



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FOLİK ASİT TÜREVİ ANTİNEOPLASTİK
İLAÇLARIN MUTAJENİK VE GENOTOKSİK
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE DNA
İLE ETKİLEŞİM MEKANİZMALARIN
MOLEKÜLER KENETLEME VE
MULTİSPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ**

FATMA NUR ÖZKÖMEÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2022

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FOLİK ASİT TÜREVİ ANTİNEOPLASTİK
İLAÇLARIN MUTAJENİK VE GENOTOKSİK
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE DNA
İLE ETKİLEŞİM MEKANİZMALARIN
MOLEKÜLER KENETLEME VE
MULTİSPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ

FATMA NUR ÖZKÖMEÇ

Bu tez,
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.
KAHRAMANMARAŞ 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

26/01/2022

Fatma Nur ÖZKÖMEÇ



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No:2020/7-5 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**FOLİK ASİT TÜREVİ ANTİNEOPLASTİK İLAÇLARIN MUTAJENİK VE
GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE DNA İLE
ETKİLEŞİM MEKANİZMALARIN MOLEKÜLER KENETLEME VE
MULTİSPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

FATMA NUR ÖZKÖMEÇ

ÖZET

Bu tez çalışması kapsamında; kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan folik asit türevi antineoplastik ilaçlar, Pemetrekset (PMT) ve Metotreksatın (MTX) in vitro mutajenik ve genotoksik potansiyelleri araştırılarak DNA molekülü arasındaki etkileşimleri incelenmiştir. Bu iki etken maddenin genotoksik ve sitotoksik etkilerini araştırma amacıyla hücre kültürleri 24 ve 48 saatlik muamele sürelerine tabi tutulmuştur. Mutajenik ve genotoksik incelemelerde, Kromozom anormalliği (KA), mikronükleus (MN) deneyleri ile genotoksik, mitotik indeks (MI), nükleer bölüne indeksi (NBI) değerleri ile sitotoksik etkileri ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde PMT'nin genotoksik etkiye sahip olmadığı fakat sitotoksik olduğu saptanmıştır. Diğer test maddemiz MTX ise yüksek dozlarda genotoksik ve sitotoksik bir potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, PMT ve MTX ile çift sarmal DNA (fsDNA) arasındaki etkileşimler floresans spektroskopisi, UV-vis spektroskopisi gibi teknikler ile incelenmiştir. Spektrumlardan; Stern-Volmer sönüm sabitleri, bağlanma sabitleri, bağlanma kısım sayıları hesaplanmıştır. Elde edilen verilere göre her iki bileşiminde DNA ile küçük oluk üzerinden etkileştiği bulunmuştur. Moleküler kenetlenme simülasyonu sonucunda PMT ve MTX için bağlanma enerjileri sırasıyla -8.7 ve -9.2 Kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Moleküler kenetlenme sonuçları deneysel verileri desteklemekle birlikte, PMT ve MTX oluk bağlayıcılar olduğunu ve bu ilaç-DNA komplekslerinin stabilitesinde H-bağ etkileşimlerinin temel bir rol oynadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Pemetrekset, Metotreksat, Genotoksite, Sitotoksite, İlaç-DNA Etkileşimi, Moleküler Kenetlenme

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı, Ocak / 2022

Danışman: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üye Mustafa ÇEŞME
Sayfa sayısı: 77

INVESTIGATION OF MUTAGENIC AND GENOTOXIC POTENTIALS OF FOLIC ACID DERIVATIVE ANTINEOPLASTIC DRUGS AND INVESTIGATION OF DNA INTERACTION MECHANISMS WITH MOLECULAR DOCKING AND MULTISPECTROSCOPIC METHODS

(M.Sc. THESIS)

FATMA NUR ÖZKÖMEÇ

ABSTRACT

Within the scope of this thesis; The in vitro mutagenic and genotoxic potentials of folic acid-derived antineoplastic drugs, Pemetrexed (PMT) and Methotrexate (MTX), which are widely used in cancer treatment, were investigated and their interactions between DNA molecules were examined. To investigate the genotoxic and cytotoxic effects of these two active substances, cell cultures were subjected to treatment times of 24 and 48 hours. In mutagenic and genotoxic studies, genotoxic effects were revealed with Chromosome aberration (CA), micronucleus (MN) tests, and cytotoxic effects with mitotic index (MI), nuclear division index (NDI) values. When the results obtained were evaluated, it was determined that PMT did not have a genotoxic effect but was cytotoxic. Our other test substance, MTX, was observed to have a genotoxic and cytotoxic potential at high doses.

In the second part of the thesis, the interactions between PMT and MTX and double-stranded DNA (fsDNA) were investigated by techniques such as fluorescence spectroscopy and UV-vis spectroscopy. Stern-Volmer extinction constants, binding constants, binding fraction numbers were calculated from the spectra. According to the data obtained, it was found that both compounds interact with DNA through the minor groove. As a result of molecular docking simulation, the binding energies for PMT and MTX were calculated as -8.7 and -9.2 Kcal/mol, respectively. While the molecular docking results support the experimental data, they suggest that PMT and MTX are groove binders and that H-bond interactions play a fundamental role in the stability of these drug-DNA complexes.

Key words: Pemetrexed, Methotrexate, Genotoxicity, Cytotoxicity, Drug-DNA Interaction, Molecular Docking

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology, January/ 2022

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mustafa ÇEŞME
Page Numbers: 77

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli bilgilerinden faydalandığım danışman hocam Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ'a, çalışmam sırasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na ve Prof. Dr. Lale DÖNBAK'a katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmalarım boyunca ilgisi, desteği ile her zaman bana rehberlik eden Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÇEŞME'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu'na maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışma sırasında genetik laboratuvarında bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan beni destekleyen değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Fatma Nur ÖZKÖMEÇ

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser Kemoterapisi.....	2
1.2. Antineoplastik İlaçlar	3
1.3. Antimetabolitler	4
1.3.1. Antifolat (Folik asit analogları) antineoplastik ilaçlar.....	6
1.4. Genotoksisite.....	6
1.5. Mutajenite	8
1.6. Nükleik asitlerin yapıları.....	9
1.7. İlaç-DNA etkileşimleri.....	11
1.8. Moleküler Kenetlenme (Docking)	12
1.9. Tez Çalışmasının Amacı	13
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
2.1. Genotoksik ve Sitotoksik Çalışmalar	15
2.2. DNA Etkileşim Çalışmaları	18
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Materyal	23
3.1.1. Pemetrekset.....	23
3.1.2. Metotreksat	24
3.1.3. Deneylerde kullanılan cihazlar ve ekipmanlar	25
3.1.4. Deneylerde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	26
3.2. Metot	27
3.2.1. PMT ve MTX dozlarının belirlenmesi ve hazırlanması	28
3.2.2. Lamaların temizlenmesi	28
3.2.3. Kromozom anormallikleri (Chromosome Aberration=CA) testi	28

3.2.4. Mikronukleus (MN) testi	30
3.2.5. İstatistiksel analizler	33
3.2.6. DNA etkileşim çalışmaları	33
3.2.7. Moleküler Kenetleme Çalışmaları.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	36
4.1. Genotoksik ve Sitotoksik Çalışmalar	36
4.1.1. PMT ve MTX'in kromozom anormallikleri (KA) oluşumu üzerindeki etkilerinin incelenmesi	36
4.1.2. PMT ve MTX'in mikronukleus (MN) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) üzerindeki etkilerinin incelenmesi	45
4.1.3. Bulguların diğer çalışmalarla birlikte değerlendirilmesi	47
4.2. Spektroskopik DNA Etkileşim Çalışmaları	50
4.2.1. Uv-vis spektrofotometresi ile yapılan çalışmalar	50
4.2.2. Floresans ile yapılan çalışmalar.....	54
4.2.3. EB-fsDNA floresans sönüm çalışmaları.....	58
4.3. Moleküler Kenetleme Analizi	59
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	Error! Bookmark not defined.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Antineoplastik ilaçların şematik sınıflandırılması.....	4
Şekil 1.2. Nükleotid yapısı	10
Şekil 1.3. DNA ve RNA yapısı.....	10
Şekil 1.4. Ligand (İlaç)-DNA etkileşiminde bağlanma modları	12
Şekil 1.5. Moleküler kenetlenme reaksiyonunun şematik gösterimi.....	13
Şekil 3.1. Pemetrekset kimyasal yapısı	24
Şekil 3.2. Metotreksat kimyasal yapısı	25
Şekil 3.3. Mononükleer hücre (2,388 µg/mL PMT, 48 saat, ♀, x500).....	31
Şekil 3.4. Binükleer hücre (0,090 µg/mL MTX, 24 saat, ♂, x500).....	32
Şekil 3.5. Trinükleer hücre (0,090 µg/mL MTX, 24 saat, ♂, x500)	32
Şekil 3.6. Tetranükleer hücre (2,388 µg/mL PMT, 48 saat, ♀, x500).....	33
Şekil 3.7. Moleküler kenetlenme işleminde kullanılan 1BNA 3D yapısı	35
Şekil 4.1. Kromatid kırığı (MTX, 0,181 µg/mL, 48 saat, ♂, x1000).....	39
Şekil 4.2. Kromozom Kırığı (PMT, 0,298 µg/mL, 48 saat, ♂, x1000)	39
Şekil 4.3. Fragment (PMT, 1,194 µg/mL, 24 saat, ♀, x1000).....	40
Şekil 4.4. Disentrik kromozom (PMT, 0,298 µg/mL, 48 saat, ♀, x1000).....	40
Şekil 4.5. Kromatid değişimi (PMT, 0,597 µg/mL, 48 saat, ♂, x1000).....	41
Şekil 4.6. Poliploidi (MTX, 0,090 µg/mL, 48 saat, ♀, x1000).....	41
Şekil 4.7. Çoklu kromozom anormallikleri	42
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda PMT'nin 24 ve 48 saat muamele edilen periferallenfositlerinde KA/Hücre'nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren grafik ...	44
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda MTX'in 24 ve 48 saat muamele edilen periferallenfositlerinde KA/Hücre'nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren grafik ...	45
Şekil 4.10. MTX'in artan derişimlerde fsDNA etkileşimine ait spektrumlar	51
Şekil 4.11. $1/(A-A_0)$ 'a karşı $1/[DNA]$ grafiğı (MTX)	52
Şekil 4.12. PMT'in artan derişimlerde fsDNA etkileşimine ait spektrumlar.....	53
Şekil 4.13. $1/(A-A_0)$ 'a karşı $1/[DNA]$ grafiğı (PMT).....	53
Şekil 4.14. MTX'in fsDNA'nın değışen konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğundafloresan spektrumu.....	54
Şekil 4.15. MTX-DNA etkileşimi için Stern-Volmer grafiğı.....	55
Şekil 4.16. MTX-DNA etkileşimi için çift-logaritma grafiğı	56

Şekil 4.17. PMT'nin fsDNA'nın değişen konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda floresan spektrumu.....	57
Şekil 4.18. PMT-DNA etkileşimi için Stern-Volmer grafiği	57
Şekil 4.19. PMT–DNA etkileşimi için çift-logaritma grafiği.....	58
Şekil 4.20. EB-fsDNA kompleksinin MTX ile yarışmalı floresan emisyon spektrumları .	59
Şekil 4.21. EB-fsDNA kompleksinin PMT ile yarışmalı floresan emisyon spektrumları .	59
Şekil 4.22. PMT-DNA kompleksinin 3 boyutlu bağlanma pozu	60
Şekil 4.23. PMT-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde 3 boyutlu bağlanma pozu.....	61
Şekil 4.24. PMT-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde 2 boyutlu bağlanma pozu	62
Şekil 4.25. MTX-DNA kompleksinin 3 boyutlu bağlanma pozu.....	63
Şekil 4.26. MTX-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde 3 boyutlu bağlanma pozu	64
Şekil 4.27. MTX-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde 2 boyutlu bağlanma pozu	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler	23
Çizelge 3.2. Kullanılan cihaz, teknik ve yazılımlar	27
Çizelge 4.1. Kontrol gruplarında ve PMT ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik oranı (KA/Hücre), anormal hücre (AH) yüzdesi ve mitotik indeks (MI) değerleri	37
Çizelge 4.2. PMT'nin farklı dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan kromozomal anormallikler	38
Çizelge 4.3. Kontrol gruplarında ve MTX ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik oranı (KA/Hücre), anormal hücre (AH) yüzdesi ve mitotik indeks (MI) değerleri	43
Çizelge 4.4. MTX'in farklı dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan kromozomal anormallikler	44
Çizelge 4.5. Kontrol grupları ve PMT'nin farklı dozlar ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde mikronukleus (MN), mikronukleuslu binukleer hücre (BNMN) ve nukleer bölünme indeksi (NBI) değerleri	46
Çizelge 4.6. Kontrol grupları ve MTX'in farklı dozlar ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde mikronukleus (MN), mikronukleuslu binukleer hücre (BNMN) ve nukleer bölünme indeksi (NBI) değerleri	47
Çizelge 4.7. MTX'in fsDNA ile etkileşimi için elde edilen bağlanma parametreleri	56
Çizelge 4.8. PMT'nin fsDNA ile etkileşimi için elde edilen bağlanma parametreleri	58
Çizelge 4.9. PMT-DNA kompleksine ait etkileşim verileri	62
Çizelge 4.10. MTX-DNA kompleksine ait etkileşim verileri	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
AH	Anormal Hücre
B'	Kromatid Kırığı
B''	Kromozom Kırığı
BNMN	Mikronukleuslu binuklear hücre
CA	Chromosome Aberration
CE	Chromatid Exchange
Cyt-B	Sitokalsin B
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DS	Disentrik Kromozom
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EB	Etidyum Bromid
F	Fragment
fsDNA	Fish-sperm DNA
g	Gram
KA	Kromozomal Anormallik
Kg	Kilogram
L	Litre
M	Molarite
mg	Miligram
MI	Mitotik İndeks
MI	Mitotik İndeks
ml	Mililitre
MMC	Mitomycin C
MN	Mikronukleus
MTX	Metotreksat
NBI	Nükleer Bölünme İndeksi
P	Poliploid
p53	Kanseri baskılayan transkripsiyon faktörü
PMT	Pemetrekset
RI	Replikasyon İndeksi
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Revolutions Per Minute (Devir/Dakika)
SU	Sister Union (Kardeş Kromatid Birleşmesi)
UV-vis	Ultraviyole-görünür

1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır. Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunda hemen hemen her dokuda başlayabilir. Normalde insan hücreleri, hücre bölünmesi adı verilen bir süreçle vücudun ihtiyaç duyduğu yeni hücreler oluşturmak için büyür ve çoğalır. Kanser, vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilen geniş bir hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir. Kullanılan diğer terimler, kötü huylu tümörler ve neoplazmalardır [1].

Hücreler yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ölürlere ve yerlerini yeni hücreler alır. Bazen bu düzenli süreç bozulur ve anormal veya hasarlı hücreler büyümeleri gerekirken çoğalır. Bu hücreler, doku topakları olan tümörler oluşturabilir. Tümörler kanserli olabilir (kötü huylu) veya kanserli olmayabilir (iyi huylu). Kanserli tümörler yakındaki dokulara yayılır veya onları istila eder ve vücuttaki diğer doku ve organlara hareket ederek yeni tümörler (metastaz adı verilen bir süreç) oluşturur [2]. Kanserli tümörler malign (kötü huylu) tümörler olarak da adlandırılabilir. Metastazlar kanser ölümlerinin birincil nedenidir. Birçok kanser katı tümörler oluşturur, ancak lösemiler gibi kan kanserleri genellikle oluşturmaz. İyi huylu tümörler yakındaki dokulara yayılmaz veya onları istila etmezken vücuttan çıkarıldığında genellikle tekrar büyümeyizler. Kanser genetik bir hastalıktır; yani, hücrelerimizin işleyişini, özellikle nasıl büyüüp bölündüklerini kontrol eden genlerdeki değişikliklerden kaynaklanır. Hücreler bölünürken meydana gelen hatalar, tütün dumanındaki kimyasallar ve güneşten gelen ultraviyole ışınları gibi çevredeki zararlı maddelerin DNA'ya verdiği zararlar ve genetik miraslar gibi birçok neden kansere sebep olan genetik değişiklikler arasında yer alırlar. Akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanser türleri iken meme, kolorektal, akciğer, rahim ağzı ve tiroid kanseri kadınlarda en sık görülen kanserlerdir [3].

Kanser, 2020'de yaklaşık 10 milyon ölümün gerçekleştiği dünya çapında önde gelen bir ölüm nedenidir. 2020'de yeni kanser vakaları açısından en yaygın olanları meme (2,26 milyon vaka), akciğer (2,21 milyon vaka), kolon ve rektum (1,93 milyon vaka), prostat (1,41 milyon vaka), cilt (melanom dışı) (1,20 milyon vaka) ve mide (1,09 milyon vaka) olarak görülmüştür. 2020'de kanser ölümlerinin en yaygın türleri arasında ise akciğer (1.80 milyon ölüm), kolon ve rektum (935 000 ölüm), karaciğer (830.000 ölüm), mide (769.000 ölüm) ve meme (685.000 ölüm) görülmüştür [4].

1950'den önce, kanserin tedavisi için sadece cerrahi tercih edilen bir tedavi seçeneği olarak görülüyordu. 1960 yılından sonra lokal hastalıkları kontrol altına almak için

radasyon tedavisine başlandı. Zaman geçtikçe, cerrahi ve radyasyonun bireysel tedavisinin, kanseri kontrol etmek için kombinasyon halinde kullanımlarına kıyasla etkili olmadığı anlaşıldı [5,6].

Günümüzde tedavi için ilaçlar, biyolojik moleküller, ışın terapisi ve immün aracılı tedaviler ve cerrahi operasyonlar kullanılmaktadır. Bugüne kadar bilim ve tıp dünyası, metastatik kanser için ölüm oranına direnen ve uzamış yaşam süresini kısaltan istisnai tedavi düzeyine ulaşamamıştır [7,8]. Radyasyon tedavisi, kanserli hücreleri öldürmek için elektronlar, protonlar ve çeşitli iyonlar gibi fiziksel varlıkların kullanımına dayanır. Radyasyon tedavisinin arkasındaki mekanizma, yüksek enerjili radyasyonların hücre bölünmesini durdurması ve genetik materyallerine zarar vererek çoğalma yeteneklerini engellemesidir. Ameliyattan önce yapılırsa tümörü küçültmek amacıyla radyasyon tedavisi verilir [5,9]. Ameliyattan sonra yapılırsa, radyasyonlar geride kalan tümör hücrelerini yok edecek ve kanserin nüksetmesini azaltacaktır. Radyasyon tedavisi sistemik kanserleri tedavi etmek için lokalize bir şekilde etki ettiğinden, kemoterapi tek başına veya radyoterapi ile birlikte kullanılır [1]. Kemoterapi, çoğu kanser türünde en etkili ve yaygın olarak kullanılan yöntem olarak kabul edilir. Kemoterapi ilaçları tümör hücrelerini hedef alır ve esas olarak genotoksisite yoluyla tümör hücrelerini büyük ölçüde yok eden reaktif oksijen türleri üretir. Bununla birlikte kemoterapi, yorgunluk, mide bulantısı, saç dökülmesi ve aşırı durumlarda kusma ve hatta ölüm gibi doza bağlı çeşitli yan sonuçlara yol açan sıradan hücrelere de zarar verir [6,7,10,11].

Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılacak kemoterapik ajanların düşük toksisite ve yüksek seçiciliğe sahip olması oldukça önemli bir parametre olarak değerlendirilmektedir. [12].

1.1. Kanser Kemoterapisi

'Kemoterapi' ifadesi ilk olarak Alman kimyager ve immünolog Paul Ehrlich tarafından kullanılmıştır [13]. Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek için ilacın kullanıldığı bir kanser tedavisi yöntemidir. Genellikle kanser hücrelerinin büyümesini, bölünmesini ve daha fazla hücre yapmasını engelleyerek çalışır. Kanser hücreleri genellikle normal hücrelerden daha hızlı büyüüp bölündükleri için kemoterapinin kanser hücreleri üzerinde daha fazla etkisi vardır [14–16]. Kemoterapinin hedefleri, kanserin türüne ve ne kadar yayıldığına bağlıdır. Kemoterapi ile kanser büyümesinin geciktirilmesi veya yavaşlatılması da kanserin neden olduğu semptomların yönetilmesine yardımcı olur.

Kanser büyümesini geciktirmek amacıyla verilen kemoterapiye bazen palyatif

kemoterapi denir. Bununla birlikte, kemoterapi için kullanılan ilaçlar güçlüdür ve sağlıklı hücrelere zarar verebilirler. Bu hasar kemoterapi ile bağlantılı yan etkilere neden olur. Bu yan etkiler arasında çoğu zaman yorgun hissetmek, hasta olmak, saç kaybı, enfeksiyon kapma riskinde artış, kuru ağırlı veya kaşıntılı cilt, ishal veya kabızlık en sık görülenlerdir. Bu yan etkilerin çoğu tedavi edilebilir veya önlenabilir ve hepsi olmasa da çoğu tedavi durduktan sonra geçer. Birçok farklı kemoterapi ilacı türü vardır, ancak hepsi benzer şekilde çalışır. Kanser hücrelerinin çoğalmasını durdururlar, bu da onların vücutta büyümesini ve yayılmasını engeller [1,17,18].

Kanser hücrelerindeki anormallikler üzerine yapılan moleküler çalışmalar, günümüzde yeni ilaçların etkinliğini kontrol etmek ve hedefe yönelik tedaviler tasarlamak için önemli bir tarama sürecidir.

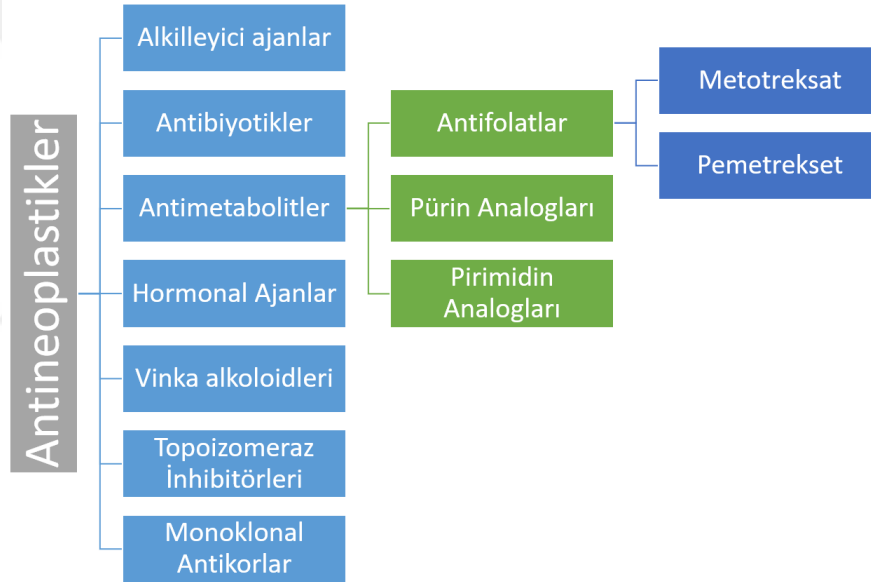
1.2. Antineoplastik İlaçlar

Antineoplastik ilaçlar kanseri tedavi etmek için kullanılan ilaçlardır. Antineoplastik ilaçlara ayrıca antikanser, kemoterapi, sitotoksik veya tehlikeli ilaçlar da denir. Bu ilaçlar birçok biçimde alınabilir. Bazıları hastaya enjekte edilen sıvılar, bazıları ise hastaların aldığı haplardır. Antineoplastik ajanlar veya antikanser ilaçları, geniş ve çeşitli bir ilaç sınıfını temsil eder. Genellikle sınırlı ancak önemli kullanımları vardır ve sıklıkla önemli hepatotoksisiteye sahiptirler [1,19].

