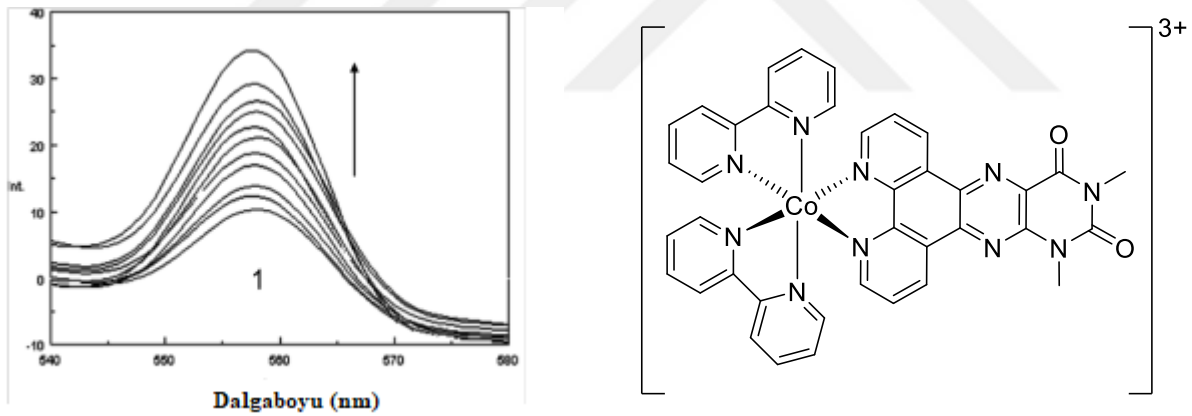
Floresans spektrumları absorpsiyon spektrumları gibi deneysel şartları verilen maddeler için karakteristiktir. Moleküller DNA'ya bağlandığında floresans spektrumunda değişiklikler yaratabilirler. Bazı maddeler DNA'ya bağlandığında floresans emisyonunda düşmeler görülürken, floresans emisyonunu arttıran maddeler de olduğu bilinmektedir.

Etidyumbromür (EtBr), 4,6-diamidin-2-fenil indol dihidroklorür (DAPI), bisbenzimidazol (Hoechst 33258), tiyazol oranj homodimeri (TO), berberin, naftilalenimidler gibi maddelerin DNA ortamında floresan şiddetleri artarken; fotokimyasal floresans uçlar olarak adlandırılan

9,10-antrakininon-2-sülfonat, fosfin 3R ve Nil mavisi gibi maddelerin DNA varlığında floresans şiddetleri azalmaktadır (Guan et al. 2006, Zhu et al. 1999).

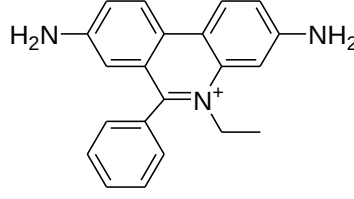
DNA ile interkalasyon yoluyla bağlanan moleküllerin floresans yoğunluğunda artma olduğu düşünülmektedir. Etrafı su molekülleri ile sarılan moleküller içlerinde bulundukları hidrofilik ortam nedeniyle floresans özellik gösteremezler. Ancak DNA ile interkalasyon yoluyla etkileştiklerinde içlerine girdikleri ortam hidrofobik özellik gösterdiğinden su molekülleri DNA sarmalının dışında kalır. Su molekülleri ile etkileşmeyen moleküller floresans özellik gösterebilir. Bu durumda DNA ile etkileşen molekül miktarı arttıkça floresansta yükselme görülür (Wu and Ji 1999).

Kumar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bir kobalt kompleksi sentezlenmiş ve bu kompleksin DNA ile etkileşimi incelenmiştir. DNA ile interkalasyon yaptığı düşünülen bu moleküllerin floresans spektrumları incelendiğinde (Şekil 1.46) eklenen DNA'ya karşılık floresansında artış olduğu görülmektedir (Kumar et al. 2011).

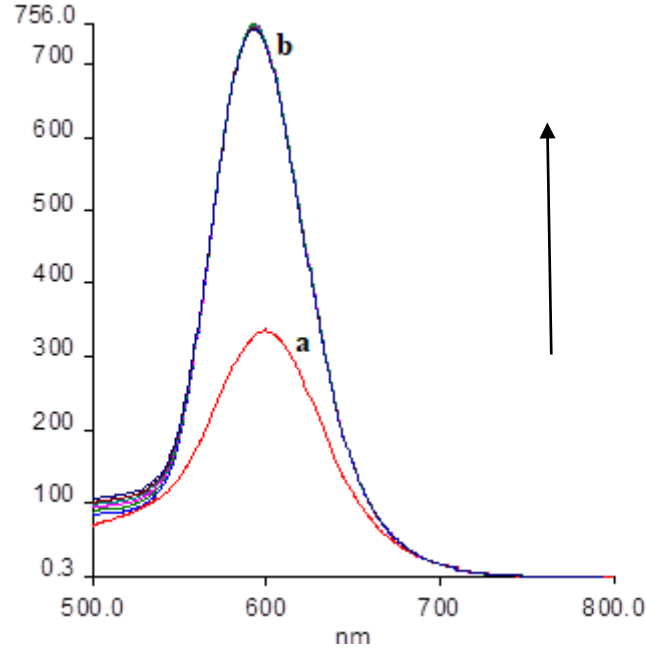


Şekil 1.46 10 µM [Co(bpy)₂(dmhbt)]³⁺ kompleksi üzerine 0-120 µM ct-DNA eklenmesi durumunda floresans şiddetindeki değişim (Kumar et al. 2011).

Moleküllerin DNA ile etkileşimlerinin floresans spektroskopisiyle belirlenmesinde EtBr'den de yararlanılır. Katyonik bir boya olan EtBr DNA için en iyi interkalatörlerden biri olarak yıllardır kullanılmaktadır (Alonso et al. 2006). EtBr DNA varlığında çok kuvvetli floresans ışıma yapar (Şekil 1.48). Sistematik adı 3,8-diamino-5-etil-6-fenil fenantridinyum bromür olan bu bileşik DNA'ya bağlanma özellikleri bakımından en çok kullanılan floresan uçtur (Şekil 1.47).



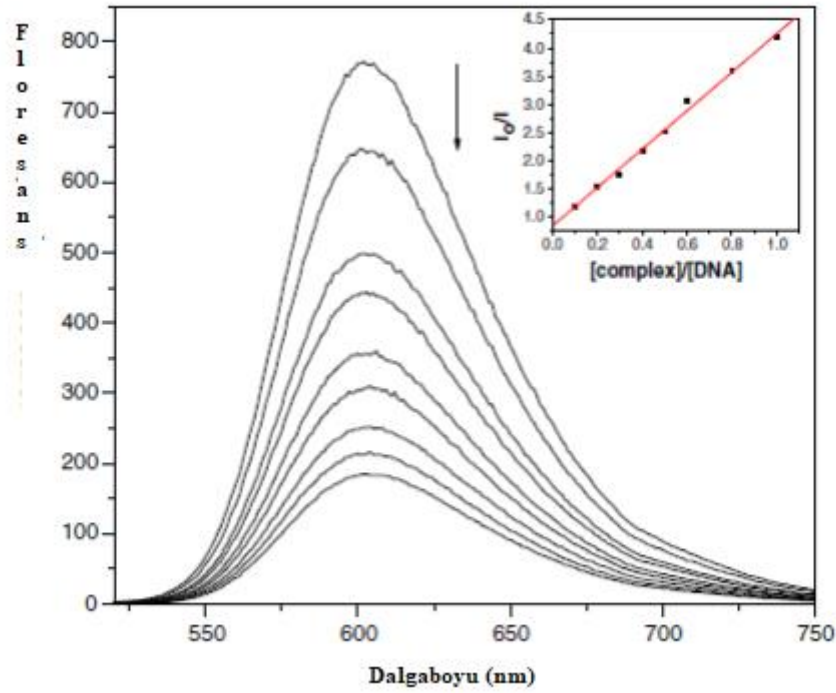
Şekil 1.47 EtBr'nin molekül yapısı



Şekil 1.48 EtBr'nin tek başına (a) ve DNA varlığında (b) floresans spektrumu

Bu yöntemde EtBr-DNA kompleksinin floresans spektroskopisi alınır. Daha sonra, DNA ile interkalasyon yaptığı düşünülen moleküller bu kompleksin üzerine eklenerek floresans yoğunluğu ölçülür. Molekül DNA ile interkalasyon yapıyorsa, EtBr'ü DNA baz çiftleri arasından çıkararak yerine yerleştiği bunda floresans yoğunluğunda düşüşe neden olduğu düşünülmektedir.

2008 yılında yapılan bir çalışmada $[\text{Co}(\text{itpy})_2](\text{ClO}_4)_3$ (itpy: imidazole-terpiridin) kompleksi sentezlenmiş ve bu kompleksin DNA ile interkalasyon yaptığı çeşitli yöntemlerle belirlenmiştir. Bu kompleksin EtBr kullanılarak floresans spektrumu alınmış ve floresans yoğunluğundaki azalma açıkça görülmüştür (Şekil 1.49) (Indumathy et al. 2008).



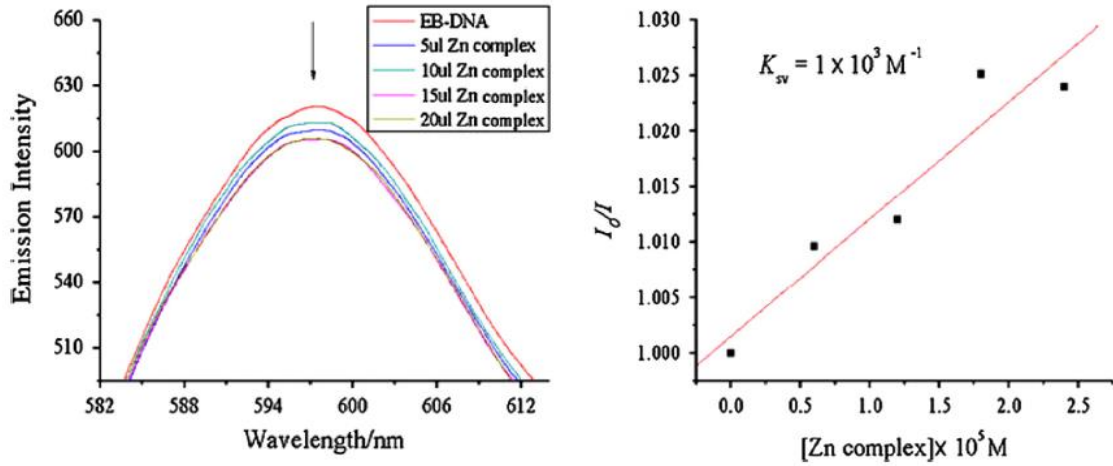
Şekil 1.49 [DNA]/[Et-Br]= 2,5 çözeltisi üzerine 0-50 μM $[\text{Co}(\text{itpy})_2]^{3+}$ kompleksi eklendiğinde floresans spektrumundaki değişimler (Indumathy et al. 2008).

Elde edilen sonuçlar düşük derişimlerde Stern-Volmer eşitliği ile değerlendirilebilir (Keizer 1983).

$$I/I_0 = 1 + K_{SV} [Q] \text{ (Stern-Volmer eşitliği)}$$

Bu eşitlikte I ölçüm yapılan dalga boyundaki floresans yoğunluğunu, I_0 ortama kompleks eklemeyen önceki floresans yoğunluğunu, $[Q]$ baskılayıcı molekül derişimini, K_{SV} de bağlanma derecesini vermektedir. I/I_0 değerine karşı $[Q]$ değeri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun eğiminden K bulunur.

Sirajuddin (2013) tarafından yapılan bir çalışmada Zn kompleksinin EtBr/DNA ile etkileşiminin floresans ölçümleri yapılmıştır (Şekil 1.50). Bu etkileşim sonunda alınan değerler Stern-Volmer eşitliği ile hesaplandığında kompleksin DNA'ya bağlanma derecesi (K_{SV}) $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

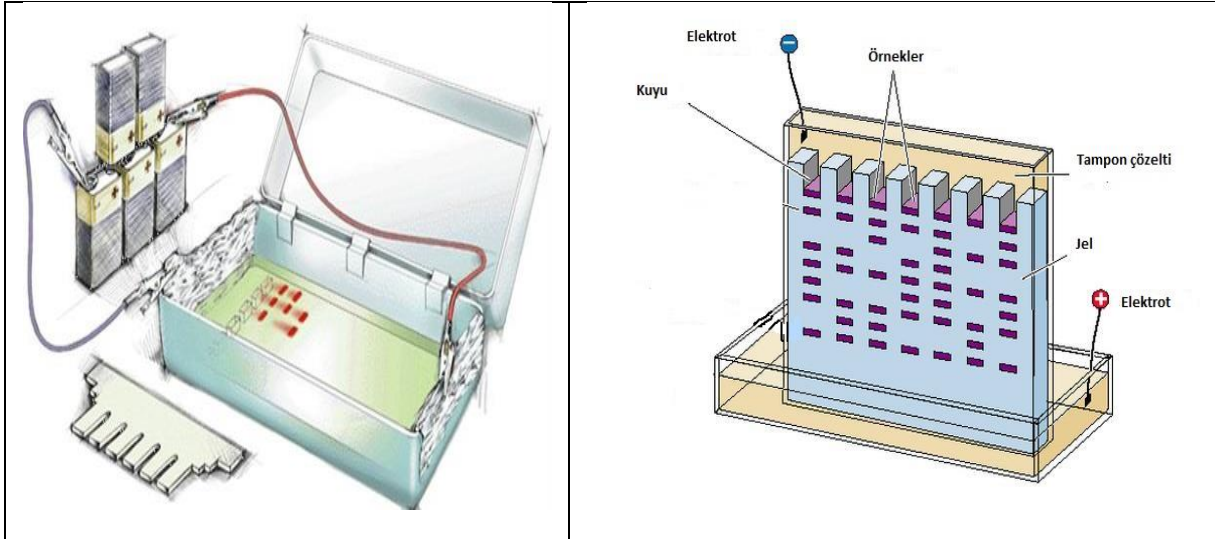


Şekil 1.50 Zn kompleks ($C_{78}H_{62}N_{26}O_{28}Zn_2$) Et-Br/DNA'ya karşı floresans spektrumu (Sirajuddin et al. 2013).

1.4.3 Elektroforez

DNA molekül etkileşimlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir diğer yöntem de elektroforezdir. Elektroforez elektriksel bir alanda moleküllerin yüklerine, moleküler ağırlıklarına ve büyüklüklerine göre ayırt edildikleri bir tekniktir. Bu analizin temeli, moleküllerin elektriksel bir alanda jel üzerindeki göçüne dayanır. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jeldeki kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akımın şiddetine bağlı olarak değişmektedir.

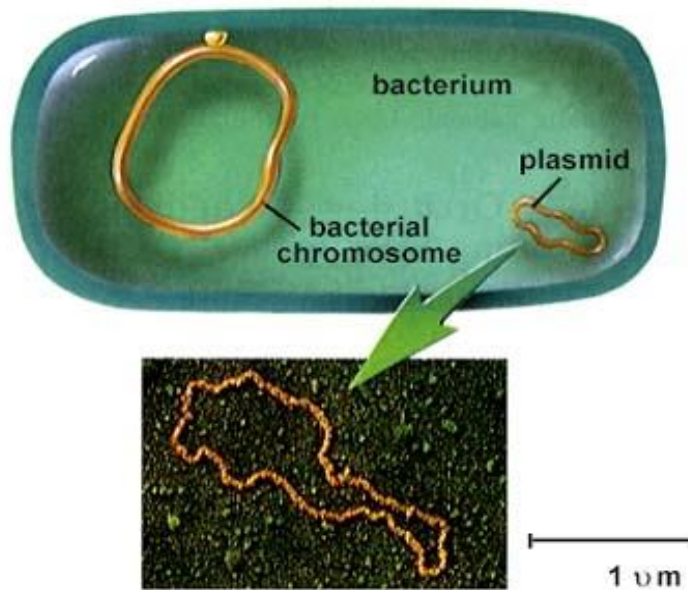
Değişik türleri olan elektroforezin DNA ile çalışılırken en kullanılan şekli agaroz jel elektroforezidir. Agaroz bir alg türünden elde edilir, yüksek sıcaklıkta uygun tamponda çözülüp tekrar soğutularak jel elde edilir. Ayırımı yapılacak örnek, jel içerisinde taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara yüklenir ve elektriksel alanda yürütülerek ayırımı yapılır. Jel uygun şekilde hazırlanırken ya da örnekler yüklenip elektriksel olarak ayrıldıktan sonra boyanır ve örneklerin görüntülenmesi gerçekleştirilir.



Şekil 1.51 Elektroforez düzeneği

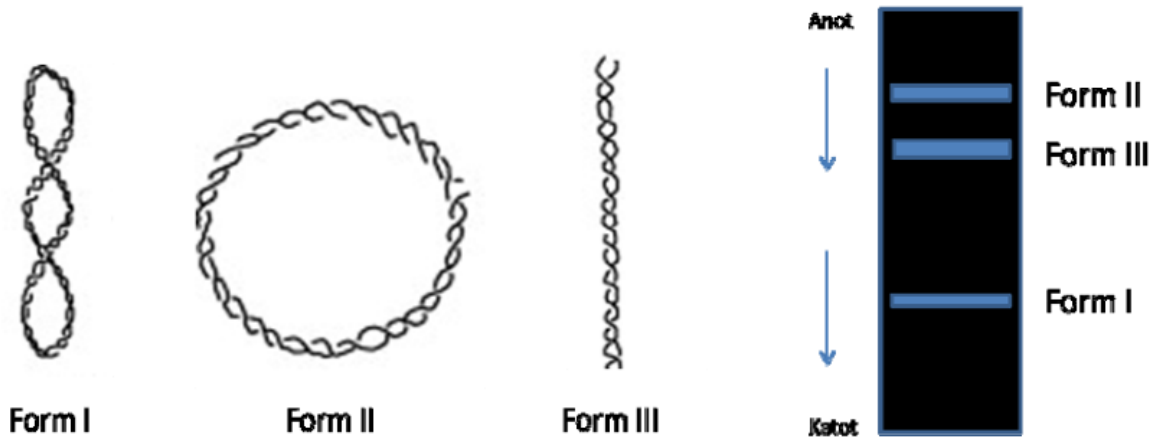
DNA negatif yük taşıyan bir moleküldür, bu nedenle iki kutuplu jele yerleştirildiğinde pozitif kutba doğru hareket eder. Ancak bu hareket sırasında DNA'ların yapıları hareket hızlarını etkiler. Süper kıvrımlı DNA'nın lineer DNA'dan, lineer DNA'nın da halkalı DNA'dan daha hızlı hareket ettiği bilinmektedir. Küçük DNA'lar büyük DNA'lardan daha hızlı hareket eder.

Jel elektroforezi çalışmalarında çoğunlukla plazmit-DNA'dan yararlanır. Plazmit-DNA genellikle bakteri stoplazmasında bulunan çift iplikli, çember şeklinde ve kendi kendine çoğalabilen DNA yapılarıdır.



Şekil 1.52 Plazmit-DNA

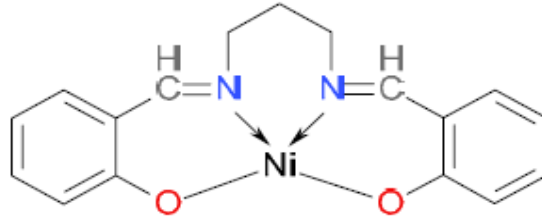
Hasarsız çift sarmallı plasmid pBR322, kompakt bir süper sarmal halinde bulunur. Zincirde kopmaların oluşması üzerine, DNA'nın süper sarmal biçimi dairesel forma ve doğrusal forma parçalanır. Bir zincir parçalanırsa, süper sarmal form dairesel form oluşturmak üzere gevşer. Her iki zincir de kırılırsa doğrusal form oluşur (Yoshino et al. 1999). Her formun elektroforezde jel içerisinde hareket hızı farklıdır. Form I de DNA zincirinde kırık yoktur. Yük yoğunluğu fazla, hacmi de düşük olduğundan jelde en hızlı hareket eden formdur. Form II DNA zincirinde sadece bir kırık içerir ve yük yoğunluğu düşük olduğundan yavaş hareket eder. DNA zincirinde birden fazla kırık içeren Form III ise form I ve Form II arasında bir hıza sahiptir (Dinç 2015).



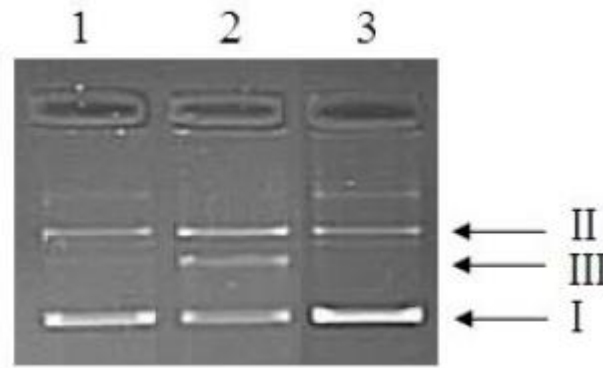
Şekil 1.53 Plasmid DNA'nın farklı formları

DNA ile çeşitli şekillerde etkileşen moleküllerin DNA'nın yapısında değişiklikler meydana getirdiği bilinmektedir. Örneğin DNA ile interkalasyon yolu ile etkileşen moleküller süper sarmal yapıda bulunan DNA'nın açılarak boyunun uzamasına ve şeklinin değişmesine sebep olabilmektedir (Richards and Rodger 2007). Bu durumda süper-sarmal DNA'nın jel elektroforezinde gözlenen davranışlarında değişiklikler meydana gelir. Bu davranış değişiklikleri incelenerek molekül DNA etkileşimlerinin türleri hakkında bilgi sahibi olunabilir.

Arıcı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sentezledikleri [N,N'-bis(salisiliden)-1,3-propandiaminato]nikel(II) (NiL) (Şekil 1.54) kompleksinin DNA ile etkileşimini elektroforez yöntemi de kullanarak incelemişlerdir (Arıcı and Nazır 2010).



Şekil 1.54 NiL kompleksinin kimyasal yapısı



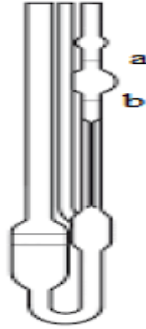
Şekil 1.55 Agoroz jel elektroforez görüntüsü: sütun 1’de 0,2 mM H₂L+ 0,4 µM DNA; sütun 2’de 0,2 mM NiL + 0,4 µM DNA; sütun 3’te 0,4 µM DNA

Burada görülmüştür ki 1 numaralı sütunda form1 ve az miktarda form 2 bulunması yani 3 numaralı sütunla (kontrol sütunu) aynı olması yüzünden H₂L ligantının DNA’ya etki etmediği şeklinde yorumlanmıştır. 2 numaralı sütunda ise form 1 yapısı azalmış, form II çoğalmış ve form 3 gözlemlenmiştir. Bu durum Ni(II)L kompleksinin DNA ile etkileştiğini göstermiştir.

1.4.4 Viskozimetri

Farklı moleküller ile DNA arasındaki etkileşimi açıklamak için viskozite ölçümleri yapılır. UV-görünür, floresans gibi yöntemler moleküllerin DNA ile etkileşimini belirlemek için gerekli fakat yeterli değildir. DNA’daki uzunluk değişimine bağlı ölçümler DNA’ya bağlanma modelinin belirlenmesinde çok önemlidir. İnterkalasyonun DNA sarmalını uzatması beklenir, çünkü baz çiftleri arasına yerleşen moleküllerin, bazlar arasında genişlemeye yol açtığı bunun da DNA’nın boyunun uzamasına dolayısıyla da viskozitesinde bir artışa yol açtığı düşünülür. Oysa kısmen, klasik olmayan ligand interkalasyonu ve dış bağlanma, DNA sarmalının boyunu kısaltarak viskozitesinde düşüşe sebep olur.