Antineoplastik ajanlar kolayca sınıflandırılmazlar, genel olarak etki şekli, kimyasal yapı, bileşim ve diğer ilaçlara homoloji, kemoterapi ilaçlarının kategorize edilmesine yardımcı olan faktörlerdir. Bazı ilaçlar, birden fazla etki şekline sahip olabileceğinden birden fazla kategoriye girebilir. Belirli bir ilacın yan etkilerini bilmek için, etki modunu incelemek gerekir. Bu bilgi daha sonra onkologlar tarafından bir ilacın ne kadar etkili çalışacağını tahmin etmek için dahil edilebilir. Kombinasyon kemoterapilerinde ilaç çalışmaları, tedavide uygulanan her ilacın zamanına, sırasına ve dozajına karar verilmesine yardımcı olur [20,21].

Antineoplastik ilaçlar tarihsel olarak, (1) alkilleyici ajanlar, (2) antimetabolitler, (3) doğal ürünler, (4) hormonlar ve antagonistler ve (5) diğerleri olarak kategorize edilirler. Antikanser ajanlar ayrıca endikasyona göre de sınıflandırılabilir. LiverTox'ta kullanılan sınıflandırma, genellikle modern farmakoloji ders kitaplarında verilenleri takip eden bu sistemlerin bir karışımını temsil eder. Hemen hemen tüm antineoplastik ajanların bir dereceye kadar hepatotoksisitesi vardır ve karaciğer hasarı genellikle doğrudan, içsel toksisiteden kaynaklanır. Hepatotoksisite doza bağlıdır ve genellikle kendi kendini sınırlar,

ancak sinüzoidal obstrüksiyon sendromu veya akut toksik karaciğer hasarı ile ortaya çıkabileceği gibi şiddetli, ilerleyici ve hatta ölümcül olabilir. Antineoplastik ajanlar genellikle dar bir toksik-terapötik orana sahiptir, ancak olağan doz sınırlayıcı toksisite miyelosupresyondur. Bazı antineoplastik ajanlar ayrıca immünolojik veya metabolik idiosenkrazi nedeniyle idiyosenkratik karaciğer hasarına neden olabilir. Bu nedenle, siklofosamid, azatioprin, merkaptopurin, melfalan ve temozolomid ile tedaviden sonra nadir durumlarda tipik ilaca bağlı kolestatik karaciğer hasarı meydana gelebilir [22]. Son yıllarda yenilikçi antineoplastik ajanların geliştirilmesinde istikrarlı bir artış olmuştur ve her yıl 5 ila 10 arasında yeni antikanser ajanı onaylanmaktadır. Yakın zamanda tanıtılan bu ajanların hepatotoksisitesi her zaman iyi tanımlanmamıştır. Tek tek ajanların listelenmesiyle birlikte antineoplastik ajanların bir sınıflandırması aşağıda verilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Antineoplastik ilaçların şematik sınıflandırılması

1.3. Antimetabolitler

Antimetabolitler, kemoterapi ilaçlarının en eski ve en yaygın türlerinden biridir. Antimetabolitler, 50 yılı aşkın süredir geliştirilmiş sitotoksik ajanlardır. Kanser hücrelerinin genetik bilgilerini kopyalaması gereken molekülleri taklit ederek ve çoğalma yeteneklerine müdahale ederek çalışırlar. Antimetabolit ilaçların etki mekanizmalarını anlamak için hücrelerin genetik bilgilerini nasıl depoladığını bilmek bu sürecin ortaya konulmasında etkili olur [18,23]. Antimetabolitler, DNA üretimine ve dolayısıyla hücre bölünmesine ve tümör büyümesine müdahale ettikleri için kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar. Bu tür maddeler, folik asit kullanımına müdahale eden antifolatlar gibi, müdahale ettikleri

metabolite yapı olarak genellikle benzerdir; bu nedenle yarışmalı inhibisyon meydana gelebilir ve antimetabolitlerin varlığı hücreler üzerinde hücre büyümesini ve hücre bölünmesini durdurmak gibi toksik etkilere sahip olabilir. Bu nedenle bu bileşikler kanser için kemoterapi ajanları olarak kullanılır.

Antimetabolitler, yapısal olarak doğal substratlara benzeyen, ancak metabolizmalarına müdahale edecek kadar farklı olan nispeten büyük bir antikanser ajan grubunu temsil eder. Antimetabolitler, yapısal olarak doğal pürin veya pirimidin bazına, nükleozit veya nükleotitlere benzer bileşikler olarak tanımlanan bir antikanser ilaç sınıfıdır [24]. Bu kimyasal benzerlikleri nedeniyle normal metabolitlerin analogları gibi davranan, birincil metabolik reaksiyonları yürütmek için gerekli moleküller hücrelerdeki metabolik süreçleri ve böylece bu sürecin sonunda DNA, RNA sentezini ve hücre bölünmesini önler. Çoğu sitotoksik antikanser ajanı gibi, antimetabolitler, özellikle kemik iliği ve gastrointestinal sistemdeki normal hücreler için toksiktir. Kanser hücreleri de dahil olmak üzere her hücre, hücrenin hayatta kalması ve kendini kopyalaması için ihtiyaç duyduğu talimatları sağlayan DNA'yı içerir.

Kanser hücreleri, genetik bilgilerini oluşturmak için birincil moleküller yerine antimetabolitleri kullandıklarında, bölmek için ihtiyaç duydukları enzimleri düzgün bir şekilde oluşturamazlar. Bu süreç kanser hücrelerinin ölümü ile sonuçlanır. Antimetabolitler, ne tür molekülleri taklit ettiklerine bağlı olarak alt kategorilere ayrılabilir [18,23,25]:

- **Folik asit analogları;** Bunlar, folik asidi tetrahidrofolat molekülüne dönüştürmek için gerekli olan dihidrofolat redüktaz adı verilen enzimi bozar. Bunun sonucunda süreç, bir kanser hücresi içindeki DNA ve RNA sentezine müdahale ederek devam (Metotreksat, Pemetrekset, Pralatreksat, Trimetreksat).
- **Pirimidin analogları;** Bu grupta bulunan ilaçlar, kanser hücrelerinin DNA ve RNA oluşturmak için ihtiyaç duyduğu pirimidinler sitozin ve urasil'e çok benzeyen moleküllerdir (Azasitidin, Kapesitabin, Sitarabin, Desitabin, Floxuridin, Fluorourasil, Gemcitabin, Trifluridin/Tiprasil).
- **Pürin analogları;** Bu moleküller, kanser hücrelerinin DNA ve RNA oluşturmak için ihtiyaç duyduğu pürin, adenin ve guanine çok benzer moleküllerdir (Azatioprin, Kladribin, Fludarabin, Merkaptopurin, Tioguanin).

1.3.1. Antifolat (Folik asit analogları) antineoplastik ilaçlar

Antifolatlar, folik asidin etkilerini antagonize eden (bloke eden) bir antimetabolit ilaç sınıfıdır. Antifolatlar, ayrıca folat antagonisti ve folik asit antagonisti olarak da adlandırılır. Antifolatlar veya antifollar, çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bileşiklerdir. Antifolatlar 65 yıl önce kliniklere giren ilk antimetabolit sınıfıdır [26]. Antifolatlar, hücrelerin DNA yapmak için folik asit kullanmasını engelleyen ve kanser hücrelerini öldürebilen bir ilaç türüdür. Folik asit ve türevlerinin hücresel süreçler üzerindeki etkilerini baskılayarak antitümör ajanlar olarak işlev görürler. Antifolatların çoğu, dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe ederek çalışır.

Sonuç olarak, antifolatlar hücre bölünmesini, DNA/RNA sentezini ve onarımını ve protein sentezini inhibe eder. Folik asidin vücuttaki birincil işlevi, serin, metionin, timidin ve pürin biyosentezinde yer alan çeşitli metiltransferazların kofaktörüdür. Antifolat ilaçlar, yapısı çeşitli kaynaklardan bilinen biyokimyasal olarak önemli bir enzim olan dihidrofolat redüktaz (DHFR) inhibe ettikleri için rasyonel ilaç tasarımı için fırsatlar sunar [27,28]. Antifolat ilaçları, folat metabolik yolu boyunca folata bağımlı enzimleri inhibe etmek için hücre içi bir folik asit eksikliği durumu meydana getirir. DNA sentezi ve hücre bölünmesi, kötü huylu tümör büyümesinde yer alan süreçler, folik asit eksikliği tarafından engellenir. Antifolatlar, meme kanseri, baş ve boyun kanseri, mesane kanseri, akut lenfositik lösemi, lenfoma, koryokarsinom ve osteojenik sarkom tedavilerinde kullanılır. Antifolatlar ayrıca sıtma, bakteriyel enfeksiyonlar, sedef hastalığı ve romatoid artrit gibi kanserli olmayan hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır [29]. Bazı antifolatlar, romatoid artrit gibi bazı kanser türlerini ve inflamatuvar durumlarında tedavi etmek için kullanılır.

Bu tez çalışması kapsamında folik asit türevi antineoplastik ajanlar olan Metotreksat ve Pemetrekset ile kullanılmıştır. Bu etken maddeler ile ilgili detaylı bilgi materyal metot kısmında verilmiştir.

1.4. Genotoksisite

Genetikte, genotoksisite, bir hücre içindeki genetik bilgiye zarar veren ve kansere yol açabilecek mutasyonlara neden olan kimyasal ajanların özelliğini tanımlar. "Mutasyon" terimi, bir organizmanın genetik materyalinin yapısında veya miktarında, işlevinde kalıtsal değişikliklere yol açabilecek kalıcı değişiklikleri ifade eder; bu değişiklikler, gen mutasyonlarının yanı sıra yapısal ve sayısal kromozomal değişiklikleri içerir. Hücrelerdeki kalıtsal genetik materyal üzerindeki toksik etkilerin incelenmesi, Muller'in (1927)

Drosophila meyve sineğinde üzerinde yaptığı deneyleriyle ortaya çıkmıştır [30].

Genotoksisite testlerinin geliştirilmesini ve onaylanmasını teşvik eden önemli bir diğer olay, 1966'da genetikçilerin Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından desteklenen bir konferansta gıda katkı maddeleri, ilaçlar ve yaygın insan maruziyetine sahip kimyasalların mutajenite açısından rutin olarak test edilmesini tavsiye etmesiyle meydana geldi. Genotoksisite, genotoksik etkilerin her zaman mutasyonlarla ilişkili olmaması dışında mutajeniteye benzemektedir. Tüm mutajenler genotoksiktir, ancak tüm genotoksik maddeler mutajenik değildir [31].

Değişimin DNA üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak mutasyonların indüklenmesi, yanlış zamanlanmış olay aktivasyonu ve mutasyonlara yol açan doğrudan DNA hasarı gibi etkileri olabilir. DNA hasarı, tek ve çift zincir kırıkları, eksizyon onarımı kaybı, çapraz bağlanma, alkali kararsız bölgeler, nokta mutasyonları ve yapısal ve sayısal kromozomal sapmalar şeklinde olabilir. Kalıcı, kalıtsal değişiklikler, organizmanın somatik hücrelerini veya gelecek nesillere aktarılabilecek germ hücrelerini etkileyebilir. Hücreler, DNA onarımı veya apoptoz yoluyla genotoksik mutasyonun ekspresyonunu önler; ancak, hasar her zaman sabit olmayabilir ve bu da mutajenez neden olabilir [32]. Genotoksik maddeler, DNA dizisi ve yapısı ile etkileşimler yoluyla hücrelerdeki genetik materyale zarar verir. Örneğin, geçiş metali kromu, yüksek değerlikli oksidasyon durumunda DNA ile etkileşime girerek karsinogeneze yol açan DNA lezyonlarına neden olur. Bir eşey hücresindeki bu tür bir hasar, kalıtsal olarak değiştirilmiş bir özelliğe (germ hattı mutasyonu) neden olma potansiyeline sahiptir. Somatik bir hücredeki DNA hasarı, malign transformasyona (kansere) yol açabilen somatik bir mutasyona neden olabilir. Bu testler, çevresel kimyasalların ve tüketici ürünlerinin güvenliğini değerlendirmek ve bilinen veya şüphelenilen kanserojenlerin etki mekanizmasını araştırmak için kullanılır.

Birçok kimyasal karsinojen/mutajen, DNA'ya kovalent olarak bağlanan reaktif türlere metabolik aktivasyona uğrar ve bu şekilde oluşan DNA eklentileri, çeşitli hassas tekniklerle hücrelerde ve insan dokularında saptanabilir [33]. İnsan dokularındaki DNA eklentilerinin tespiti ve karakterizasyonu, insan kanserinin etiolojisine dair ipuçları sağlar. Deneysel sistemlerde genotoksinlerin bilinen mutajenik profilleri ile ortak olarak insan tümörlerindeki gen mutasyonlarının karakterizasyonu, insan kanserinde çevresel mutajenlerin rolü hakkında daha fazla bilgi sağlayabilir. Sonuç olarak, kimyasalların kansere yol açabilecek DNA hasarına neden olma potansiyelini değerlendirmek için Ames Testi, in vitro ve in vivo Toksikoloji Testleri ve Comet Assay dahil olmak üzere birçok karmaşık

teknik geliştirilmiştir [34]. Genotoksisite testleri aynı zamanda maddelerin DNA'ya veya genomun aslına uygunluğunu düzenleyen hücresel bileşenlere zarar verme kapasitesini ölçen testleri de içerir. Genotoksisite testlerin amacı, bir substratın genetik materyali etkileyip etkilemeyeceğini veya kansere neden olup olmayacağını belirlemektir. Bakteri, maya ve memeli hücrelerinde gerçekleştirilebilirler [35]. Testlerden elde edilen bilgilerle, hassas organizmaların genotoksik maddelere karşı erken gelişimi kontrol edilebilir.

1.5. Mutajenite

Mutajenite, hücrelerin veya organizmaların genetik materyalinin miktarında veya yapısında kalıcı bulaşıcı değişikliklerin indüklenmesi anlamına gelir. "Mutajen" terimi, en yaygın olarak DNA ile etkileşim yoluyla kalıtsal genetik değişiklikleri indükleyen bir kimyasal ifade eder ve "mutajenite" bir mutasyonu indükleme sürecini ifade eder [35,36]. Mutajenite, endüstriyel kimyasal kayıt işlemi sırasında kapsamlı bir değerlendirme gerektiren önemli bir toksikolojik son noktadır. Bu değişiklikler, tek bir gen veya gen segmenti, bir gen bloğu veya kromozom içerebilir. Mutasyonlar germ hücrelerinde veya somatik hücrelerde meydana gelebilir. Mutasyon bir germ hücresinde meydana gelirse, etki kalıtsaldır. Mutasyon somatik bir hücrede meydana gelirse, maruz kalan kişide hücre büyümesinin değişmesine (örn. kanser) veya hücre ölümüne (örn. teratogenez) neden olabilir [37]. Genetik değişime mutasyon, değişikliğe neden olan ajana mutajen denir. Mutajenez, bir organizmanın genetik bilgisinin bir mutasyon üretimi ile değiştirildiği bir süreçtir. Doğada kendiliğinden veya mutajenlere maruz kalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Laboratuvar prosedürleri kullanılarak deneysel olarak da elde edilebilir. Bir mutajen, organizmanın genetik kodunda artan mutasyon oranıyla sonuçlanan, kimyasal veya fiziksel mutasyona neden olan bir ajandır.

Mutajenez kansere ve çeşitli kalıtsal hastalıklara yol açabilir [38]. Mutajenez, reaktif oksijen türleri ve DNA eklentileri oluşturabilen normal hücresel süreçler yoluyla veya DNA replikasyonu ve onarımındaki hata yoluyla endojen olarak (örneğin, spontan hidroliz) meydana gelebilir. Mutajenez, bir organizmanın DNA'sında değişikliklere neden olan çevresel mutajenlerin varlığının bir sonucu olarak da meydana gelebilir. Mutasyonun meydana geldiği mekanizma, ilgili mutajene veya neden olan ajana göre değişir. Çoğu mutajen, bir organizmanın DNA'sı üzerinde doğrudan veya mutajenik metabolitler aracılığıyla dolaylı olarak etki ederek lezyonlar oluşturur. Ancak bazı mutajenler, replikasyon veya kromozomal bölünme mekanizmasını ve diğer hücresel süreçleri etkileyebilir [39].

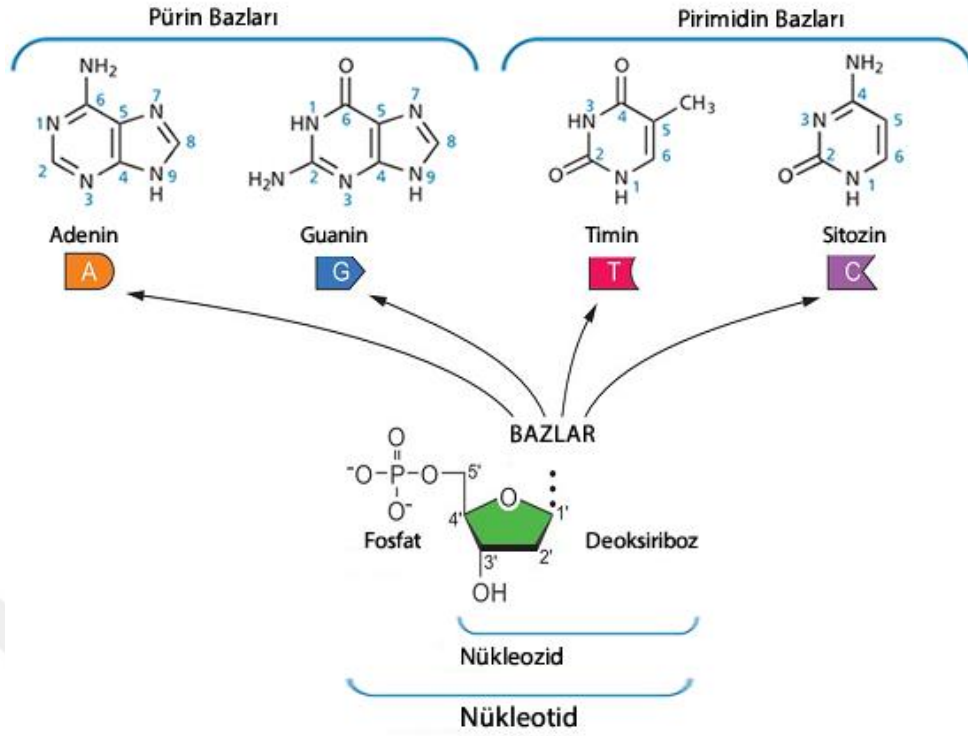
Mutajenite testlerinin amacı, somatik veya germ hücrelerde genetik değişikliklere neden olabilecek maddeleri belirlemektir. İn vitro mikronükleus testleri, interfaz hücrelerinde genotoksik hasarı tespit eder. İn vitro mikronükleus testi, kromozom sapma testine bir alternatif sağlar ve in vitro mikronükleus testi, hücreleri interfazda incelediği bir test yöntemidir [40,41].

1.6. Nükleik asitlerin yapıları

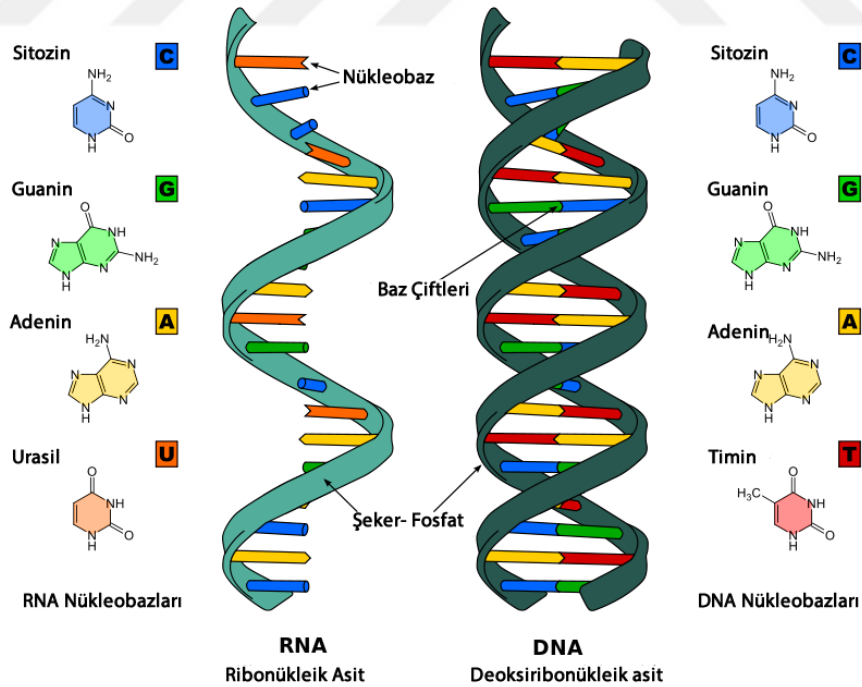
Nükleik asitler ilk olarak 1869'da Friedrich Miescher tarafından Almanya'nın Tübingen Üniversitesi'nde keşfedildi. İlk adını nüklein olarak alan nükleik asitler, bilinen tüm yaşam formları için gerekli olan biyopolimerler, makromoleküllerdir. Nükleik asit, tüm hücrelerde ve virüslerde bulunan önemli bir makromolekül sınıfıdır. Nükleik asitler, hücrelerde birincil bilgi taşıyan moleküler olarak görev yapan ve genetik materyali oluşturan doğal olarak oluşan kimyasal bileşiklerdir. Nükleik asitler, dünyadaki her yaşam formunun her canlı hücresinin bilgilerini oluşturdukları, kodladıkları ve daha sonra depoladıkları tüm canlılarda bol miktarda bulunur. Sırasıyla, hücre çekirdeğinin içindeki ve dışındaki bu bilgiyi hücrenin iç işleyişine ve nihayetinde her canlı organizmanın bir sonraki nesline iletmek ve ifade etmek için işlev görürler. Protein sentezini yönlendirmede özellikle önemli bir rol oynarlar [42,43].

Nükleik asitlerin işlevleri, genetik bilginin depolanması ve ifadesi ile ilgilidir. Nükleik asitlerin temel bileşeni, her biri bir pentoz şekeri (riboz veya deoksiriboz), bir fosfat grubu ve bir nükleobaz içeren nükleotittir. Nükleik asitler ayrıca laboratuvarında enzimler (DNA ve RNA) ve katı faz kimyasal sentezi aracılığıyla üretilir. Kimyasal yöntemler aynı zamanda doğada bulunmayan değiştirilmiş nükleik asitlerin, örneğin peptid nükleik asitlerinin üretilmesini de sağlar [42,44,45].

Nükleik asitler deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asittir (RNA) olmak üzere iki ana başlık altındadır. Her nükleotid azotlu bir baz, bir pentoz (beş karbonlu) şeker ve bir fosfat grubu olarak üç bileşenden oluşur (Şekil 1.2). DNA, tek hücreli bakterilerden çok hücreli memelilere kadar tüm canlı organizmalarda bulunan genetik materyaldir. DNA ve RNA içerdikleri bazlarda da farklılık gösterirler: adenin, guanin ve sitozin her iki molekülde de mevcutken, timin, yalnızca DNA'da, urasil ise yalnızca RNA'da bulunur (Şekil 1.3) [46–48].