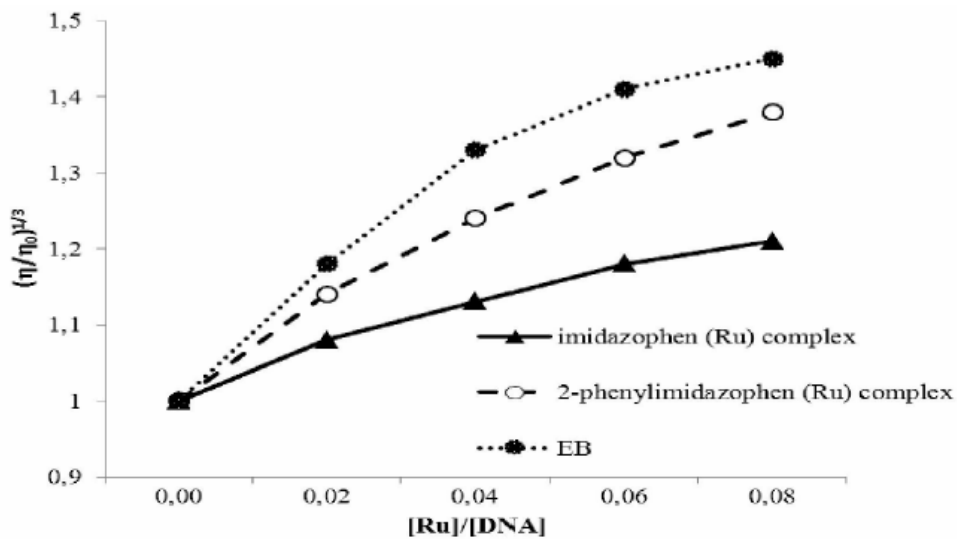
Viskozite ölçümleri çok pahalı olmayan malzemelerle basit bir şekilde yapılabilir. DNA molekül etkileşimlerinin belirlenmesinde Ubbelohde viskozimetresi kullanılmaktadır.



Şekil 1.56 Ubbelohde viskozimetresi

Bu yöntemde belirli bir sıcaklıkta DNA'nın viskozitesi Ubbelohde viskozimetresindeki a-b noktaları arasındaki akış süresinin kronometre ile ölçülmesiyle hesaplanır. Daha sonra DNA üzerine belirli miktarda, DNA ile etkileştiği düşünülen maddeden eklenerek akış süresi ölçülür. Akış süresindeki değişim DNA molekülün etkileşim türü hakkında bizlere ipucu verebilir.

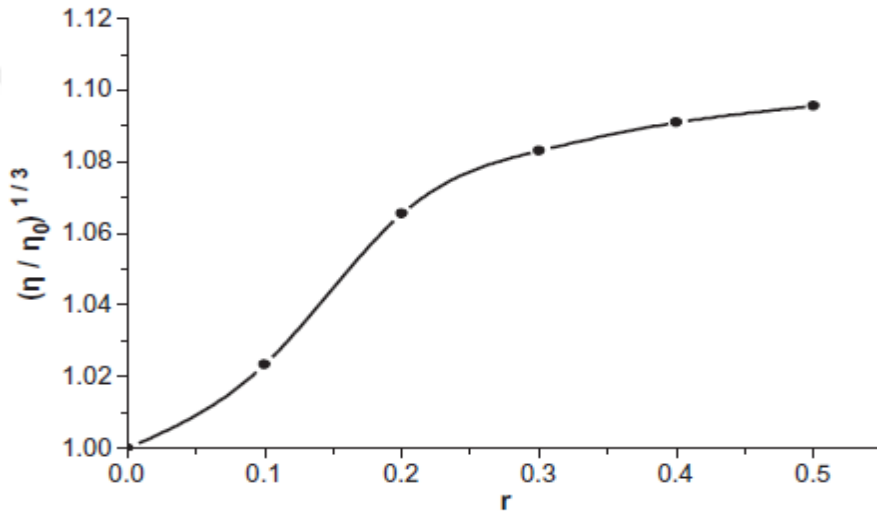
EtBr'ün DNA ile interkalasyon yoluyla etkileştiği bilinmektedir. EtBr DNA ile bu etkileşimi DNA'nın viskozitesinde artış görülür. İncesu ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada fenantrolin-rutenyum(II) kompleksinin DNA ile etkileşimleri incelenmiş ve yapılan viskozite deneyinde (Şekil 1.57) viskozitenin arttığı görülmüştür (İncesu et al. 2013).



Şekil 1.57 Ru komplekslerinin ve EtBr'nin DNA viskozitesine etkisi

Burada η/η_0 bağıl viskozite değerini vermektedir.

İnterkalasyonda DNA'ya bağlanan moleküller baz çiftleri arasına yerleşerek, baz çiftleri arasındaki uzaklığın açılmasına ve bu sebeple DNA'nın boyunun uzamasına sebep olur. DNA'nın boyunun uzaması DNA viskozitesinde artışa neden olur (Guo et al. 2012). Guo ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada dihidromirisitrin-manganez(II) kompleksinin DNA etkileşimi incelenmiş ve yaptıkları UV spektroskopisi, floresans spektroskopisi ve viskozimetri deneylerinden (Şekil 1.58) aldıkları sonuçlar kompleksin DNA ile etkileştiği ve bu etkileşimin interkalasyon olduğu konusunda birbirini desteklemiştir.



Şekil 1.58 Dihidromirisitrin-manganez kompleksinin DNA viskozitesine etkisi

Bunların dışında molekül DNA ile kısmi interkalasyon yaparak etkileşiyorsa, DNA'da büzülme ya da bükülme görüleceğinden viskozitede düşme olabilir (Indumathy et al. 2008). Netropsin, distamin gibi oluk bağlayıcı ilaçların DNA'nın viskozitesinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı görülmüştür (Mahadevan and Palaniandavar 1997).



BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOD

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Çözücü Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan bütün kimyasallar ve çözücüler analitik derecede ve saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. Reaksiyonlarda ve etkileşimlerde kullanılacak bütün sulu çözeltilerin hazırlanmasında Milli-Q su saflaştırma ünitesi kullanılmıştır. DNA ile yapılan çalışmalarda pH'yı (pH: 7,5) sabit tutabilmek için 50 mM amonyum asetat çözeltisi kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan; dimetilsülfoksit (DMSO), hidrojen peroksit (% 30), Bakır(II)sülfat (CuSO_4) ve Çinkosülfat (ZnSO_4) tuzları Merck firmasından temin edilmiştir. Çalışmalarımızda sıgır timüsünden izole edilmiş DNA (CT-DNA) ise Aldrich firmasından alınmıştır. CT-DNA 50 mM amonyum asetat çözeltisi içerisinde (pH 7,5) 24 saat bekletilerek 3 mM stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltinin derişimi Beer-Lambert yasası kullanılarak spektrofotometrede 260 nm'de absorbsiyon okunmasıyla $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ değeri kullanılarak hesaplanmıştır. Bütün titrasyon işlemlerinde bu stok çözelti kullanılmıştır.

Elektroforez işleminde Aldrich firmasından temin edilen 50 $\mu\text{g/ml}$ derişiminde pBR322 (plasmit-DNA) kullanıldı. Plasmit DNA 50 mM amonyum asetat tamponu kullanılarak 20 $\mu\text{g/ml}$ 'ye seyreltildi. Elektroforezde kullanılacak jel için %1'lik agaroz jel TBE (Tris-Borikası-EDTA) tamponu ile 1/10 oranında seyreltildikten sonra kaynatılıp soğutularak jel forma getirildi. Jel soğuması esnasında özel tank içerisine dökülerek içine uygun taraklar yerleştirildi. Plasmit DNA incelediğimiz maddeler ve bunların metal kompleksleriyle farklı oranlarda karıştırıldı. Bu karışımların jel üzerindeki ilerleyişini gözlemleyebilmek için bütün karışımlara brom fenol çözeltisi eklendi. Bu çözelti bromfenol mavisinin %40'luk sükroz

çözeltilisinde çözünmesiyle elde edilmiştir. Çözeltilerimiz jel üzerindeki kuyucuklara enjekte edildikten sonra 3 saat süresince 40 V akımla muamele edilmiştir. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel etidyumbromür ile boyanmış daha sonra saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra jeldeki görüntü DNr Minibus Pro Bio-Imaging System ile fotoğraflanmıştır.

2.1.2 Kullanılan Cihazlar

UV/Vis Spektrofotometresi: Jasco FT/IR-300 E

Floresans Spektrofotometresi Perkin Elmer LS 55

Jel Elektroforez Thermo Electron Corporation EC-330 Midicell Primo

2.2 UV TİTRASYONU

Flavonoidlerin (rutin, kuersitrin ve mirisitrin) UV titrasyonları yapılmıştır. Flavonoid ya da flavonoid metal kompleksinin üzerine artan miktarda DNA eklenerek maddelerin absorpsiyon spektrumundaki değişiklikler izlendi. 60 μ M rutin, 40 μ M kuersitrin ve 40 μ M mirisitrin çözeltileri ayrı ayrı 25 mM NaCl-5 mM tris-HCl (1 M hazır Tris HCl den 100 ml alınarak 500 ml'ye seyreltildi içerisine 0,146 g NaCl eklenerek tampon hazırlandı) tamponu içerisinde hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 2,5 ml kuvartz küvet içerisine alındı. 50 mM Amonyum asetat tamponu (385 mg NH_4COO 100 ml su) içerisinde hazırlanan 1,25 mM ct-DNA (6 mg DNA 5 ml Amonyum asetat tamponu içerisinde çözünerek yaklaşık 3 mM DNA çözeltisi hazırlandı. Bu standart çözelti 1,25 mM a seyreltildi) çözeltisi kullanılarak titre edildi. Her 1 μ M'lık DNA eklenmesi sonrasında karışım temiz bir enjektörle karıştırıldı ve 5 dakika (dk) beklendikten sonra ölçüm yapıldı.

DNA'nın metallerle etkileşimini inceleyebilmek için 50 mM amonyum asetat içerisinde hazırlanmış 0,1 mM ct-DNA'dan 2,5 ml alınarak kuvartz küvet içerisinde UV spektrumu alındı. Daha sonra DNA çözeltisi 3 mM Cu^{2+} çözeltiden her defasında 5 μ l ekleyerek titre edildi. Metal iyonlarının her eklemesinden sonra 5 d beklendi ve ölçüm yapıldı.

Flavonoidlerin metallerle etkileşimini görebilmek için rutin, kuersitrin ve mirisitrin çözeltilerinden 2,5 ml alınarak kuvartz küvet içerisinde UV spektrumu alındı. Çözelti üzerine 3 mM metal (Zn^{2+} ya da Cu^{2+}) çözeltisinden 5 μ l ekleyerek titre edildi. Her 5 μ l metal

eklenmesinden sonra kompleks oluşumunu sağlayabilmek için 5 d beklendikten sonra ölçüm yapıldı. Bu metoda göre yapılan titrasyonlar ve takip edilen parametreler aşağıdaki çizelgelerde sunulmuştur.

Çizelge 2.1 Rutin için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler

Eklenen DNA	Toplam Hacim	[DNA], M	[kompleks], M	Absorbans	$\epsilon_{a(359\text{ nm})}$	$(\epsilon_a - \epsilon_f)$	[DNA] _{bp}	[DNA] _{bp} /($\epsilon_a - \epsilon_f$)
Hacim, L	L			359 nm	ϵ_f			
0	2,500E-03	0,000E+00	6,00000E-06	0,411325753	6,85543E+04	0	0,000E+00	
1,00E-06	2,501E-03	4,998E-07	5,99760E-06	0,409935623	6,83499E+04	-204,359	4,998E-07	
0,000002	2,502E-03	9,992E-07	5,99520E-06	0,416371286	6,94507E+04	896,438	9,992E-07	1,11463E-09
3,00E-06	2,503E-03	1,498E-06	5,99281E-06	0,413966507	6,90772E+04	522,919	1,498E-06	2,86508E-09
0,000004	2,504E-03	1,997E-06	5,99042E-06	0,411959231	6,87697E+04	215,435	1,997E-06	9,26869E-09
5,00E-06	2,505E-03	2,495E-06	5,98802E-06	0,411035925	6,86430E+04	88,707	2,495E-06	2,81263E-08
0,000006	2,506E-03	2,993E-06	5,98563E-06	0,411318719	6,87176E+04	163,355	2,993E-06	1,83209E-08
7,00E-06	2,507E-03	3,490E-06	5,98325E-06	0,413975716	6,91891E+04	634,849	3,49023E-06	5,49773E-09
0,000008	2,508E-03	3,987E-06	5,98086E-06	0,412183374	6,89171E+04	362,768	3,98724E-06	1,09912E-08
9,00E-06	2,509E-03	4,484E-06	5,97848E-06	0,412437767	6,89871E+04	432,798	4,48386E-06	1,03602E-08

Çizelge 2.2 Kuersitrin için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler

Eklenen DNA	Toplam Hacim	[DNA], M	[kompleks], M	Absorbans	$\epsilon_{a(355\text{ nm})}$	$(\epsilon_a - \epsilon_f)$	[DNA] _{bp}	[DNA] _{bp} /($\epsilon_a - \epsilon_f$)
Hacim, L	L			355 nm	ϵ_f			
0	2,500E-03	0,000E+0	4,00000E-06	0,423177898	1,05794E+05	0	0,000E+00	
1,00E-06	2,501E-03	4,998E-07	3,99840E-06	0,418026507	1,04548E+05	-1246,045	4,998E-07	
0,000002	2,502E-03	9,992E-07	3,99680E-06	0,4201186	1,05114E+05	-680,801	9,992E-07	-1,46768E-09
3,00E-06	2,503E-03	1,498E-06	3,99521E-06	0,416499764	1,04250E+05	-1544,584	1,498E-06	-9,69972E-10
0,000004	2,504E-03	1,997E-06	3,99361E-06	0,415553302	1,04055E+05	-1739,928	1,997E-06	-1,14764E-09
5,00E-06	2,505E-03	2,495E-06	3,99202E-06	0,415845364	1,04169E+05	-1625,211	2,495E-06	-1,53519E-09
0,000006	2,506E-03	2,993E-06	3,99042E-06	0,412646771	1,03409E+05	-2385,194	2,993E-06	-1,25475E-09
7,00E-06	2,507E-03	3,490E-06	3,98883E-06	0,414864957	1,04007E+05	-1787,830	3,49023E-06	-1,95221E-09
0,000008	2,508E-03	3,987E-06	3,98724E-06	0,413376361	1,03675E+05	-2119,683	3,98724E-06	-1,88106E-09
9,00E-06	2,509E-03	4,484E-06	3,98565E-06	0,415885329	1,04346E+05	-1448,845	4,48386E-06	-3,09478E-09

Çizelge 2.3 Mirisitrin için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler

Eklenen DNA	Toplam Hacim	[DNA], M	[kompleks], M	Absorbans	$\epsilon_{a(359\text{ nm})}$	$(\epsilon_a - \epsilon_t)$	[DNA] _{bp}	[DNA]bp/($\epsilon_a - \epsilon_t$)
Hacim, L	L			359 nm	ϵ_t			
0	2,500E-03	0,000E+00	4,00000E-06	0,426473051	1,06618E+05	0	0,000E+00	
1,00E-06	2,501E-03	4,998E-07	3,99840E-06	0,425313324	1,06371E+05	-247,401	4,998E-07	
0,000002	2,502E-03	9,992E-07	3,99680E-06	0,417998076	1,04583E+05	-2035,144	9,992E-07	-4,90973E-10
3,00E-06	2,503E-03	1,498E-06	3,99521E-06	0,413200051	1,03424E+05	-3194,290	1,498E-06	-4,69025E-10
0,000004	2,504E-03	1,997E-06	3,99361E-06	0,405500382	1,01537E+05	-5080,967	1,997E-06	-3,92997E-10
5,00E-06	2,505E-03	2,495E-06	3,99202E-06	0,40231517	1,00780E+05	-5838,313	2,495E-06	-4,27351E-10
0,000006	2,506E-03	2,993E-06	3,99042E-06	0,396930367	9,94707E+04	-7147,513	2,993E-06	-4,18721E-10
7,00E-06	2,507E-03	3,490E-06	3,98883E-06	0,392800868	9,84752E+04	-8143,085	3,49023E-06	-4,28612E-10
0,000008	2,508E-03	3,987E-06	3,98724E-06	0,389175952	9,76053E+04	-9012,934	3,98724E-06	-4,42391E-10
9,00E-06	2,509E-03	4,484E-06	3,98565E-06	0,383861542	9,63109E+04	-10307,402	4,48386E-06	-4,35013E-10

Çizelge 2.4 Rutin-Cu²⁺ kompleksi için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler

Eklenen DNA	Toplam Hacim	[DNA], M	[kompleks], M	Absorbans	$\epsilon_{a(396\text{ nm})}$	$(\epsilon_a - \epsilon_t)$	[DNA] _{bp}	[DNA]bp/($\epsilon_a - \epsilon_t$)
Hacim, L	L			396 nm	ϵ_t			
0	2,500E-03	0,000E+00	2,00000E-05	0,6132	3,06600E+04	0	0,000E+00	
1,00E-06	2,501E-03	4,998E-07	1,99920E-05	0,6123	3,06272E+04	-32,754		
2,00E-06	2,502E-03	9,992E-07	1,99840E-05	0,6053	3,02892E+04	-370,788	9,99201E-07	-2,6948E-09
3,00E-06	2,503E-03	1,498E-06	1,99760E-05	0,6012	3,00961E+04	-563,928	1,49820E-06	-2,65673E-09
4,00E-06	2,504E-03	1,997E-06	1,99681E-05	0,5962	2,98577E+04	-802,304	1,99681E-06	-2,48884E-09
5,00E-06	2,505E-03	2,495E-06	1,99601E-05	0,5929	2,97043E+04	-955,710	2,49501E-06	-2,61064E-09
6,00E-06	2,506E-03	2,993E-06	1,99521E-05	0,592	2,96710E+04	-988,960	2,99282E-06	-3,02623E-09
7,00E-06	2,507E-03	3,490E-06	1,99442E-05	0,5881	2,94873E+04	-1172,666	3,49023E-06	-2,97632E-09
8,00E-06	2,508E-03	3,987E-06	1,99362E-05	0,5857	2,93787E+04	-1281,288	3,98724E-06	-3,1119E-09
0,000009	2,509E-03	4,484E-06	1,99283E-05	0,5834	2,92750E+04	-1384,988	4,48386E-06	-3,23747E-09
1,00E-05	2,510E-03	4,980E-06	1,99203E-05	0,5788	2,90558E+04	-1604,240	4,98008E-06	-3,10432E-09
1,10E-05	2,511E-03	5,476E-06	1,99124E-05	0,5776	2,90071E+04	-1652,928	5,47591E-06	-3,31285E-09
1,20E-05	2,512E-03	5,971E-06	1,99045E-05	0,574	2,88378E+04	-1822,240	5,97134E-06	-3,27692E-09

Çizelge 2.5 Kuersitrin-Cu²⁺ kompleksi için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler

Eklenen DNA	Toplam Hacim	[DNA], M	[kompleks], M	Absorbans	$\epsilon_{a(387\text{ nm})}$	$(\epsilon_a - \epsilon_i)$	[DNA] _{bp}	[DNA] _{bp} /($\epsilon_a - \epsilon_i$)
Hacim , L	L			387 nm	ϵ_i			
0	2,500E-03	0,000E+00	2,00000E-05	0,4256	2,12800E+04	0	0,000E+00	
1,00E-06	2,501E-03	4,998E-07	1,99920E-05	0,4247	2,12435E+04	-36,506		
2,00E-06	2,502E-03	9,992E-07	1,99840E-05	0,417	2,08667E+04	-413,320	9,99201E-07	-2,4175E-09
3,00E-06	2,503E-03	1,498E-06	1,99760E-05	0,4138	2,07148E+04	-565,172	1,49820E-06	-2,65088E-09
4,00E-06	2,504E-03	1,997E-06	1,99681E-05	0,4126	2,06630E+04	-616,992	1,99681E-06	-3,23635E-09
5,00E-06	2,505E-03	2,495E-06	1,99601E-05	0,4116	2,06212E+04	-658,840	2,49501E-06	-3,78697E-09
6,00E-06	2,506E-03	2,993E-06	1,99521E-05	0,4081	2,04540E+04	-826,028	2,99282E-06	-3,62314E-09
7,00E-06	2,507E-03	3,490E-06	1,99442E-05	0,4072	2,04170E+04	-862,992	3,49023E-06	-4,04433E-09
8,00E-06	2,508E-03	3,987E-06	1,99362E-05	0,4048	2,03048E+04	-975,232	3,98724E-06	-4,0885E-09

Çizelge 2.6 Mirisitrin-Cu²⁺ kompleksi için UV titrasyon hesaplamalarında kullanılan veriler

Eklenen DNA	Toplam Hacim	[DNA], M	[kompleks], M	Absorbans	$\epsilon_{a(418\text{ nm})}$	$(\epsilon_a - \epsilon_i)$	[DNA] _{bp}	[DNA] _{bp} /($\epsilon_a - \epsilon_i$)
Hacim , L	L			418 nm	ϵ_i			
0	2,500E-03	0,000E+00	2,00000E-05	0,3766	1,88300E+04	0	0,000E+00	
1,00E-06	2,501E-03	4,998E-07	1,99920E-05	0,3581	1,79122E+04	-917,838		
2,00E-06	2,502E-03	9,992E-07	1,99840E-05	0,3514	1,75841E+04	-1245,944	9,99201E-07	-8,01963E-10
3,00E-06	2,503E-03	1,498E-06	1,99760E-05	0,3472	1,73808E+04	-1449,168	1,49820E-06	-1,03384E-09
4,00E-06	2,504E-03	1,997E-06	1,99681E-05	0,3457	1,73127E+04	-1517,344	1,99681E-06	-1,31599E-09
5,00E-06	2,505E-03	2,495E-06	1,99601E-05	0,3404	1,70540E+04	-1775,960	2,49501E-06	-1,40488E-09
6,00E-06	2,506E-03	2,993E-06	1,99521E-05	0,3396	1,70208E+04	-1809,248	2,99282E-06	-1,65418E-09
7,00E-06	2,507E-03	3,490E-06	1,99442E-05	0,3366	1,68771E+04	-1952,876	3,49023E-06	-1,78722E-09
8,00E-06	2,508E-03	3,987E-06	1,99362E-05	0,3334	1,67233E+04	-2106,656	3,98724E-06	-1,89269E-09

2.3 FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ

2.3.1 Komplekslerin Floresans Spektroskopisi

10 μ M Flavonoid-Cu²⁺ kompleks çözeltisi, 5 mM tris-HCl tamponu içerisinde hazırlandı. Hazırlanan çözelti 2,5 ml’lik kısmı kuvarz küvete alındı ve 337 nm dalga boyunda uyarılarak emisyon spektrumu kaydedildi. Daha sonra 1 μ l 1,25 mM ct-DNA çözeltisi eklendi. Her eklemekten sonra 5 d bekletilerek ölçüm yapıldı ve spektrum kaydedildi.

2.3.2 EtBr ile Yarışmalı Floresans

3 ml 20 μ M EtBr çözeltisi ile 3 mM 100 μ l ct-DNA (iyonize sodyum tuzu ve yüksek oranda polimerize, D1502) oda sıcaklığında karıştırılarak Floresans için gerekli çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözeltiden 2,5 ml kuvartz küvete alınarak 427 nm’de uyarılarak emisyon spektrumu kaydedildi. Çözelti üzerine 1 mM flavonoid çözeltisinden 10’ar μ l’lik porsiyonlar halinde eklendi. Her eklemenden sonra 5 d beklendi, ölçüm yapıldı ve spektrum kaydedildi. Elde edilen veriler çizelge 2.7-2.9’da verilmiştir.