Şekil 1.2. Nükleotid yapısı



Şekil 1.3. DNA ve RNA yapısı

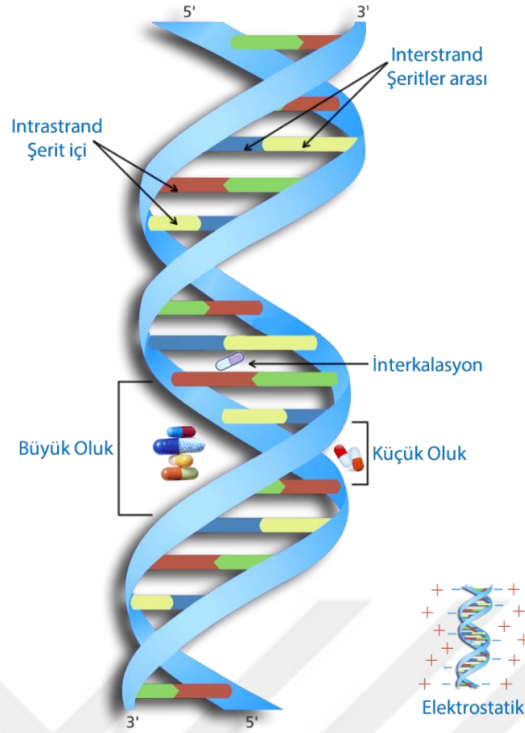
1.7. İlaç-DNA etkileşimleri

Deoksiribonükleik asit (DNA), bir tür biyolojik makromoleküldür. Benzersiz bir çift sarmal yapıya sahiptir ve genetik süreci, hücre büyümesini, farklılaşmayı ve yaşlanmayı kontrol eder. DNA bir bütün olarak suda çözünür bir makromolekül olmasına rağmen, DNA sarmalının içinde bulunan bitişik baz çiftleri, DNA sarmalının dış tarafında hidrofilik şeker ve fosfat gruplarının varlığından dolayı hidrofobiktir [49]. Buna karşılık, baz çiftleri nispeten hidrofobiktir [50]. Bu nedenle, hidrofobik özelliklere sahip birçok küçük molekül, DNA baz çiftlerinin hidrofobikliği nedeniyle doğrudan DNA'ya bağlanabilir. DNA yaygın olarak antikanser ilaçlardan antifungal ajanlara, bitki özlerine, pestisitlere ve toksik maddelere kadar farklı sınıflardan birkaç küçük molekül için birincil farmakolojik hedef olarak kabul edilir. Araya giren bağlanma modu (interkalasyon), küçük moleküller ve DNA arasındaki en önemli bağlanma modlarından biridir. 1961'de Lerman ilk olarak akridin boyasının hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler, hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleri gibi kovalent olmayan kuvvetlerle DNA sarmalının baz çiftlerine karışabileceğini keşfetti [51].

Bu nedenlerden dolayı, DNA hedefli küçük moleküllerin/ilaçların tam bağlanma modunu açıklamak, sadece terapötik ajanların moleküler mekanizmalarını veya toksik etkilerini anlamak için değil, aynı zamanda daha verimli ve spesifik olarak yeni DNA hedefli ilaçlar tasarlamak için de çok faydalıdır. Bu küçük moleküllerin in vitro olarak taranmasına yardımcı olmanın yanı sıra daha az yan etkiye sahiptir [52].

İlaçlar çift sarmal DNA molekülü ile kovalent ve kovalent olmayan bağlarla (moleküller arası zayıf etkileşimler) etkileşirler. Kovalent olmayan bağlanma modları kendi arasında elektrostatik bağlanma, interkalasyon ve oluk bağlanması olmak üzere üçe ayrılır. (Şekil 1.4).

Ayrıca, güçlü bağlanma etkinlikleri nedeniyle, hemen hemen tüm interkalatörler, DNA'da güçlü yapısal bozulmalara neden olur ve oldukça genotoksik olabilir. Aslında, mutasyonun istenmediği durumlarda interkalatif bağlanmanın genellikle daha mutajenik ve dolayısıyla toksik olduğu bulunmuştur. Öte yandan, DNA çift sarmalının biyolojik olarak önemli olan B-formu, sıkı-geniş bir büyük oluğa (büyük oluk, 22 Å genişliğinde) ve bir derinden küçük oluğa (küçük oluk, 12 Å genişliğinde) sahiptir. İlginç bir şekilde, uygun fiziksel boyutları nedeniyle küçük oluğun küçük molekülleri bağlamak için en çekici bölge olduğu bulunmuştur [53].



Şekil 1.4. Ligand (İlaç)-DNA etkileşiminde bağlanma modları

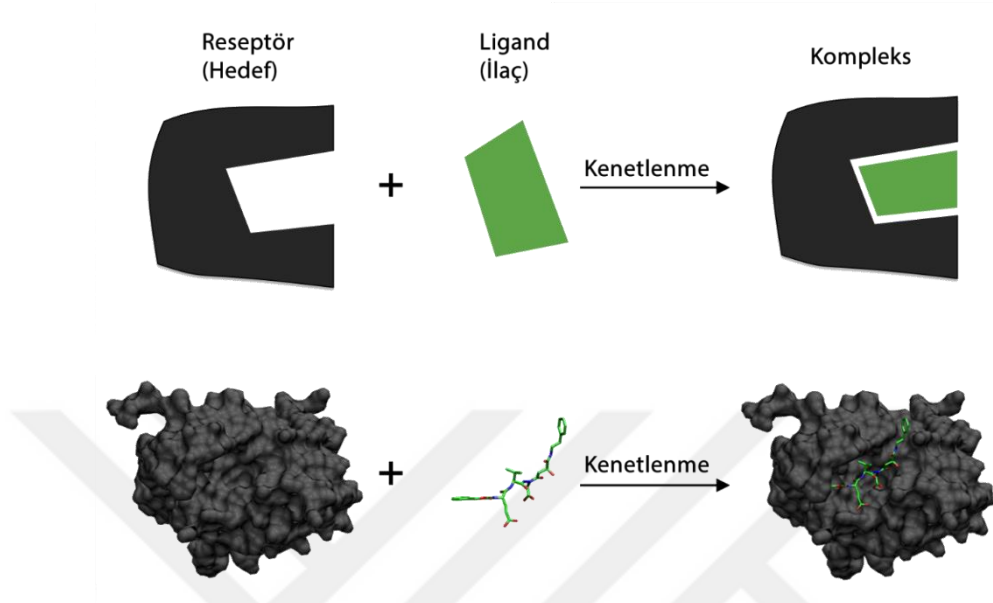
1.8. Moleküler Kenetlenme (Docking)

Moleküler kenetlenme, ilaç keşfinde yaygın olarak kullanılan, yerleşik bir siliko yapı tabanlı yöntemdir. Kenetlenme, diğer hedef modülatörlerin kimyasal yapısını önceden bilmeden, moleküler düzeyde ligand-hedef etkileşimlerini tahmin ederek veya yapı-aktivite ilişkilerini (SAR) betimleyerek, terapötik açıdan ilgi çekici yeni bileşiklerin tanımlanmasını sağlar. Başlangıçta küçük ve büyük moleküller arasındaki moleküler tanıma mekanizmalarını anlamaya yardımcı olmak için geliştirilmiş olmasına rağmen, ilaç keşfinde kenetlenme kullanımları ve uygulamaları son yıllarda büyük ölçüde değişti [54,55].

1970'lerin ortalarında ilk ortaya çıkışından bu yana, moleküler kenetlenme, kimyasal bileşiklerin moleküler hedefleriyle nasıl etkileşime girdiğini anlamaya ve ilaç keşfi ve geliştirmeye yardımcı olmak için önemli bir araç olduğunu kanıtladı. Nitekim, (i) verimli ligand-reseptör bağlanması için gerekli yapısal belirleyicileri belirlemek için moleküler kenetlenmenin kullanımı ve (ii) daha doğru kenetleme yöntemlerinin geliştirilmesini bildiren çalışmaların sayısı, ilk başlangıcından bu yana büyük ölçüde artmıştır [56,57].

Moleküler modelleme alanında, kenetlenme, bir ligand ve bir hedef kararlı bir kompleks oluşturmak üzere birbirine bağlandığında, bir molekülün bir saniyeye tercih edilen yönelimini tahmin eden bir yöntemdir. Tercih edilen oryantasyon bilgisi, örneğin skarlama fonksiyonları kullanılarak iki molekül arasındaki birleşmenin veya bağlanma afinitesinin

gücünü tahmin etmek için kullanılabilir [58]. Aşağıda bir reseptör veya hedef molekülün ligand yada ilaç molekülü ile kenetlenme reaksiyonu sonucu oluşan kompleks yapılar şematize edilmiştir (Şekil 1.5) [59] .



Şekil 1.5. Moleküler kenetlenme reaksiyonunun şematik gösterimi

Proteinler, peptitler, nükleik asitler, karbonhidratlar ve lipitler gibi biyolojik olarak ilgili moleküller arasındaki ilişkiler, sinyal iletiminde merkezi bir rol oynar. Ayrıca, etkileşen iki ortağın göreceli yönelimi, üretilen sinyalin türünü etkileyebilir (örneğin, agonizm ve antagonizma). Bu nedenle, kenetlenme, üretilen sinyalin hem gücünü hem de türünü tahmin etmek için kullanışlıdır. Moleküler kenetlenme, küçük moleküllü ligandların uygun hedef bağlanma bölgesine bağlanma-konformasyonunu tahmin etme yeteneğinden dolayı, yapı bazlı ilaç tasarımında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bağlanma davranışının karakterizasyonu, ilaçların rasyonel tasarımında ve temel biyokimyasal süreçlerin aydınlatılmasında önemli bir rol oynar [60].

1.9. Tez Çalışmasının Amacı

Tez kapsamında çalışılmış iki etken madde PMT [61], ve MTX [62], ile ilgili daha önce yapılmış olan çalışmaların genotoksik ve sitotoksik alanlarda az olması ortaya çıkan sonuçların farklı test sistemleri ile desteklenmesi bu ajanların genotoksik ve sitotoksik etkileri hakkındaki sonuçların güvenilirliği açısından önem teşkil etmektedir. Bunun nedeni olarak ise ilaçların direkt etken madde formundan ziyade ilaç formunda çalışılması sonuçların validasyonunu etkileyebilmektedir.

Bu çalışmanın temel amacından biri folik asit analogu olan etken maddelerin (PMT ve MTX), sağlıklı insanların in vitro periferel kan lenfositlerindeki kısa süreli genotoksik ve sitotoksik etkilerini ortaya çıkarmaktır. Diğer amaç ise bu iki etken maddenin DNA etkileşim mekanizmalarını; spektroskopik tekniklerle in vitro, hesaplamalı yöntemlerle in-siliko yaklaşımları kullanarak incelemektir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu tez kapsamında çalışılan Pemetrekset ve Metotreksat etken maddeleri, folik asit türevi antineoplastik ilaçlar arasında yer almaktadır. Bu gruba giren ve kanser tedavisinde kullanılan ve diğer bazı ilaçlarla birlikte PMT ve MTX etken maddeleri ile ilgili yapılmış genotoksik ve sitotoksik çalışmalar ile çeşitli ilaç etken maddelerin DNA ile etkileşim çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

2.1. Genotoksik ve Sitotoksik Çalışmalar

Ashoka ve ark. (2019) [63], İsviçre albino farelerinde flavonoid olan rutin'in metotreksat genotoksitesine karşı antijenotoksik etkileri gözlemlenmiştir. Çalışmada, antikanser ilacı metotreksat'ın neden olduğu yan etkileri modüle eden bir flavonoid olan rutin'in antiklastojenik potansiyelini değerlendirmek amaçlanmıştır. Çalışma sırasında beş gün süreyle günde bir kez farklı dozlarda rutin (50, 100 ve 150 mg/kg canlı ağırlık) ve dördüncü gün metotreksat (20 mg/kg/kg) intraperitoneal olarak verilmiştir. Rutin'in metotreksat yan etkilerine karşı koruyucu etkisini gözlemlemek için metotreksat uygulamasından 48 saat sonra mikronükleus testi ve kromozom anomali testleri yapılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda 20mg/kgbw metotreksat'ın polikromatik eritrositlerde mikronükleusu önemli ölçüde indüklediğini ($p<0.05$) ve toplam kromozomal anormalliklerde önemli artışa yol açtığını gözlemlemişlerdir. Sonuçlara ek olarak flavonoid rutin ile ön tedavi, metotreksat grubuna kıyasla kemik iliğinde MNPCE ve kromozomal anormallikleri ve periferik kanda mikronükleus NCE'yi azalttığı bulgular arasında yer almaktadır. Rutin, metotreksat ile tedavi edilen farelere kıyasla mitotik baskılamadan iyileşmeyi desteklemiştir. Bu çalışma ile metotreksatın genotoksik etkilerine karşı rutin maddesinin başlıca terapötik kullanımı olduğu belirlenmiştir.

Çobanoğlu ve ark. (2017) [64], Pemetrekset'in genotoksik potansiyelinin in vitro koşullarda kuyruklu yıldız testi (comet) kullanılarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, pemetrekset'in in vitro koşullarda normal lökositler üzerine genotoksik etkisinin olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmada, genotoksikite çalışmalarında hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi adına yaygın kullanılan bir yöntem olan alkali tek hücre jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. İki sağlıklı bireyden alınan insan periferik kan örneklerinden elde edilen lökositler, etken maddenin dört farklı konsantrasyonu (25, 50, 75 ve 100µg/mL) ile 1 saat muamele edilmiştir. DNA hasarı bakımından 75µg/mL ($p<0,05$) ve 100µg/mL'de ($p<0,01$) negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit

edilmiştir. Bu sonuç, pemetrekset'in normal lökositler üzerine genotoksik potansiyelinin olabileceğini göstermiştir.

Yang ve ark. (2013) [65], Yeni nesil bir antifolat olan pemetrekseti, mutasyona uğramış/p53-bağımlı ve bağımsız sinyal yolları ile hem içsel hem de dışsal apoptoz üzerinde etkisini görmek için çalışma yapmışlardır. Pemetrekset aracılı apoptozun moleküler olayları, ataksi telenjiyektazi mutasyona uğramış (ATM)/p53'e bağımlı ve bağımsız sinyal yollarının aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışma, pemetrekset'in A549 hücrelerinde DNA hasarını ve kaspaz-2,3,8 ve 9 aktivasyonunu indüklediğini ve kaspaz inhibitörleri ile tedavinin hücre ölümünü önemli ölçüde ortadan kaldırdığını ve kaspaza bağımlı bir apoptotik mekanizmayı düşündürdüğünü gösterilmiştir. dTTP ile takviyesi ile, normal S-faz ilerlemesi normal seyrinde ilerlemiş ve pemetrekset'e yanıt olarak apoptotik ölümü kurtarmıştır. Çalışma sonucundaki genel olarak bulgular, timidilat sentazda azalma görülmüştür ve Bax, PUMA, Fas, DR4 ve DR5 genlerindeki artışın, Pemetrekset yanıtı tahmin etmek için biyolojik belirteçler olarak hizmet edebileceğini ortaya koymuştur.

İstifli ve ark. (2013) [66], İnsan periferik kan lenfositlerinde Pemetrekset genotoksitesisi üzerinde çalışma yapılmıştır. İnsan periferik kan lenfositlerine dört farklı konsantrasyonda (25, 50, 75 ve 100 lg/mL) dozlara maruz bırakılmıştır. Bu çalışmada, genotoksik olarak pemetrekset potansiyeli periferik kanda değerlendirilmiştir. Sağlıklı bireylerden elde edilen lenfositler kromozom sapması (CA), kardeş kromatid kullanılarak değişim (SCE) ve mikronükleus (MN) tahlilleri yapılmıştır. 24 ve 48 saatlik muamele süreleri olan deney düzeneğinde dört farklı konsantrasyon dozlar kullanılmış ve 24 saatlik muamele CA oluşumunu artırırken 48 saatlik muamelede ise CA sayısında bir değişimine neden olmamıştır. 24 ve 48 saatlik periyotlar sonucunda SCE sıklığının çarpıcı bir şekilde artış gösterdiğini rapor etmişlerdir. İn vitro koşullarda yapılan bu çalışmada, Pemetrekset etken maddesinin mitotik indeksi (MI) ve nükleer bölünme indeksini (NBI) güçlü bir şekilde azalttığı sonuçlanmıştır. 24 ve 48 saatlik periyotlar sonuçlarında dört farklı konsantrasyonlarda Pemetrekset etken maddesinin güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür.

Buqué ve ark. (2012) [29], İnsan melanom hücrelerinde Pemetrekset kaynaklı apoptozda rol oynayan moleküler mekanizma üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. Gerçekleştirilen çalışmada, MTA'nın dört insan melanom hücre dizisi A375, Hs294T, HT144, MeWo ve iki NSCLC hücre dizisi H1299 ve Calu-3 üzerindeki etkisi incelenmiştir. MTA'nın DNA hasarını, S-fazı hücre döngüsü durduğunu ve kaspaz bağımlı ve bağımsız apoptozu indüklediği bulunmuştur. ROS ve p53-kusurlu H1299-NSCLC hücre hattını bloke

etmek için N-Asetil-L-Sistein (NAC) kullanarak MTA ile indüklenen sitotoksosite için hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve p53'ün artması gerektiği gösterilmiştir. Melanom hücrelerinin NAC ile ön tedavisinde MTA'nın DNA hasarını, p53 yukarı regülasyonunu ve sitotoksik etkisini azalttığını gözlemlemişlerdir. MTA, p53 ekspresyonunu indükleyerek, p53'e bağlı genler Mcl-1 ve PIDD'nin yukarı regülasyonuna yol açmıştır, ardından apoptozu iyileştiren Mcl-1'in transkripsiyon sonrası bir regülasyonuna yol açtığı bulgular arasında bulunmuştur. MTA'nın insan melanom hücrelerinde in vitro koşullarda DNA hasarını ve mitokondriyal aracılı apoptozu indüklediğini ve ilişkili apoptozun hem kaspaz bağımlı hem bağımsız hem de p53 aracılı olduğu bulunmuştur Çalışma sonucundaki veriler, MTA'nın insan malign melanomunun gelecekteki tedavisi için terapötik önemi olabileceğini gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Padmanabhan ve ark. (2008) [38], İsviçre erkek farelerinin germ hücreleri üzerinde metotreksatın sitotoksik ve genotoksik etkileri dört farklı konsantrasyon ile gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, erkek İsviçre farelerinde MTX tarafından indüklenen hücre toksisitesi araştırılmıştır. Metotreksat dört farklı doz şeklinde (5, 10, 20 ve 40 mg/kg) farelere (20-25 g) 5 ve 10 hafta boyunca haftada bir olarak uygulanmıştır. Hayvanlar son metotreksat muamelesinin ardından 1 hafta sonra öldürülmüştür. Germ hücre toksisitesi, testis ağırlığı, sperm sayısı, sperm baş morfolojisi, sperm kuyruklu yıldız testi, TUNEL ve testiste halo testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan metotreksat çalışması sonucunda, sperm sayısı önemli ölçüde azalmıştır ve doza bağlı bir şekilde sperm başı anormalliklerinin oluşumu arttığı raporlanmıştır. Testis toksisitesini indüklediği gözlemlenmiştir. Testiste, sperm kuyruklu yıldızı, TUNEL ve halo tahlili de Metotreksat'ın önemli ölçüde DNA hasarı ortaya çıkardığı bulgular arasında yer almıştır. Gerçekleştirilen bu çalışma sonucuna dayanarak, metotreksat'ın farelerde germ hücre toksisitesini indüklediği sonucuna varılmıştır.

Shahin ve ark. (2001) [67], Folinik asidin düşük doz Metotreksat'ın genotoksitesini üzerindeki koruyucu etkisini görmek Wistar albino sıçanları ve romatizmal eklem iltihabı hastaları(RA) üzerinde çalışma yapmışlardır. Folinik asidin metotreksat'ın neden olduğu sitogenetik hasara karşı inhibitör etkisine ilişkin bilgilerin sınırlı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmanın amacı, folinik asidin metotreksat sitogenotoksitesine karşı koruyucu etkisini değerlendirmektir. Her iki cinsiyetten kırk sıçan rastgele dört eşit gruba ayrılmış ve farklı konsantrasyonlarda dozlar uygulanmıştır. Dozlar, art arda 8 gün boyunca günde bir kez olarak verilmiştir. Her sıçan için bir kemik iliği kromozomal çalışması ve bir mikronükleus testi yapılmıştır. Bir ay boyunca haftalık 10 mg metotreksat dozu alan RA'lı 20 hastaya (5 erkek ve 15 kadın), metotreksat uygulamasından 4 saat sonra tek doz olarak 10 mg folinik

aside ek olarak aynı doz metotreksat uygulaması yapılmıştır. Her hasta için kromozomal çalışmalar ve mikronükleus testi değerlendirilmiştir. Metotreksat, Grup III hayvanlarında artan kromozomal anormallik ve mikronükleus oluşumu gözlemlenmiştir. Çalışma sonunda, folinik asit (grup IV), metotreksat'ın neden olduğu genetik hasarlara karşı önemli bir koruma ürettiği ortaya konulmuştur. RA hastalarında folinik asit, metotreksat kaynaklı genetik hasarın tatmin edici bir şekilde iyileşmesini sağladığı görülmüştür. Folinik asit, insan ve hayvan modellerinde metotreksat genotoksitesine karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

2.2. DNA Etkileşim Çalışmaları

Ameen ve ark. (2022) [68], idrar kaçırma, taşıt tutması, spazmik hareketler gibi çeşitli merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarını tedavi etmek için kullanılan Skopolamin ilaç etken maddesinin DNA ile etkileşimini bir dizi in vitro ve in siliko yöntem kullanarak tayin etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında etkileşim ve kompleks oluşumu incelemek için UV-görünür ve kararlı durum floresan spektroskopisi gibi teknikleri kullanmışlardır. Rekabetçi yer değiştirme deneyleri ve potasyum iyodür söndürme, skopolamin ve DNA arasındaki bağlanma modunu doğrulamıştır. Skopolamin varlığında DNA'da indüklenen yapısal değişiklikler DD (dairesele dikroizm) spektroskopisi ile değerlendirilmiştir. Plazmit çentiği ve NBT (nitro-blue tetrazolium) deneyi, skopolaminin genotoksik etkisini doğrulamıştır. Moleküler kenetlenme ve moleküler dinamik simülasyonu ile yapılan in-siliko çalışma, etkileşim modunu, ana stabilize edici kuvvetleri ve ayrıca skopolaminin bağlandığı nükleotid dizilerini ortaya çıkarmıştır.

Dehkordi ve ark. (2021) [69], çalışmalarında son araştırmalarda da antikanser ajanı olarak kullanımı potansiyeli de ortaya çıkan Bavachinin'in (BVC) DNA ile etkileşiminin rolünü vurgulamaktadır. Bu çalışmada, BVC'nin DNA bağlama özelliklerini birçok spektroskopik ve hesaplamalı yaklaşımla araştırılmıştır. UV-görünür ve DD spektral analizlerinden elde edilen kanıtlar, BVC'nin minör oluk bağlama yoluyla DNA ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Termodinamik analizlere dayanarak, bağlanma işleminin kendiliğinden olduğu ve hidrofobik etkileşimin BVC-DNA bağlanmasında önemli bir rol oynadığı sonucuna varmışlardır. In siliko moleküler kenetlenme ve dinamik simülasyon çalışmaları sonunda BVC'nin B-DNA yapısının küçük oluk (AT bakımından zengin) bölgesinde yer aldığı ve etkileşim süreci sırasında DNA'nın ikincil yapısında hafif bir değişikliğe neden olduğunu deneysel sonuçlarıyla güçlendirmişlerdir. Ek olarak BVC, MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı önemli sitotoksite göstermiştir. Ayrıca kantitatif

analizler MCF-7 hücrelerinde p53, kaspaz-3,-8 ve -9 ile yapılan deneylerde, BVC'nin proapoptotik genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. BVC'nin moleküler hedeflerini daha fazla araştırmak için, moleküler kenetlenme çalışmaları, BVC'nin proapoptotik proteinlerle nispeten iyi bir bağlanma afinitesine işaret etmiş olduğu sonucuna varmışlardır.