Çizelge 2.7 Rutin-Cu²⁺ kompleksinin yarışmalı floresans hesaplamalarında kullanılan veriler

<i>Eklenen Hacim (L)</i>	<i>Toplam Hacim(L)</i>	<i>[D2], M</i>	<i>[kompleks], M</i>	<i>[DNA]/M</i>	<i>M/DNA</i>	<i>F</i>	<i>F0/F</i>	<i>F0/F</i>
0	2,500E-03	1,000E-04	0,00000E+00		0,00000E+00	275,70	1,00	
1,00E-05	2,510E-03	9,960E-05	1,99203E-07	5,00000E+02	2,00000E-03	239,04	1,15	1,15
0,00002	2,520E-03	9,921E-05	3,96825E-07	2,50000E+02	4,00000E-03	208,21	1,32	1,32
3,00E-05	2,530E-03	9,881E-05	5,92885E-07	1,66667E+02	6,00000E-03	178,83	1,54	1,54
0,00004	2,540E-03	9,843E-05	7,87402E-07	1,25000E+02	8,00000E-03	154,89	1,78	1,78
5,00E-05	2,550E-03	9,804E-05	9,80392E-07	1,00000E+02	1,00000E-02	137,51	2,00	2,00
0,00006	2,560E-03	9,766E-05	1,17188E-06	8,33333E+01	1,20000E-02	120,35	2,29	2,29
7,00E-05	2,570E-03	9,728E-05	1,36187E-06	7,14286E+01	1,40000E-02	101,44	2,72	2,72
0,00008	2,580E-03	9,690E-05	1,55039E-06	6,25000E+01	1,60000E-02	89,82	3,07	3,07
9,00E-05	2,590E-03	9,653E-05	1,73745E-06	5,55556E+01	1,80000E-02	81,11	3,40	3,40
0,0001	2,600E-03	9,615E-05	1,92308E-06	5,00000E+01	2,00000E-02	68,60	4,02	4,02

Çizelge 2.8 Kuersitrin-Cu²⁺ kompleksinin yarışmalı-floresans hesaplamalarında kullanılan veriler

<i>Eklenen Hacim(L)</i>	<i>Toplam Hacim(L)</i>	<i>[D2], M</i>	<i>[kompleks],M</i>	<i>[DNA]/M</i>	<i>M/DNA</i>	<i>F</i>	<i>F0/F</i>	<i>F0/F</i>
0	2,500E-03	1,000E-04	0,00000E+00		0,00000E+00	278,00	1,00	
2,00E-05	2,520E-03	9,921E-05	3,96825E-06	2,50000E+01	4,00000E-02	256,00	1,09	1,09
0,00003	2,530E-03	9,881E-05	5,92885E-06	1,66667E+01	6,00000E-02	226,00	1,23	1,23
4,00E-05	2,540E-03	9,843E-05	7,87402E-06	1,25000E+01	8,00000E-02	205,00	1,36	1,36
0,00005	2,550E-03	9,804E-05	9,80392E-06	1,00000E+01	1,00000E-01	180,00	1,54	1,54
6,00E-05	2,560E-03	9,766E-05	1,17188E-05	8,33333E+00	1,20000E-01	167,00	1,66	1,66
0,00007	2,570E-03	9,728E-05	1,36187E-05	7,14286E+00	1,40000E-01	150,00	1,85	1,85
8,00E-05	2,580E-03	9,690E-05	1,55039E-05	6,25000E+00	1,60000E-01	127,00	2,19	2,19
0,00009	2,590E-03	9,653E-05	1,73745E-05	5,55556E+00	1,80000E-01	117,00	2,38	2,38

Çizelge 2.9 Mirisitrin-Cu²⁺ kompleksinin yarışmalı floresans hesaplamalarında kullanılan veriler

<i>Eklenen Hacim (L)</i>	<i>Toplam Hacim(L)</i>	<i>[D2], M</i>	<i>[kompleks],M</i>	<i>[DNA]/M</i>	<i>M/DNA</i>	<i>F</i>	<i>F0/F</i>	<i>F0/F</i>
0	2,500E-03	1,000E-04	0,00000E+00		0,00000E+00	288,00	1,00	
1,00E-05	2,510E-03	9,960E-05	1,99203E-06	5,00000E+01	2,00000E-02	259,00	1,11	1,11
0,00002	2,520E-03	9,921E-05	3,96825E-06	2,50000E+01	4,00000E-02	237,00	1,22	1,22
3,00E-05	2,530E-03	9,881E-05	5,92885E-06	1,66667E+01	6,00000E-02	218,00	1,32	1,32
0,00004	2,540E-03	9,843E-05	7,87402E-06	1,25000E+01	8,00000E-02	199,00	1,45	1,45
5,00E-05	2,550E-03	9,804E-05	9,80392E-06	1,00000E+01	1,00000E-01	184,00	1,57	1,57
0,00006	2,560E-03	9,766E-05	1,17188E-05	8,33333E+00	1,20000E-01	170,00	1,69	1,69
7,00E-05	2,570E-03	9,728E-05	1,36187E-05	7,14286E+00	1,40000E-01	157,00	1,83	1,83
0,00008	2,580E-03	9,690E-05	1,55039E-05	6,25000E+00	1,60000E-01	146,00	1,97	1,97
9,00E-05	2,590E-03	9,653E-05	1,73745E-05	5,55556E+00	1,80000E-01	135,00	2,13	2,13
0,0001	2,600E-03	9,615E-05	1,92308E-05	5,00000E+00	2,00000E-01	123,00	2,34	2,34

2.4 VİSKOZİTE ÇALIŞMALARI

Viskozite çalışmaları 30°C'deki su banyosunda Ubbelohde viskozimetresi kullanılarak gerçekleştirildi. Viskozite ölçümleri için, 400 µM derişimde ct-DNA (3 mM standart DNA çözeltisinden seyreltildi) 50 mM amonyum asetat tamponu kullanılarak hazırlandı. 15 ml DNA çözeltisi için viskozite ölçümü dijital bir kronometre kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra 1 mM flavonoid-metal komplekleri 100 µl'lik porsiyonlar halinde eklendi. Her eklemenin ardından karışım çalkalandı ve 5 d etkileşimin tamamlanması için bekletildi. Dijital kronometre ile karışımın akış süresi 3 defa ölçüldü ve üçünün ortalamasından bağlı viskozite değeri hesaplanarak DNA derişimine karşı grafiğe geçirildi.

2.5 AGARoz JEL ELEKTROFOREZ

Jel elektroforezi süper-sarmal yapıdaki plasmit-DNA'nın (pBR322) çeşitli ligandlarla etkileşimi sonucu göç mesafesindeki farklılıklar ve süper sarmalın yapısındaki açılma oranını belirlemek için yapılır. Elektroforez işleminde %1'lik agaroz jel hazırlanırken 1,5 g agaroz 150 ml TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tampon ile 1/10 oranında seyreltilerek kaynatıldı ve oda sıcaklığına kadar soğuması beklendi. Hazırlanan jel tanka alınarak içerisine dikkatli bir şekilde taraklar yerleştirildi. Bu şekilde işlem için gerekli kuyucukların oluşması sağlandı. 50 µg/ml pBR322 DNA 50 mM amonyum asetat tamponu (pH=7,5) içerisinde 20 µg/ml'ye seyreltildi.

Maddelerin DNA ile etkileşimini belirlemek için jele 10 µl plazmit-DNA (20µg/ml) ve 10 µl ligand (flavonoid, metal ya da flavonoid-metal kompleksi) farklı derişimlerde eklendi. Kontrol örneklerine ise kompleks yerine 10 µl amonyum asetat tamponu eklendi. Karışımlar 38 °C’de 1 saat bekletildi. Daha sonra çözeltiler üzerine 5µl boya (% 0,25 bromfenol mavisi, %40’lık sukroz çözeltisinde w/v) eklendi. Elektroforez güç kaynağı yardımıyla 3 saat boyunca 40 V uygulandı. Daha sonra jel EtBr (15 µl 10mg/ml EtBr’nin 500 ml suya eklenerek hazırlanmış) ile 20 d boyandı arkasından 20 d da su ile yıkandı. Hazırlanan jel DNr MiniBIS Pro Bio-Imaging System görüntüleme cihazı kullanılarak fotoğraflandı. Maddelerin DNA ile etkileşimlerine peroksit etkisinin çalışılması için karışımlara 2 µl H₂O₂ (% 30’luk) eklemesi yapıldı.



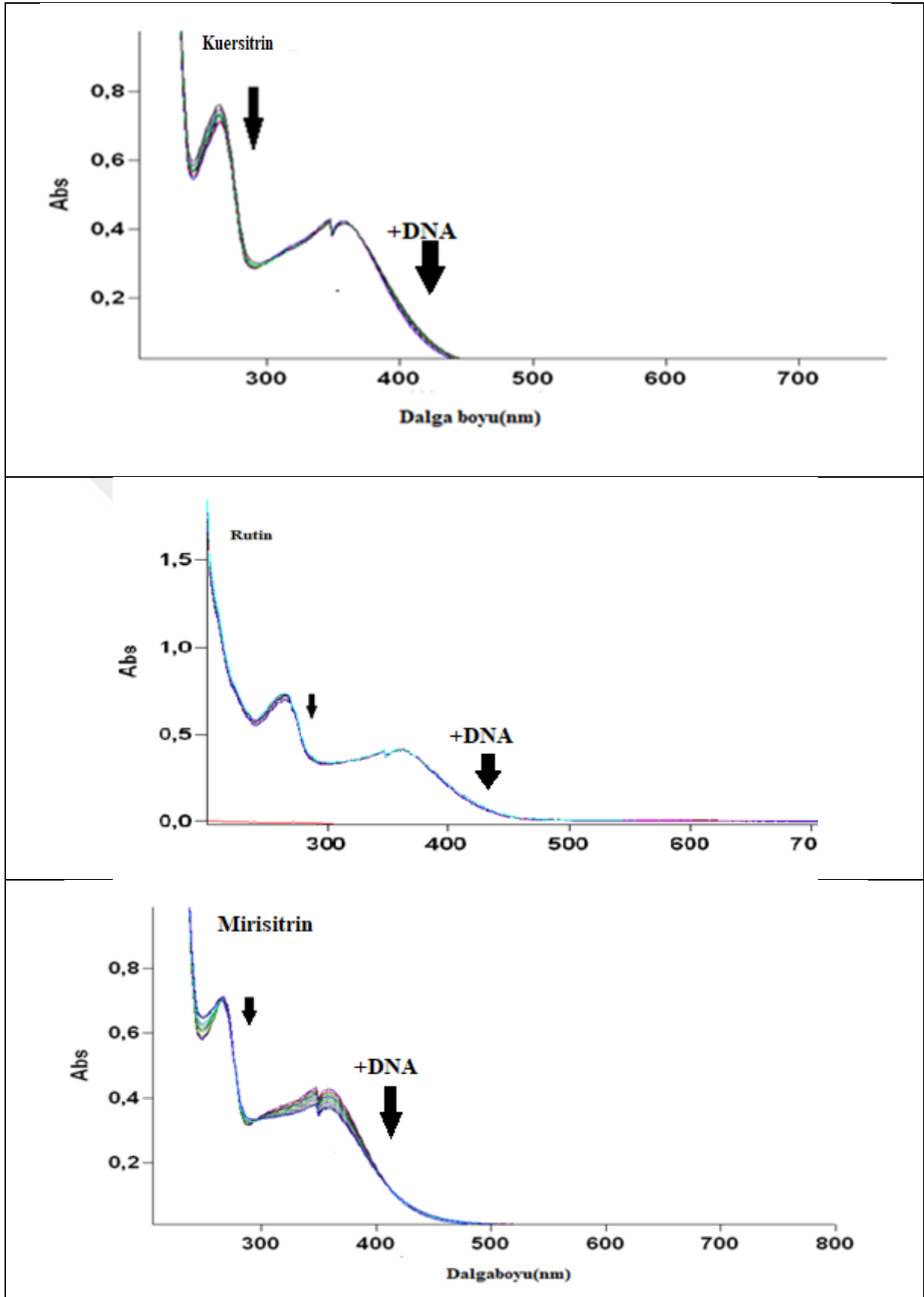
BÖLÜM 3

SONUÇLAR

3.1 UV TİTRASYON SONUÇLARI

Absorpsiyon spektroskopisi, herhangi bir maddenin DNA'ya etkisini araştırmak için en çok kullanılan tekniklerden birisidir. Bu yöntemde maddenin absorpsiyon ve dalga boyundaki değişimler izlenerek DNA'ya bağlanma şekli karakterize edilebilir.

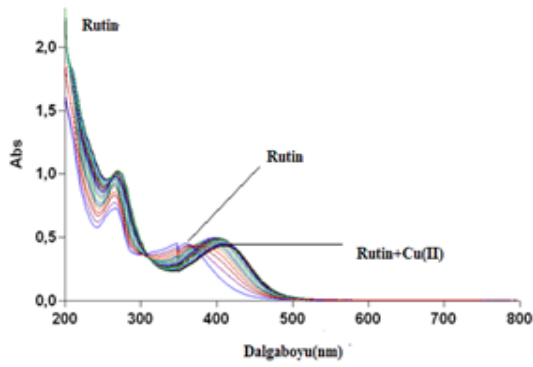
Flavanoidlerin DNA ile yaptığı etkileşim türünün belirlenmesi için UV spektroskopi çalışması yapılmıştır. Bunun sonunda flavonoidlerin absorbansında düşme yani hipokromik etki ile beraber çok az da olsa batokromik etki gözlemlendi. Dalga boyunda düşme (hipokromik etki) ve dalga boyunun kırmızıya kayması (batokromik etki) özellikle mirisitrin (M)'de açık şekilde görülürken, rutin (R) ve kuersitrin (Q)'de görülen etki daha kısıtlıydı. Flavonoid üzerine sabit miktarda DNA eklenmesi sonucu gözlemlenen değişimler Şekil 3.1'de açıkça görülmektedir.



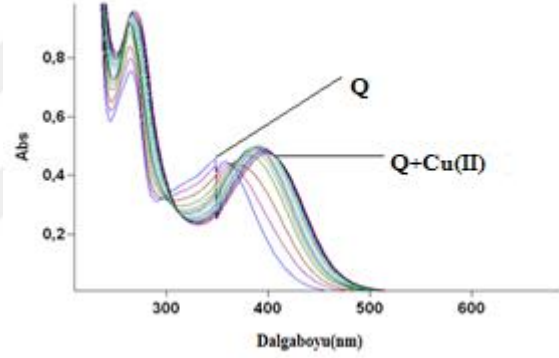
Şekil 3.1 Flavonoidlerin artan DNA konsantrasyonuyla UV absorpsiyonundaki değişimler

Flavanoidlerin serbest halde iken DNA ile etkileşimleri incelendikten sonra metal iyonları ile oluşturacakları komplekslerin DNA ile olan etkileşimlerini incelendi. Bunun için flavonoidlerin metal kompleksleri oluşturuldu. Tris HCl tamponunda belirli derişimlerdeki flavonoidler üzerine 3 mM Cu(NO)₂ çözeltisi 5 µl'lik porsiyonlar halinde eklendi. Her eklemekten sonra UV-vis'te elektron absorpsiyon spektrumu kaydedildi. UV spektrumlarında batokromik etki yani dalga boyundaki kırmızıya kayma belirgin şekilde gözlemlendi. Ikeda ve arkadaşları (2015), Afanas'eva ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan çalışmalarda, kompleks oluşumuna kanıt olarak gösterdikleri batokromik etki, çalışmamızda da görüldü. Her üç flavonoidde de gözlemlenen bu durum, flavonoidlerin Cu²⁺ iyonlarıyla kompleks oluşturduğu sonucuna ulaştırdı. Şekil 3.2'de flavonoidler üzerine Cu²⁺ iyonları eklendiğinde gerçekleşen değişimler görülmektedir.

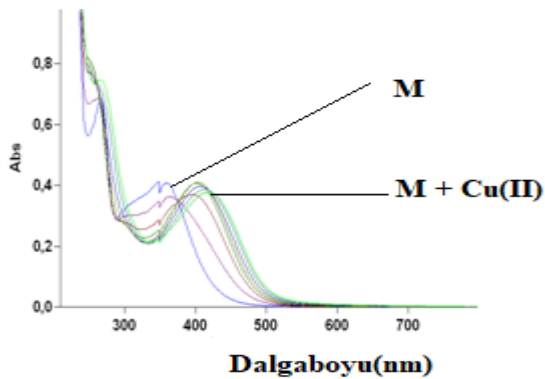
a-Rutin



b-Kuersitrin



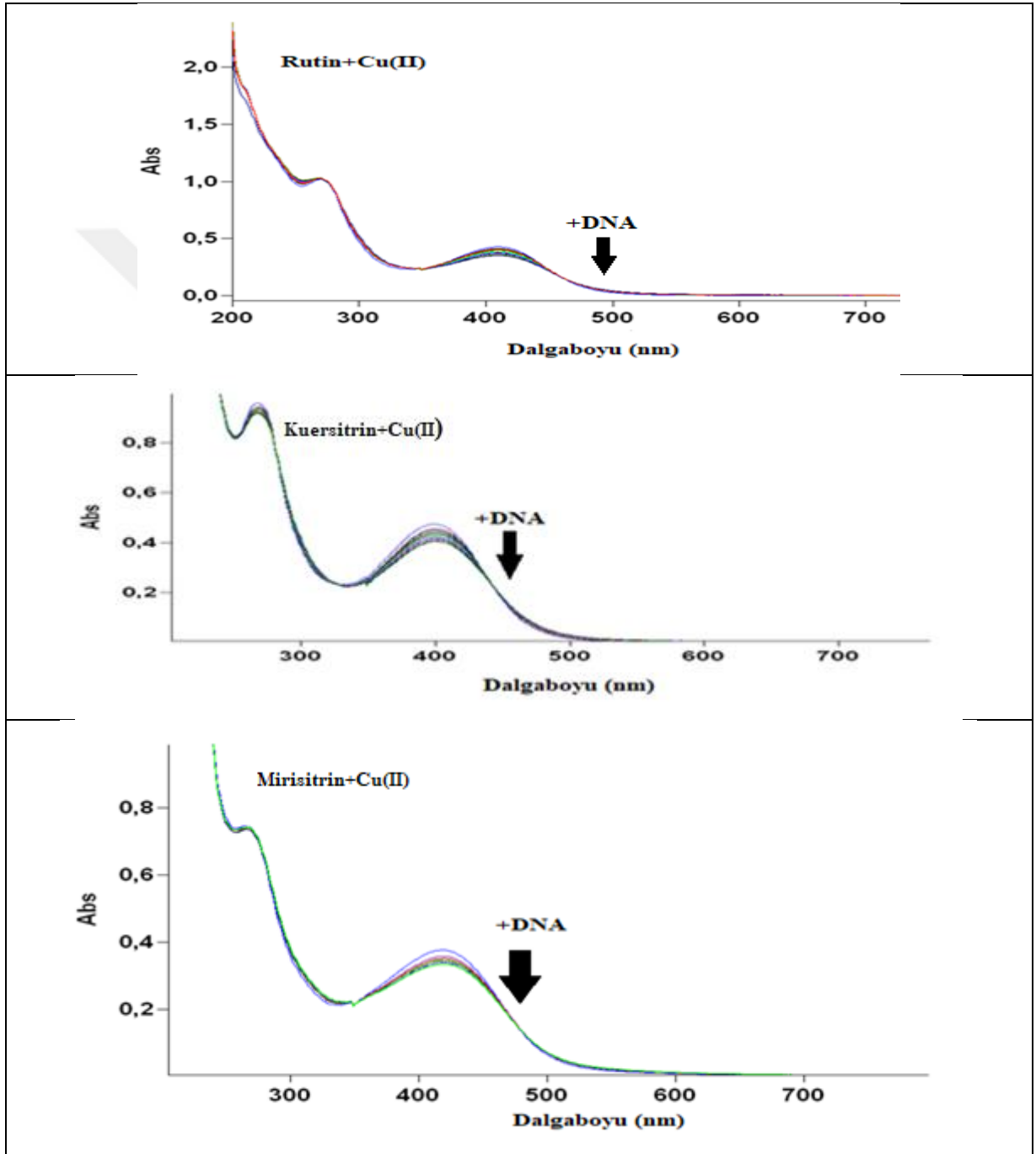
c-Mirisitrin



Şekil 3.2 Flavanoidlerin artan Cu²⁺ konsantrasyonu sırasındaki UV absorpsiyonundaki değişimler

Daha öncede belirtildiği gibi flavonoid-metal komplekslerinin DNA ile etkileşimine yönelik pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda dalga boyundaki kayma kompleks oluşumuna kanıt olarak gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada flavonoidlerin Cu²⁺ iyonlarıyla oluşturduğu

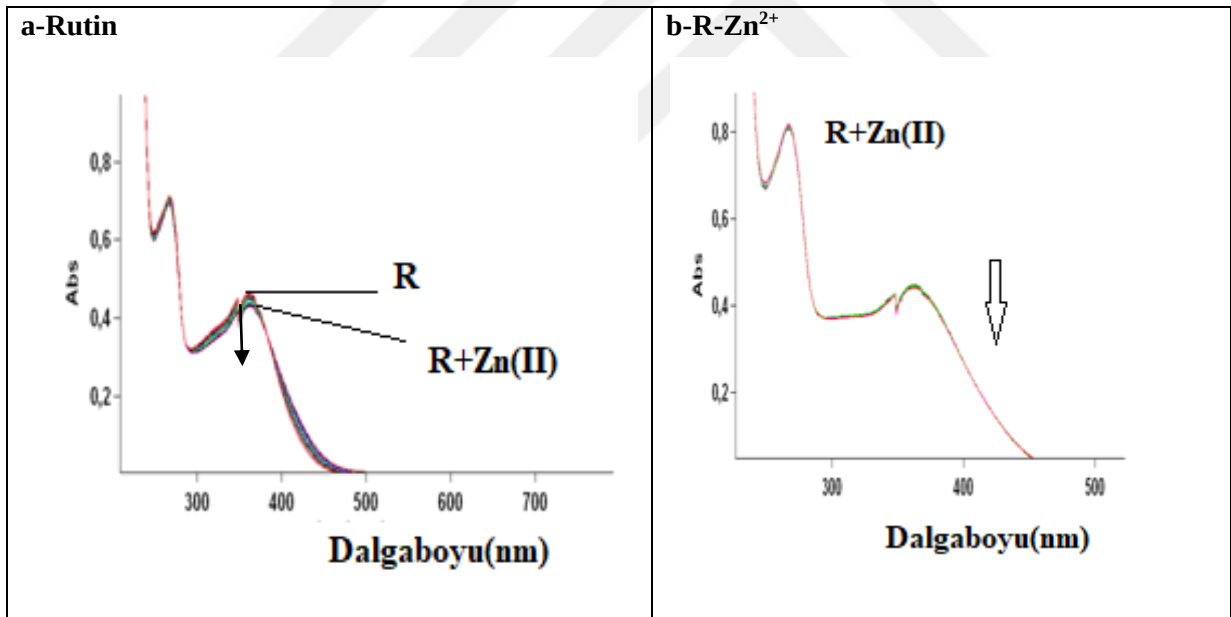
etkileşim UV spektrometre grafiklerinde açıkça görülmüş ve flavanoidlerin metallerle kompleks oluşturduğu sonucunu doğurmuştur. Bütün bunlardan hareketle flavonoidlerin Cu^{2+} komplekslerin DNA ile etkileşimleri UV titrasyonu ile incelenmiştir. Şekil 3.3’de flavanoidlerin bakır iyonlarıyla oluşturdukları komplekslerin DNA ile etkileşimleri grafikleri görülmektedir.



Şekil 3.3 Flavonoid- Cu^{2+} komplekslerinin artan DNA konsantrasyonu ile UV absorpsiyonundaki değişimler

Grafiklerde görüldüğü gibi (Şekil 3.3) flavonoid-Cu²⁺ kompleksleri üzerine DNA küçük porsiyonlar halinde eklendiğinde maddenin absorbandsında düşme yani hipokromik etki görüldü. Ayrıca dalga boyunda yani grafiklerin tepe noktalarında çok az da olsa kırmızıya kayma yani batokromik etki gözlemlendi. Bu durum flavonoid-metal komplekslerinin ana flavonoidlere oranla DNA ile daha iyi etkileşime girdiğini ve bu etkileşimin interkalasyon şeklinde olabileceğini kanıtladı. Serbest flavonoidler, interkalasyon yaparak DNA'ya bağlanır, ancak bu flavonoidlerin Cu(II) kompleksleri, interkalasyona ek olarak metalin elektrostatik etkileşimi sayesinde daha da kuvvetli şekilde DNA'ya bağlanır.