Shahabadia ve ark. (2021) [70], Guaifenesin ilacı ve DNA arasındaki etkileşim mekanizmasını, çoklu spektroskopik ve moleküler kenetlenme yaklaşımları ile karakterize etmişlerdir. Artan DNA konsantrasyonu ile ilaç elektronik absorpsiyonundaki değişiklikler ve ayrıca DNA varlığında guaifenesin emisyonunun önemli ölçüde söndürülmesi, etkileşimler sırasında guaifenesin ve DNA arasındaki kompleks oluşumunu kanıtlamıştır. Etkileşim için hem bağlanma sabiti hem de termodinamik parametreler hesaplanmıştır. Termodinamik etkileşim sonuçları da guaifenesin-DNA etkileşiminde hidrofobik kuvvetin rolünü doğrulamıştır. Dairesel dikroizm çalışması, guaifenesinin DNA'nın negatif bandında bir azalmaya neden olduğunu ve aynı zamanda DNA konformasyonunun B'den A'ya geçişini gösteren pozitif bandın artmasına neden olduğunu göstermiştir. KI söndürme deneyi, guaifenesinin DNA'ya interkalatif olmayan yollarla bağlandığını belirtirken Hoechst 33258 ve metilen mavisi problemlerine dayanan yarışmalı bağlanma çalışmaları, guaifenesin-DNA kompleksinin oluk bağlama modunu doğrulamıştır. Ayrıca, bağlanma sabiti ve etkileşim modunun deneysel sonuçlarıyla moleküler kenetlenme simülasyonunun tam uyumu, sonuçların yüksek doğruluğunu desteklemiştir.

Gan ve ark. (2020) [71], Daha önceki çalışmalarında, bazı B-norkolesterol benzimidazol bileşiklerini sentezlemişler ve kanser hücreleri üzerinde yapılan testler, bu bileşiklerin in vitro olarak iyi anti-kanser aktivitelerine sahip olduklarını göstermiştir. Araştırmacılar bileşiklerin etki mekanizmasını daha fazla araştırmak için, üç farklı B-norkolesterol benzimidazol bileşiği seçmiş ve bu bileşiklerin DNA ile etkileşimi UV-Vis, dairesel dikroizm (DD) ve floresan spektroskopik teknikler, viskozite gibi çeşitli yöntemler kullanılarak izlemişlerdir. Sonuçlar, moleküllerin DNA ile etkileşimi nedeniyle hafif bir kırmızıya kayma beraberinde hipokromik bir etki olduğunu göstermiştir. UV-Vis ve floresan spektrumlarına göre, bahsedilen bileşikler, tercihen DNA sarmalına kısmi interkalasyon yoluyla bağlanmıştır. Ayrıca, etidyum bromür (EB) ve Hoechst 33258 yarışmalı bağlanma deneyleri, bileşiklerin DNA ile etkileşim modunu doğrulamak için de kullanılmıştır. Hoechst 33258 yer değiştirme deneyinde, floresan yoğunluğunda önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. İyodür söndürme, viskozite ve DD spektroskopisi gibi ek deneyler ayrıca, interkalasyonun seçilen bileşiklerin DNA ile ana bağlanma modu olması gerektiğini

doğrulamıştır. Bu üç bileşiğin sitotoksitesi de MTT yöntemiyle değerlendirilmiş ve sonuçlar, bu bileşiklerin DNA'ya bağlanma yeteneklerinin sitotoksite davranışlarıyla uyumlu olduğunu göstermiştir. Deneysel sonuçlar, diğer bileşiklere kıyasla bileşik 3 için daha yüksek bir bağlanma afinitesi göstermiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışma ile, B-norkolesterol benzimidazol bileşikleri ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlamış olduğunu ve yeni B-steroid olmayan antikanser bileşiklerinin belirlenmesine faydalı bir bakış açısı sunacağını öne sürmüştür.

Shi ve ark. (2018) [72], Bir sülfonilüre herbisit olarak, tarımda geniş yaprakların ve yabani otların kontrolünde yaygın olarak kullanılan sülfosülfüron etken maddesi ile çalışmışlardır. Çalışmadaki sülfosülfüron ekinlerde ve meyvelerde yaygın olarak uygulanması ve kalıntısı nedeniyle insan ve otobur sağlığı için potansiyel bir risk oluşturabileceği için DNA ile etkileşimi incelenmiştir. DNA'nın sülfosülfüron ile bağlanma özelliklerinin incelenmesi, bir dizi spektroskopik teknik ve bilgisayar simülasyonu yoluyla gerçekleştirilmiştir. Deneysel sonuçlar, sülfosülfüronun oluk bağlanması yoluyla DNA ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Termodinamik parametrelerin (ΔH_0 , ΔS_0 ve ΔG_0) negatif değerleri, sülfosülfüron'un DNA ile reaksiyonunun kendiliğinden ilerleyebileceğini ve hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetlerinin sülfosülfüron-ct-DNA bağlanması için gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır. Elde edilen bilgiler -moleküler kenetlenme çalışması ile doğrulanmıştır. Bu arada, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler de sülfosülfüronun DNA ile etkileşimi için destekleyici bir işlev oynamıştır. Dairesel dikroizm (DD) sonuçları, etkileşim süreci sırasında DNA'nın ikincil yapısında küçük bir değişiklik sergilemiştir. Ayrıca araştırmacılar, sülfosülfüron konformasyonunun DNA'ya bağlandıktan sonra bariz bir değişikliği olması sonucu hakkında, sülfosülfüron esnekliğinin sülfosülfüron-DNA kompleksinin stabilize edilmesine katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir.

Yang ve ark. (2017) [73], çeşitli farmakolojik ve biyolojik anti-romatizmal ve antineoplastik tedavide kullanılan Metotreksat (MTX) ile çalışmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada, bir floresan probu olarak berberine (BH) dayalı olarak MTX ve deoksiribonükleik asit (DNA) arasındaki moleküler etkileşimleri belirlemişlerdir. UV-Vis spektroskopisi ve floresan çalışmaları, bu etkileşim sürecinin ağırlıklı olarak statik bir süreç olduğunu ve MTX'in hsDNA'nın çift sarmalına bağlanması şeklinde olduğunu ortaya koymuştur. Termodinamik parametrelerden hesaplanan negatif değerler, bağlanma reaksiyonunun ağırlıklı olarak hidrojen bağları ve van der waals etkileşimleri tarafından yönlendirildiğini ortaya koymuştur. MTX'in DNA ile interkalatif bağlanmasını desteklemek için iyodür söndürme çalışmaları, termal denatürasyon ve pH'ın DNA-BH-MTX sistemi

üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca, moleküler kenetlenme yöntemleri, MTX ve DNA arasındaki seçici bağlanma modunu daha da doğrulamıştır. Araştırmacılar tarafında elde ettikleri bulgular doğrultusunda, MTX'in farmakolojik testlerinin yanı sıra klinik yeniden araştırma ve in vitro ilaç taramasına fayda sağlaması noktasında katkı sunacağını beklenmektedir.

Saito ve ark. (2012) [74], Bitki ve mantar türevli bir antrakinon olan, genotoksik ve antioksidatif etkiler gösteren Emodin ilaç etken maddesi ve DNA arasındaki moleküler etkileşimleri, fizyolojik pH'da sulu bir solüsyonda spektroskopik yöntemlerle incelemiştir. Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve UV absorpsiyon spektrumları, yapısal özellikleri, bağlanma modunu ve ilişki sabitlerini belirlemek için kullanılmıştır. UV-spektroskopik sonuçları, emodinin DNA ile interkalasyon ve dış bağlanma yoluyla etkileştiğini göstermiştir. FTIR sonuçları, emodin etkileşiminin tercihen adenin ve timin baz çiftleri yoluyla ve ayrıca DNA çift sarmalının fosfat omurgası ile zayıf bir şekilde gerçekleştiğini ortaya çıkarmıştır. Emodin-DNA kompleksleşmesi üzerine DNA konformasyonunda önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

3. MATERYAL VE METOT

Tez kapsamında kullanılan tüm kimyasal maddeler ve bunların deney ortamında kullanımı için gerekli olan hazırlanış yöntemleri bu bölümde verilmiştir. Ayrıca kullanılan cihazlar ve yazılımlarla birlikte yöntemlerde çalışma konusunun amacı doğrultusunda anlatılmıştır. Tez kapsamında kullanılan tüm kimyasallar analitik safsızlıkta olup herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan alındığı gibi kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında genotoksik-sitotoksik etkilerini incelemek ve DNA ile etkileşim mekanizmalarını araştırmak üzere folik asit türevi antineoplastik ilaç grubunda yer alan PMT ve MTX etken maddeleri kullanılmıştır. Çalışmanın genotoksik-sitotoksik etkilerini inceleme kısmı için materyal olarak sigara içmeyen, alkol kullanmayan, herhangi bir kalıtsal veya kronik hastalığı bulunmayan iki erkek (20-24 yaşlarında) ve iki bayandan (20-24 yaşlarında) sağlıklı bireylerden alınan periferik kan kullanılmıştır. Ön çalışma ile belirlemiş olduğumuz dört farklı doz 24 ve 48 saatlik muamele süreleri şeklinde periferik kan örneklerine uygulanmıştır.

İkinci kısımda ise DNA ile etkileşim çalışmaları in-vitro koşullarda spektroskopik olarak, in-siliko yaklaşım ile modelleme ve hesaplamalı olarak araştırılmıştır.

3.1. Materyal

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler aşağıda verilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler Çizelge 3.1’de verilmiştir. PMT ve MTX etken maddelerinin kimyasal yapı ve özellikleri hakkında bilgi verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler

Kimyasal Madde	Firma Adı	Katalog No
Kromozom medyum	Gibco	12552013
Kolşisin	Sigma	C 3915
Sitokalsin B	Sigma	C-6762
KCl	Merck	P9333
Glasiyel asetik asit	Merck	56
Metonol	Sigma	M 1775
NaCl	Merck	1.06404
Tris- HCL	Merck	77-86-1
DMSO	Carlo Erba	67-68-5
Nitrik asit	Merck	K40382656-935
Entellan	Merck	7961
Heparin (Vasparin)	Merck	9041-08-1
Etil alkol	Sigma	64-17-5
HCl	Sigma	7647-01-0
NaOH	Sigma	1310-73-2
KH ₂ PO ₄	Sigma	P 5379
Na ₂ HPO ₄	Sigma	S 7907
Giemsa	Merck	109204
Mitomisin C	Sigma	M-0503
PMT	Sigma	PHR-1596
MTX	Chemcruz	SC3507A
fsDNA (Fish Sperm dsDNA)	Sigma	D1601
Etidyum Bromür	Sigma	E7637
HCl	Sigma	320331

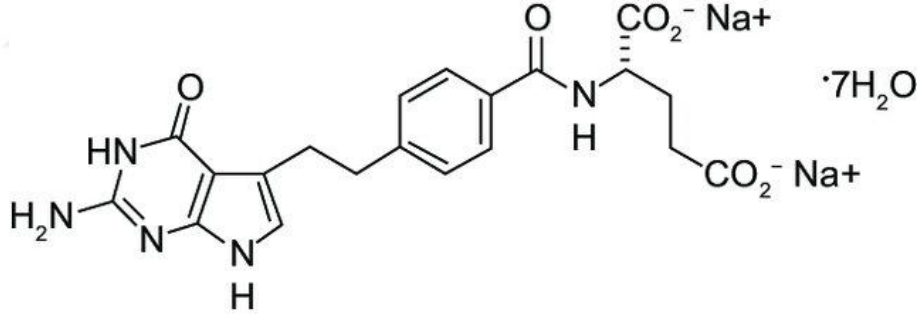
3.1.1. Pemetrekset

Pemetrekset, kimyasal olarak folik aside benzer ve folat antimetabolitleri adı verilen kemoterapi ilaçları sınıfındadır. Pemetrekset, timidin sentaz, dihidrofolat redüktaz ve glisinamid ribonükleotid formiltransferaz gibi folat bağımlı sentetik yollarda yer alan enzimlere karşı bir antagonist olarak işlev gören bir folik asit analogudur [75]. Kimyasal yapısı Şekil 3.1’de verilmiştir. Deneylerde kullanılan PMT’nin molekül formülü C₂₀H₃₃N₅Na₂O₁₃ ve molekül ağırlığı 597.5 g/mol’dür Pürin ve pirimidin sentezinde kullanılan üç enzimi timidin sentaz (TS), dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve glisinamid ribonükleotid formiltransferaz inhibe ederek çalışır [76]. Pemetrekset öncü purin ve pirimidin nükleotitlerinin oluşumunu engelleyerek hem normal hücrelerin hem de kanser hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması için gerekli olan DNA ve RNA oluşumunu

engeller. Bu enzimlerin inhibisyonu, hücre içi timidin ve pürinde azalmaya yol açar, bu da DNA sentezine müdahale eder ve hızla bölünen hücrelerde apoptotik hücre ölümüne yol açar [77]. İn-vitro ve in-vivo çalışmalar, pemetrekset'in mezotelyoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizilerinin büyümesini engellediğini göstermiştir ve bu kanserlerin ileri formlarında yapılan klinik deneyler, pemetrekset ile tedavi edilen deneklerde genel hayatta kalma sürelerinde iyileşmeler göstermiştir [75].

Pemetrekset'in yaygın olarak bilinen yan etkileri arasında;

- Düşük kan hücresi sayısı
- Zihinsel yorgunluk ve uyku hali
- Mide bulantısı ve kusma
- İshal
- Oral mukozit iltihabı
- İştah kaybı
- Kabızlık
- Deri döküntüsü

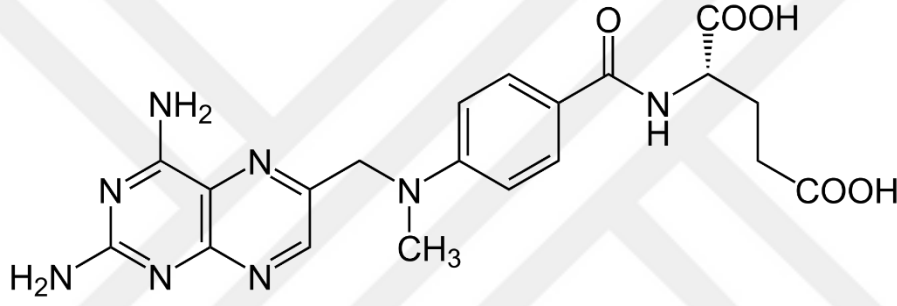


Şekil 3.1. Pemetrekset kimyasal yapısı

3.1.2. Metotreksat

Metotreksat, antifolat tipi bir antimetabolittir. Kimyasal yapısı Şekil 3.2'de verilmiştir. Molekül formülü $C_{20}H_{22}N_8O_5$ ve molekül ağırlığı 454.4 g/mol'dür Eskiden ametopterin olarak bilinen metotreksat (MTX), bir kemoterapi ajanı ve bağışıklık sistemi baskılayıcıdır. Metotreksat, lösemi, lenfoma, katı tümörler, sedef hastalığı ve romatoid artrit tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antineoplastik ve immünosupresif ajandır. Kanser, otoimmün hastalıklar ve ektopik gebelik tedavisinde ve tıbbi düşüklüklerde kullanılır. Kullanıldığı kanser türleri arasında meme kanseri, lösemi, akciğer kanseri, lenfoma, gestasyonel trofoblastik hastalık ve osteosarkom bulunur. Ağız yoluyla veya enjeksiyon

yoluyla verilebilir. Metotreksat orijinal olarak geliştirilmiştir ve kemoterapi için tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde kullanılmaya devam etmektedir [78]. Metotreksat, folat metabolizmasını inhibe ederek, dihidrofolik asit redüktazı bloke eder, böylece pürin ve pirimidin sentezini inhibe eden MTX, DNA ve RNA sentezini azaltarak etki eder. Son sonuçlar, metotreksatın ayrıca immünosupresif aktivitesine aracılık edebilen adenosin artışına ve salınımına da yol açtığını göstermektedir. Kanser için metotreksat, tetrahidrofolat sentezine katılan bir enzim olan dihidrofolat redüktazı (DHFR) yarışmalı olarak inhibe eder. DHFR, dihidrofolatın aktif tetrahidrofolata dönüşümünü katalize eder. Ayrıca folat, pürin ve pirimidin baz biyosentezi için gereklidir, bu nedenle sentez engellenecektir. Bu nedenle metotreksat, DNA, RNA, timidilatlar ve proteinlerin sentezini inhibe eder [24,79].



Şekil 3.2. Metotreksat kimyasal yapısı

3.1.3. Deneylerde kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

Flow kabin (steril kabin): Kültür tüplerinin içerisine eşit miktarda kromozom medyumunun paylaştırılması, kan ekimlerinin yapılması, kolşisin, bromodeoksiüridin, sitokalsin B ve PMT veya MTX etken madde konsantrasyonlarından dozların kültür tüplerine eklenmesi işlemleri flow kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. %99,9 partikül tutan filtreli, 1500 m³/h emme gücüne sahip, cam kapaklı, UV ve floresan ampulü sahip Labormed marka flow kabin kullanılmıştır.

İnkübatör: Hücre kültür tüplerinin 37 °C’de inkübasyonu için iç ısı 0-100 °C’ arasında ayarlanabilen Memmert marka inkübatör kullanılmıştır.

Santrifüj: Çalışmalarda lenfosit kültürü elde etmek amacıyla kanın şekilli elemanlarının çöktürülmesi, rotor çapı 21 cm olan, hızı 4000 devir/dakikaya (rpm) kadar artabilen ve 28 tüp kapasiteli ve dijital göstergelidir.

Vortex: Hücre kültürlerine muamele edilen kimyasalların homojen olarak dağılması için kullanılmıştır.

pH Metre: Çalışmada kullanılan kimyasalların pH değerlerini saptamak için WTW 315i (Germany) marka pH metre kullanılmıştır.

Mikroskop: Koordinat cetveli olan x4, x10, x40, x100 büyütme özelliğine sahip Olympus marka binoküler ışık mikroskobu preparatların incelenmesinde kullanılmıştır.

Mikropipet: 10-100 µL arası ayarlanabilen kültür tüplerine çeşitli kimyasalların muamelesi sırasında Genex marka mikropipet kullanılmıştır.

3.1.4. Deneylerde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Cytochalasin B: Mikronukleus (MN) testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nukleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. 5 mg Cytochalasin B maddesini %50'lik 9 mL etil alkolde çözerek stok çözelti elde edilir.

Kolşisin: KA'yı inceleme amacıyla preparatların hazırlanmasında iğ ipliklerinin oluşumunu engellemek için mitotik zehir olarak kullanılmıştır. Steril saf su içerisinde 2,025 gr kolşisin çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır ve hücre kültürünün 70. saatinde 2.7 ml'lik kromozom medyumuna içerisine ilave edilmiştir.

Hipotonik solüsyon: %0,4'lük KCl, KA ve MN deneylerinde farklı iki formda hazırlanmıştır. KA deneyi için; 1,397 gr KCl 250 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. MN deneyi için; 1,860 gr KCl 250 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan hipotonik solüsyonlar ağzı kapaklı şişelerde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Hücrelerin şişmesi için kullanılan solüsyonlar 37 °C inkübatöre konmuştur.

Sorensen tamponu: buzdolabında + 4°C de saklanan tamponlar Sorensen Tampon A ve Sorensen Tampon B olmak üzere iki stok çözelti şeklindedir. Bu tampon çözeltiler %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında kullanılmıştır.

Sorensen tamponu A (pH=4,8); 11,34 gr KH₂PO₄, 250 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Sorensen tamponu B (pH=9,3) ise 14,83 gr Na₂HPO₄.12H₂O 250 mL saf su içerisinde çözülerek elde edilmiştir.

Fiksatif: KA'yı incelemek amacıyla hazırlanan fiksatif hücrelerin morfolojik özelliklerinin bozulmasını önlemek amacıyla kullanılmıştır. KA preparatları için 1:3 oranında glasiyel asetik asit ve metanol karışımıyla hazırlanan fiksatif, MN preparatları için iki farklı şekilde hazırlanmıştır. 1 birim glasiyal asetik asit ile 5 birim metanol karışıma 1:1 oranında %0,9'luk NaCl eklenerek hazırlanmıştır. İkinci ve üçüncü fiksatif 1 birim glasiyal asetik asit: 5 birim metanol karışımıyla elde edilmiştir. Fiksatif deneyde kullanılmadan yaklaşık 2 saat önce hazırlanıp ağzı kapalı cam bir şişede buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir. Fiksatif işlemi soğuk olarak uygulanmıştır.

Giemsa (%5): Kromozoları ve MN testinde nükleusları boyamak için kullanılan boya 8 ml tampon A, 8 ml tampon B ve 8 ml giemsa boyası karıştırılıp üzeri 160 ml saf suyla tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan boya yüzeyindeki yağ partiküllerinden filtre edilerek arındırılmıştır.

Kromozom medyumu: Hücre kültürü yapımında kullanılan PB max. kromozom medyumu steril koşullarda her tüpte 2,5 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Tüpler kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Mitomisin C: Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan MMC çözeltisi 2 mg Mitomisin C’yi 30 ml steril saf suda çözdürerek elde edilmiştir. MMC kültür tüplerine 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

Nitrik asit: Lamları temizlemek için 1 N HNO₃ çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti; 7 ml HNO₃, 250 ml saf su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında plastik şişede saklanarak tekrar tekrar kullanılmıştır.

Entellan: Hazırlanan preparatları daimî hale getirmek için entellan kullanılmıştır.

Tris-HCl tamponu: DNA etkileşim çalışmalarında tampon olarak Tris-HCl (Ph=7, 0.02 M) kullanılmıştır. 0.02 M Tris-HCl tampon çözeltisi 3.152 g (0.02 mol) Tris HCl içermektedir. Çözeltinin pH’nın 7 değerine ayarlanması 0.1 N NaOH ve/veya 0.1 N HCl ilavesiyle Ph metre ile ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çözeltiye pH ayarladıktan sonra NaCl derişimi 0.02 M olacak şekilde 1.168 g NaCl eklenmiştir.

3.2. Metot

Tez çalışması kapsamında kullanılan bütün cihazlar ile bu cihazlardan elde edilecek verilerin işlenmesi için kullanılan yazılımlar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihaz, teknik ve yazılımlar

Kullanılan Teknik	Cihaz Marka ve Modeli	Yazılım
Floresans Spektrofotometresi	Perkin Elmer spectrum LS55	FL Winlab 5
UV-vis Spektrofotometresi	Perkin Elmer Lambda 45	UV WinLab 6.02
İletkenlik ve pH Ölçümleri	ThermoScientific Star A215	
Analitik Terazî	Presica xb 220	
Isıtıcı/Manyetik Karıştırıcı	Heidolph	
Santrifüj (soğutmasız)	Nüve NF800	
İstatiksel Analiz	-	IBM-SPSS 26
Molekül- Yapı Çizimleri	-	Chem Office 20
Moleküler Kenetlenme	-	PyRx
Moleküler Kenetlenme Değerlendirme	-	Discovery Studio

3.2.1. PMT ve MTX dozlarının belirlenmesi ve hazırlanması

Çalışmada kullanılan PMT ve MTX ilaç etken maddeleri yüksek safsızlıkta olup stok derişimleri 1×10^{-3} M olarak hazırlanmıştır. PMT etken maddesi 59,748 mg alınıp 100 ml distile saf suda balonjoje içerisinde çözdürülmüştür. MTX için ise 45,445 mg alınıp 2,5 ml DMSO eklenerek 100 ml distile saf su ile tamamlanmıştır. %50 oranında seyreltilerek hazırlanan konsantrasyonlar doz belirleme çalışması sonrası her iki etken madde için mitotik indeksi %50 düşüren dozlar bulunarak LD50 dozlar belirlenmiş sonrasında LD50 doz en yüksek doz kabul edilip diğer dozlar %50 azalan katlar halinde dört farklı konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

PMT için; 1/5: 2,388 µg/ml, 1/10: 1,194 µg/ml, 1/20: 0,597 µg/ml, 1/40: 0,298 µg/ml dört farklı konsantrasyon belirlenmiştir. MTX için; 1/100: 0,181 µg/ml, 1/200: 0,090 µg/ml, 1/400: 0,045 µg/ml, 1/800: 0,022 µg/ml olarak dört farklı konsantrasyon belirlenmiştir.

3.2.2. Lamların temizlenmesi

Etiketlenen lamlar kültür süresinin bitiminden iki gün önce dike şalelere çapraz dizilerek üzerini kapatacak şekilde 1 N HNO₃ çözeltisi konulmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda lamlar 30 dk boyunca akan çeşme suyunun altında bekletilmiştir. Lamlar 3-4 kez distile sudan geçirilip şale distile su ile doldurulup buzdolabında +4 °C’de saklanmıştır. Lamlar preparat yapılacağı zaman soğuk halde kullanılır.

3.2.3. Kromozom anormallikleri (Chromosome Aberration=CA) testi

Çalışma kapsamında hücre kültürünün hazırlanışı, preparatların yapılması, mikroskopik incelemeler ve sonuçların hesaplanması; Evans (1984) [80], Perry ve Thompson (1984) [81] ve Rencüzoğulları ve Topaktaş’ın (1991) [82] çalışmalarında izlediği deney protokolü temel ve referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Preparatlarında incelenmesi için; Mace ve ark. (1978) [83] ve Preston’un (1987) [84] deneysel protokolleri dikkate alınarak yapılmıştır.

Steril koşullarda heparize edilen kan örnekleri 2,5 mL kromozom medyumunu içeren kültür tüplerine 6’şar damla (0,2 mL) ekilmiştir. Kan örneklerinin ekimi yapıldıktan sonra 37°C 72 saat inkübe edilmiştir. PMT ve MTX maddelerinin etkisini incelemek için inkübasyon süresi bitmeden 24 ve 48 saat önce PMT ve MTX etken maddelerin dört farklı konsantrasyonları hücre kültür tüplerine ilave edilip tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve

48 saatlik muamele sürelerinde kullanılan 10 µl MMC pozitif kontrol tüplerine eklenmiştir. Kültür sürelerin bitiminden 2 saat önce yani kültürün 70. saatinde her tüpe metafaz bloklarını engellemek amacıyla 50 µl kolşisin çözeltisinden ilave edilmiş tüpler tekrar 37°C'ye kaldırılmıştır. Kültür süresinin sonunda tüpler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımları atılmıştır. Tüpün dip kısmında kalan 0,5-0,7 mL'lik hücreleri içeren sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, hipotonik çözeltiden yaklaşık 10 mL ilave edilmiştir. Pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu homojen hale getirilmiştir. Hücrelerin şişmesi için 37°C'de 8 dakika hipotonik çözelti ile muamele edilmiştir. Süre sonunda tüpler santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılan tüplere soğuk fiksatif (1 glasiyal asetik asit: 3 metanol) ilave edilmiştir. Fiksasyon işlemleri toplamda 3 kez tekrar edilmiştir işlemler sonunda tüplerdeki sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Son santrifüj işleminden sonra dipte 0,5-0,7 mL'lik sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmış ve preparat yapma işlemine geçilmiştir. Tüplerin dip kısmında kalan hücreler pastör pipeti ile karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra pastör pipetine çekilmiştir. Buzdolabında distile su içerisinde bekletilen etiketlenmiş lamaların üzerine farklı alanlara yaklaşık 60 cm yükseklikten hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerine yayılması işlemi gerçekleştirmiştir. Lamalar kuruması için üzerleri kapatılarak 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kuruyan preparatlar şalelere yerleştirilmiş ve %5'lik giemsa boyası ile 25 dakika boyanmıştır. Süre sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerinde biriken fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bu işlem sonrası preparatlar dik bir şekilde oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar kuruduktan sonra entellan aracılığı ile lamelle kapatılarak daimî hale getirilmiştir.

Daimî hale getirilen preparatlarda; hücre başına düşen kromozomal anormallik (KA/Hücre) oranı, kromozomal anormallik içeren hücrelerin (AH) frekansı ve mitotik indeks (MI) hesaplanmıştır. KA/Hücre oranını saptamak için 100 hücre (4 kişiden toplam 400 hücre) incelenmiştir. İncelenen 100 hücrede saptanan toplam kromozomal anormallik sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek KA/Hücre oranı hesaplanmıştır. İncelenen 100 hücre içinde kromozomal anormallik içeren hücrelerin sayısı hesaplanarak AH frekansı (%) olarak kaydedilmiştir. PMT ve MTX maddelerinin mitoz bölünme üzerine etkisini MI değeri hesaplanarak saptanmıştır. MI hesaplamak için her bir preparatda toplam 3000 hücre (dört kişiden toplam 12.000) incelenerek bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. İncelenen 3000 hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı, yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks (MI) bulunmuştur.

3.2.4. Mikronukleus (MN) testi

Mikronukleus deneylerinde hücre kültürlerinin hazırlanışı, preparatların hazırlanıp daimi hale getirilmesi, mikroskopik incelemeler ve sonuçların hesaplanması için; Rothfuss ve ark. (2000) [85], Kirsch-Volders ve ark. (2003) [86] ve Rencüzoğulları ve Topaktaş (1991) [82] deney protokolleri kullanılmıştır. Mikronukleus deney preparatlarının incelenmesi için; Titenko-Holland ve ark. (1997) [87] ve Fenech (2000) [88] çalışmaları doğrultusunda yapılmıştır.

Steril koşullarda heparize edilen kan örnekleri 2,5 mL kromozom medyumunu içeren kültür tüplerine 6'şar damla (0,2 mL) ekilmiştir. Kan örneklerinin ekimi yapıldıktan sonra 37°C 68 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik muamele süresi için kültürün başlangıcından itibaren 44. saatte 48 saatlik muamele süresi için ise kültürün başlangıcından itibaren 20. saatte PMT ve MTX maddelerinin dört farklı dozlarından kültür tüplerine eklenmiş ve 37°C inkübasyona devam edilmiştir. 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak kullanılacak olan MMC çözeltisinden uygun tüplere ilave edilmiştir. İnkübasyonun 44. saatinde, tüm hücre kültür tüplerine, binükleer hücre oluşumunu sağlamak için son konsantrasyonu 6 µg/mL olacak şekilde sitokalsin B ilave edilmiştir. İnkübasyonun sonunda kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım atılmıştır. Tüplerin dip kısmında kalan 0,5-0,7mL civarındaki hücreler homojenize edilmiş ve 37 °C'de bekletilen hipotonik solüsyondan tüplere ilave edilerek pipetaj yapıldıktan sonra tüpler 5 dk 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüpler santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımları atılmıştır. Tüplere soğuk fiksatif (%0,9' luk NaCl içeren) ilave edilmiş ve kültür tüpleri oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Ardından hücre kültürleri, santrifüj edilerek süpernatant kısım atılmıştır. Daha sonra tüpler 1:5 oranında glasiyal asetik asit: metanolden oluşan fiksatif ile iki kez muamele edilmiştir. Üç fiksasyon işlemi biten tüplerde dipte 0,5-0,7 mL'lik sıvı kalacak şekilde süpernatant atılarak preparat yapma işlemine geçilmiştir. Tüplerin dip kısmında kalan hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra pastör pipetine çekilmiştir. Buzdolabında distile su içerisinde bekletilen lamaların üzerine farklı alanlara yaklaşık 10 cm yükseklikten hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin lam üzerine yayılması sağlanmıştır. Daha sonra lamaların üzerleri kapatılmış ve kuruması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Preparatlar kuruduktan sonra şalelerde %5'lik Giemsa boyası ile 8 dakika boyanmıştır. Sürenin sonunda boyadan çıkarılan preparatlar, üç ayrı kap içerisinde bulunan saf sudan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmıştır. Daha sonra preparatlar dik bir şekilde oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan preparatlar, entellan aracılığıyla lamelle kapatılarak daimî hale getirilmiştir. MN testi için daimî hale getirilen preparatlarda mikronükleus (% MN) oranı, mikronükleus içeren binükleer hücre (% BNMN) frekansı ve nükleer bölünme indeksi (NBI) saptanmıştır. MN sayısını tespit etmek için her bir kişiye ait daimî preparatlarda toplam 1000 binükleer hücre incelenmiştir. Bu hücrelerdeki toplam mikronukleus sayısı hesaplanarak % MN belirlenmiştir. İncelenen bu 1000 binükleer hücre içerisinde mikronükleus ihtiva eden hücrelerin sayısı belirlenmiş ve % BNMN olarak kaydedilmiştir.

NBI hesaplaması için; Eastmond ve Tucker (1989) [89] ve Fenech (2000) [88] tarafından önerilen aşağıdaki formül esas alınarak hesaplama yapılmıştır. İlgili mikroskop görüntüleri, mononükleer (Şekil 3.3) binükleer (Şekil 3.4) trinükleer (Şekil 3.5) tetranükleer (Şekil 3.6) olarak verilmiştir.

$$NBI = (1 \times MI) + (2 \times MII) + (3 \times MIII) + (4 \times MIV) / N$$

Bu formülde;

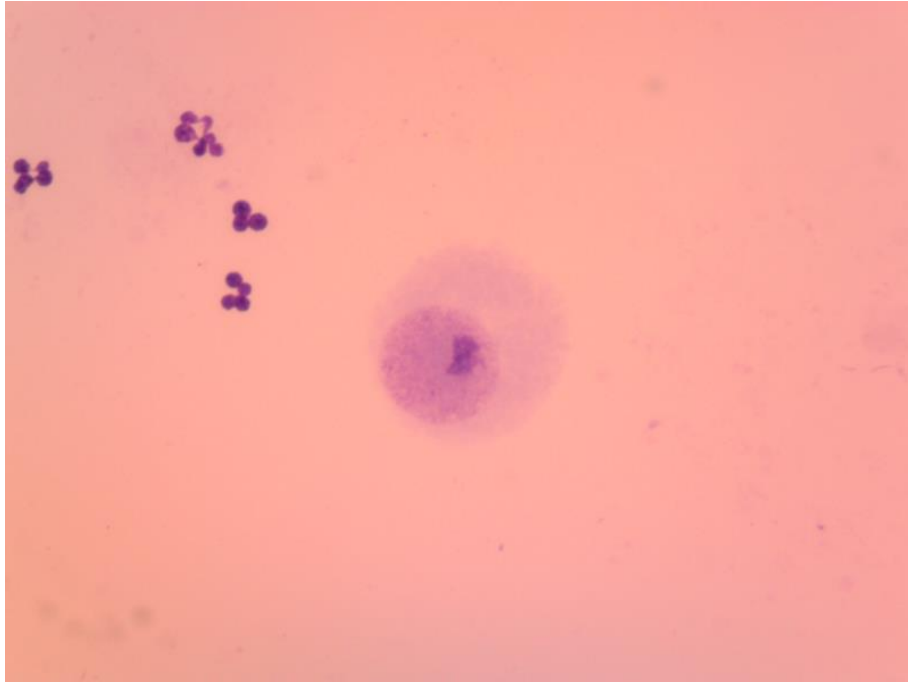
MI: Mononükleer hücrelerin sayısı

II: Binükleer hücrelerin sayısı

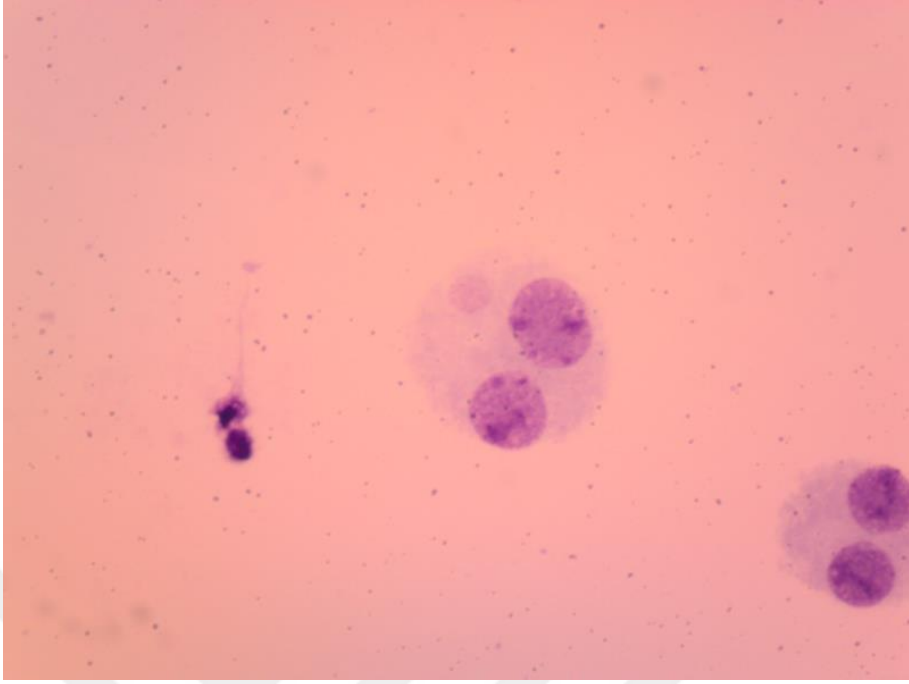
III: Trinükleer hücrelerin sayısı

IV: Tetranükleer hücrelerin sayısı

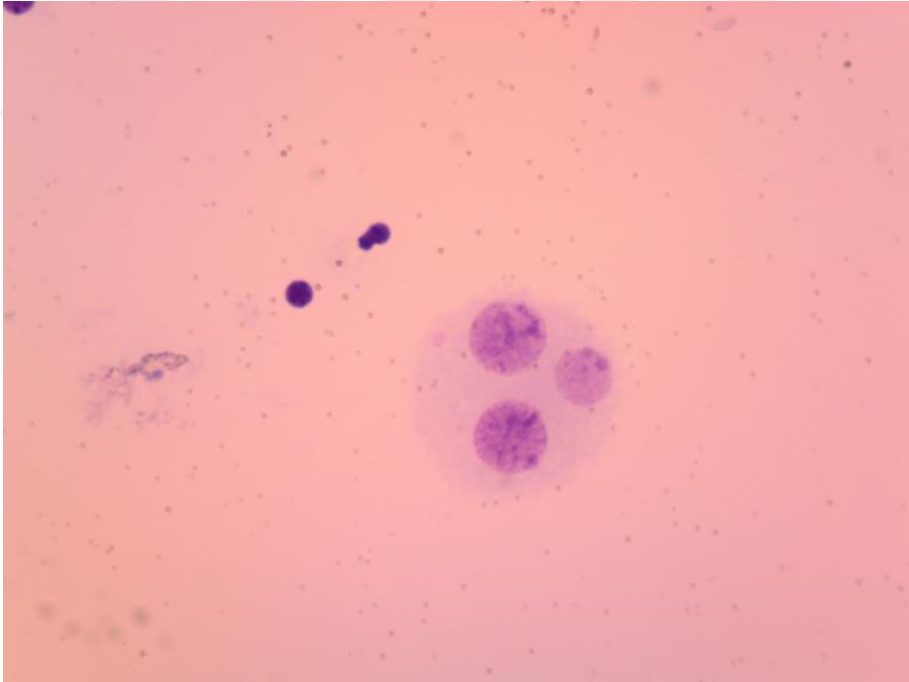
N: İncelenen toplam hücre sayısını ifade etmektedir.



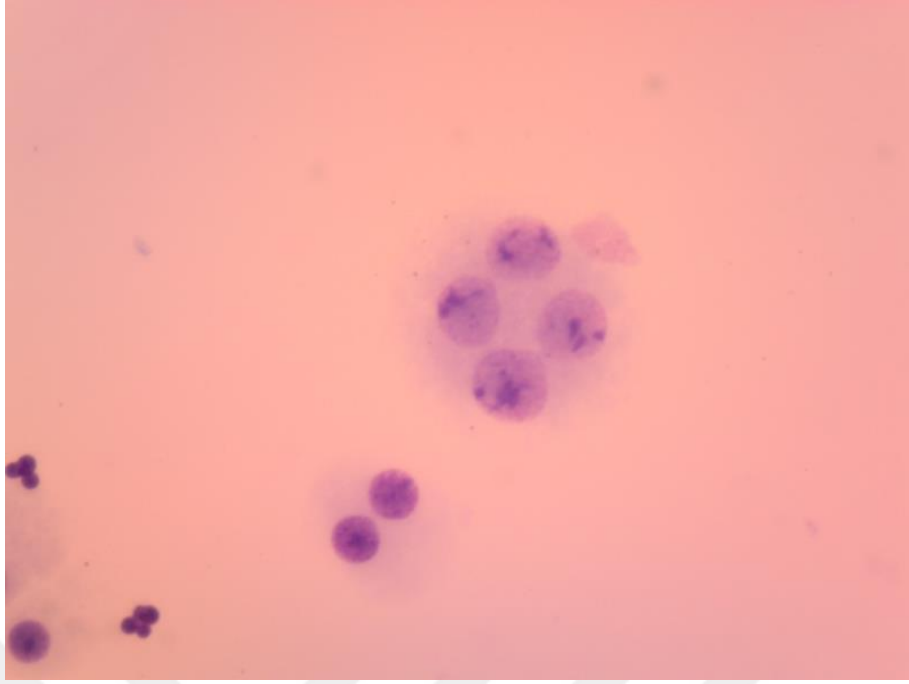
Şekil 3.3. Mononükleer hücre (2,388 µg/mL PMT, 48 saat, ♀, x500)



Şekil 3.4. Binukleer hücre (0,090 $\mu\text{g/mL}$ MTX, 24 saat, ♂, x500)



Şekil 3.5. Trinükleer hücre (0,090 $\mu\text{g/mL}$ MTX, 24 saat, ♂, x500)



Şekil 3.6. Tetranükleer hücre (2,388 µg/mL PMT, 48 saat, ♀, x500)

3.2.5. İstatistiksel analizler

Dört kişiden elde edilen KA, %AH, MI, MN, BNMN, NBI parametrelerine ait veriler için her bir muameleli grubun ortalamaları ile kontrol kültürlerinin ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı SPSS analiz programı ile istatistiksel analizi yapılmıştır. Mikroskopik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular çizelge ve grafikler halinde verilmiştir. Önemlilik düzeyi; $p \leq 0,05$ alınmıştır. Elde edilen sonuçlar bulgular ve tartışma kısmında ayrıntılı olarak incelenip bilgi verilmiştir.

3.2.6. DNA etkileşim çalışmaları

Tez kapsamında çalışılan antineoplastik ilaç etken maddeleri PMT ve MTX'in DNA ile etkileşim afinitesini tayin etmek için bir dizi spektroskopik çalışma (Uv-vis ve fotoluminesans) ve hesaplamalı moleküler kenetleme (docking) çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Uv-vis absorpsiyon ve fotoluminesans spektroskopisi ile yapılan çalışmalarda 200-600 nm aralığında 1 cm genişliğinde kuvars küvet ile çalışılmış ve pH 7.4 Tris-HCl tamponu seyreltme işlemlerinde kullanılmıştır. PMT ve MTX ilaç etken maddelerinin stok derişimleri 1×10^{-3} M olarak hazırlanmış ve elde edilen spektrumlara göre Lambert-Beer kuralları gözetilerek seyreltme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Stok DNA çözeltisi, 5 mg fsDNA 100 ml Tris-HCl tamponunda çözdürülerek hazırlanmış ve derişim 1.91×10^{-4} M

olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan tüm çözeltiler +4 °C'de 48 saatten fazla saklanmamak koşulu ile kullanılmıştır.

Uv-vis absorbans spektroskopisi ile yapılan DNA etkileşim çalışmalarında çalışılacak derişimi tayin edilen belirli miktarlarda PMT ve MTX çözeltileri üzerine artan derişimlerde fsDNA eklenmiştir. Tüm ölçümler üç tekrar halinde yapılmış ve her numune için karışımın karşılık gelen spektrumunun ölçümleri alınmadan önce, falkon tüpler hafifçe çalkalanmış ve 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Eklenen fsDNA ile elde edilen absorpsiyon spektrumu, DNA-İlaç ölçümündeki (aynı miktarda eklenen fsDNA) spektrumdan çıkarılmış ve nihai spektrumlar elde edilmiştir. Elde edilen spektrumlar üzerinden PMT ve MTX'in absorbans ve dalga boyu değişimleri ortamda fsDNA olduğu ve olmadığı şartlarda yorumlar yapılmış ve ilgili bağlanma sabitleri elde edilen grafikler üzerinden hesaplanmıştır.

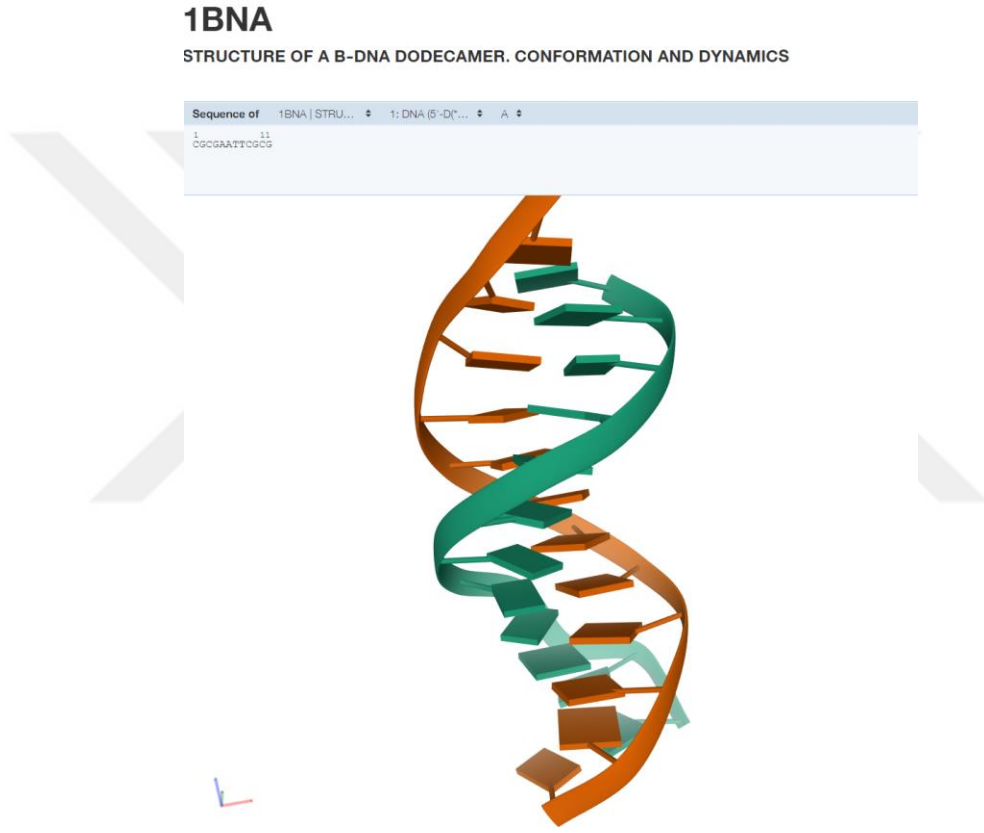
Floresan çalışmaları, optik yol uzunluğu 1 cm olan bir kuvars küvet kullanılarak kuvars hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PMT ve MTX'in floresan emisyon spektrumları, 329 ve 376 nm'de uyarılmış, daha sonra 300-600 nm aralığında kaydedilmiştir. Floresan yoğunluğundaki değişiklik, sabit ilaç konsantrasyonunun değişen konsantrasyonlarda fsDNA (10–100 µM) ile titre edilmesiyle gözlemlendi.

Etken maddelerin floresan özellik sergilememesi nedeni ile fotoluminesans ile yapılan yarışmalı etkileşim analizleri fsDNA'nın iyi bir interkelatör ve floresan prob ajan olarak bilinen Etidyum Bromür (EB) oluşturulan kompleksleri referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde uyarma ve emisyon yarıkları, optik yol uzunluğu 1 cm olan bir kuvars küvet kullanılarak sırasıyla 5 ve 10 nm'ye ayarlanmıştır. PMT ve MTX'in fsDNA ile bağlanmasını araştırmak için, fsDNA çözeltisi, deneyden hemen önce hazırlanan etidyum bromür (EB) ile DNA: EB (10:1) konsantrasyon oranı ile 25°C'de 15 dakika boyunca dikkatlice karıştırıldı. EB moleküllerinin DNA'nın çift sarmal yapısına interkalasyon moduyla bağlanması, EB'nin floresan yoğunluğunda önemli bir artışa neden olur. Daha sonra, bu karışıma çeşitli miktarlarda ilaç çözeltileri (0-100 uM) ilave edilerek, son karışımın 15 dakika süreyle inkübe edilmesi sağlanmış ve spektrumlar alınmıştır.