Kompleks oluşumu Zn²⁺ iyonlarıyla denendiğinde, rutin çinko iyonlarıyla kompleks oluşturduğunu ancak bu kompleksin Cu²⁺ kompleksindeki kadar DNA'ya etki etmediğini gözlemlendi. Şekil 3.4 (a)'da rutin üzerine Zn²⁺ iyonları eklenerek yapılan ölçümlerin UV spektrometre grafiği görülmektedir. (b)'de ise oluşan R-Zn²⁺ kompleksi üzerine küçük porsiyonlar halinde DNA eklendiğinde gerçekleşen değişim görülmektedir.

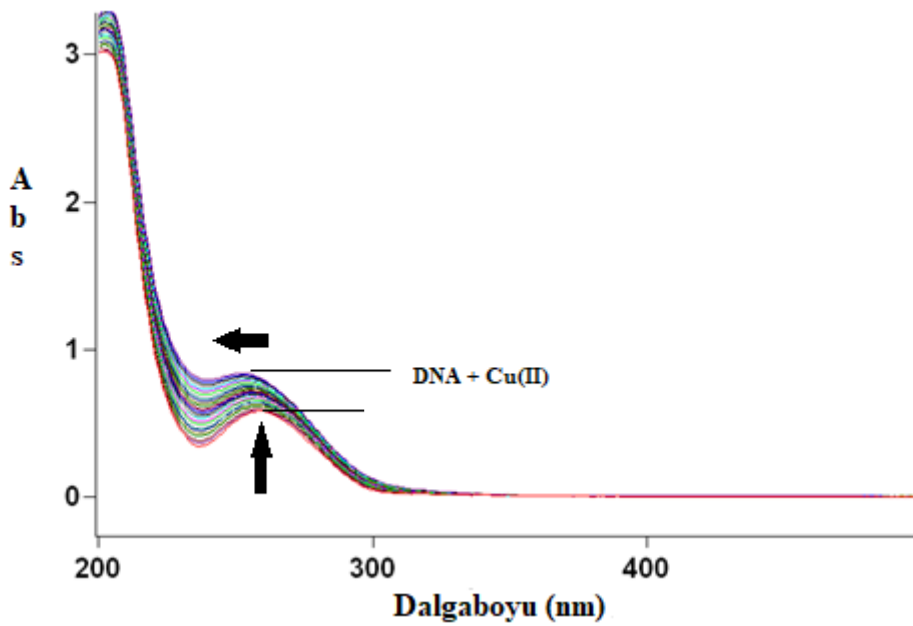


Şekil 3.4 (a) Rutin üzerine çinko eklemesi sırasında meydana gelen değişimler (b) Rutin-Zn kompleksinin üzerine DNA eklenmesi sırasında UV absorpsiyonundaki değişimler

Rutin üzerine Zn²⁺ iyonları eklendiğinde absorbansta düşme görüldü ancak dalga boyunda değişim çok az gerçekleşti (Şekil 3.4 a). Oluşan kompleks üzerine DNA'dan küçük porsiyonlar şeklinde eklenmesiyle yapılan UV titrasyonu sonunda hipokromik etki gözlemlendi. Hipokromik etki kompleksin DNA ile interkalasyon yaptığıının göstergesi olarak

kabul edildiğinden, bu sonuç kompleksin DNA ile interkalasyon yaparak etkileştiği sonucuna ulaşmamızı sağladı.

Flavonoid-metal komplekslerinin üzerine DNA çözeltisi eklendiğinde absorbansta belirli oranlarda düşüş olduğunu gözlemledi. Bu etkinin komplekslerden mi yoksa komplekslerin içerdiği metallerden mi kaynaklandığını anlayabilmek için de artan Cu^{2+} konsantrasyonu ile DNA'nın UV absorpsiyonunda meydana gelen değişimler incelendi. Şekil 3.5'de 0,1 mM 2,5 ml DNA üzerine 3 mM Cu^{2+} çözeltisi 5 μl 'lık porsiyonlar halinde eklendiğinde meydana gelen değişim görülmektedir.



Şekil 3.5 DNA Cu^{2+} etkileşim grafiği

Grafik incelendiğinde DNA üzerine Cu^{2+} iyonları eklendiğinde DNA'nın absorbanasında artış ve tepe noktasında sola kayma görülmektedir. Hiperkromik etki yani absorbansta artış DNA'ya elektrostatik bağlanmaya işaret ettiği bilinmektedir. Bu durumda flavonoid komplekslerin DNA üzerine yaptığı etki içerdikleri metalden kaynaklansa idi, UV spektroskopisi sırasında DNA derişimi artıkça absorbansta düşme değil artış olması gerekirdi. Bu durum komplekslerle DNA arasında görülen etkileşimin, komplekslerimizin içerdiği metalden değil de kompleksin yapısından kaynaklandığı sonucuna ulaştırdı.

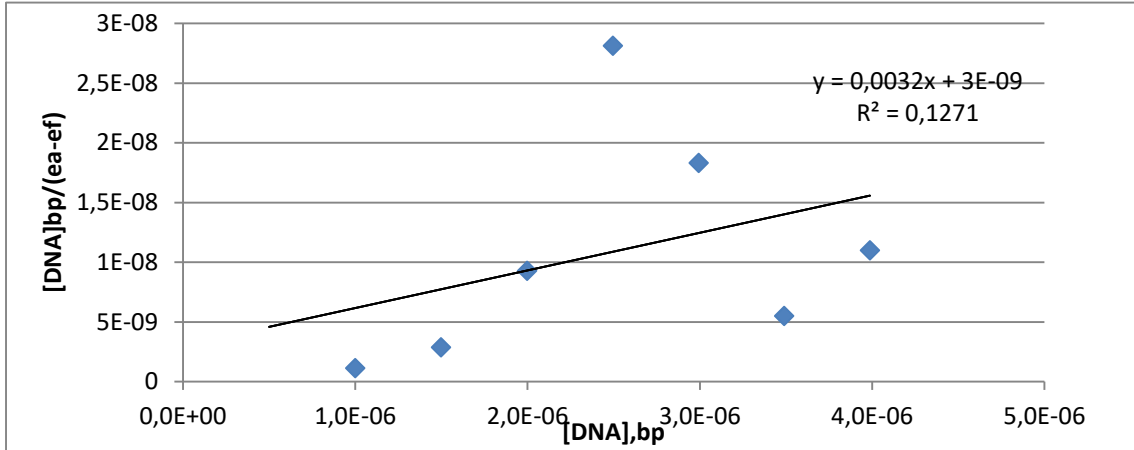
Komplekslerin DNA ile etkileşiminin kuvvetinin belirlenebilmesi ve başka komplekslerle karşılaştırılabilmesi için bağlanma sabiti hesaplandı (Pyle et al. 1989).

$$[\text{DNA}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f) = [\text{DNA}]/(\varepsilon_B - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_B - \varepsilon_f) \quad (3.1)$$

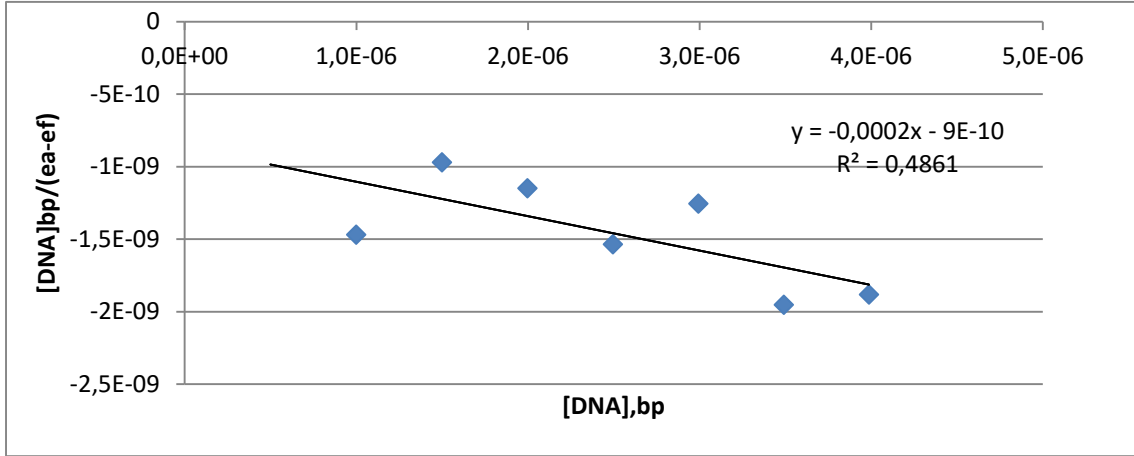
$[\text{DNA}]$ değerine karşılık $[\text{DNA}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f)$ değeri grafiğe geçirildiğinde eğim $1/(\varepsilon_B - \varepsilon_f)$ değerine kesim noktası ise $1/K_b(\varepsilon_B - \varepsilon_f)$ değerine karşılık gelmektedir. Burada $[\text{DNA}]$ ölçüm yapılan dalga boyundaki DNA derişimi, ε_A o noktadaki sönüm katsayısı, ε_B kompleksin DNA'ya tamamen bağlandığı andaki yani titrasyon sonunda absorbens değışiminin durduğu andaki sönüm katsayısı, ε_f ise serbest haldeki yani ortamda DNA olmadığı durumdaki sönüm katsayısına eşittir (Yıldız 2012).

Flavonoid ve Flavonoid-metal komplekslerinin belirli dalga boylarında gösterdiği absorbens piki kullanılarak eşitlikten elde edilen lineer grafikler çizilmiştir. Bu grafiklerdeki eğim ve kesim noktası değerleri kullanılarak bağlanma sabitleri (K_b) hesaplanmıştır (Şekil 3.6).

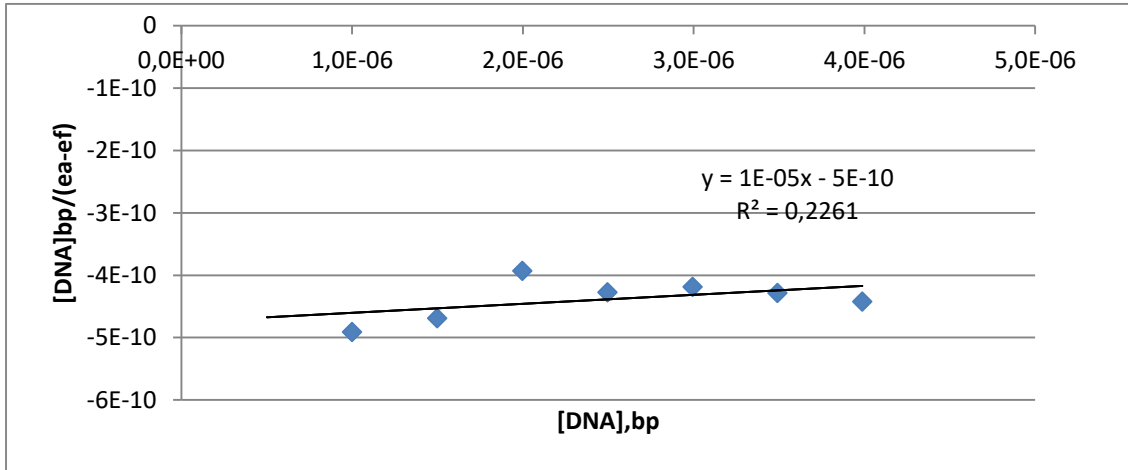
Rutin



Kuersitrin



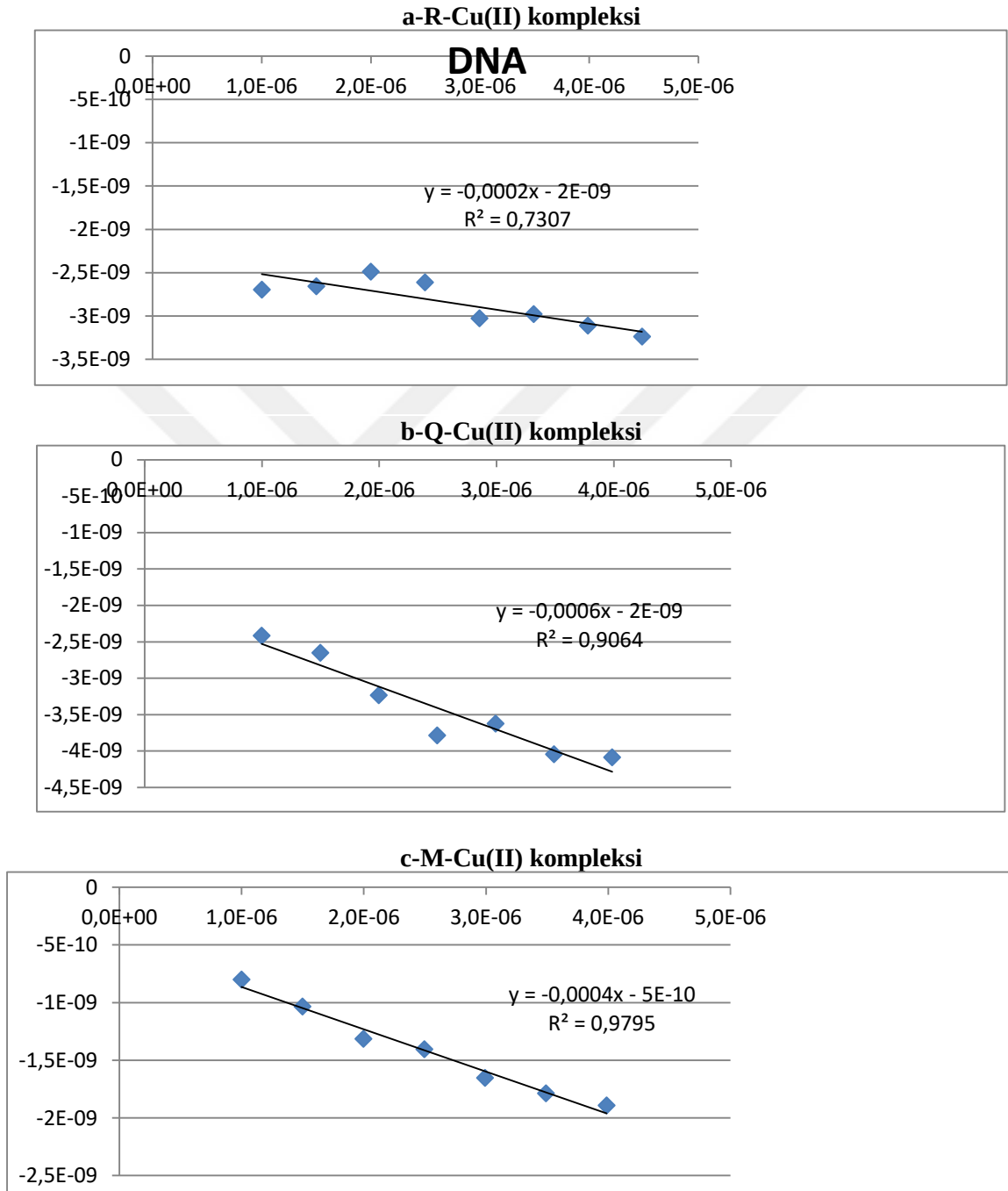
Mirisitrin



Şekil 3.6 Flavonoidler için $[DNA]$ değerine karşı $[DNA]/(εA-εf)$ grafiği

Flavonoidler için $[DNA]$ değerine karşı $[DNA]/(εA-εf)$ grafiği çizilip K_b değerleri hesaplandığında **Q** için $2,2 \times 10^5 M^{-1}$, **M** için $4,0 \times 10^5 M^{-1}$ ve **R** için $1,0 \times 10^5 M^{-1}$ değerlerine ulaşılmıştır. Bu durumda flavonoidlerin tek başlarına DNA ya bağlanma sabitleri $M > Q > R$

şeklinde gerçekleşmiştir. Bu durumda DNA ile etkileşimde en güçlü flavonoidin Mirisitrin olduğu sonucuna ulaşılır. Şekil 3.7 Flavonoid-Cu²⁺ kompleksi için [DNA] değerine karşı [DNA]/(ε_A-ε_f) grafikleri görülmektedir.



Şekil 3.7 Flavonoid-Cu²⁺ kompleksleri için [DNA] değerine karşı [DNA]/(ε_A-ε_f) grafikleri

R-Cu kompleksi için 396 nm’de, M-Cu kompleksinin 418 nm’de, Q-Cu kompleksinin ise 387 nm’de gösterdiği absorbans piki kullanılarak eşitlikten elde edilen lineer grafik gösterilmiştir.

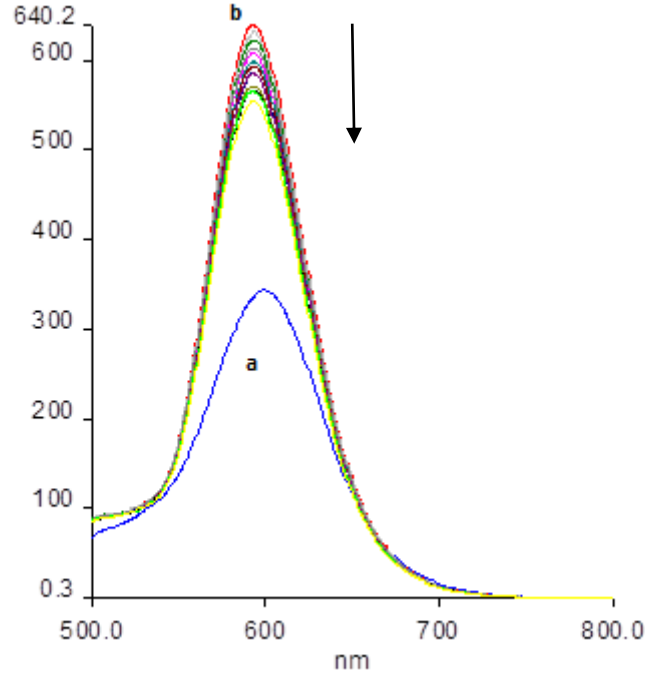
Eğim ve kesim noktası değerleri kullanılarak bağlanma sabitleri R-Cu için $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, M-Cu kompleksi için $8,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, Q-Cu kompleksi için $3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Komplekslerin DNA'ya bağlanma sabitleri arasındaki ilişki $\text{M-Cu} > \text{Q-Cu} > \text{R-Cu}$ şeklinde gerçekleşmiştir. Flavonoidler kompleks oluşturmadan da sıralama bu şekilde gerçekleşmişti. Kompleks oluşturmadan DNA ile iyi etkileşen bir molekülün kompleks oluşturduğunda da DNA ile iyi etkileşmesi beklenebilecek bir durumdur.

Sonuçlar incelendiğinde flavonoid-Cu komplekslerinin bağlanma sabitlerinin flavonoidlerin bağlanma sabitlerinden daha büyük olduğu görülmektedir. Bu durum flavonoid-Cu komplekslerimizin DNA ile daha iyi etkileştiği sonucuna ulaştırır. Zaten DNA absorbansındaki düzenli düşüşte bu düşüncüyü doğrular.

Bu sonuçlar karşılaştırıldığında DNA'ya bağlanma sabiti en büyük olan kompleksin M-Cu kompleksi olduğu görülmektedir. Bu durum bizi M-Cu kompleksinin molekül yapısının DNA baz çiftleri arasına girmeye daha uygun olduğu sonucuna ulaştırabilir.

3.2 YARIŞMALI FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ SONUÇLARI

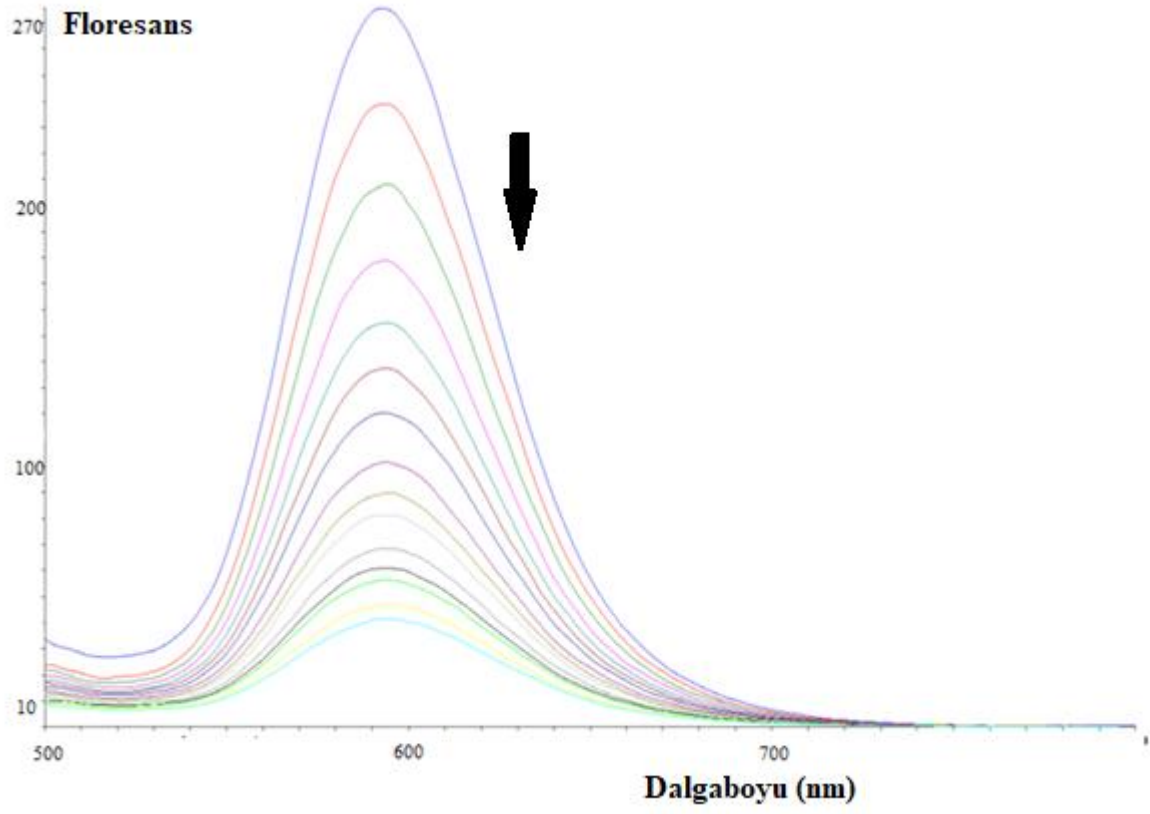
20 μM 3 ml EtBr çözeltisi ile 3 mM 100 μl ct-DNA çözeltileri karıştırılarak yarışmalı floresans için uygun ortam hazırlandıktan sonra flavonoidlerden 1 mM 10'ar μl küçük porsiyonlar halinde eklenmiş ve floresans ölçümleri yapılmıştır. Şekil 3.8'de 2,5 ml 0,1 mM DNA – 20 μM EtBr karışımı üzerine 1 mM rutinden 10 μl eklendinde gözlemlenen değişim grafikte gösterilmiştir.