3.2.7. Moleküler Kenetleme Çalışmaları

PMT ve MTX bileşiklerinin kimyasal yapıları ZINC [90] veri tabanından indirilip enerjileri Chem3D 20 ile minimize edilmiştir. Moleküler kenetleme analizi, Autodock Vina aracı ile PyRx yerleştirme yazılımı kullanılarak bir model sistem olarak 1BNA'ya karşı ilaç etken maddeleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Serbest DNA'nın yüksek çözünürlüklü (1.90

Å) yapısı (Şekil 3.7), PDB veri tabanından (PDB kodu: 1BNA) (www.rcsb.org/pdb) indirilmiştir [91]. Bir sonraki adımda, 1BNA, $x \times y \times z$ ($30 \times 25 \times 47$) yönlerinde ızgara noktaları olan bir kutu içine alınmış ve $15 \times 21 \times 10$ boyutlarında kübik bir kutu kullanılarak kenetlenme gerçekleştirilmiştir. Bu analizde, esnek-ligand:katı-reseptör kenetleme yöntemi gerçekleştirildi ve en iyi yerleştirme koşulları seçilmiştir. Kenetlenen kompleksler (PMT-DNA ve MTX-DNA), en düşük bağlanma enerjisi (Kcal/mol) değerleri üzerinde değerlendirilmiştir. Kenetlenmiş tüm komplekslerinin grafik gösterimleri ve ilgili sonuçları Discovery Studio 2021 kullanılarak gerçekleştirilip analiz edilmiştir.



Şekil 3.7. Moleküler kenetlenme işleminde kullanılan 1BNA 3D yapısı

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

Materyal metot kısmında açıklanan PMT ve MTX için yapılan incelemeler sonucunda elde edilen tüm deney verileri analiz edilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4.1. Genotoksik ve Sitotoksik Çalışmalar

PMT ve MTX etken maddelerin insan periferik lenfositlerinde 24 ve 48 saatlik dört farklı konsantrasyon ile muamelesi elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

4.1.1. PMT ve MTX'in kromozom anormallikleri (KA) oluşumu üzerindeki etkilerinin incelenmesi

PMT ve MTX maddelerinin insan periferik lenfositlerinde dört farklı konsantrasyon ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucu elde edilen; hücre başına düşen kromozom anormallığı (KA), hücre başına düşen anormal hücre yüzdesi (AH) ve mitotik indeks (MI) değerleri sırasıyla PMT ve MTX için Çizelge 4.1 ve e verilmiştir. İnsan periferik lenfositlerinin, PMT ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucunda elde edilen veriler hücre başına düşen kromozomal anormallik oranı ve anormal hücre yüzdesi yönünden değerlendirildiğinde; her iki muamele süresinde tüm dozlar kontrol grubuyla kıyaslandığında KA/Hücre ve AH frekansını istatistiksel olarak etkilemediği gözlemlenmiştir. Diğer taraftan PMT ile muamele edilen hücrelerde tüm dozlarda ve muamele sürelerinde kontrol grubuna kıyasla mitotik indeks değerinde istatistiki anlamda önemli düzeyde azalma olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Kontrol gruplarında ve PMT ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik oranı (KA/Hücre), anormal hücre (AH) yüzdesi ve mitotik indeks (MI) değerleri

Test maddesi	Muamele		KA/Hücre±SD	AH±SD %	MI±SD	
	Süre(s)	Doz µg/mL)				
K (-) ^a	24	0	0,042±0,034	4,000±2,943	11,12±1,887	
K (+) ^b		0,1	0,257±0,573	22,250±5,73	2,565±0,461	
PMT			7			
		2,388	0,062±0,017	5,00±1,825	2,007±0,542***	
		1,194	0,057±0,041	4,500±1,914	2,365±0,841***	
		0,597	0,070±0,027	6,750±2,629	2,290±0,501***	
		0,298	0,052±0,020	5,250±2,061	1,755±0,702***	
K (-) ^a		48	0	0,042±0,034	4,000±2,943	11,12±1,887
K (+) ^b	0,1		0,105±0,071	3,250±0,957	0,112±0,037	
PMT	2,388		0,185±0,043	12,00±3,162	2,047±0,737***	
	1,194		0,180±0,031	12,25±1,707	2,562±0,900***	
	0,597		0,192±0,081	12,00±4,242	2,085±0,538***	
	0,298		0,160±0,073	9,750±2,629	1,793±0,400***	

* p<0,05, *** p<0,01, a: Kontrol, b: Pozitif kontrol, Mitomisin C

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi bu çalışmada gözlenen kromozomal anormallikler; kromatid kırığı (Şekil 4.1), kromozom kırığı (Şekil 4.2), fragment (Şekil 4.3), disentrik kromozom (Şekil 4.4), kromatidlerin değişmesi (Şekil 4.5), poliploidi (Şekil 4.6) ve çoklu kromozom anormallikleri (Şekil 4.7) şeklindedir.

Çizelge 4.2. PMT'nin farklı dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde saptanan kromozomal anormallikler

Test Maddesi	Muamele		Kromozom Anormallikleri						
	Süre (s)	Doz(µg/mL)	B'	B''	F	SU	CE	P	DS
K (-)^a	24	0	10	1	1	1	1	1	1
K (+)^b		0.1	45	14	5	4	21	5	8
PMT		2.388	17	6	1	-	1	-	-
		1.194	13	3	1	1	4	-	1
		0.597	20	6	-	1	-	1	-
		0.298	12	5	3	1	-	-	-
K (-)^a	48	0	10	1	1	1	1	1	1
K (+)^b		0.1	20	10	-	1	10	-	-
PMT		2.388	44	21	-	-	4	5	-
		1.194	45	18	2	-	6	1	-
		0.597	54	17	-	-	5	1	-
		0.298	40	13	2	-	6	2	1

B': Kromatid Kırığı; B'': Kromozom Kırığı; F: Fragment; SU: Kardeş Kromatidlerin Birleşmesi; DS: Disentrik Kromozom; P: Poliploidi a: Kontrol b: Pozitif kontrol, Mitomisin C



Şekil 4.1. Kromatid kırığı (MTX, 0,181 $\mu\text{g/mL}$, 48 saat, ♂, x1000)



Şekil 4.2. Kromozom Kırığı (PMT, 0,298 $\mu\text{g/mL}$, 48 saat, ♂, x1000)



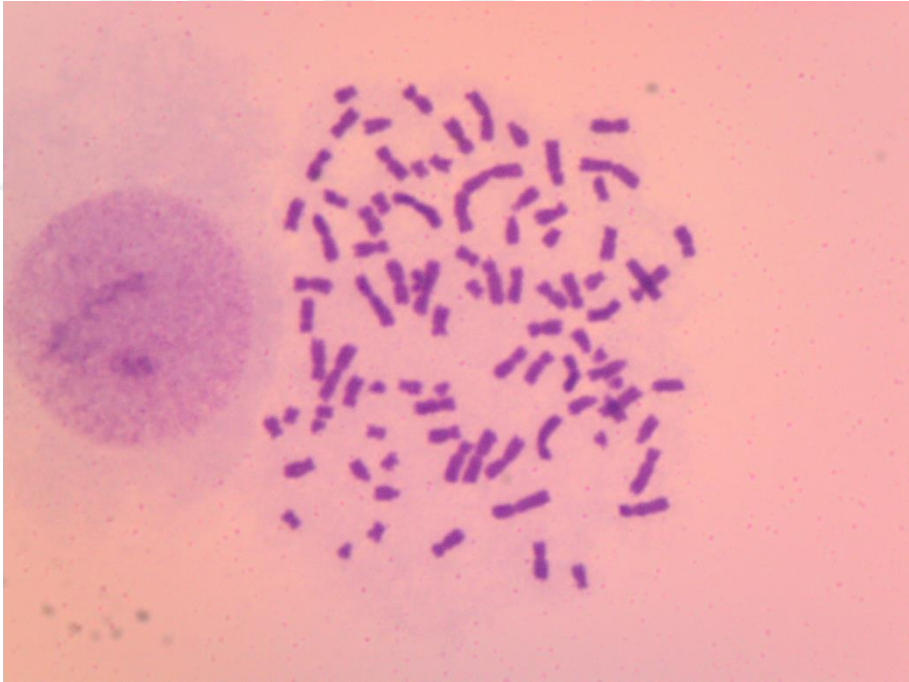
Şekil 4.3. Fragment (PMT, 1,194 $\mu\text{g/mL}$, 24 saat, ♀, x1000)



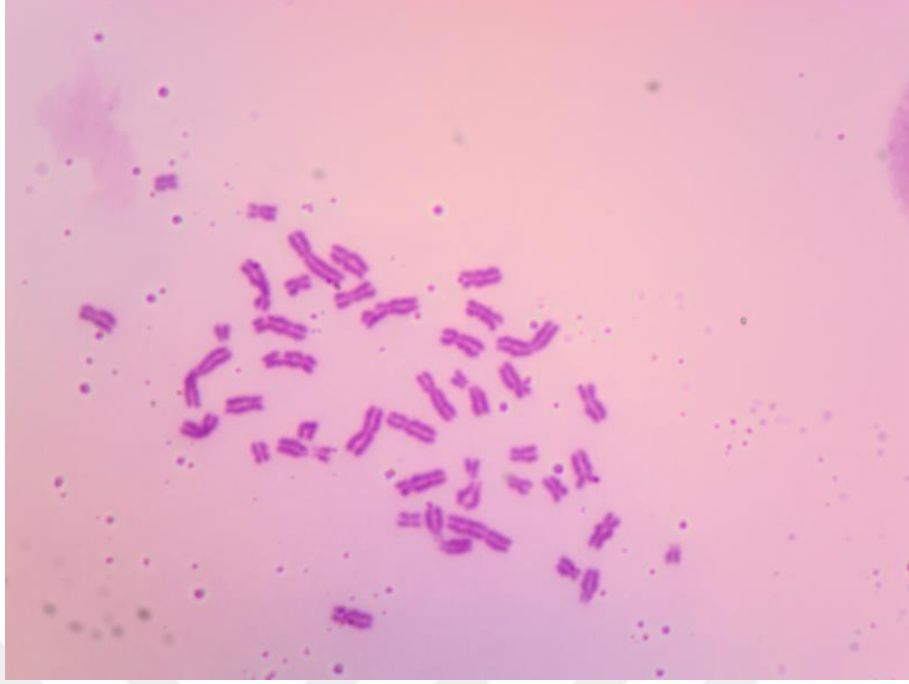
Şekil 4.4. Disentrik kromozom (PMT, 0,298 $\mu\text{g/mL}$, 48 saat, ♀, x1000)



şekil 4.5. Kromatid değişimi (PMT, 0,597µg/mL, 48 saat, ♂, x1000)



şekil 4.6. Poliploidi (MTX, 0,090 µg/mL, 48 saat, ♀, x1000)



Şekil 4.7. Çoklu kromozom anormallikleri

Yaptığımız çalışmada MTX 24 saatlik muamele süresinde anormal hücre yüzdesi, hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansını ve mitotik indeks değerinde kontrol ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir. MTX 48 saatlik muamele verilerinde ise; anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen kromozomal anormallik oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalnızca en yüksek 2 dozda (0,181 $\mu\text{g/mL}$ - 0,090 $\mu\text{g/mL}$) istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırdığı diğer konsantrasyonlarda herhangi bir fark gözlenmediği saptanmıştır. Mitotik indeks değerinde herhangi bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3. Kontrol gruplarında ve MTX ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik oranı (KA/Hücre), anormal hücre (AH) yüzdesi ve mitotik indeks (MI) değerleri

Test maddesi	Muamele		KA/Hücre±SD	AH±SD %	MI±SD
	Süre(s)	Doz µg/mL			
K (-)^a	24	0	0,032±0,020	3,000±1,825	6,150±2,704
K (+)^b		0,1	0,113±0,118	14,000±2,581	2,775±0,842
ÇK		0,1	0,017±0,009	1,750±0,957	7,350±4,906
MTX		0,181	0,055±0,046	4,500±3,316	4,115±1,234
		0,090	0,040±0,021	3,500±1,732	8,625±2,507
		0,045	0,042±0,009	4,000±0,816	9,025±3,208
		0,022	0,032±0,029	3,000±2,581	8,882±1,795
K (-)^a	48	0	0,032±0,020	3,000±1,825	6,150±2,704
K (+)^b		0,1	0,040±0,054	1,750±1,707	0,436±0,196
ÇK		0,1	0,015±0,017	1,500±1,732	11,482±5,573***
MTX		0,181	0,090±0,053***	8,750±2,500***	5,222±1,502
		0,090	0,072±0,028***	6,000±2,160***	8,082±2,377
		0,045	0,040±0,014	4,000±1,414	8,682±0,497
		0,022	0,017±0,009	1,750±0,957	8,540±0,0908

* p<0,05, *** p<0,01, a: Kontrol, b: Pozitif kontrol, Mitomisin C

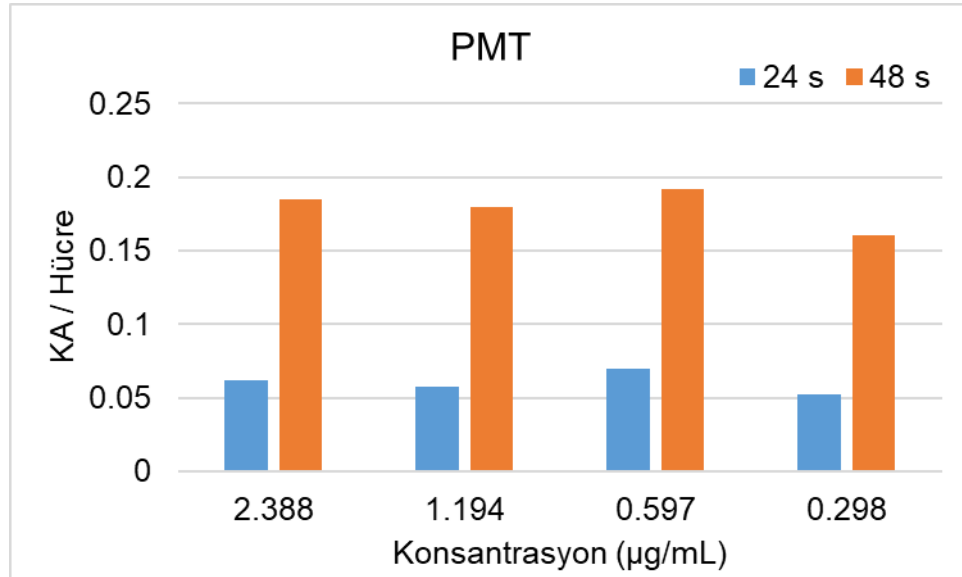
Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi bu çalışmada gözlenen kromozomal anormallikler; kromatid kırığı (Şekil 4.1), kromozom kırığı (Şekil 4.2), fragment (Şekil 4.3), kromatidlerin değişmesi (Şekil 4.5), disentrik kromozom (Şekil 4.4) ve poliploidi (Şekil 4.6) şeklindedir.

Çizelge 4.4. MTX'in farklı dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinde saptanan kromozomal anormallikler

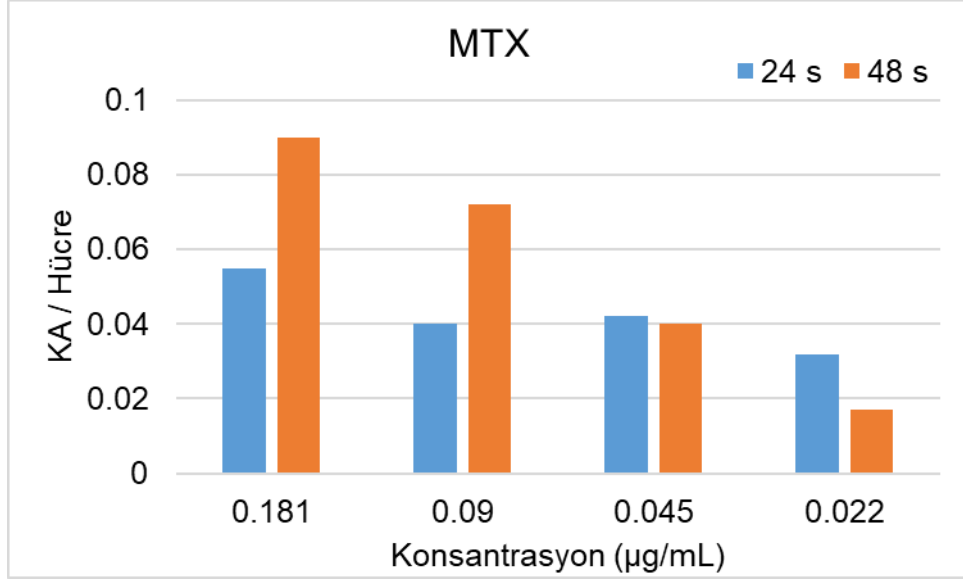
Test maddesi	Muamele		Kromozom Anormallikleri							
	Süre (s)	Doz(µg/mL)	B'	B''	F	SU	CE	P	DS	
K (-) ^a	24	0	8	1	-	2	-	2	-	
K (+) ^b		0.1	23	14	1	-	5	2	-	
ÇK		0.1	1	-	-	3	1	2	-	
MTX		0.181	11	8	1	-	2	-	-	
		0.09	3	8	3	-	-	2	-	
		0.045	5	6	-	1	-	4	-	
		0.022	7	2	-	-	-	4	-	
K (-) ^a	48	0	8	1	-	2	-	2	-	
K (+) ^b		0.1	6	7	-	-	3	-	-	
ÇK		0.1	4	1	-	-	-	1	-	
MTX		0.181	21	13	-	-	-	2	-	
		0.09	17	4	1	-	2	4	-	
		0.045	2	8	2	2	1	1	-	
		0.022	1	3	1	-	1	1	-	

B': Kromatid Kırığı; B'': Kromozom Kırığı; F: Fragment; SU: Kardeş Kromatidlerin Birleşmesi; DS: Disentrik Kromozom; P: Poliploidi a: Kontrol b: Pozitif kontrol, Mitomisin C * p<0,05

PMT ve MTX'e ait konsantrasyon ve muamele süresine bağlı KA/Hücre grafikleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda PMT'nin 24 ve 48 saat muamele edilen periferall lenfositlerinde KA/Hücre'nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren grafik



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda MTX'in 24 ve 48 saat muamele edilen periferall lenfositlerinde KA/Hücre'nin konsantrasyona bağı artışını gösteren grafik

4.1.2. PMT ve MTX'in mikronükleus (MN) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) üzerindeki etkilerinin incelenmesi

PMT ve MTX maddelerinin insan periferall lenfositlerinde dört farklı konsantrasyon ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucu elde edilen; mikronükleus (MN), mikronükleuslu binükleer hücre (BNMN) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri sırasıyla PMT ve MTX için Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6 verilmiştir. Elde edilen veriler mikronükleus ve mikronükleuslu hücre frekansı açısından değerlendirildiğinde; PMT ile hem 24 hem de 48 saat muamele süreleri sonucunda insan periferall lenfositlerinde MN ve BNMN frekanslarının tüm dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde değişikliğe neden olmazken NBI değerinde her iki muamele süresinde ve tüm dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalmaya neden olmuştur.

Çizelge 4.5. Kontrol grupları ve PMT'nin farklı dozlar ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde mikronukleus (MN), mikronukleuslu binukleer hücre (BNMN) ve nukleer bölünme indeksi (NBI) değerleri

Test maddesi	Muamele		MN±SD (‰)	BNMN±SD (‰)	NBI±SD
	Süre(s)	Doz µg/mL)			
K (-)^a	24	0	1,750±2,872	1,000±1,414	1,480±0,098
K (+)^b		0,1	4,500±5,446	4,500±5,446	1,283±0,121
PMT		2,388	2,250±1,500	2,250±1,500	1,270±0,102**
		1,194	1,250±1,500	1,250±1,500	1,259±0,135**
		0,597	1,250±1,892	1,000±1,414	1,284±0,068**
		0,298	1,000±1,154	1,000±1,154	1,324±0,110
K (-)^a	48	0	1,750±2,872	1,000±1,414	1,480±0,098
K (+)^b		0,1	15,500±9,882	14,75±9,810	1,152±0,075
PMT		2,388	7,000±4,690	6,750±4,500	1,42±0,065**
		1,194	9,000±6,976	7,750±6,020	1,142±0,039**
		0,597	10,00±6,271	9,250±5,795	1,134±0,040**
		0,298	9,500±7,047	7,916±6,921	1,199±0,063**

* p<0,05, *** p<0,01, a: Kontrol, b: Pozitif kontrol, Mitomisin C

MTX ile yapılan MN çalışmamızda hem 24 hem de 48 saat muamele süreleri sonucunda insan periferel lenfositlerinde MN ve BNMN frekanslarının tüm dozlarda istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gözlenmezken, aynı muamele sürelerinde NBI frekansında sadece en yüksek konsantrasyonlarda (0,181 µg/mL) istatistiki olarak önemli düzeyde düştüğü, diğer tüm konsantrasyonlarda istatistiki olarak önemli bir değişikliğin olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.6. Kontrol grupları ve MTX'in farklı dozlar ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde mikronukleus (MN), mikronukleuslu binukleer hücre (BNMN) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri

Test maddesi	Muamele		MN±SD (‰)	BNMN±SD (‰)	NBI±SD
	Süre(s)	Doz µg/mL)			
K (-)^a	24	0	11,750±8,655	11,000±7,702	1,555±0,136
K (+)^b		0,1	10,750±8,539	15,500±3,872	1,345±0,169
ÇK		0,1	8,750±5,737	8,500±5,507	1,478±0,074
MTX		0,181	10,750±4,573	10,250±4,349	1,399±0,048**
		0,090	16,250±14,080	14,750±11,701	1,510±0,126
		0,045	13,000±6,976	13,000±6,976	1,505±0,129
		0,022	13,250±7,932	13,250±7,932	1,458±0,029
K (-)^a	48	0	11,750±8,655	11,000±7,702	1,555±0,136
K (+)^b		0,1	26,00±5,163	25,250±4,272	1,262±0,118
ÇK		0,1	14,000±13,341	13,000±12,138	1,523±0,046
MTX		0,181	13,750±3,862	13,250±3,774	1,203±0,051***
		0,090	10,250±5,852	10,250±5,852	1,485±0,171
		0,045	14,750±8,958	14,750±8,958	1,485±0,053
		0,022	12,000±5,830	11,750±5,619	1,550±0,098

* p<0,05, *** p<0,01, a: Kontrol, b: Pozitif kontrol, Mitomisin C

4.1.3. Bulguların diğer çalışmalarla birlikte değerlendirilmesi

Tez kapsamı çalışmasından önce yapılan literatür taramalarında PMT ve MTX etken maddeleri için olası genotoksik ve sitotoksik etkisi ile ilgili yapılmış çok az çalışma bulunmuştur. Bunlardan ilkinde, Çobanoğlu ve ark. (2017), Pemetrekset'in genotoksik potansiyelinin in vitro koşullarda kuyruklu yıldız testi (comet) kullanılarak değerlendirmişlerdir. Çalışmada, alkali tek hücre jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. İki sağlıklı bireyden alınan insan periferal kan örneklerinden elde edilen lökositler, etken maddenin dört farklı konsantrasyonu (25, 50, 75 ve 100µg/mL) ile 1 saat muamele sonucunda DNA hasarı bakımından 75µg/mL (p<0,05) ve 100µg/ml'de (p<0,01) negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu sonuç, pemetrekset'in normal lökositler üzerine genotoksik potansiyelinin olabileceğini göstermiştir. Yaptığımız bu çalışmada, CA ve MN test sonuçlarına göre PMT test maddesinin hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde genotoksik etki gözlenmemiştir. Farklı sonuçlara ulaşılması seçilen konsantrasyon farkından dolayı olduğu düşünülmektedir.