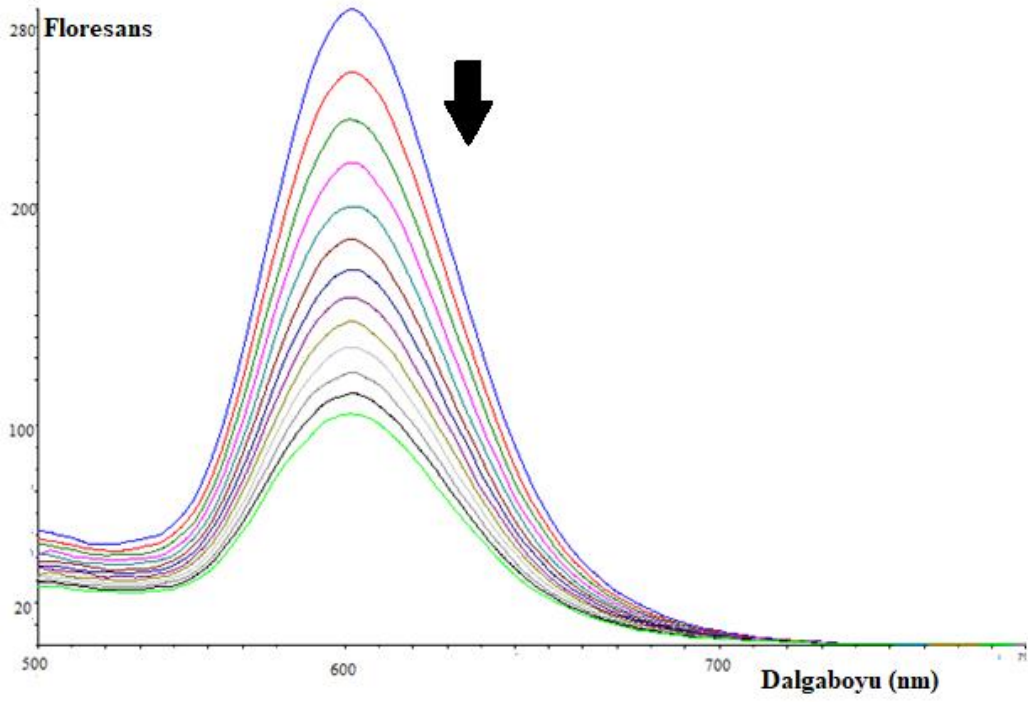
Şekil 3.8 (a) 20 μ M EtBr (b) DNA/ EtBr karışımı üzerine rutin eklenmesi

Grafikte görüldüğü gibi Et-Br-DNA karışımı üzerine 1 mM rutinden 10 μ l'lik porsiyonlar halinde eklendiğinde floresans şiddetinde düşme görülmüştür. Ancak bu düşüş çok az oranda gerçekleşmiştir. Bu durumda rutin in DNA ile interkalasyon yapmış olan EtBr'nin çok azını yerinden çıkararak floresansta düşme yarattığı düşünülebilir. Çok güçlü bir interkalatör olan EtBr'nin tümünü çıkarmak için rutin tek başına yeterli gelmediği düşünülebilir. Q ve M ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum daha önce yapılan UV titrasyonu sonuçlarıyla da benzerlik gösterdi. Orada da rutin tek başınayken absorbansta düşme görülmüş ancak düşüş çok şiddetli gerçekleşmemiştir.

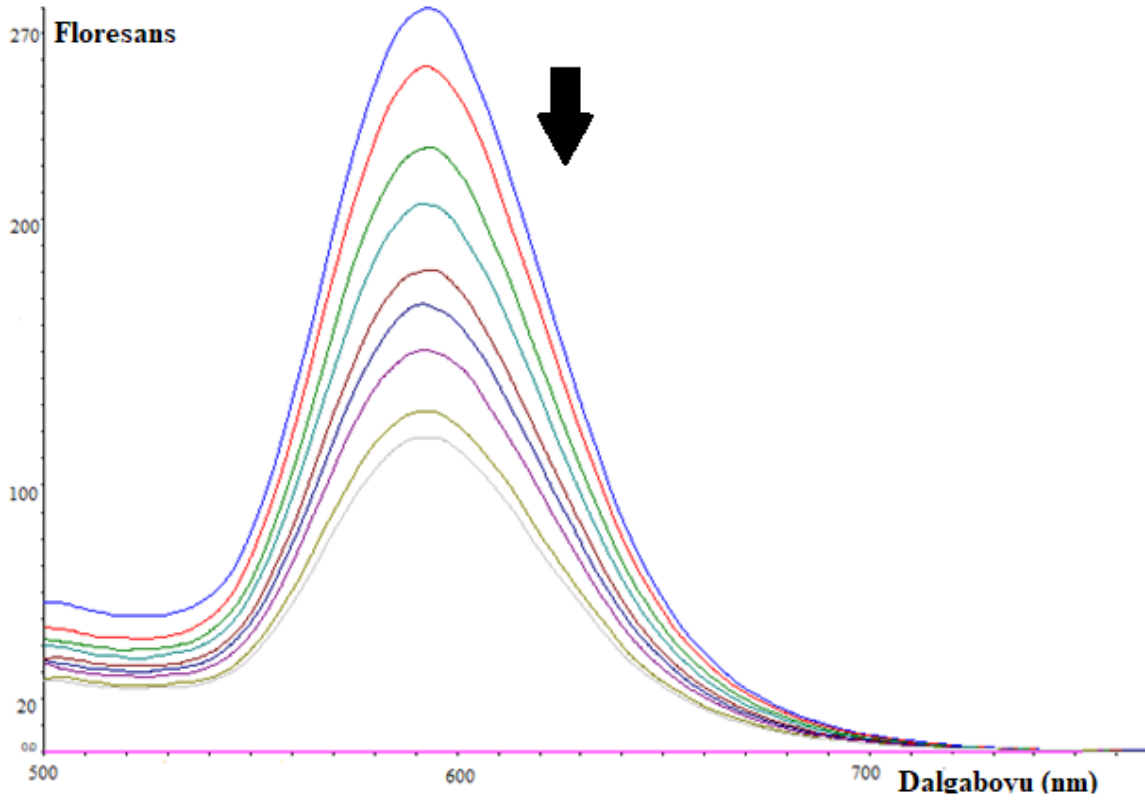
Aynı işlemi flavonoid-Cu kompleksleriyle yapıldığında ise EtBr-DNA karışımının floresansında belirgin şekilde düşme görüldü. Şekil 3.9'da EtBr/DNA karışımı üzerine flavonoid-Cu⁺² komplekslerinden 1 mM 10 μ l'lik küçük porsiyonlar halinde eklendiğinde 550 nm'de çözeltinin floresans şiddetinde görülen değişimler verilmiştir.



Şekil 3.9 DNA–EtBr karışımı üzerine artan R-Cu konsantrasyonunun etkisi



Şekil 3.10 DNA–EtBr karışımı üzerine artan M-Cu konsantrasyonunun etkisi



Şekil 3.11 DNA–EtBr karışımı üzerine artan Q-Cu konsantrasyonunun etkisi

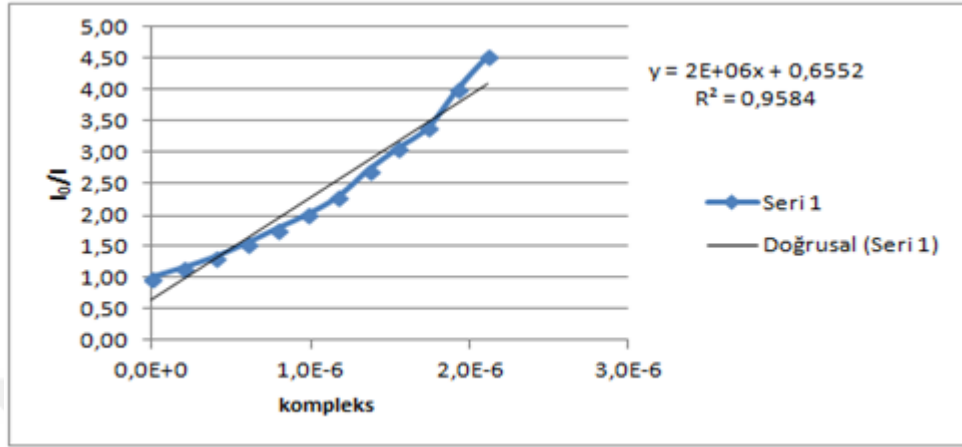
Flavonoid-metal kompleksleri DNA/EtBr karışımı içerisinde EtBr’yi çıkararak karışımın floresansında belirgin bir düşmeye sebep olmuştur. Güçlü bir interkalatör olduğu bilinen EtBr’yi DNA baz çiftleri arasında çıkarabilmesi komplekslerin DNA ile interkalasyon yaptığının kanıtıdır.

Yarışmalı floresans yönteminde bağlanma sabiti hesaplanması için Stern-Volmer eşitliği kullanılır. Elde edilen sonuçlar klasik Stern-Volmer eşitliğine (eşitlik 3.2) yerleştirilerek kompleksin bağlanma derecesi belirlenebilir (Eftink and Ghiron 1981).

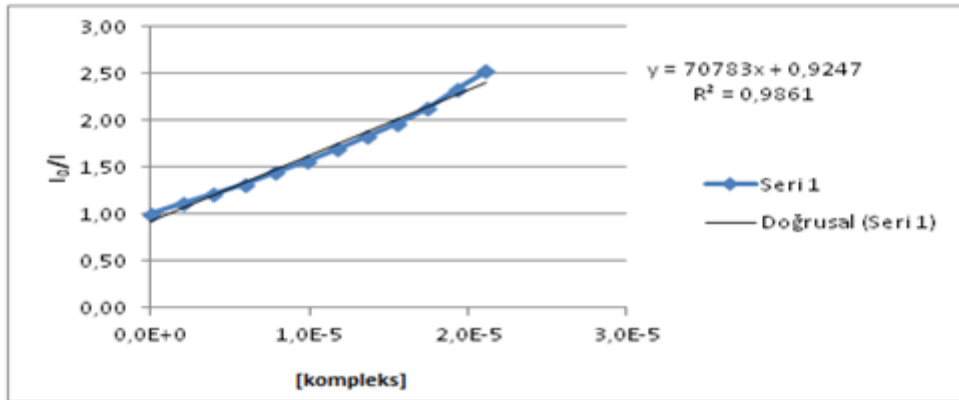
$$I / I_0 = 1 + K [Q] \quad (3.2)$$

Eşitlik 2’de o noktadaki floresans yoğunluğunu, I_0 ortama kompleks eklenmeden önceki floresans yoğunluğunu, $[Q]$ baskılayıcı molekül derişimini, K ise baskılayıcı oran katsayısını vermektedir. Çözeltinin floresansını düşüren etken kompleks olduğu için baskılayıcı derişim olarak kompleks derişimi kullanılmıştır (Hao et al. 2010).

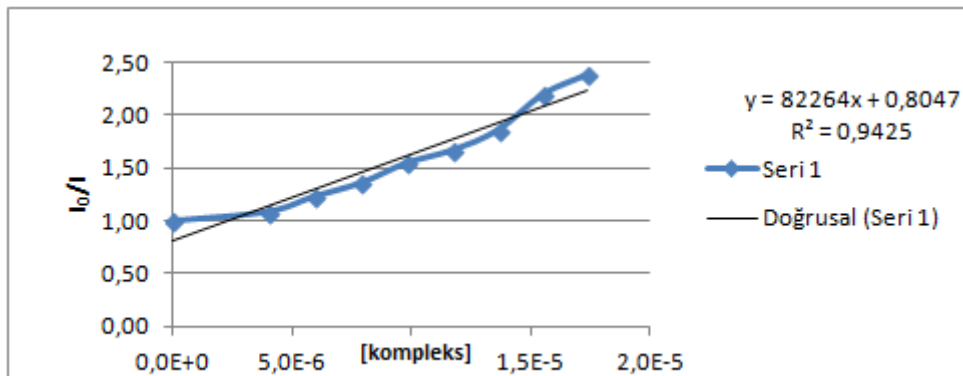
Şekil 3.12-14'te flavonoid-Cu²⁺ kompleksleri ile yapılan yarışmalı floresans çalışması sonunda sonuçların Stern-Volmer eşitliğine yerleştirilmesiyle elde edilen lineer grafikler verilmiştir.



Şekil 3.12 R-Cu kompleksinin Stern Volmer eşitliği



Şekil 3.13 M-Cu kompleksinin Stern-Volmer Eşitliği



Şekil 3.14 Q-Cu bileşiğinin Stern Volmer eşitliği

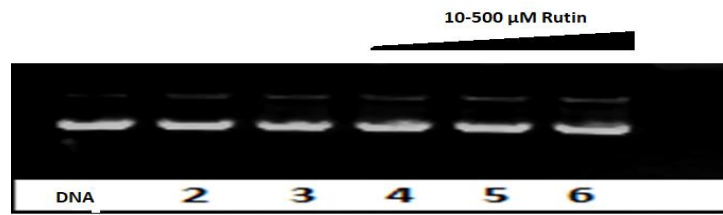
Kompleks konsantrasyonuna karşı floresans yoğunluğu oranı değeri grafiğe geçirildiğinde eğim değeri K_{SV} değerine eşit olmaktadır. Yapılan hesaplamalar sonunda K_{SV} değerleri rutin kompleksi için $0,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, mirisitrin kompleksi için $5,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ve kuersitrin kompleksi içinse $4,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

3.3 ELEKTROFOREZ ÇALIŞMA SONUÇLARI

DNA moleküllerinin analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla beraber tüm laboratuvarlarda rutin olarak yararlanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezidir. Yöntemin avantajları basit ve hızlı olması diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayıramayan DNA fragmentlerinin ayrılmasını sağlamaktır. Elektroforez çalışmalarında amacımız DNA'nın flavonoidler ve flavonoid metal kompleksleriyle yalnız ve peroksit varlığında kırılmaya uğrayıp uğramadığını ortaya çıkarmaktır. DNA ile çeşitli şekillerde etkileşen moleküllerin DNA'nın yapısında değişiklikler meydana getirdiği bilinmektedir. DNA'nın şeklinin değişmesi ya da boyunun uzaması şeklinde meydana gelen bu değişiklikler elektroforezde DNA'nın ilerleme hızını etkilemektedir.

3.3.1 Rutin ve Rutin- Cu^{2+} komplekslerinin Jel Elektroforez Sonuçları

Şekil 3.15'de Rutinin, pBR322 plazmit DNA'ya etkisi, sabit miktarda DNA'ya karşı değişen oranlarda (10-500 μM) rutin kullanılıp 1 saat inkübasyona tabi tutularak karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.15 1 saat inkübasyon sonrası Rutine ait elektroforez sonuçları

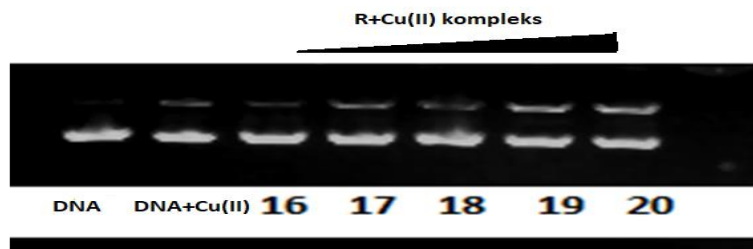
Resimde 1 numaralı hatta tek başına pBR322, 2-6 arası ise 10-500 μM arasında değişen rutin çözeltisi eklenmiştir. Jel elektroforez sonuçları incelendiğinde hemen hemen bütün hatlarda DNA form I yapısında görülmektedir. Form 2 ise 2-6 hatlar arasında çok az miktarda görülmektedir. Bu durumda rutin DNA ile çok az miktarda etkileştiği sonucuna ulaşılmıştır.

Plasmid DNA'nın form 1 yapısının bozulmaması rutin DNA ile etkileşiminin sınırlı düzeyde kaldığını göstermiştir.



Şekil 3.16 1 saat inkübasyon sonrası Rutin ve H₂O₂'e ait elektroforez sonuçları

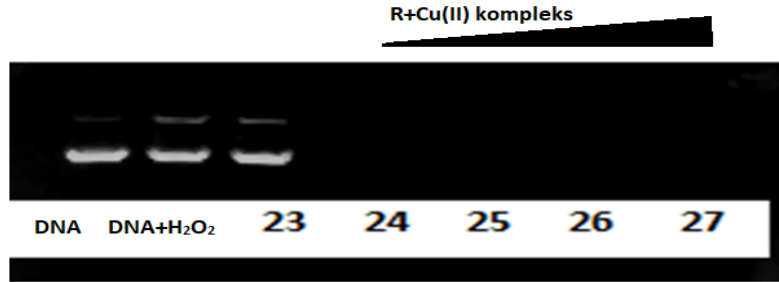
Şekil 3.16'da rutin peroksit varlığında DNA'da meydana getirdiği değişimler çalışılmıştır. Resimde 7 numaralı hatta tek başına pBR322, 8 numaralı hatta pBR322 ile beraber H₂O₂, 9-13 arası ise sabit (H₂O₂ + DNA) miktarına karşı değişen miktarda (10-500 µM) rutin eklenmiş hatlar görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde H₂O₂'in plazmit-DNA'nın yapısını bozduğu görülmektedir (8 numaralı hat). Burada Form II tipinde DNA görülmüştür. DNA çeşitli ajanlarla etkileştiğinde süper-sarmal yapısı bozularak açık sarmal forma dönüşebilir. Form 2 olarak adlandırılan bu form süper sarmal forma yani form 1'e göre jelde daha yavaş hareket etmektedir. 9-13 arasındaki hatlarda ise sadece form 1 türünde DNA görülmektedir. H₂O₂'nin DNA üzerinde yaptığı hasar rutin varlığında görülmemektedir. H₂O₂'nin DNA üzerinde yarattığı hasarın Rutin tarafından ortadan kaldırması rutin, DNA hasarını önleyebilen bir molekül olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.17 1 saat inkübasyon sonrası R-Cu⁺² kompleksine ait elektroforez sonuçları

Şekil 3.17'de R-Cu kompleksinin pBR322 plazmit DNA'ya etkisi farklı oranlarda kompleks kullanılarak araştırılmıştır. Resimde 14 numaralı hatta tek başına pBR322, 15 numaralı hatta pBR322 ile beraber 1:25 oranında karıştırılmış Cu²⁺, 16-20 arasındaki kolonlar ise DNA ile beraber 10-500 µM oranlarında karıştırılmış R-Cu kompleksi görülmektedir. Resimde görüldüğü gibi Cu²⁺ iyonları ve R-Cu kompleksleri plasmid DNA'nın yapısını bozmaktadır.

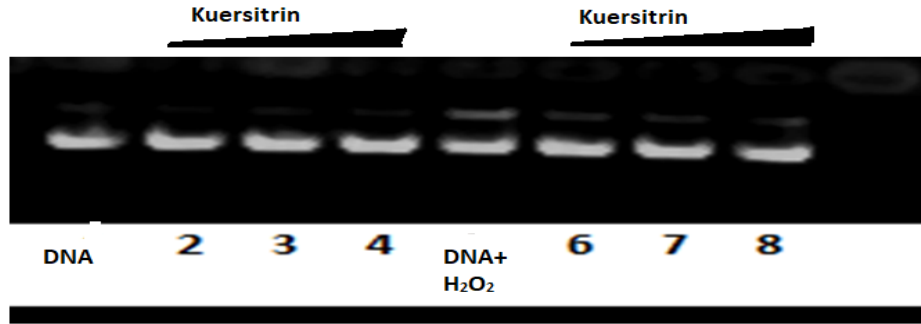
15-20 kolonlar arasında form 2 tip DNA görülmüştür. Form 2 tip DNA süper-sarmal formun yapısının bozulduğunu işaret eder. Bakır iyonları tek başınayken DNA üzerine etkisi daha azken, flavonoid kompleksi DNA'nın yapısını daha fazla bozmuştur. Kompleksin derişimi arttıkça Form 2 miktarı artmakta yani DNA'daki hasar artmaktadır.



Şekil 3.18 1 saat inkübasyon sonrası peroksit varlığında R-Cu⁺² kompleksinin elektroforez sonuçları

Şekil 3.18’de R-Cu kompleksinin peroksit varlığında DNA üzerindeki etkisi incelenmiştir. Resimdeki 21 numaralı hatta tek başına pBR322, 22 numaralı hatta DNA ile beraber H₂O₂, 23-27 arası ise sabit (H₂O₂ - DNA) karışımına karşı 10-500 µM oranında karıştırılmış rutin-Cu⁺² kompleksi görülmektedir. Resimde 22 numaralı hatta H₂O₂’nin plasmid DNA’nın yapısında meydana getirdiği bozulma açıkça görülmektedir. Form 2 oluşumu bu etkinin kanıtıdır. 23 numaralı hatta R-Cu⁺² kompleksinin H₂O₂’in yaptığı bu hasar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmektedir. 22 ve 23 numaralı hatta da görülen Form2 miktarı aynıdır. 24 numaralı hattan itibaren yani 50µM kompleks oranından başlayarak DNA’daki bozulma çok artmış ve plasmid-DNA tamamen parçalanmış ortamdan kaybolmuştur. Ajanların DNA ile etkileşimi kuvvetli olduğunda süper sarmal DNA’nın yapısı tamamen açılarak lineer hale geçer. Bu form 3 olarak adlandırılır ve jel de form1 ile 2’nin arasında görülür. Burada 24. hattan itibaren form 3 bile görülmemiştir. Bu durumda kompleksin bu derişiminde DNA’yı tamamen parçaladığı sonucuna ulaşılır.

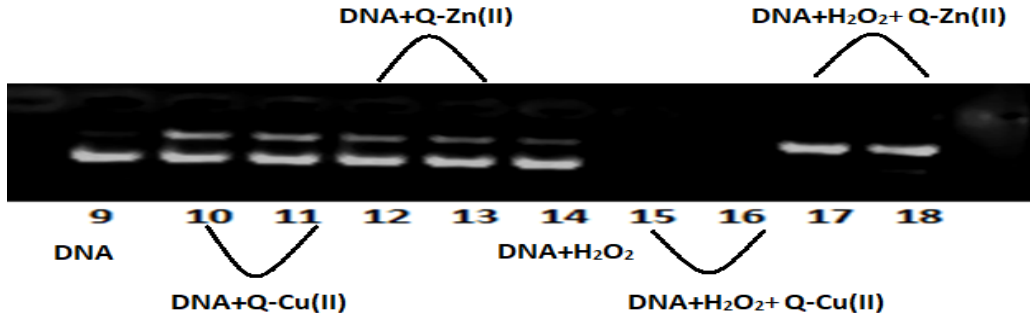
3.3.2 Kuersitrin ve Kuersitrin-Cu²⁺ Komplekslerinin Jel Elektroforez Sonuçları



Şekil 3.19 1 saat inkübasyon sonrası kuersitrine ait elektroforez sonuçları

Şekil 3.19’ da kuersitrinin DNA üzerindeki etkisi incelenmiştir. 1 numaralı hatta sadece pBR322, 2-4 numaralı hatlarda DNA/kuersitrin oranı 0,1:5, 1:25, 2:25 oranında değişen karışımları göstermektedir. 1-4 arasındaki hatlarda görüldüğü gibi kuersitrin tek başına DNA’nın yapısında çok az değişikliğe sebep olmaktadır. DNA’nın büyük kısmı form 1 şeklinde ilerlerken çok az kısmı form 2 haline dönüşmüştür. Görülen form 2 DNA’nın çok az kısmının yarı-sarmal forma döndüğünü gösterir. Bu durum kuersitrinin DNA üzerine çok az etki ettiğini göstermiştir. 5 numaralı hatta pBR322 ile beraber H₂O₂, 6-8 numaralı hatlar ise (DNA/H₂O₂) karışımına karşı 0,1:5, 1:25, 2:25 oranlarında kuersitrin içeren karışımlar içermektedir. 5 numaralı kolonda H₂O₂’in DNA üzerine yaptığı etki açıkça görülmektedir. DNA’nın bir kısmı form 2’ye dönüşmüştür. 6-8 hatlarda ise kuersitrinin, H₂O₂’in DNA üzerindeki etkisini azalttığı görülmektedir. Elektroforez sonucunda form 2 yine görülmektedir ancak H₂O₂’in tek başına olduğu hatta göre form 2 miktarı azalmıştır. Form 2 miktarının azalması DNA’nın bozulan miktarının azaldığı anlamını taşır ki bu durum kuersitrinin DNA’da meydana gelen hasarı azaltıcı etkisini gösterir.

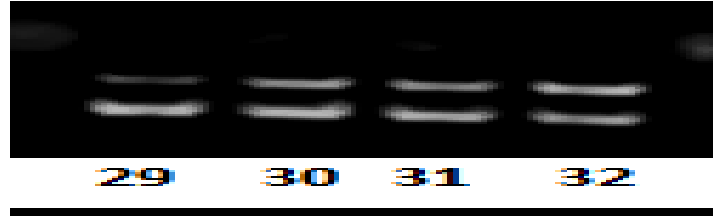
Şekil 3.20’de Q-metal komplekslerinin DNA’ya olan etkisi DNA ile 1/5 oranında karıştırılan komplekslerle 1 saat inkübasyon sonrası elektroforez düzeneğinde incelenmiştir.



Şekil 3.20 1 saat inkübasyon sonrası kuersitrin-Cu²⁺ ve kuersitrin-Zn²⁺ komplekslerine ait elektroforez sonuçları

Resimdeki 9 numaralı hatta tek başına pBR322, 10-11 numaralı hatlar DNA/(Q-Cu) , 12-13 numaralı hatlarda DNA/(Q-Zn) karışımları görülmektedir. Şekilden de anlaşılabileceği gibi her iki komplekste DNA'nın yapısını belirgin şekilde bozmuştur. Her iki kompleksle etkileşen DNA'da form 2 oluşumu görülmektedir. Ancak sonuçlarda bakır kompleksinde form 2 oluşumunun çok daha yoğun olduğu görülmektedir. Form 2 daha öncede belirtildiği gibi süper-sarmal formda bulunan DNA'nın yarı-sarmal bir forma geçtiğini göstermektedir. 14 numaralı hat pBR322 ile beraber H₂O₂, 15-16 numaralı hatlar DNA+(Q-Cu)+H₂O₂ içeren karışımı, 17-18 numaralı kolonlar ise DNA+(Q-Zn)+H₂O₂ içeren karışımı göstermektedir. 14 numaralı hatta yine H₂O₂'in DNA üzerindeki etkisi görülmektedir. H₂O₂ plasmid DNA'nın yapısını bozmuş ve form 2 oluşumunu sağlamıştır. 15-16 numaralı hatlarda Cu-kuersitrin kompleksi, H₂O₂ etkisini arttırmış ve plasmid-DNA tamamen parçalanarak ortamdaki kaybolmuştur. Bu sonuç hem rutinde gördüğümüz durum hem de Jun ve ark. tarafından yapılan çalışmayla benzerlik taşımaktadır (Jun et al. 2007b). Kompleks konsantrasyonu arttıkça yarattıkları hasar DNA'nın tamamen parçalanmasına sebep olmaktadır. 17-18 numaralı hatlarda ise yine Q-Zn kompleksinin etkisini DNA üzerindeki etkisini H₂O₂ arttırmış, DNA'nın hepsinin form 2'ye dönüşmesini sağlamıştır. Ancak DNA halen ortamdadır, tamamen parçalanmamıştır. Buradan Q-Cu kompleksinin DNA üzerindeki etkisinin Q-Zn kompleksine göre daha kuvvetli olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Şekil 3.21'de metallerin kompleks içerisinde değil de tek başınayken DNA üzerine etkilerini inceleyebilmek için elektroforez çalışması yapıldı.

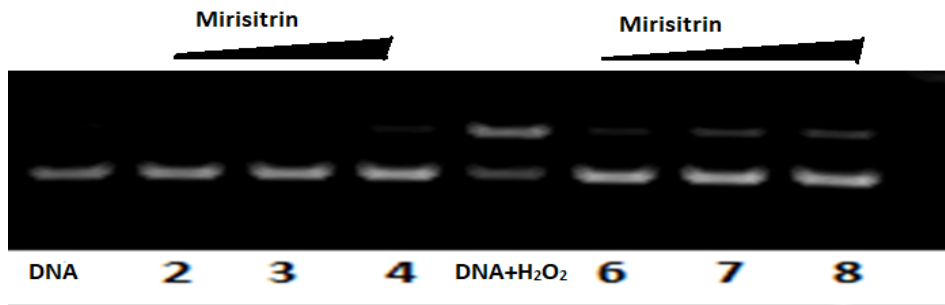


Şekil 3.21 1 saat inkübasyon sonrası Cu^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarına ait elektroforez sonuçları

Resimdeki 29-30 numaralı hatta $[\text{DNA}]/[\text{Cu}^{2+}]$ oranı 1:5 olan karışım görülmektedir. Süper sarmal DNA'nın yapısının bozulduğu ve Form 2 oluşumu açık şekilde görülmektedir. 31-32 numaralı hatta $[\text{DNA}]/[\text{Zn}^{2+}]$ oranı 1:5 olan karışımında da DNA yapısı bozulmuş ve form 2 oluşmuştur. Ağır metallerin DNA ile etkileşebildiği, negatif yüklü olan DNA iskeletine bağlanabildiği bilinmektedir. Bu durumda flavonoid-metal komplekslerimizin DNA üzerindeki etkisi hem kompleksden, hem de kompleksin içerdiği metallere kaynaklanabilir. Ancak metal iyonlarının DNA ile elektrostatik dış bağlanma yaptığı bilinmektedir. Bu durumda absorpsiyon grafiklerinde hiperkromik etkiye sebep olmalıydı. Ancak yapılan çalışmada böyle bir durum olmadığına göre DNA'daki bozulmaya komplekslerin oluşturduğu sonucuna varıldı.

3.3.3 Mirisitrin ve Mirisitrin- Cu^{2+} komplekslerinin jel elektroforez sonuçları

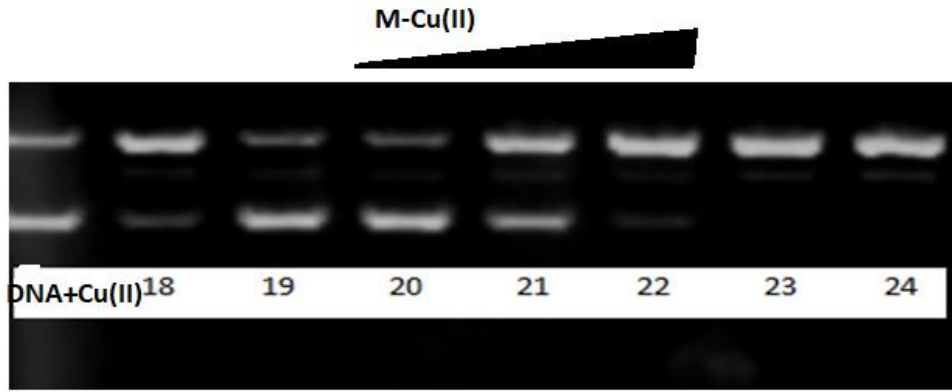
Şekil 3.22 de mirisitrinin pBR322'ye etkisi $[\text{DNA}]/[\text{Mirisitrin}]$ miktarı değiştirilip, 1 saat inkübasyondan sonraki elektroforez görüntüsüdür.



Şekil 3.22 Mirisitrine ait elektroforez sonuçları

Şekildeki 1 numaralı kolon tek başına pBR322 DNA, 2-4 numaralı kolonlar ise $[\text{DNA}]/[\text{Mirisitrin}]$ oranı 0,1:5, 1:25, 2:25 şeklinde değişen karışımları göstermektedir. Resimde görüldüğü gibi farklı oranlarda mirisitrin, pBR322 üzerine uygulandığında plasmid

DNA'nın yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır. Sadece 4 numaralı hatta bir miktar form II'ye rastlanmıştır. Bu durum mirisitrinin tek başınayken DNA üzerindeki etkisinin çok az olduğunu göstermektedir. Bu durum daha önce yaptığımız UV deneyleriyle de desteklenmektedir. Yapılan UV titrasyonlarında mirisitrinin tek başına DNA ile çok az etkileştiği görülmüştür. 5 numaralı kolon pBR322 ile beraber H_2O_2 6-8 numaralı kolonlar ise sabit miktarda ($DNA+H_2O_2$) karışımına karşı 100-250-500 μM mirisitrin eklenmiştir. 5 numaralı hatta DNA H_2O_2 etkisi ile parçalanmıştır. DNA'nın yapısının bozularak form II yapısının oluştuğu görülmektedir. 6-8 numaralı hatlarda ise ortamda yine H_2O_2 varken ortama farklı oranlarda eklenen mirisitrinin H_2O_2 'in DNA üzerine yaptığı hasarı engellediği görülmüştür. Form II tip DNA yine görülmektedir fakat miktarı belirgin şekilde azalmıştır. Bu durum flavonoidlerin DNA hasarını giderici etki gösterdiği konusundaki çalışmaları desteklemektedir.



Şekil 3.23 M-Cu²⁺ kompleksine ait elektroforez sonuçları

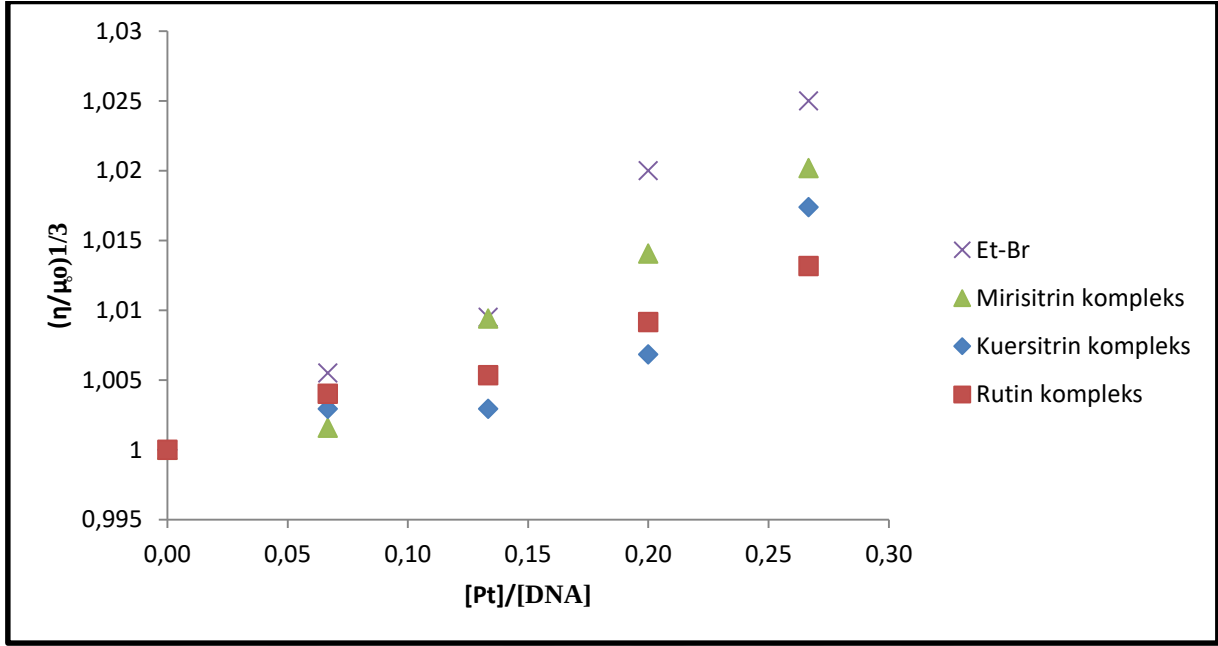
Şekil 3.23'de M-Cu²⁺ kompleksinin DNA üzerindeki etkisi görülmektedir. Resimde 17 numaralı hat pBR322 DNA ile 1:25 oranında karıştırılmış Cu(II) iyonları içeren karışımı göstermektedir. Görüldüğü gibi Cu²⁺ iyonları plasmid DNA'nın yapısını bozmuştur. 18-24 arası hatlar ise sabit miktarda DNA üzerine 10-500 μM arasında farklı derişimlerde mirisitrin-Cu²⁺ kompleksi eklenmiştir. Burada görüldüğü gibi hem Cu²⁺ iyonları tek başına hem de M-Cu(II) kompleksleri DNA'nın yapısını bozmaktadır. Hatların hepsinde süper-sarmal formdaki DNA'nın dönüşerek form II halini aldığı görülmektedir. Komplekslerimizin derişimi arttıkça DNA üzerine olan etkisi artmış ve DNA tamamen form II haline dönüşmüştür. Ancak rutin ve kuersitrinin, Cu²⁺ ile oluşturduğu komplekslerde olduğu gibi DNA'da tamamen bir parçalanma görülmemiştir.

Elektroforez sonuçlarını incelediğimizde birer flavonoid olan rutin, kuersitrin ve mirisitrin tek başlarına DNA ile etkileşimleri çok azdır. Bu sonuç yaptığımız UV ve floresans titrasyonunda da aynı şekilde görülmüştür. Ancak H₂O₂ ile etkileştirilerek yapısı bozulan DNA'da meydana gelen hasarın, maddelerimizin farklı derişimlerde karışımlarıyla etkileştirildiğinde azaldığı görülmüştür. Bu durum flavonoidlerin çeşitli şekillerde DNA üzerinde oluşabilecek hasarı önleme etkileri olduğunu göstermiştir. Elektroforez sonuçlarımızda pBR322'nin maddelerimizin Cu²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarıyla oluşturduğu komplekslerle etkileştiğinde bozulmaya uğradığı görülmüştür.

3.4 VİSKOZİTE ÇALIŞMA SONUÇLARI

Küçük moleküllerin DNA'ya bağlanma modelinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri de vizkozitedir. Bu yöntemde DNA baz çiftlerinin arasına interkalasyon yoluyla yerleşen moleküllerin DNA'nın boyunu uzattığı bunda DNA'nın viskozitesini arttırdığı düşünülmektedir (Sun et al. 2011).

Şekil 3.24'de 100 µM DNA çözeltisi üzerine 1 mM EtBr ve kompleks çözeltilerinden 100'er µl eklendiğinde oluşan viskozite değişim grafiği görülmektedir. Grafik incelendiğinde yaptığımız deneylerde, flavonoid-metal komplekslerinin artan [kompleks]/[DNA] oranıyla DNA'nın bağıl viskozitesinin yükseldiği görülmektedir. Bu durum bu komplekslerin DNA ile interkalasyon yoluyla etkileşiyor olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3.24 Flavonoid-metal komplekslerinin viskozite grafiği

Aynı deneyi flavonoidler tek başlarına iken tekrar ettiğimizde DNA'nın bağlı viskozitesinde belirli bir artış gözlemlenmedi. Bu durum çalışmada yaptığımız diğer deneylerle paralellik göstermektedir.



BÖLÜM 4

TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1 UV-vis SPEKTROSKOPİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Flavonoidler pek çok araştırmacının ilgisini çeken, çok farklı biyolojik aktiviteleri bulunan bir madde sınıfıdır. Özellikle DNA ile olan etkileşimleri ve antioksidan özellikleri üzerine çalışmaların devam ettiği flavonoidlerin üzerinde en çok araştırma yapılanı da kuersetindir. Fizyolojik koşullarda flavonoid-DNA bağlanma etkileşimlerinin spektrofotometrik analizinin yapıldığı bir çalışmada morin, kuersetin ve rutin flavonoidlerinin DNA etkileşimleri UV spektroskopisiyle belirlenmiş, etkileşimin interkalasyon olduğu belirtilmiştir. Hesaplanan bağlanma sabiti değerlerinde en yüksek sonuca $6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ile kuersetinde ulaşılmıştır ve sıcaklık ve pH'ın da bağlanma sabiti değerleri üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Janjua et al. 2009). Lutein, kaempferol, apigeninin DNA'ya bağlanma kabiliyetlerinin incelendiği başka bir çalışmada da bağlanma modu klasik interkalasyon olarak belirlenmiştir (Rusak et al. 2010). Kuersetin, delphinidin ve kaempferol flavonoidleriyle yapılan çalışmada flavonoidlerin DNA ile etkileşiminin hem interkalasyon hem de dış bağlanmayla olduğunun belirtildiği bu çalışmada da en yüksek bağlanma sabiti $7,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ile kuersetin için hesaplanmıştır (Kanakis et al. 2007).

Bu çalışmada UV spektroskopisi ölçümleri öncelikle mirisitrin, kuersitrin ve rutin serbest halde iken DNA ile etkileştirilerek yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonunda UV spektroskopisi grafiklerinde absorbansta azalma (hipokromik etki) ile beraber çok az miktarda dalga boyunda artış (batokromik etki) görülmüştür. Bu durum konuyla ilgili yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Rutin, mirisitrin ve kuersitrinin DNA ile interkalasyon yoluyla etkileştiği sonucuna ulaşılmıştır. Ancak çalışmamızda en yüksek bağlanma sabiti $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ile mirisitrin için hesaplanmıştır. Etkileşim kuvvetleri arasındaki ilişkinin mirisitrin > kuersitrin > rutin şeklinde gerçekleştiği görülmüştür. Çalışmamızda, bağlanma sabitleri mirisitrin için 4×10^5 , kuersitrin için $2,2 \times 10^5$ ve rutin için $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Hesapladığımız bağlanma sabitleri diğer çalışmalardaki sabitlerden daha büyüktür. Deneylerin yapıldığı şartlar sıcaklık, pH, flavonoidin DNA ile etkileşim süresi, çözücü türleri gibi etkiler bağlanma sabitleri arasındaki farklara sebep olabilir (Janjua et al. 2009). Ayrıca yapıdaki glikozitlerin oyuklarla ya da fosfat gruplarıyla hidrojen bağı yapması da muhtemeldir.

Flavonoidlerin DNA ile etkileşimleri pek çok çalışmanın ana konusu olduğu gibi, flavonoid-metal kompleksleride en az serbest flavonoidlerin özellikleri kadar dikkat çekicidir. Flavonoid-metal komplekslerinin yapısını inceleyen bir çalışmada flavonoid ve flavonoid-metal komplekslerinin UV-vis de spektrum grafikleri incelenmiş ve grafiklerde batokromik etki gözlemlenmiştir. Batokromik etki yani kırmızıya kaymanın kompleksler oluşurken oluşan konjugatif etkiden kaynaklandığı belirtilmiştir (Malešev and Kuntić 2007). Flavonoid-metal kompleksinin incelendiği başka bir çalışmada, metal rutin kompleksleri pH 7.4'te Tris-HCl, demir ya da bakır tuzları rutin ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Komplekslerin oluşumu UV-vis grafiğinde sağa 366 nm'lik bir uzun dalga boyu kayması ile karakterize edilmiştir (Afanas'eva et al. 2001). Rutin-Zn²⁺ kompleksinin karakterizasyonu ve biyolojik değerlendirmesinin yapıldığı başka bir çalışmada da kompleks çeşitli yöntemlerle hazırlandıktan sonra UV-vis ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonunda dalga boyundaki değişim, batokromik etki net olarak görülmektedir. Bu durum çinkonun rutinle kompleks oluşturmaya kanıt olarak sunulmuş ve kompleksin oluşumu ile ilgili bir modelleme yapılmıştır (Ikeda et al. 2015). Bu çalışmada da flavonoidler sabit Cu(II) ve Zn(II) çözeltileri ile karıştırılmış ve yapılan ölçümler sonunda dalga boyunda kırmızıya kayma özellikle Cu(II) komplekslerinde net şekilde görülmüştür. Bu durum literatürdeki diğer çalışmalardan hareketle, çalışılan pH'da metallerin flavonoidler ile kompleks oluşturduğunu göstermiştir.

Kuersetin-Zn(II) kompleksinin ct-DNA ile ilişkisi Tan ve ark. (Tan et al. 2009b) ve Ni ve ark. (Ni et al. 2007) tarafından floresans titrasyonu yoluyla incelenmiştir. Bu incelemeler komplekslerin ct-DNA ile interkalasyon yoluyla etkileşimini kanıtlamıştır. Kuersitrin-Te kompleksinin ct-DNA ile ilişkisinin ele alındığı bir çalışmada UV-spektropisinde hipokromik etki, DNA viskozitesinde artış ve artan DNA miktarına karşı Q-Te floresans yoğunluğunda düşme görülmüş ve bunların DNA ile dış bağlanmaya işaret edebileceği belirtilmiştir (Dehghan et al. 2011). Raza ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada rutin-Ni kompleksi oluşturularak nikelin rutin kimyasal aktivitesini belirgin şekilde yükselttiği gözlemlenmiş ve rutin-Ni kompleksinin DNA ile etkileşimi yarışmalı floresans, elektroforez

gibi yöntemlerle kanıtlanmıştır (Raza et al. 2016a). Yine Raza ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada da kuersetinin-demir kompleksi sentezlenmiş ve UV spektroskopisi, floresans, elektroforez gibi yöntemlerle kompleksin DNA ile etkileşimi incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda, kuersetin-demir kompleksinin kuersetine göre çok daha aktif olduğu ve DNA ile etkileştiği belirtilmiştir (Raza et al. 2016b). Rutin ve rutin-demir kompleksleri üzerine Selvaraj ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada komplekslerin DNA ile daha iyi etkileşime girdiği kanıtlanmış ve bu durum metal iyonları varlığının, ana flavonoidin düzlemselliğini arttırmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Selvaraj et al. 2012).

Mirisitrin, kuersitrin ve rutin Cu(II) komplekslerinin DNA ile etkileşimi UV-vis spektrofotometresi ile incelendiğinde gözlemlenen hipokromik ve batokromik etki komplekslerin DNA ile interkalasyon yaptığı sonucunu doğurmuştur. Bu durum literatürdeki diğer çalışmalarla da uyumludur. Komplekslerin DNA'ya bağlanma sabitleri hesaplandığında sıralamanın $M-Cu^{+2} > Q-Cu^{+2} > R-Cu^{+2}$ şeklinde olduğu görülmüştür. Bu sıralama serbest flavonoidlerin bağlanma sabitleri sıralamasıyla paralellik göstermektedir. Serbest halde iken DNA ile iyi etkileşen molekülün kompleks haline geldiğinde de daha aktif olması beklenen bir sonuçtur. Komplekslerin bağlanma sabitleri serbest flavonoidlerden daha büyüktür. Bu durumda yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Bağlanma sabitleri $M-Cu^{+2}$ için $8,0 \times 10^5$, $Q-Cu^{+2}$ için $3,1 \times 10^5$ ve $R-Cu^{+2}$ için ise $2,0 \times 10^5 M^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Guo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada dihidromirisetin-manganez kompleksi sentezlenmiş ve kompleksin DNA ile etkileşimi UV-vis, floresans, viskozite ölçümleri yapılarak belirlenmiştir. Hipokromik etki ve dalga boyunda kırmızıya kayma kompleksin DNA ile interkalasyon yoluyla bağlanmasının kanıtı olarak sunulmuş ve bağlanma sabiti $6,5 \times 10^4 M^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Guo et al. 2012). Kuersetin- Cu^{+2} kompleksinin özelliklerinin incelendiği farklı bir çalışmada bağlanma sabiti $1,8 \times 10^5 M^{-1}$ olarak hesaplanmış, kuersetin- La^{+3} kompleksinin bağlanma sabiti ise $3,9 \times 10^5 M^{-1}$ olarak belirtilmiştir (Ni et al. 2007). Morin, kuersetin ve 6-hidroksiflavon flavonoidlerinin Cu ve Cr kompleksleriyle yapılan çalışmada UV spektroskopisi ölçümlerinde yine hipokromik ve batokromik etkiler görüldükten sonra bağlanma sabiti hesaplanmıştır. Yalnız bu çalışmada komplekslerin yapısına sudaki çözünürlüğü arttırmak için β -siklodekstrin eklenmiştir. Yapılan hesaplamalarda morin-Cu için $1,2 \times 10^4$, kuersetin-Cu $1,0 \times 10^4$, Cu-6HF $1,6 \times 10^3$, morin-Cr $4,6 \times 10^2$, kuersetin-Cr 4×10^2 ve Cr-6HF $3,5 \times 10^2 M^{-1}$ değerleri elde edilmiştir (Jabeen et al. 2014). Terpiridinden sentezlenen Co(II) ve Co(III) komplekslerinin DNA ile interkalasyon

yaparak bağlandığı belirtilen çalışmada bağlanma sabitleri Co(II) için $1,9 \times 10^4$ ve Co(III) için $2,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Indumathy et al. 2007). Bis-kalkon ve bis-flavonolün Ru(II) katyonu ile iki farklı kompleksi sentezlenmiş ve bu komplekslerin DNA ile etkileşimi UV-vis titrasyonu kullanılarak izlenmiştir. Kalkon kompleksi için bağlanma sabiti $2,1 \times 10^6$, flavonol içinse $1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Komplekslerin bağlanma sabitleri arasındaki bu fark konjuge yapılarıyla ilgili olabileceği belirtilmiştir (Gaur and Mishra 2013). Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında çalışmamızdaki bağlanma sabitleri oldukça büyüktür. Ni ve ark. tarafından yapılan çalışmadaki değerlere daha yakındır. Komplekslerin DNA ile etkileşiminde kompleksteki metal ve kompleksin yapısı önem taşımaktadır. Bağlanma sabitleri arasındaki farklar bu etkilerin sonucu olabilir.