Benzer şekilde, İstifli ve ark. (2013), İnsan periferal kan lenfositlerinde Pemetrekset genotoksitesisi üzerinde yaptıkları çalışmada 25, 50, 75 ve 100 lg/mL dozlar kullanılmıştır. Bu çalışmada, pemetrekset'in genotoksik potansiyeli periferal kanda değerlendirilmiştir.

Kromozom sapması (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mikronükleus (MN) testleri yapmışlardır. 24 saatlik muamele CA oluşumunu artırırken 48 saatlik muamelede ise CA sayısında bir değişimine neden olmadığını saptamışlardır. 24 ve 48 saatlik periyotlar sonucunda SCE sıklığının çarpıcı bir şekilde artış gösterdiğini rapor etmişlerdir. Pemetrekset etken maddesinin MI ve NBI değerlerini güçlü bir şekilde azalttığını bildirmişlerdir. 24 ve 48 saatlik periyotlar sonuçlarında dört farklı konsantrasyonlarda Pemetrekset etken maddesinin güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür. Çobanoğlu ve ark. (2017) yaptığı çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da uygulanan doz miktarının farklılığı sonuçların benzerlik göstermemesinin nedeni olarak düşünülmektedir.

Yang ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada pemetrekseti, mutasyona uğramış/p53-bağımlı ve bağımsız sinyal yolları ile hem içsel hem de dışsal apoptoz üzerinde etkisini görmek için çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışma, pemetrekset'in A549 hücrelerinde DNA hasarını ve kaspaz-2,3,8 ve 9 aktivasyonunu indüklediğini ve kaspaz inhibitörleri ile tedavinin hücre ölümünü önemli ölçüde ortadan kaldırdığını ve kaspaza bağımlı bir apoptotik mekanizmayı düşündürdüğünü gösterilmiştir. dTTP ile takviyesi ile, normal S-faz ilerlemesi normal seyrinde ilerlediğini gözlemlemişlerdir ve pemetrekset'e yanıt olarak apoptotik ölümü kurtarmıştır. Çalışma sonucundaki genel olarak bulgular, timidilat sentazda azalma görülmüştür ve Bax, PUMA, Fas, DR4 ve DR5 genlerindeki artışın, Pemetrekset yanıtı tahmin etmek için biyolojik belirteçler olarak hizmet edebileceğini ortaya koymuştur. Yang ve ark. (2013), elde ettikleri bulgular PMT ile yapmış olduğumuz CA ve MN deneylerinden elde ettiğimiz NBI ve MI değerlerinin her iki muamele sürelerinde kontrole göre düşüş gözlemlenmesi (sitotoksik etkiye sahip olduğu) açısından benzerlik görülmüştür.

Buqué ve ark. (2012), İnsan melanom hücrelerinde Pemetrekset kaynaklı apoptozda rol oynayan moleküler mekanizma üzerine inceleme yapmışlardır. MTA'nın dört insan melanom hücre dizisi A375, Hs294T, HT144, MeWo ve iki NSCLC hücre dizisi H1299 ve Calu-3 üzerindeki etkisi incelemişlerdir. MTA'nın DNA hasarını, S-fazı hücre döngüsü durduğunu ve kaspaz bağımlı ve bağımsız apoptozu indüklediğini bulmuşlardır. MTA, p53 ekspresyonunu indükleyerek, p53'e bağlı genler Mcl-1 ve PIDD'nin yukarı regülasyonuna yol açmıştır, ardından apoptozu iyileştiren Mcl-1'in transkripsiyon sonrası bir regülasyonuna yol açtığı bulgular arasında yer almaktadır. Çalışma sonucundaki veriler, MTA'nın insan malign melanomunun gelecekteki tedavisi için terapötik önemi olabileceğini gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Buqué ve ark. (2012), yaptığı çalışma PMT ile elde ettiğimiz CA ve MN sonuçlarımızla benzerlik göstermemektedir. Bunun nedeni olarak kullanılan hücre tiplerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Diğer taraftan Ashoka ve ark. (2019), İsviçre albino farelerinde yapmış oldukları çalışmada flavonoid olan rutin maddesinin metotreksatın genotoksitesine karşı koruyucu etkilerini gözlemlemişlerdir. Çalışma sırasında beş gün süreyle günde bir kez farklı dozlarda rutin (50, 100 ve 150 mg/kg canlı ağırlık) ve dördüncü gün metotreksat (20 mg/kg/kg) intraperitoneal olarak verilmiştir. Metotreksat uygulamasından 48 saat sonra mikronükleus testi ve kromozom anomali testleri yapılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda, metotreksat'ın polikromatik eritrositlerde mikronükleusu önemli ölçüde indüklediğini ve toplam kromozomal anormalliklerde önemli artışa yol açtığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışma ile metotreksatın genotoksik etkilerine karşı rutin maddesinin başlıca terapötik kullanımı olduğu belirlenmiştir.

Padmanabhan ve ark. (2008), İsviçre erkek farelerinin germ hücreleri üzerinde metotreksatın sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Erkek İsviçre farelerinde MTX tarafından indüklenen hücre toksisitesini araştırmışlardır. Metotreksat dört farklı doz şeklinde (5, 10, 20 ve 40 mg/kg) farelere 5 ve 10 hafta boyunca haftada bir olarak uygulamışlardır. Hayvanlar son metotreksat muamelesinin ardından 1 hafta sonra öldürülmüştür. Germ hücre toksisitesi, testis ağırlığı, sperm sayısı, sperm baş morfolojisi, sperm kuyruklu yıldız testi, TUNEL ve testiste halo testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan metotreksat çalışması sonucunda, sperm sayısı önemli ölçüde azalmıştır ve doza bağlı bir şekilde sperm başı anormalliklerinin oluşumunun arttığı raporlanmıştır. Testis toksisitesini indüklediği gözlemlenmiştir. Testiste, sperm kuyruklu yıldız, TUNEL ve halo testi ile Metotreksat'ın önemli ölçüde DNA hasarı ortaya çıkardığı bulgular arasında yer almıştır. Gerçekleştirilen bu çalışma sonucuna dayanarak, metotreksat'ın farelerde germ hücre toksisitesini indüklediği sonucuna varılmıştır.

Başka bir çalışmada Shahin ve ark. (2001), Wistar albino sıçanları ve romatizmal eklem iltihabı hastaları (RA) üzerinde folinik asidin düşük doz Metotreksat'ın genotoksitesini üzerindeki koruyucu etkisini incelemişlerdir. Folinik asidin metotreksat sitogenotoksitesine karşı koruyucu etkisini incelemek için yapılan bu çalışmada her iki cinsiyetten kırk sıçan rastgele dört eşit gruba ayrılmış ve farklı konsantrasyonlarda dozlar uygulanmıştır. Dozlar, art arda 8 gün boyunca günde bir kez olarak verilmiştir. Her sıçan için bir kemik iliği kromozomal çalışması ve bir mikronükleus testi yapılmıştır. Bir ay boyunca haftalık 10 mg metotreksat dozu alan RA'lı 20 hastaya (5 erkek ve 15 kadın), metotreksat uygulamasından 4 saat sonra tek doz olarak 10 mg folinik aside ek olarak aynı doz metotreksat uygulaması yapılmıştır. Her hasta için kromozomal çalışmalar ve mikronükleus testi değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda, hayvanlarında artan kromozomal

anormallik ve mikronükleus oluşumu ve folinik asit, metotreksat'ın neden olduğu genetik hasarlara karşı önemli bir koruma ürettiği ortaya konulmuştur. RA hastalarında folinik asit, metotreksat kaynaklı genetik hasarın tatmin edici bir şekilde iyileşmesini sağladığı görülmüştür.

Yukarıda bahsetmiş olduğumuz çalışmalardan elde edilen sonuçlar MTX ile yaptığımız çalışmamızla farklılık göstermektedir. Bunun nedeni, çalışma yapılan hücrelerin farklı yapıda hücreler olması, muamele sürelerinin farklılığı, uygulanan doz miktarının farklı olması ve farklı test yöntemlerinin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2. Spektroskopik DNA Etkileşim Çalışmaları

Bu bölüme ilaç etken maddelerinin Uv-vis ve floresans spektrofotometresi ile DNA etkileşim çalışmaları gerçekleştirilmiş ve EB ile floresans sönüm çalışmaları yapılmıştır.

4.2.1. Uv-vis spektrofotometresi ile yapılan çalışmalar

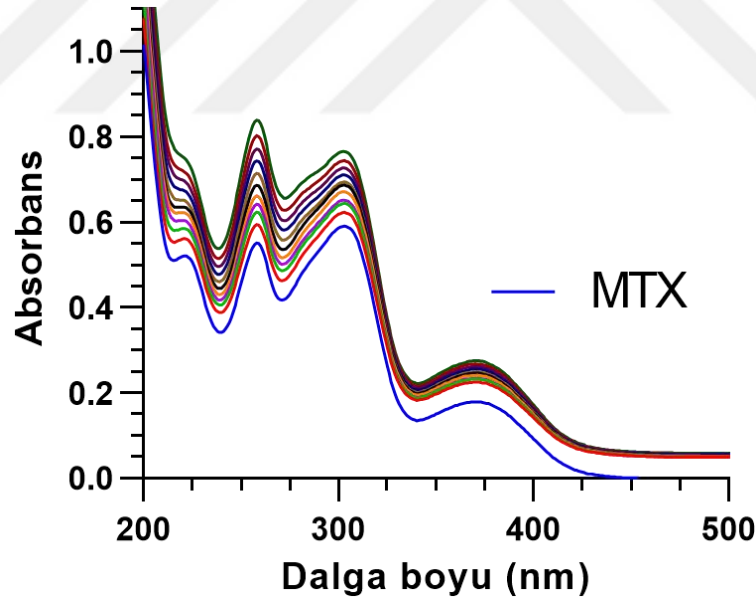
Elektronik absorpsiyon spektroskopisi, biyomoleküllerin küçük moleküllerle etkileşimlerinde bağlanma afinitesini incelemek için en basit ve en kolay yöntemlerden biridir. Elektronik absorpsiyon spektroskopisi, yüksek duyarlılığı nedeniyle DNA'ya bağlanan küçük molekülleri ortaya çıkarmak için standart bir yöntemdir. Ligandların veya DNA moleküllerinin absorpsiyon spektrum bantlarının yoğunluğu ve konumu gibi parametrelerdeki değişiklikler, bunlar arasındaki olası etkileşimi ve kompleks oluşumunu tespit eder. Bu yöntemde tepe yoğunluğunda ve tepe konumunda herhangi bir değişiklik, çözeltideki ikinci kompleksin varlığını gösterebilir ve etkileşim mekanizmasını izlemek için kullanılabilir.

Genel olarak DNA ile küçük molekül/ilac titrasyonundan sonra elde edilen absorpsiyon spektrumlarında kırmızıya kayma/maviye kayma ve hiperkromik/hipokromik gibi dört ana etki gözlenir. Bu dört etki, DNA sarmalının konformasyonundaki değişiklikler ve küçük moleküllerle etkileşim nedeniyle bağlanma yeteneğinin belirteçleri olarak kabul edilir [92].

Genel olarak, DNA çözeltisine eklenen ligand veya küçük molekül, absorpsiyon zirvesinin kırmızıya kayması nedeniyle DNA'nın bir miktar hipokromizme maruz kalmasına neden olabilir. İnterkalasyon-bağlanma modunda, küçük molekülün spektrumunda kırmızıya kayma ve DNA varlığında çok az hipokromizm görülebilir veya hiç görülmeyebilir. Bu fenomenin nedeni, π - π^* konjugasyonunun, DNA baz çiftlerindeki π orbitali ile küçük moleküllerin π^* orbitalinin etkileşimi nedeniyle meydana gelmesi ve

küçük moleküllerin kromofor grupları arasında bir tür istifleme etkileşimi bulunmasıdır. Molekül ve DNA baz çiftlerinde, $\pi-\pi^*$ geçiş enerjisindeki azalma, maksimum tepe konumunda bir azalmaya ve kırmızıya kaymanın çok az olmasına veya hiç olmamasına neden olur [93–95]. Spektrumda görülen hiperkromik etki, elektrostatik bağlanma modu ile ilişkilidir ve DNA'ya bağlanan küçük molekül, DNA'nın yapısındaki esnekliği ve çeşitliliği yansıtan bir hiperkromik etki ile sonuçlanır. Ek olarak, başka bir bağlanma modunda, küçük molekülün oluk bağlanma modu aracılığıyla DNA ile bağlanması, hipokromik veya hiperkromik bir etki ve tepe konumunda küçük bir kayma veya hiç kayma olmaması ile sonuçlanır [72,96].

Şekil 4.10'da 20 μM MTX üzerine artan derişimlerde fsDNA eklenmesiyle elde edilen spektrumlar verilmiştir. Eklenen fsDNA ile elde edilen absorpsiyon spektrumları, DNA-İlaç ölçümündeki (aynı miktarda eklenen fsDNA) spektrumdan çıkarılmış ve nihai spektrumlar elde edilmiştir. MTX'in yalnız başına spektrumu incelendiğinde MTX; 221, 258, 303 ve 370 nm'de belirgin 4 ana bant sergilemiştir. fsDNA eklenmesiyle birlikte özellikle 258 nm'de bulunan tepe noktası hiperkromik etki göstermiştir.

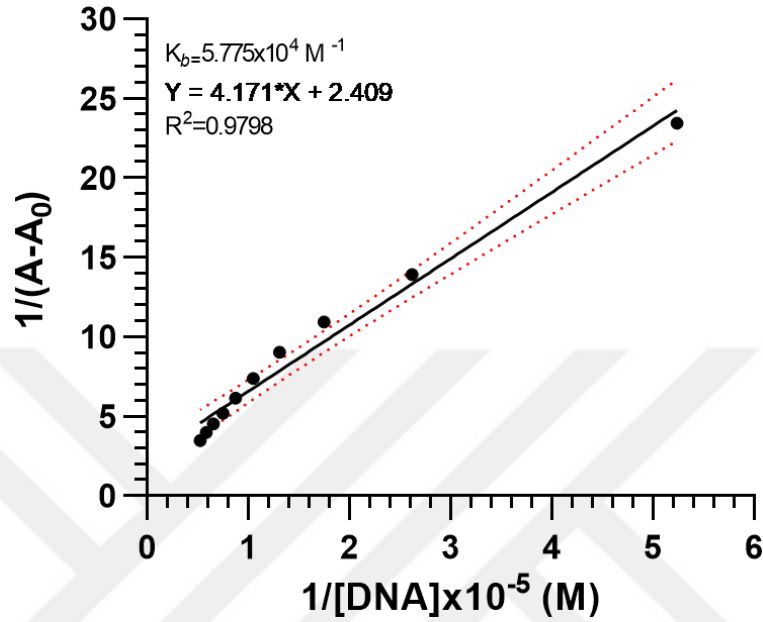


Şekil 4.10. MTX'in artan derişimlerde fsDNA etkileşimine ait spektrumlar

Şekil 4.10'da verilen spektrumlar analiz edilerek Şekil 4.11 elde edilmiştir. Elde edilen doğru denklemi kullanılarak DNA ile bağlanma sabiti/birleşim sabiti, Benesi-Hildebrand eşitliği uygulanarak belirlenmiştir (Eşitlik 1).

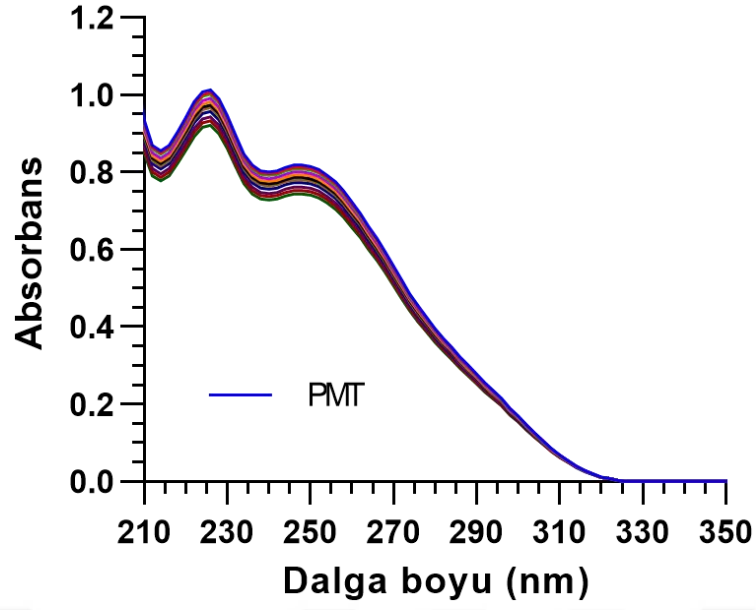
$$1/(A - A_0) = \epsilon_d/(\epsilon_d - \epsilon_c) + \frac{\epsilon_d}{\epsilon_d - \epsilon_c} x 1/Kb[\text{DNA}] \quad (1)$$

Formüldeki A_0 ve A değerleri sırasıyla ortamdaki DNA yokluğundaki ve varlığındaki absorbans değerlerini ifade ederken, ϵ_d ve ϵ_c ise ilaç ve ilaç-DNA kompleksine ait absorpsiyon katsayılarını ifade etmektedir. $1/(A-A_0)$ 'a karşı $1/[DNA]$ grafiğinden elde edilen veriler sonucu bağlanma sabiti (K) $5.775 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

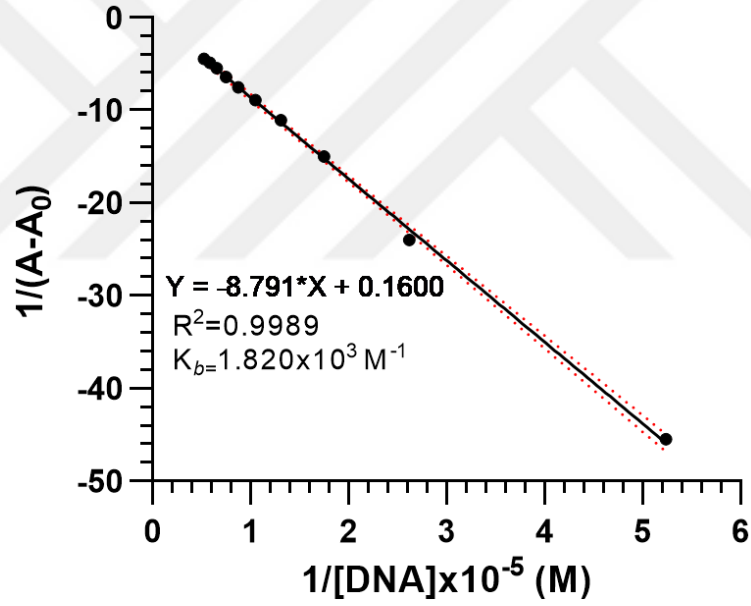


Şekil 4.11. $1/(A-A_0)$ 'a karşı $1/[DNA]$ grafiği (MTX)

Şekil 4.12'de $50 \mu\text{M}$ PMT üzerine artan derişimlerde fsDNA ($10\text{-}100 \mu\text{M}$) eklenmesiyle elde edilen spektrumlar verilmiştir. PMT'nin ortamda DNA olmadan elde edilen spektrumu incelendiğinde 228 nm 'de belirgin bir pike sahip olduğu görülmektedir. Artan DNA derişimi ilavesiyle bu tepe noktası hipokromik bir etki sergilemiş ve PMT-DNA kompleks sisteminin absorbansı düşmüştür. Eşitlik 1'deki denklem kullanılarak yapılan hesaplamalarda bağlanma sabiti (K) $1.820 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. PMT'in artan derişimlerde fsDNA etkileşimine ait spektrumlar



Şekil 4.13. $1/(A-A_0)$ 'a karşı $1/[DNA]$ grafiğı (PMT)

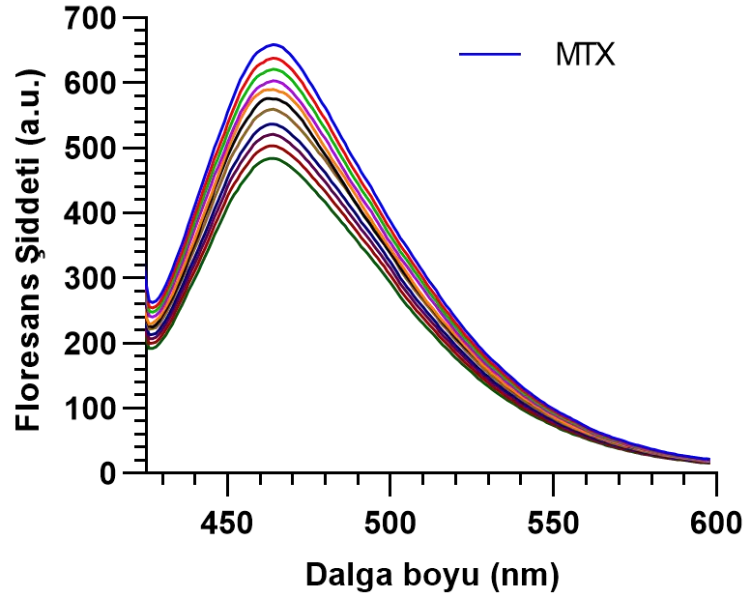
Uv-vis spektrofotometresi ile yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde spektrumlarda görülen; MTX için hiperkromik, PMT için hipokromik etki her iki molekülün DNA ile etkileşiminde interkalasyondan ziyade oluk bağlanması modunun daha güçlü olduğunu söylemek mümkündür. Bu nedenle ayrıntılı bağlanma modu hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için floresans spektroskopisi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. Floresans ile yapılan çalışmalar

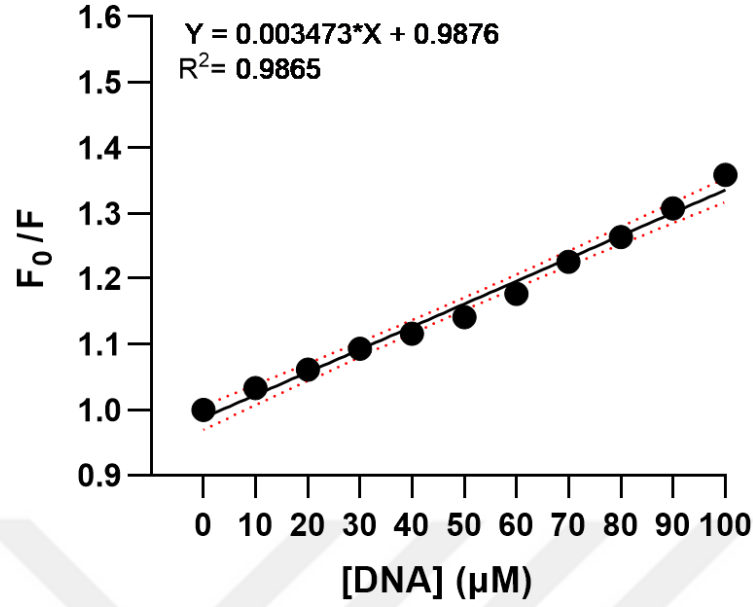
İlaç etken maddeleri ve fsDNA arasındaki etkileşimi daha fazla araştırmak için kararlı durum floresans (söndürme) deneyleri gerçekleştirilmiştir. Floresans, moleküler etkileşimlerle ilgili temel bilgileri araştırmak için doğrudan, hassas ve hızlı bir tekniktir. DNA çok zayıf bir endojen floresansa sahiptir; bu nedenle, ilaç etken maddelerinin fsDNA ile etkileşimini incelemek ve bağlanma yapısını belirlemek için bir prob olarak kullanılmıştır.