Bütün bu sonuçlar rutin, kuersitrin ve mirisitrin ile yapılan çalışmayla benzerlik taşımaktadır. Gözlemlediğimiz dalga boyunda artış ve absorbansta gözlemlediğimiz düşüş komplekslerin DNA ile interkalasyon yolu ile etkileştiğini kanıtlamış, hesapladığımız bağlanma sabitleri de bu etkileşimin oldukça kuvvetli olduğunu göstermiştir. Bağlanma sabitlerindeki yüksek değer flavonoidlerdeki glikozit kısımlarının DNA ile hidrojen bağı yapması ile de açıklanabilir.

4.2 FLORESANS SPEKTROSKOPİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

EtBr DNA ile interkalasyon yaptığı kanıtlanmış bir moleküldür. EtBr DNA baz dizilerinin arasına interkalasyon yaparak girdiğinde kuvvetli floresans özellik gösterir. Herhangi bir etki ile EtBr molekülleri DNA içerisinden çıkarıldığında floresansta düşme görülür. Yarışmalı floresans adı verilen bu yöntemle, küçük moleküllerin DNA ile interkalasyon yapıp yapmadığı anlaşılabilir.

Çalışmamızda EtBr-DNA kompleksi üzerine rutin, mirisitrin ve kuersitrin tek başlarına herhangi bir yapıya dahil olmadan küçük porsiyonlar halinde eklendiğinde DNA floresansında düşme görüldü ancak bu düşüş çok az seviyede gerçekleşti. Bu durum flavonoidlerin tek başlarına DNA ile etkileştiğini ancak bu etkileşimin EtBr'yi tamamen DNA içerisinden çıkarmaya yetmeyecek şekilde gerçekleştiğini gösterir.

Kuersetin-Zn kompleksinin DNA ile etkileşiminin çeşitli yöntemler kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada EtBr-DNA kompleksi üzerine artan miktarda kuersetin-Zn molekülü eklenmiş ve DNA kompleksi flüoresansında belirgin düşme gözlemlenmiştir. Bu durum DNA

kompleksindeki EtBr'nin DNA'dan ayrılarak yerine kuersetin kompleksinin yerleşmesiyle açıklanmış ve kompleksin DNA ile interkalasyon yaptığına diğer çalışmalarla beraber kanıt olarak sunulmuştur (Tan et al. 2009b). Aynı durum çalışmamızda rutin, kuersitrin ve mirisitrinin Cu^{2+} iyonları ile yaptığı komplekslerde de görülmüş, EtBr-DNA kompleksi üzerine flavonoid-metal komplekslerinden eklediğimizde, flüoresansta düşme görülmüş ve komplekslerin DNA ile interkalasyon yaptığı sonucuna ulaşmamızı sağlamıştır. Çünkü yapılan çalışmalar göstermiştir ki EtBr molekülü DNA ile interkalasyon yaparak birleşir ve kuvvetli floresans özellik gösterir. Başka bir molekül EtBr'yi DNA baz çiftleri arasından çıkarabilirse, DNA'nın flüoresansında büyük oranda düşme görülür. Bu durum yarışmalı flüoresansta interkalasyonu ispatlar. Nötr kırmızısı (NR) yapı olarak diğer düzlemsel boyalara benzeyen bir fenazin boyasıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar NR'nin aynı EtBr gibi (LePecq and Paoletti 1967) DNA ile interkalasyon yaparak bağlandığını göstermiştir (Heli et al. 2004). Ni ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sabit miktarda NR üzerine farklı konsantrasyonlarda DNA eklendiğinde, NR nin floresans yoğunluğu büyük ölçüde artmış ve tepe noktası 509 nm'den 521 nm'ye kaymıştır. Kuersetin-Cu(II) kompleksinin NR-DNA çözeltisine eklenmesiyle, NR-DNA çözeltisinin floresansında düşme görülmüştür. Bu durum kuersetin-Cu kompleksinin NR-DNA kompleksindeki NR ile yer değiştirdiği tezini doğurmuştur (Ni et al. 2007). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, çalışmamızdaki flavonoid- Cu^{2+} komplekslerinin DNA-EtBr kompleksleri ile verdiği etkileşimlerle uyumaktadır. Her iki çalışmada da Kuersetin- Cu^{2+} kompleksi, DNA ile kompleks oluşturmuş olan boya (NR, EtBr) DNA içerisinden çıkararak yerine yerleşmiş bu durumda kompleksin floresansında düşüşe sebep olmuştur. Bu boya (NR, EtBr) DNA ile interkalasyon yaptığı, baz dizilerinin arasına yerleştiği bilindiğine göre, komplekslerinde DNA ile interkalasyon yaptığı sonucuna ulaşılmıştır. Tris(N-metilbenzimidazol-2-ilteni)amin ligandı kullanılarak manganez ve çinko geçiş metalleriyle kompleksler sentezlenmiş ve bu komplekslerin DNA ile etkileşimi yarışmalı floresans kullanılarak araştırılmıştır. Floresansta meydana gelen düşme interkalasyona delil olarak gösterilerek bağlanma sabiti Mn-kompleksi için $2,0 \times 10^3$ ve Zn-kompleksi için $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Wu et al. 2011).

Yarışmalı floresans deney sonuçları için Stern-Volmer eşitliği kullanılarak hesaplanan bağlanma sabiti değerleri M- Cu^{2+} kompleksi için $5,8 \times 10^5$, Q- Cu^{2+} kompleksi için $4,8 \times 10^5$, R- Cu^{2+} kompleksi için ise $0,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerler UV'de kompleksler için hesaplanan K_b bağlanma sabiti değerine çok yakındır. Bu durumda yarışmalı floresansta da sıralama $\text{M-Cu}^{2+} > \text{Q-Cu}^{2+} > \text{R-Cu}^{2+}$ şeklinde olmuştur ki bu sıralama UV

titrasyonda elde ettiğimiz sıralamayla aynıdır. Hesaplanan bu değerlerden de görüldüğü gibi DNA ile etkileşimde M-Cu kompleksi diğer komplekslere göre daha iyi bağlanmıştır. Bu durum daha önce yaptığımız UV titrasyon sonuçlarıyla benzerlik taşımaktadır. Her iki deney sonucu da birbiriyle örtüşmektedir. Bağlanma sabiti değerleri karşılaştırıldığında bu çalışmadaki flavonoid komplekslerinin bağlanma sabiti değerlerinin oldukça büyük olduğu, komplekslerin DNA içerisinde EtBr'yi tamamen çıkararak floresansı düşürdüğü gözlemlenmiştir.

4.3 ELEKTROFOREZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Elektroforezde küçük moleküllerin DNA ile etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan etkin yöntemlerden biridir. Yapılan elektroforez deneylerinde rutin tek başına iken DNA'nın yapısında çok az değişime sebep olmuş, az miktarda form 2 olduğu görülmüştür. Aynı durum kuersitrin ve mirisitrinde de gerçekleşmiştir. Bu durum daha önce yaptığımız UV-vis ve floresans ölçümleriyle uyum göstermektedir. Bu deneylerde de flavonoidlerin yalnızken DNA ile çok az etkileştiği sonucuna ulaşılmıştır.

Ancak flavonodlerin üçü de DNA'da peroksit kaynaklı hasarı engellemiştir. Bu durumda flavonoidlerin antioksidan karakter taşıdığı, DNA'da herhangi bir sebeple meydana gelen hasarı belli derişimlere kadar önledikleri söylenebilir. Gong ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hücre kültürlerinde hidrojen peroksitin sebep olduğu zehirlenme ve hücre ölümleri gözlemlenmiştir. Bu hücre kültürleri en az 12 saat rutin ile muamele edildikten sonra H₂O₂ ile etkileştirildiğinde, hücre ölümlerinin çok aza indirgendiği görülmüştür. Rutin, peroksitin hücre kültürü üzerindeki etkisini azaltmıştır (Gong et al. 2010). Görüldüğü gibi çalışmaların sonuçları örtüşmektedir. Her iki çalışmada da rutin, peroksitin sebep olduğu hücre hasarını en aza indirmiştir. Yapılan bir çalışmada kuersetinin, 150-250 µmol/l derişimde, peroksitin sebep olduğu hücre ölümünü önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Aynı çalışmada laboratuvar ortamında flavonoidler üzerinde yapılan antioksidan deneylerinde en yüksek antioksidan aktivitesine mirisetin ulaşmıştır (Wätjen et al. 2005). Kuersetinin, Cu²⁺ iyonlarının sebep olduğu DNA hasarına karşı etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada kuersetinin tek başına DNA hasarına sebep olmadığı, düşük konsantrasyonlarda Cu²⁺/H₂O₂'nin sebep olduğu DNA hasarını önlediği ancak yüksek konsantrasyonda bu hasarı desteklediği görülmüştür (Jun et al. 2007c). Her iki çalışmadaki sonuçlar çalışmamızla uyusmaktadır. Çalışmamızda kuersitrinin tek başına DNA üzerinde belirgin bir hasar oluşturmadığı ancak

DNA'da H₂O₂ kaynaklı hasarı azalttığı görülmüştür. Ancak yüksek derişimlerde kuersetin ve Cu²⁺ iyonu içeren karışımlarda DNA iplikçikleri tamamen kaybolmuş, DNA parçalanmıştır. Çalışmamızda, flavonoidlerin hücre DNA'sına direk etki etmediği ancak H₂O₂ kaynaklı hasarı azaltabildiği görülmüştür. Benzer sonuçlara ulaşılan başka bir çalışmada flavonoidlerin Caco-2 hücrelerine etkileri incelenmiştir. Aherne tarafından yapılan çalışmada, flavonoidlerin tek başlarına hücre DNA zincirinde herhangi bir zarara sebep olmadığı görülmüştür. Belirli bir derişimin üzerindeki H₂O₂ ise hücre DNA'sına zarar vermiştir. Bunun üzerine hücreler 24 saat 200 µM rutin, kuersetin, mirisetin ve flavonoid karışımına (2:1:1 kuersetin/mirisetin/rutin) maruz bırakılmıştır. Daha sonra 30 dakika süresince 37 °C'de 50 µM H₂O₂ ile etkileştirilen hücrelerdeki DNA hasarı incelendiğinde, flavonoidlerin DNA hasarını önlediği görülmüştür (Aherne and O'brien 1999). Yapılan benzer bir çalışmada bir flavonoid olan ve yapı olarak kuersetine çok benzeyen luteolinin H₂O₂ ile hasara uğrayan lenfositlerde koruyucu etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada kaempferol ve apigeninin etkisi sınırlı kalmıştır. Ancak aynı çalışmada lutein ve kaempferol sağlam lenfositlerde DNA hasarına sebep olduğu görülmüştür. Flavonoid konsantrasyonu ve etki süresinin bu süreçte önemli olduğu belirtilmiştir (Rusak et al. 2010). Flavonoid türevleri olan antisiyoninler üzerine yapılan bir çalışmada jel elektroforezi kullanılmış ve antisiyoninlerin DNA ile interkalasyonuna dair bir kanıtın bulunmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada antisiyoninlerin serbest radikal temizleyici olarak etki ettiği belli derişimlerde DNA'daki hasarı giderebildikleri görülmüştür (Webb et al. 2008).

Flavonoid-metal komplekslerinin DNA üzerindeki etkisi incelendiğinde, komplekslerin artan derişimlerde DNA'ya zarar verdiği bir noktadan sonrada tamamen parçalayabildiği görüldü. Jun ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da küçük derişimlerde flavonoidin bakır iyonunun DNA'da yarattığı hasarı önlerken, derişim arttıkça DNA'nın tamamen parçalandığı görülmüştür (Jun ve ark. 1992). Jun ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada kuersetin-Zn kompleksinin DNA'nın yapısını bozarak kırıklar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Kompleks derişimi arttıkça ve DNA'nın kompleksle etkileşme süresi uzadıkça form 2 oluşumu artmıştır (Jun et al. 2007b). Süre uzadıkça kompleksin DNA'ya verdiği hasar, form 2 oluşumu artmış ancak DNA'nın tamamen parçalanma durumu gözlemlenmemiştir. Kuersetin-Mn(II) komplekslerinin, DNA bölünmesi üzerindeki etkileri pBR322 DNA kullanılarak jel elektroforezi ile incelenmiştir. Artan kompleks derişiminde DNA'nın bölünmesi açık şekilde gözlemlenmiştir. Ayrıca reaksiyon süresi arttıkça, DNA bölünmesinin arttığı belirlenmiştir. Düşük derişimde süper sarmal DNA'nın yapısında herhangi bir değişim olmazken, 50

μM 'dan sonra süper sarmal DNA'nın yapısı bozulmuş ve gevşemiştir (Jun et al. 2007a). Her iki çalışmada da, farklı kuersetin-metal komplekslerinin, jel elektroforezde süper sarmal DNA'nın yapısını bozarak form 2 oluşumuna sebep olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, çalışmamızda ulaştığımız sonuçlarla örtüşmektedir. Flavonoid-metal kompleksleri DNA'nın yapısını bozarak hasara sebep olmaktadır. Kompleksin DNA'nın yapısını ne kadar bozduğu, kompleksin yapısına, kompleksteki metal iyonuna, uygulanan derişime ve etki süresine bağlı olarak değişebilmektedir. Metal flavonoid komplekslerinin bu özelliği bu moleküllerin antitümör özellikli olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

4.4 VİSKOZİTE ÇALIŞMA SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Viskozite çalışması da DNA etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan önemli yöntemlerden biridir. Kuersetin-Zn kompleksi üzerine yapılmış bir çalışmada kompleks derişimi arttıkça DNA'nın viskozitesinin arttığı görülmüştür. Bu artış çalışmadaki diğer etkilerle beraber kompleksin DNA ile interkalasyon yapmasına kanıt olarak gösterilmiştir (Tan et al. 2009b). Oksidatif süreci inhibe etmek veya yavaşlatmak için kullanılan sentetik bir fenol olan ve flavonoidlere benzerlik gösteren 2-tert-butil-4-metilfenol (TBMP) ile DNA'nın pH 7,4 de 10 mM Tris-HCl sulu çözeltisindeki etkileşimi spektrofotometre ve viskozimetrik ölçümler yapılarak incelenmiştir. TBMP çözeltisi lüminesans özellik gösterdiğinden, TBMP ve ct-DNA arasındaki etkileşim, floresan titrasyon deneyleri yapılarak incelenmiştir. TBMP'nin emisyon yoğunluğu eklenen DNA miktarı arttıkça azalmıştır. Floresanstaki azalma DNA-TBMP arasındaki etkileşimin interkalasyon olduğunun ispatı olarak verilmiştir. TBMP ve DNA arasındaki etkileşimi daha fazla açıklığa kavuşturmak için, viskozite ölçümleri yapılmıştır. İnterkalasyonda, moleküllerin DNA'daki baz dizilerinin arasına girerek, DNA'nın boyunu uzatmaları beklenir. Bu durumda DNA'nın viskozitesinde artışa yol açar. Viskozite çalışmaları interkalasyonun en önemli delili sayılır. DNA üzerine farklı derişimlerde TBMP eklendiğinde DNA'nın viskozitesinde belirgin şekilde artış gözlemlenmiştir (Kashanian and Dolatabadi 2010). Bu çalışmada floresans yoğunluğundaki düşüş, vizkozitedeki artış interkalasyonun kanıtı olarak verilmiştir.

Aynı ekip tarafından bir diğer fenol bileşiği olan 2-tert-butilhidrokinon (TBHQ) adlı gıda katkı maddesi üzerine yapılan çalışmada, bu molekülünde DNA ile etkileşim yolunun interkalasyon olduğu belirtilmiştir (Kashanian and Dolatabadi 2009). Bunun için de UV ve floresans spektroskopisi ve viskozite çalışmaları kanıt olarak sunulmuştur. DNA'nın yapısını

bozduğu düşünölen bu maddenin gıda katkı maddesi olarak kullanılmaması önerilmiştir. Bütöhidroksianisol bileşiminin ct- DNA ile etkileşimi fizyolojik pH'da çeşitli spektrometrik yöntemlerle incelenmiştir. Yapılan viskozite çalışmasında ct-DNA'nın viskozitesinde çok belirgin bir artış görölmüş ve bu bileşimin DNA'da baz dizilerinin arasına yerleşmesine yani interkalasyona kanıt olarak gösterilmiştir (Kashanian and Ezzati Nazhad Dolatabadi 2009).

Flavonoidler tek başlarına iken DNA ile etkileşimlerinin viskoziteleri ölçölmüştür. Ancak bu ölçömlerde viskozitede önemli bir artış gözlemlenmemiştir. Bu beklenen bir sonuçtur çünkü etkileşimi belirlemeye çalıştığımız diğör yöntemlerde de flavonoidler tek başlarına iken güçlü bir etkileşim görölmedi. Viskozitede artışın sınırlı olması flavonoidlerin yalnızken DNA ile etkileşiminin çok zayıf olmasından kaynaklanabilir. Flavonoid komplekslerinin DNA ile etkileşimini viskozite ile belirlenmeye çalışıldığında, komplekslerin DNA'nın bağıl viskozitesini belirgin şekilde arttırdığı göröldü. Bu durum bu konuda yapılan diğör çalışmalardan hareketle komplekslerin DNA ile interkalasyon yaptığı sonucuna ulaşmamızı sağlamıştır. Viskozitede en yüksek artış mirisitrin kompleksinde görölmüştür ki bu durum çalışmadaki diğör sonuçlarla da örtüşmektedir.

Guo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada dihidromirisetin-Mn kompleksinin DNA ile olan etkileşimi UV-vis absorbsiyon spektroskopisi, floresans spektroskopisi ve viskozite ölçömleri kullanılarak incelenmiştir. Bütün ölçömler çalışmamıza benzer sonuçlar vermiş, yapılan ölçömler kompleksin DNA ile güçlü bir interkalasyon modu ile DNA'ya bağlandığı belirtilmiştir. Bağlanma sabiti $6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmış ve EtBr ile rekabet edebilecek bir interkalatör olarak belirtilmiştir (Guo et al. 2012). Kuersetin-Cu²⁺ kompleksinin özelliklerinin araştırıldığı detaylı bir çalışmada, kompleksin DNA ile etkileşimi UV spektrumları, floresans ölçümü, viskozite ölçümü ve agaroz jel elektroforezi gibi yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Kompleksin elektronik absorbsiyon spektrumları 260-440 nm bölgesinde geniş bir band şeklindedir ve ct-DNA konsantrasyonunun artmasıyla 270 nm'de absorbsiyon spektrumu görölmüş ve absorbsiyon yoğunluğu düşmüştür. Kompleksle yapılan elektroforez çalışmasında kompleksin plazmid DNA'da hasara sebep olduğı ve kompleks konsantrasyonu artıkça DNA üzerindeki hasarın arttığı görölmüştür. Belirli derişimdeki kompleks üzerine ct-DNA çözeltisi artan miktarlarda ilave edildiğinde DNA viskozitesinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Çalışma sonunda, kuersetin-Cu kompleksinin DNA bölünmesini destekleyebileceğı ve DNA baz dizileri arasına girebileceğini göstermiştir. Kompleksin antitümör mekanizmasının, yalnızca reaktif oksijen

türlerinin üretilmesiyle oluşan DNA hasarını değil, spesifik bir DNA etkileşimini gösterdiği belirtilmiştir (Tan et al. 2009). Co^{+2} ve Co^{3+} katyonları kullanılarak terpiridinden iki farklı kompleks sergilenmiş ve bu komplekslerin ct-DNA ile etkileşimleri UV spektroskopisi, viskozite, elektroforez yöntemleri ile belirlenmiştir. Kompleks üzerine artan miktarda DNA eklendikçe UV absorpsiyonunda düşme, viskozitede artış gözlemlenmiş ve kompleksler interkalatör olarak belirlenmiştir. Co(III) kompleksinin bağlanma aktivitesi Co(II) kompleksine göre daha büyük çıkması elektrostatik hususların bu komplekslerin DNA ya bağlanmasında önemli rol oynadığının göstergesi olabileceği belirtilmiştir (Indumathy et al. 2007). Bütün bu çalışmalar, bu tezde ele alınan flavonoid ve flavonoid-metal komplekslerinin DNA ile ilişkisinin belirlenmesi çalışmalarıyla paralellik göstermektedir.

4.5 SONUÇ

Flavonoidler, pek çok sebze ve meyve yapısında bulunan doğal bileşiklerdir. Uzun yıllardır pek çok araştırmanın konusu olmuş flavonoidlerin insan sağlığı üzerinde yararlı etkilerinden bahsedilmektedir. Yapılan araştırmalar genellikle insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden bahsetse de belli derişimlerin üzerinde ya da belirli metallerle kompleks oluşturduğunda, insan sağlığı üzerinde zararlı etkiler oluşturabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar, flavonoidlerin kendilerine gösterilen ilgiyi hak ettiği ve gelecek dönemlerde de bu ilginin devam edeceği düşüncesini doğurmaktadır. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar Flavanolların özellikle de kuercetinin bazı metal komplekslerinin DNA'ya interkalasyon, bazı durumlarda da elektrostatik dış bağlanmayla bağlanabildiğini göstermektedir. Bu özelliğinin önümüzdeki yıllarda flavonoid-metal komplekslerinin anti-tümör ilaçları olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Antioksidan etkileri belirlenen bu moleküller, günlük hayatta yeterli miktarda alındığında, insanların hayatlarını daha sağlıklı şekilde devam ettirmesini sağlayabilirler.

Bu çalışma, rutin, mirisitrin ve kuersitrin flavonoidlerinin ve bunların metal komplekslerinin DNA ile etkileşimi üzerine yapıldı.

Spektrofotometrik yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda flavonoidlerin kendi başlarına DNA ile çok az etkileştikleri fakat metal iyonları varlığında etkileşimin arttığı ve komplekslerin DNA'ya interkalasyonla bağlandıkları anlaşılmıştır. UV-Vis titrasyon sonucunda flavonoidlerin bağlanma sabitleri sırasıya rutin ($K_b 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), kuersitrin (K_b

$2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) ve mirisitrin ($K_b 4,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) olarak, flavonoid-Cu komplekslerinin bağlanma sabitleri sırasıyla R-Cu için $K_b 2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, Q-Cu için $3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ve M-Cu için $K_b 8,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Flavonoid-metal komplekslerinin bağlanma sabiti, flavanoidlerin bağlanma sabitlerinden daha büyük çıkmış ayrıca UV spektroskopisi grafiklerimizde absorbanstaki düşüş çok daha güzel şekilde gözlemlenmektedir. Bu durumda komplekslerimizin, DNA ile interkalasyon yaparak, flavonoidlere oranla çok daha iyi biçimde bağlandığı sonucuna ulaşılır. En büyük bağlanma sabiti M-Cu²⁺ kompleksine aittir, M-Cu²⁺ kompleksimizin molekül yapısının DNA baz çiftleri arasına girmeye daha uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Floresans spektrofotometresiyle yapılan çalışmada da komplekslerin DNA ile kuvvetli etkileştiği görülmüştür. Yarışmalı floresans tekniğinde ise flavonoidler tek başlarıyken flüoresansta anlamlı bir düşmeye sebep olmasa da flavonoid-Cu²⁺ komplekslerinin DNA baz dizileri arasından EtBr'yi çıkardığı görüldü ve emisyonundaki düşüş belirgin şekilde gözlemlenmiştir. Stern-Volmer eşitliği kullanılarak yarışmalı floresans sonuçları karşılaştırıldığında rutin, mirisitrin ve kuersitrin için bağlanma sabitleri K_{sv} sırasıyla $0,9 \times 10^5$, $5,8 \times 10^5$ ve $5,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerlere göre M-Cu²⁺ kompleksi diğer komplekslere göre DNA'ya çok daha kuvvetli şekilde bağlanmıştır. Bu durum UV titrasyon sonuçlarıyla benzerlik taşımaktadır.

Jel elektroforez sonuçları incelendiğinde ise flavonoidlerin DNA ile çok az etkileştiği, DNA zincirinde herhangi bir bozulmaya sebep olmadığı görülmüştür. Bu durum daha önce yaptığımız UV titrasyon ve yarışmalı floresans sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Yine jel elektroforezde DNA'nın yapısını bozduğu bilinen H₂O₂ kullanıldığında flavonoidlerin üçünün de peroksitin DNA'ya verdiği hasarı azalttığı görülmüştür. Bu durum flavonoidlerin, DNA'da herhangi bir nedenle oluşabilecek zararları önlemede etkili olabileceği sonucuna ulaşmamızı sağlamıştır. Flavonoid-metal komplekslerinin ise jel elektroforezde DNA'nın yapısını belirgin şekilde bozduğu görülmüştür. Komplekslerimizin derişimi arttıkça DNA'ya verdikleri hasar da artmaktadır. Hatta belirli derişimden sonra, DNA iplikçikleri tamamen ayrılmakta ve DNA tamamen parçalanarak ortamda kalmamaktadır. Bu durum flavonoid-metal komplekslerinin önümüzdeki süreçte antitümör ilaçlar olarak kullanılabileceği düşüncesini desteklemektedir. Ancak bu etki mekanizmasının, gerekli derişimlerin belirlenmesi daha başarılı sonuçların oluşmasını sağlayacaktır.

Viskozite çalışmalarında ise artan kompleks/DNA derişimine bağı olarak DNA'nın viskozitesinde artış gözlemlenmiştir. Oysa ki flavonoidler kompleks oluşturmada DNA'nın viskozitesinde anlamlı bir artışa sebep olmamıştır. Bu durum diğer metotlarla verdiğimiz flavonoid komplekslerinin DNA ile interkalasyon yoluyla etkileşmiş olabileceğı savını kuvvetlendirmektedir.

Bazı metal iyonlarının, özellikle geğış metallerinin, çeşitli biyolojik süreçlerde çok önemli roller oynamakla kalmayıp, aynı zamanda serbest hallerinde potansiyel olarak toksik olabileceğı göz önüne alındığında, flavonoid-metal kompleksleri ve DNA arasındaki etkileşim çalışmaları önemlidir.

Flavonoidler, flavonoid-metal kompleksleri ve bunların etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar önemlidir. Çünkü flavonoidler besinlerle insanlar tarafından direk alınabilmektedir. Flavonoidlerin laboratuvar ortamında antioksidan özellik gösterdikleri kanıtlanmıştır. Ancak bu özelliğı canlı vücudunda da gösterip göstermedikleri eğer gösteriyorlarsa hangi mekanizmalarla bunu yaptıklarını bilmek önemlidir. Ayrıca besinlerle vücuda alındıklarında emilim oranlarının ne olduğı vücutta geçirdikleri metabolizma süreçlerini de bilmek önemlidir. Flavonoid-metal komplekslerinin ise DNA ile farklı şekillerde etkileştine dair çalışmalar mevcuttur. Ancak çalışmalar belli derişimin üzerinde bu komplekslerin DNA'da hasara sebep olduğı konusunda hemfikirdir. DNA'yı ne şekilde bozduğunun, bunu başlatan süreçlerin mekanizmasının bilinmesi bu komplekslerin antitümör ilaçları olarak kullanılabilmesinin, yeni ilaç tasarımı ve sentezlerinin yapılmasının önünü açacaktır.

KAYNAKLAR

- Afanas'eva I B, Ostrakhovitch E A, Mikhal'chik E V, Ibragimova G A and Korkina L G** (2001) Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*, 61(6): 677-684.
- Aherne S and O'brien N** (1999) Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutrition and Cancer*, 34(2): 160-166
- Alonso A, Almendral M, Curto Y, Criado J, Rodriguez E and Manzano J** (2006) Determination of the DNA-binding characteristics of ethidium bromide, proflavine, and cisplatin by flow injection analysis: usefulness in studies on antitumor drugs. *Analytical Biochemistry*, 355(2): 157-164.
- Alvi N, Rizvi R and Hadi S** (1986) Interaction of quercetin with DNA. *Bioscience Reports*, 6 (10): 861-868.
- Anastassopoulou J** (2003) Metal–DNA interactions. *Journal of Molecular Structure*, 651: 19-26.
- Arıcı M and Nazır H** (2010) [N, N'-Bis (salisiliden)-1, 3-propandiaminato] nikel (II) Kompleksinin Sentezi ve DNA Etkisinin İncelenmesi. *SDÜ Fen Dergisi*, 5(1): 67-74.
- Arjmand F and Aziz M** (2009) Synthesis and characterization of dinuclear macrocyclic cobalt (II), copper (II) and zinc (II) complexes derived from 2, 2', 2'-S, S [bis (bis-N, N-2-thiobenzimidazolyloxalato-1, 2-ethane)]: DNA binding and cleavage studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(2): 834-844.
- Aslanoglu M** (1997) The application of electroanalytical methods to the measurement of metal complex-nucleic acid interactions. B. Sc. Thesis, Newcastle University.
- Blasiak J** (2001) DNA-damaging effect of cadmium and protective action of quercetin, *Department of Molecular Genetics. University of Łódź Polish Journal of Environmental Studies*, 10: 437-42.
- Bukhari S B, Memon S, Mahroof-Tahir M and Bhanger M** (2009) Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(5): 1901-1906.
- Chen X, Tang L-J, Sun Y-N, Qiu P-H and Liang G** (2010) Syntheses, characterization and antitumor activities of transition metal complexes with isoflavone. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(4): 379-384.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Chiang L-C, Ng L T, Lin I-C, Kuo P-L and Lin C-C** (2006) Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. *Cancer Letters*, 237(2): 207-214.
- Chow J-M, Shen S-C, Huan S K, Lin H-Y and Chen Y-C** (2005) Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 69(12): 1839-1851.
- Çimen M B Y** (1999) Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 19(5): 296-304.
- De Souza R F and De Giovani W F** (2004) Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9(2): 97-104.
- De Souza R F and De Giovani W F** (2005) Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al (III) and Zn (II) complexes with flavonoids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(9): 1985-1990.
- Dehghan G, Dolatabadi J E N, Jouyban A, Zeynali K A, Ahmadi S M and Kashanian S** (2011) Spectroscopic studies on the interaction of quercetin–terbium (III) complex with calf thymus DNA. *DNA and Cell Biology*, 30(3): 195-201.
- Demirkiran O, Mesaik M A, Beynek H, Abbaskhan A and Choudhary M** (2013) Immunosuppressive phenolic constituents from *Hypericum montbretii* Spach. *Records of Natural Products*, 7: 210-219.
- Dinç H** (2015) Bis-akridin ligantlarının sentezi, yapısal karakterizasyonu, antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Diyarbakır, 86.
- Dolatabadi J E N** (2011) Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(2): 227-233.
- Durgo K, Halec I, Šola I and Franekić J** (2011) Cytotoxic and genotoxic effects of the quercetin/lanthanum complex on human cervical carcinoma cells in vitro. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 62(3): 221-227.
- Eftink M R and Ghiron C A** (1981) Fluorescence quenching studies with proteins, *Analytical Biochemistry*. 114(2): 199-227.
- Elik M, Serdaroğlu G and Özkan R** (2007) Mirisetin ve kuersetin bileşiklerinin antioksidan etkilerinin DFT yöntemiyle incelenmesi. *C. Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 28(2): 53-65.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Erlund I** (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research*, 24(10): 851-874.
- Fernandez M T, Mira M L, Florencio M H and Jennings K R** (2002) Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92(2): 105-111.
- Frankel E, German J, Kinsella J, Parks E and Kanner J** (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, 341(8843): 454-457.
- García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno M A and Martínez J A** (2009) Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9): 537-552.
- García-Ramos J C, Galindo-Murillo R, Cortés-Guzmán F and Ruiz-Azuara L** (2013) Metal-based drug-DNA interactions. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 57(3): 245-259.
- Gaur R and Mishra L** (2013) Bi-nuclear Ru (II) complexes of bis-chalcone and bis-flavonol: synthesis, characterization, photo cleavage of DNA and Topoisomerase I inhibition. *RSC Advances*, 3(30): 12210-12219.
- Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna J P, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cooper E L and Cossarizza A** (2011) Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 591356.
- Gong G, Qin Y, Huang W, Zhou S, Yang X and Li D** (2010) Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. *European journal of Pharmacology*, 628(1-3): 27-35.
- Guan Y, Zhou W, Yao X, Zhao M and Li Y** (2006) Determination of nucleic acids based on the fluorescence quenching of Hoechst 33258 at pH 4.5. *Analytica Chimica Acta*, 570(1): 21-28.
- Guo Q, Yuan J, Zeng J, He X and Li D** (2012) Synthesis of dihydromyricetin–manganese (II) complex and interaction with DNA. *Journal of Molecular Structure*, 1027: 64-69
- Güven E Ç, Otkun G T ve Boyacıoğlu D** (2010) Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. *Gıda Dergisi*, 35(5): 387-394.
- Hao Z-Y, Liu Q-W, Xu J, Jia L and Li S-B** (2010) Synthesis, Characterization, Antioxidant Activities, and DNA-Binding Studies of (E)-N'-[1-(Pyridin-2-yl) ethylidene] isonicotinohydrazide and Its Pr (III) and Nd (III) Complexes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(10): 1306-1312.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Heli H, Bathaie S and Mousavi M** (2004) Electrochemical investigation of neutral red binding to DNA at the surface. *Electrochemistry Communications*, 6(11): 1114-1118.
- Hertog M G, Feskens E J, Kromhout D, Hollman P and Katan M** (1993a) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342(8878): 1007-1011.
- Hertog M G, Hollman P C and Van de Putte B** (1993b) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(8): 1242-1246.
- Ikeda N E A, Novak E M, Maria D A, Velosa A S and Pereira R M S** (2015) Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin–zinc (II) flavonoid-metal complex. *Chemico-Biological Interactions* 239: 184-191.
- Incesu Z, Blijnkli K, Akalin G and Gunduğdukaraburun** (2013) The effects of some Phenanthroline ruthenium (II) complexes on A549 cell proliferation. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2): 193-203.
- Indumathy R, Kanthimathi M, Weyhermuller T and Nair B U** (2008) Cobalt complexes of terpyridine ligands: crystal structure and nuclease activity. *Polyhedron*, 27(17): 3443-3450.
- Indumathy R, Radhika S, Kanthimathi M, Weyhermuller T and Nair B U** (2007) Cobalt complexes of terpyridine ligand: crystal structure and photocleavage of DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(3): 434-443
- Indumathy R, Radhika S, Kanthimathi M, Weyhermuller T and Nair B U** (2007) Cobalt complexes of terpyridine ligand: crystal structure and photocleavage of DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(3): 434-443.
- Jabeen E, Janjua N K and Hameed S** (2014) β -Cyclodextrin assisted solubilization of Cu and Cr complexes of flavonoids in aqueous medium: A DNA-interaction study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128: 191-196.
- Janjua N K, Siddiqi A, Yaqub A, Sabahat S, Qureshi R and ul Haque S** (2009) Spectrophotometric analysis of flavonoid–DNA binding interactions at physiological conditions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74(5): 1135-1137.
- Jiang P, Burczynski F, Campbell C, Pierce G, Austria J and Briggs C** (2007) Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International* 40(3): 356-364.
- Jun T, Bochu W and Liancai Z** (2007a) Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin manganese (II) complexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55(2): 149-152.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Jun T, Bochu W and Liancai Z** (2007b) Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin zinc (II) complex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(5): 1197-1199.
- Jun T, Liancai Z and Bochu W** (2007c) Effects of quercetin on DNA damage induced by copper ion. *International Journal of Pharmacology*, 3(1): 19-22.
- Kale A, Gawande S and Kotwal S** (2008) Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research*, 22(5): 567-577.
- Kanakis C D, Tarantilis P A, Polissiou M, Diamantoglou S and Tajmir-Riahi H** (2007) An overview of DNA and RNA bindings to antioxidant flavonoids. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 49(1): 29-36.
- Kang N J, Jung S K, Lee K W and Lee H J** (2011) Myricetin is a potent chemopreventive phytochemical in skin carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1229(1): 124-132.
- Kashanian S and Dolatabadi J E N** (2009) DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chemistry*. 116(3): 743-747.
- Kashanian S and Dolatabadi J E N** (2010) In vitro studies on calf thymus DNA interaction and 2-tert-butyl-4-methylphenol food additive. *European Food Research and Technology*. 230(6): 821-825.
- Kashanian S and Ezzati Nazhad Dolatabadi J** (2009) In vitro study of calf thymus DNA interaction with butylated hydroxyanisole. *DNA and Cell Biology*. 28(10): 535-540.
- Kawai M, Hirano T, Higa S, Arimitsu J, Maruta M, Kuwahara Y, Ohkawara T, Hagihara K, Yamadori T and Shima Y** (2007) Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergology International*. 56(2): 113-123.
- Keizer J** (1983) Nonlinear fluorescence quenching and the origin of positive curvature in Stern-Volmer plots. *Journal of the American Chemical Society*. 105(6): 1494-1498.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A and Maatela J** (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal*. 312(7029): 478-481.
- Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Heliövaara M, Teppo L, Pukkala E and Aromaa A** (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology*. 146(3): 223-230.
- Korkmaz A and Kolankaya D** (2010) Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney. *Journal of Surgical Research*. 164(2): 309-315.
- Kumar K A, Reddy K L and Satyanarayana S** (2011) Synthesis, DNA Binding, DNA Photocleavage and Antimicrobial Activity of [Co (bpy) 2DMHBT] 3+,[Co (dmb) 2DMHBT] 3+ and [Co (phen) 2DMHBT] 3+ Complexes. *Spectroscopy Letters*, 44(1): 27-37.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kumar S and Pandey A K** (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, Article ID 162750.
- KuntiĆ V, Filipović I and Vujić Z** (2011) Effects of rutin and hesperidin and their Al (III) and Cu (II) complexes on in vitro plasma coagulation assays. *Molecules*, 16(2): 1378-1388.
- Kurt B and Temel H** (2013) 2, 6 DiaminoPridin İle Elde Edilen Yeni Schiff Bazı İle Metal Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu Ve DNA Etkileşiminin belirlenmesi. *İlaç kimyası üretimi teknolojisi standardizasyonu Kongresi, 29-31 Mart, Antalya*.
- Le Marchand L** (2002) Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6): 296-301.
- LePecq J-B and Paoletti C** (1967) A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical—chemical characterization. *Journal of Molecular Biology*, 27(1): 87-106.
- Li Y and Ding Y** (2012) Minireview: Therapeutic potential of myricetin in diabetes mellitus. *Food Science and Human Wellness*, 1(1): 19-25.
- Liu H-K and Sadler P J** (2011) Metal complexes as DNA intercalators. *Accounts of Chemical Research*, 44(5): 349-359.
- Mahadevan S and Palaniandavar M** (1997) Spectroscopic and voltammetric studies on copper complexes of 2, 9-dimethyl-1, 10-phenanthrolines bound to calf thymus DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1(67): 343.
- Malešev D and KuntiĆ V** (2007) Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(10): 921-939.
- Mandalari G, Bennett R, Bisignano G, Trombetta D, Saija A, Faulds C, Gasson M and Narbad A** (2007) Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (Citrus bergamia Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2056-2064.
- Middleton Jr E and Kandaswami C** (1992) Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, 43(6): 1167-1179.
- Mira L, Tereza Fernandez M, Santos M, Rocha R, Helena Florêncio M and Jennings K R** (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, 36(11): 1199-1208.
- Mukherjee A and Sasikala W D** (2013) Drug–DNA intercalation: from discovery to the molecular mechanism. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 92: 1-62.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Muthukumaran S, Sudheer A R, Menon V P and Nalini N** (2008) Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats. *Toxicology*, 243(1-2): 207-215.
- Neto B and Lapis A** (2009) Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends. *Molecules*, 14(5): 1725-1746.
- Ni Y, Du S and Kokot S** (2007) Interaction between quercetin–copper (II) complex and DNA with the use of the Neutral Red dye fluorophor probe. *Analytica Chimica Acta*, 584(1): 19-27.
- Ong K C and Khoo H-E** (1997) Biological effects of myricetin. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29(2): 121-126.
- Pereira R, Andrades N, Paulino N, Sawaya A, Eberlin M, Marcucci M, Favero G, Novak E and Bydlowski S** (2007) Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity. *Molecules*, 12(7): 1352-1366.
- Pietta P-G** (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7): 1035-1042.
- Pyle A, Rehmann J, Meshoyrer R, Kumar C, Turro N and Barton J K** (1989) Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 111(8): 3051-3058.
- Raza A, Bano S, Xu X, Zhang R X, Khalid H, Iqbal F M, Xia C, Tang J and Ouyang Z** (2016a) Rutin–Nickel Complex: Synthesis, Characterization, Antioxidant, DNA Binding, and DNA Cleavage Activities. *Biological Trace Element Research*, 178(1): 160-169.
- Raza A, Xu X, Xia L, Xia C, Tang J and Ouyang Z** (2016b) Quercetin-iron complex: synthesis, characterization, antioxidant, DNA binding, DNA cleavage, and antibacterial activity studies. *Journal of Fluorescence*, 26(6): 2023-2031.
- Reinhardt C G and Krugh T R** (1978) A comparative study of ethidium bromide complexes with dinucleotides and DNA: direct evidence for intercalation and nucleic acid sequence preferences. *Biochemistry*, 17(23): 4845-4854.
- Ren J, Meng S, Lekka C E and Kaxiras E** (2008) Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(6): 1845-1850.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L and Zhang L** (2003) Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4): 519-534.
- Richards A D and Rodger A** (2007) Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure. *Chemical Society Reviews*, 36(3): 471-483.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Rossi M, Lugo A, Lagiou P, Zucchetto A, Polesel J, Serraino D, Negri E, Trichopoulos D and La Vecchia C** (2012) Proanthocyanidins and other flavonoids in relation to pancreatic cancer: a case-control study in Italy. *Annals of Oncology*, 23(6): 1488-93.
- Rusak G, Piantanida I, Mašić L, Kapuralin K, Durgo K and Kopjar N** (2010) Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1): 181-189.
- Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F and Marzano C** (2013) Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chemical reviews*, 114(1): 815-862.
- Seanger W** (1984) *Nucleic Acid Structure*. Springer Verlag, New York, NY.
- Selvaraj S, Krishnaswamy S, Devashya V, Sethuraman S and Krishnan U M** (2014) Flavonoid-metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents. *Medicinal Research Reviews* 34(4): 677-702.
- Selvaraj S, Krishnaswamy S, Devashya V, Sethuraman S and Krishnan U M** (2012) Synthesis, characterization and DNA binding properties of rutin-iron complex. *RSC Advances*, 2 (7): 2797-2802.
- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T and Sugimoto H** (2008) Three distinct neuroprotective functions of myricetin against glutamate-induced neuronal cell death: involvement of direct inhibition of caspase3. *Journal of Neuroscience Research*, 86(8): 1836-1845.
- Sirajuddin M, Ali S and 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.
- Ska-Kordala M S, Kowska A B, Skı J O and Gabrielska J** (2001) Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 6: 277-281.
- So F V, Guthrie N, Chambers A F, Moussa M and Carroll K K** (1996) Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and Cancer*, 26(2): 167-181
- Spencer J P, Chaudry F, Pannala A S, Srai S K, Debnam E and Rice-Evans C** (2000) Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(1): 236-241.
- Šturdík J V M O E** (2008) Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47(4): 151-162.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Sun J, Wu S, Chen H-Y, Gao F, Liu J, Ji L-N and Mao Z-W** (2011) Synthesis, characterization and DNA-binding and DNA-photocleavage studies of two Ru (II) complexes containing two main ligands and one ancillary ligand. *Polyhedron*, 30(12): 1953-1959.
- Sungur Ş and Uzar A** (2008) Investigation of complexes tannic acid and myricetin with Fe (III). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 69(1): 225-229.
- Tan M, Zhu J, Pan Y, Chen Z, Liang H, Liu H and Wang H** (2009) Synthesis, cytotoxic activity, and DNA binding properties of copper (II) complexes with hesperetin, naringenin, and apigenin. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2009 article ID 347872.
- Tan J, Wang B and Zhu L** (2009a) DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper (II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14 (5): 727-739.
- Tan J, Wang B and Zhu L** (2009b) DNA binding, cytotoxicity, apoptotic inducing activity, and molecular modeling study of quercetin zinc (II) complex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(2): 614-620.
- Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D and Giammanco M** (2007) Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2): 466-479.
- Tsuchiya H and Iinuma M** (2000) Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7(2): 161-165.
- Vijayalakshmi R, Kanthimathi M, Parthasarathi R and Nair B U** (2006) Interaction of chromium (III) complex of chiral binaphthyl tetradentate ligand with DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(10): 3300-3306.
- Wang B-d, Yang Z-Y, Wang Q, Cai T-k and Crewdson P** (2006) Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding properties of the La (III) complex with Naringenin Schiff-base. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(6): 1880-1888.
- Wang L, Lee I M, Zhang S M, Blumberg J B, Buring J E and Sesso H D** (2009) Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(3): 905-12.
- Wang S Y, Bowman L and Ding M** (2008) Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry*, 107(3): 1261-1269.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Wätjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, Tran-Thi Q-H, Proksch P and Kahl R** (2005) Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The Journal of Nutrition*, 135(3): 525-531.
- Webb M R, Min K and Ebeler S E** (2008) Anthocyanin interactions with DNA: Intercalation, topoisomerase I inhibition and oxidative reactions. *Journal of Food Biochemistry*, 32(5): 576-596.
- Wu H-L, Li K, Sun T, Kou F, Jia F, Yuan J-K, Liu B and Qi B-L** (2011) Synthesis, structure, and DNA-binding properties of manganese (II) and zinc (II) complexes with tris (N-methylbenzimidazol-2-ylmethyl) amine ligand. *Transition Metal Chemistry*, 36(1): 21-28.
- Wu J-Z and Ji L-N** (1999) Synthesis and spectroscopic DNA binding studies of homoleptic and heteroleptic ruthenium (II) complexes with imidazo [4, 5-f][1, 10] phenanthroline or its derivatives. *Transition Metal Chemistry* 24(3): 299-303.
- Xu R, Zhang Y, Ye X, Xue S, Shi J, Pan J and Chen Q** (2013) Inhibition effects and induction of apoptosis of flavonoids on the prostate cancer cell line PC-3 in vitro. *Food Chemistry*, 138(1): 48-53.
- Yalçın G T** (2013) Flavonoidlerin kanser hücrelerine etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya, 84.
- Yang G J, Xu J J, Chen H Y and Leng Z Z** (2004) Studies on the interaction between rutin and DNA in the absence and presence of β -cyclodextrin by electrochemical and spectroscopic methods. *Chinese Journal of Chemistry*, 22(11): 1325-1329.
- Yıldız U** (2012) Bazı metal komplekslerinin DNA ile etkileşiminin incelenmesi. *Yüksek lisans tezi*, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Anabilimdalı, Zonguldak, 109.
- Yola M L and Özaltın N** (2012) Investigation of interaction of simvastatin with human genomic DNA. *Journal of Faculty of Pharmacy*, 32: 1-16.
- Yoshino M, Haneda M, Naruse M and Murakami K** (1999) Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68(4): 468-472.
- Zhou J, Wang L-f, Wang J-y and Tang N** (2001a) Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth (III) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83(1): 41-48.
- Zhou J, Wang L, Wang J and Tang N** (2001b) Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal (II) complexes. *Transition Metal Chemistry*, 26(1-2): 57-63.
- Zhu Q-Z, Yang H-H, Li D-H and Xu J-G** (1999) Determination of nucleic acids using phosphin 3R as a fluorescence probe. *Analytica Chimica Acta*, 394(2): 177-184.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

Zou Y P, Lu Y H and Wei D Z (2010) Protective effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytotherapy Research*, 24(S1): S6-S10.





ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Karabük'te doğdu. İlk, orta öğrenimini Karabük merkez, lise öğrenimini Safranbolu ilçesinde tamamladıktan sonra lisans öğrenimini 1994–1999 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü'nde yaptı. Halen Zonguldak Prof. Dr. Şaban Teoman Duralı Bilim ve Sanat Merkezinde Kimya Öğretmeni olarak görev yapmaktadır.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres : Yeşil Mahalle, Akşemsettin Sokak, Tersane Sitesi, F2 Blok, No: 6
Merkez/ ZONGULDAK

Tel : (+90) 506 533 36 59

E-posta : burcuatabey_75@hotmail.com