MTX ile yapılan çalışmalarda sabit MTX konsantrasyonu (20 μ M), 376 nm'de uyarılmış ve floresan emisyonu, 466 nm'de maksimumu gösteren 420 ila 650 nm arasında kaydedilmiştir. Artan fsDNA konsantrasyonu ile, MTX ve fsDNA arasındaki etkileşimin gerçekleşmiş olduğuna atfedilen tepe pozisyonunda kayda değer herhangi bir değişiklik olmaksızın floresan şiddetinde ilerleyici bir söndürme olmuştur (Şekil 4.14). Floresans yoğunluğundaki azalmanın fsDNA konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur. MTX ve fsDNA arasındaki etkileşimleri nicel olarak ifade etmek için elde edilen grafik, fsDNA konsantrasyonuna karşı fsDNA'nın (F₀/F) varlığında ve yokluğunda MTX'in tepe floresan emisyonu [Q] Stern-Volmer denklemi (Eşitlik 2) kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.15).

$$F_0/F = K_{sv}[Q] + 1 \quad (2)$$



Şekil 4.14. MTX'in fsDNA'nın değişen konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda floresan spektrumu



Şekil 4.15. MTX-DNA etkileşimi için Stern-Volmer grafiği

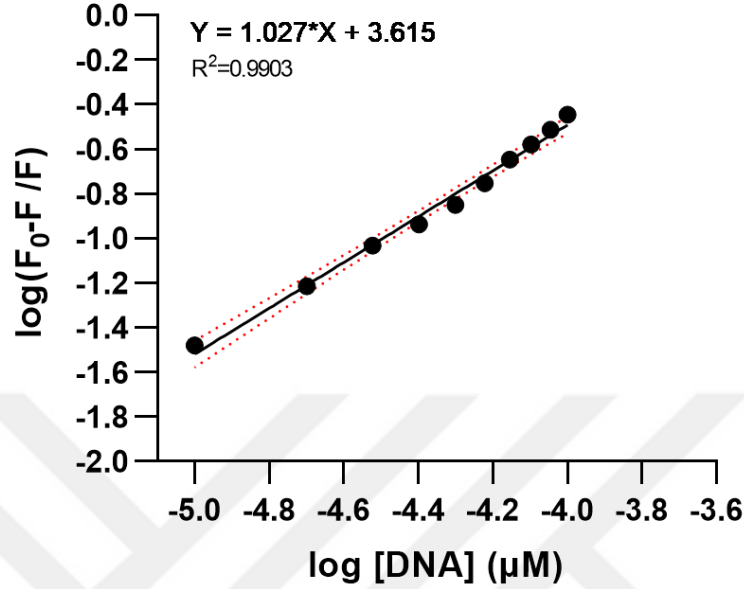
Şekil 4.15’den elde edilen doğru denklemi doğrultusunda MTX için K_{sv} değeri $3.516 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Stern–Volmer grafiğinden elde edilen veriler, yalnızca söndürme sürecini doğrular, ancak bu söndürme işleminin statik mi yoksa dinamik mi olduğunu bildirmez. Söndürme sürecini daha fazla doğrulamak için biyomoleküler söndürme hızı sabiti denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3) [68].

$$K_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad (3)$$

Burada τ_0 (sınırlayıcı difüzyon hızı sabiti), değeri tipik olarak 10^8 s^{-1} ’ye yakın olan söndürücünün yokluğunda bir floroforun ortalama ömrüdür. Hesaplanan K_q değeri 10^{11} s^{-1} mertebelerinde olduğu için MTX ve DNA arasındaki bağlanma işleminde söndürmenin dinamik tipinden ziyade statik olduğu doğrulanmıştır. Statik söndürme, temel durumda söndürücü ile florofor arasındaki kompleks oluşumu nedeniyle ortaya çıkar ve dinamik söndürme, bunlar arasındaki çarpışmalar nedeniyle meydana gelir [97]. Floresan söndürme verileri, modifiye edilmiş Stern-Volmer grafikleri yoluyla MTX-fsDNA etkileşimi için çeşitli bağlanma parametrelerini tahmin etmek için de kullanılabilir. Bağlanma sabiti ve bağlama bölgelerinin sayısı 'n' aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir (eşitlik 4).

$$\log(F_0 - F)/F = \log K_b + n \log [\text{DNA}] \quad (4)$$

Eşitlik 4'den elde edilen doğru denklemi Şekil 4.16'da verilmiş ve K_b (bağlanma sabiti) ve n (bağlanma kısım sayısı) sayıları elde edilmiştir. Buna göre MTX için n sayısı 1.027 K_b ise $4.120 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



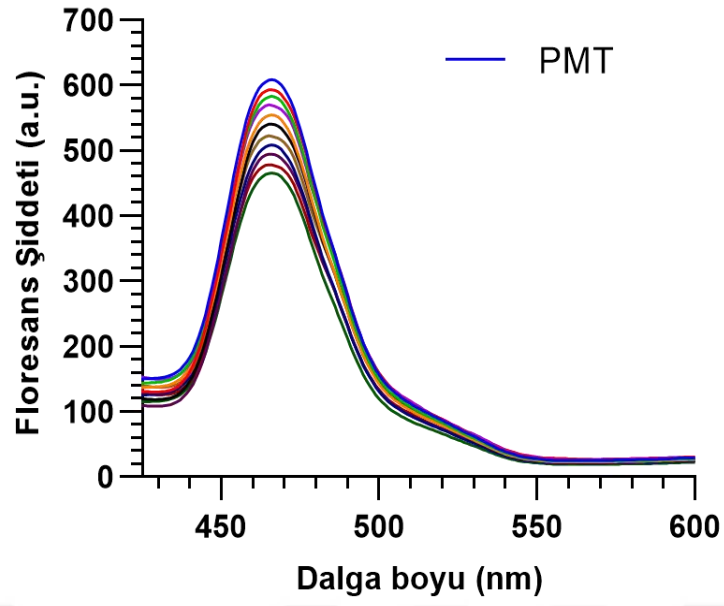
Şekil 4.16. MTX–DNA etkileşimi için çift-logaritma grafiği

MTX ve DNA etkileşiminde yukarıda bahsedilen bağlanma sabitleri ve parametrelerine ilişkin değerler Çizelge 4.7'de özetlenmiştir.

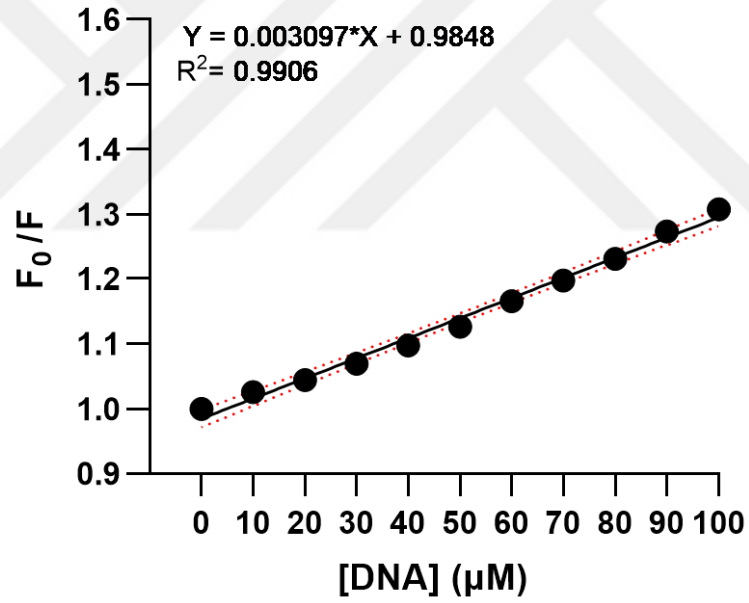
Çizelge 4.7. MTX'in fsDNA ile etkileşimi için elde edilen bağlanma parametreleri

$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	$K_q (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	n	$K_b (\text{M}^{-1})$
3.516×10^3	3.516×10^{11}	1.027	4.120×10^3

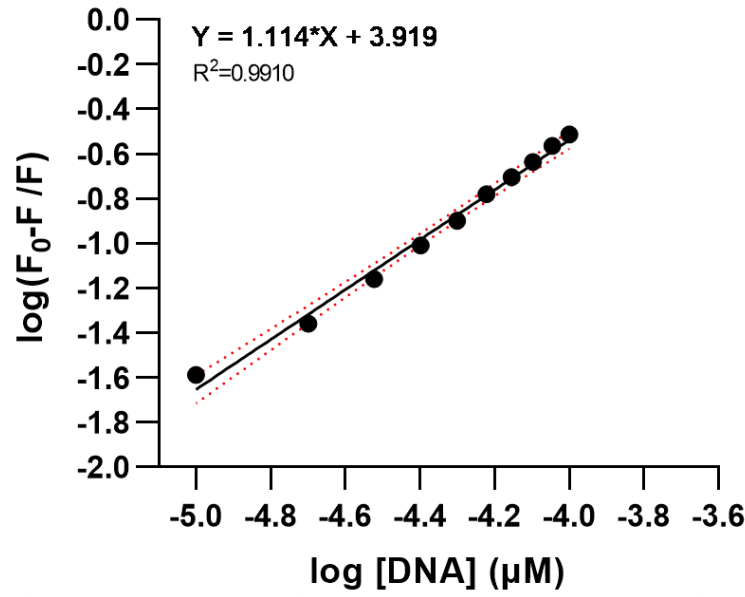
PMT ile yapılan çalışmalarda sabit PMT konsantrasyonu (50 µM), 329 nm 'de uyarılmış ve floresan emisyonu, 463 nm 'de maksimumu gösteren 420 ila 650 nm arasında kaydedilmiştir (Şekil 4.17). Artan fsDNA konsantrasyonu ile, MTX ile benzer şekilde PMT ve fsDNA arasındaki etkileşimin gerçekleşmiş olduğuna atfedilen tepe pozisyonunda kayda değer herhangi bir değişiklik olmaksızın floresan şiddetinde ilerleyici bir söndürme olmuştur. Elde edilen spektrumlardan eşitlikler 2, 3 ve 4 kullanılarak K_{sv} , K_b , K_q ve n değerleri hesaplanmıştır. PMT-DNA etkileşimi için Stern-Volmer grafiği Şekil 4.18'de çift logaritma grafiği ise Şekil 4.19'da verilmiştir. Elde edilen veriler ve bağlanma sabitleri Çizelge 4.8'de özetlenmiştir.



Şekil 4.17. PMT'nin fsDNA'nın değişen konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda floresan spektrumu



Şekil 4.18. PMT-DNA etkileşimi için Stern-Volmer grafiği



Şekil 4.19. PMT–DNA etkileşimi için çift-logaritma grafiği

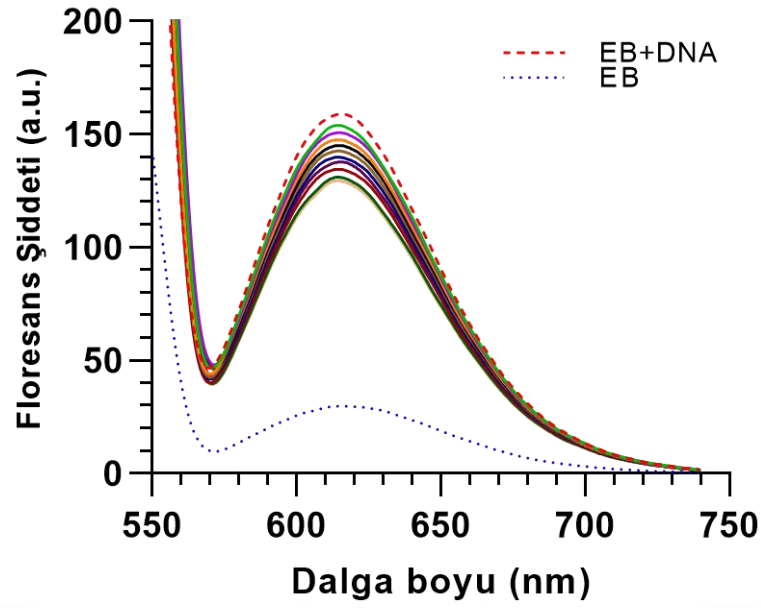
Çizelge 4.8. PMT'nin fsDNA ile etkileşimi için elde edilen bağlanma parametreleri

$K_{sv} (M^{-1})$	$K_q (M^{-1} s^{-1})$	n	$K_b (M^{-1})$
3.144×10^3	3.144×10^{11}	1.114	8.298×10^3

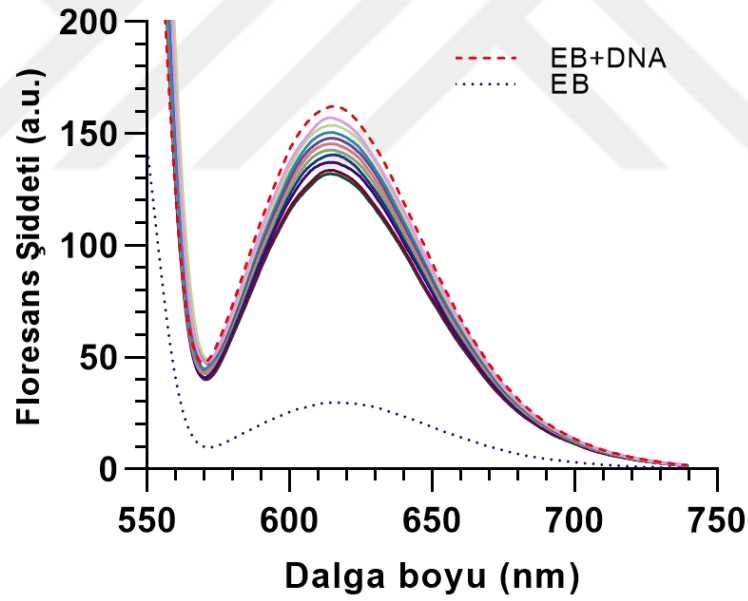
4.2.3. EB-fsDNA floresans sönüm çalışmaları

İlaç etken maddeleri ve fsDNA'nın bağlanma modu, bağlanma modları iyi kurulmuş olan etidyum bromür (bağlı prob) ile yarışmalı yer değiştirme deneyleri kullanılarak ayrıca incelenmiştir. Bağlı prob, ilaç moleküllerinin bağlanmasıyla yer değiştirirse, ilacın DNA'yı yer değiştirmiş prob ile benzer bir şekilde bağladığı varsayılabilir [98]. İnterkalatif bağlanma modu için, bir prob olarak yaygın olarak etidyum bromür kullanılır [99]. Etidyum bromür (EB), solvent molekülleri tarafından söndürülmesi nedeniyle sulu ortamda zayıf floresan yoğunluğu gösterir. Bununla birlikte, EB yapısında bulunan düzlemsel fenantridinyum halkası DNA'nın baz çiftleriyle birleştiğinde floresan yoğunluğu artar [100]. Daha önce bildirildiği gibi, EB-fsDNA kompleksinin artan floresan yoğunluğu, interkalasyon modu yoluyla bağlanan ilaçla söndürülebilir [101].

Her iki ilaç için Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de gösterildiği gibi, EB-fsDNA'nın floresan yoğunluğundaki söndürme, EB-fsDNA komplekslerinin artan derişimlerde MTX ve PMT (0-100 μM) ile titre edilmesiyle incelenmiş ve etken maddelerin EB-fsDNA kompleksinin floresan yoğunluğunu söndüremediği bulunmuştur. Bu nedenle, her iki etken madde içinde minör oluklarda oluk bağlanma modu aracılığıyla fsDNA'ya bağlandığı önerilebilir.



Şekil 4.20. EB-fsDNA kompleksinin MTX ile yarışmalı floresan emisyon spektrumları



Şekil 4.21. EB-fsDNA kompleksinin PMT ile yarışmalı floresan emisyon spektrumları

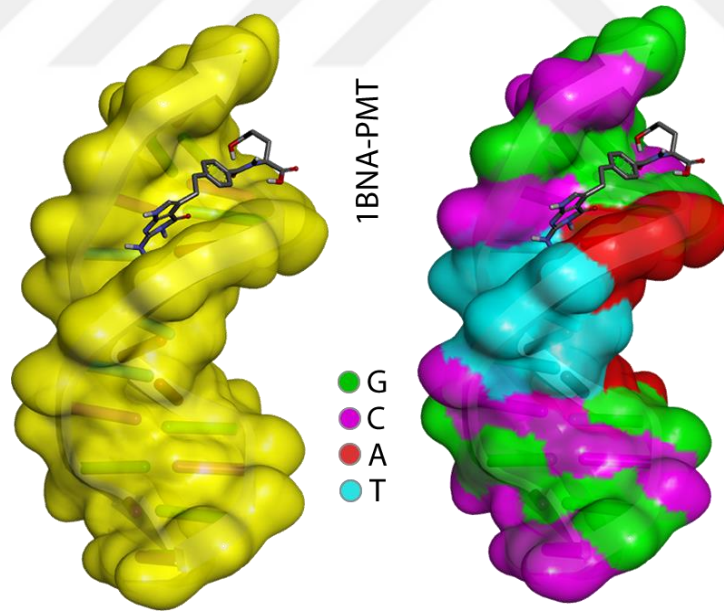
4.3. Moleküler Kenetleme Analizi

Moleküler kenetleme çalışmaları, biyolojik makromoleküllerin küçük moleküllerle bağlanma etkileşim mekanizmalarının araştırılmasında artan bir ilgi kazanmıştır. Moleküler kenetleme, reseptör-ligand kompleksinin en kararlı yapısını, bağlanma eğilimini ve bağlanma modunu tahmin etmek için rasyonel ilaç tasarımı değerli bir tekniktir, böylece etkileşim detayları yeni ilaç keşfi ve geliştirme sürecinde daha iyi tanınabilir ve incelenebilir.

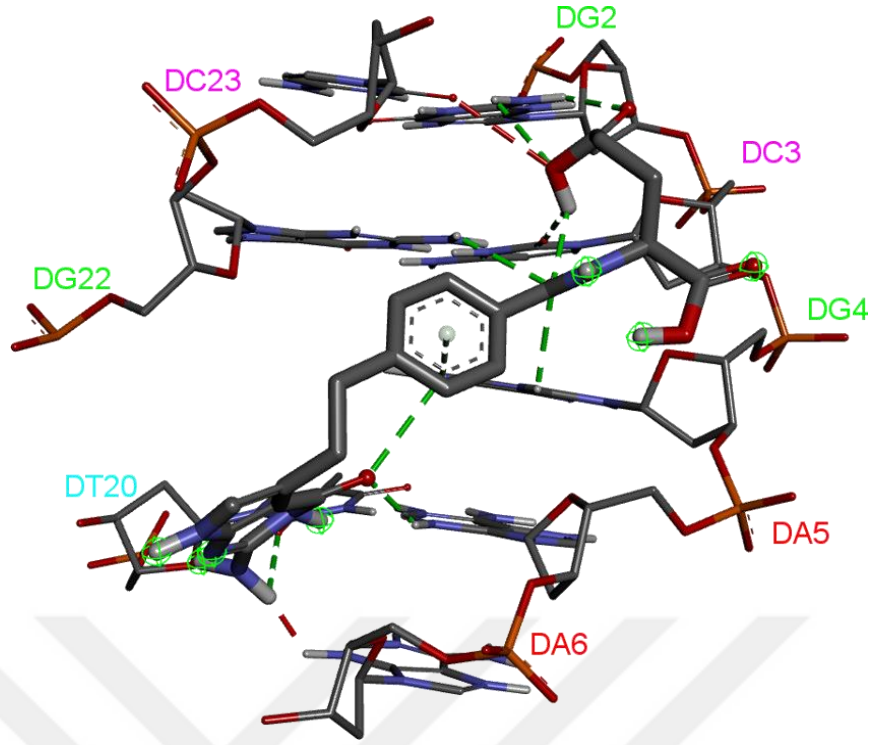
Bu yöntem genellikle ilaç tasarımı ve geliştirmenin önemli adımlarında sanal arama araçları olarak kullanılır. DNA üzerinde ligandların tercih edilen yerini bulmak için moleküler kenetleme çalışmaları yapılmıştır. Genel olarak, etkileşimden kaynaklanan bağlanma enerjisi ne kadar negatif olursa, küçük molekül ve DNA'nın oluşturduğu kompleks o kadar kararlı ve küçük molekül ve DNA arasındaki etkileşim o kadar güçlü olur.

Bu çalışmada 1BNA sekansı (d(CGCGAATTCGCG)₂) kullanılarak PMT ve MTX için moleküler yerleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

PMT ile yapılan kenetlenme işleminde bağlanma enerjisi (kenetlenme skoru) -8.7 Kcal/mol olarak bulunmuştur. Oluşan PMT-DNA komplekslerinin kararlı yapısında H-bağ etkileşimlerinin baskın bir rol oynadığı görülmüştür. PMT-DNA kompleksinin kenetlenmiş pozunun bağlanma enerjisi bakımından en uygun gösterimi 3 boyutlu olarak Şekil 4.22'de verilmiştir. Buna göre PMT bağlanma bölgesi olarak DNA yapısındaki küçük oluğu tercih etmiştir. PMT-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde 3 boyutlu bağlanma pozu Şekil 4.23'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde PMT'nin bağlanma bölgesi olarak DNA'nın G-C bakımından zengin nükleotidlerin bulunduğu bölgede küçük oluk diye tabir ettiğimiz lokasyonda konumlandığı anlaşılmıştır.

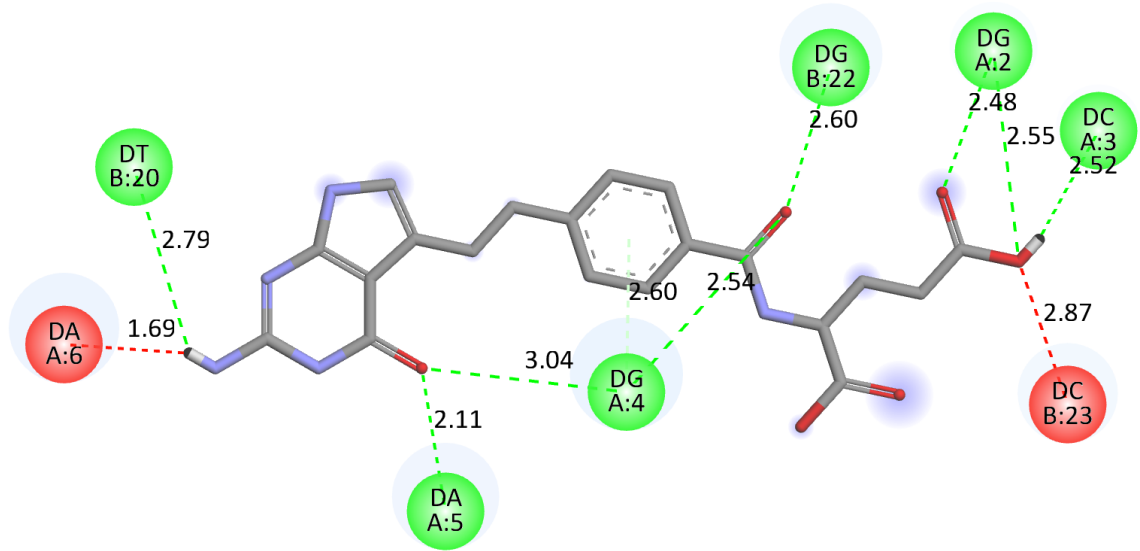


Şekil 4.22. PMT-DNA kompleksinin 3 boyutlu bağlanma pozu



Şekil 4.23. PMT-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde 3 boyutlu bağlanma pozu

PMT ve DNA arasındaki etkileşimin atomik düzeyde iki boyutlu olarak grafiği incelendiğinde, PMT için DNA'nın hem A hem de B zinciri ile 12 farklı H-bağ etkileşimine sahip olduğu görülmektedir. PMT'nin nükleotid bağlanması ve moleküler yapısı göz önüne alındığında, PMT-DNA kompleksinde oluşan hidrojen bağlarının, guanin ve sitozin nükleotidlerinin yoğun olduğu bölgede yer aldığı görülmüştür. Bununla birlikte PMT yapısında bulunan ve bileşiğin piteridin halkasına bağlı amin grubundaki hidrojen atomlarından biri deproton olarak DNA'nın A zincirindeki 6 numaralı adenin yapısında bulunan H atomu ile donor-donor (PMT:H-A:DA6:H3) etkileşimi göstermiştir. Benzer durum molekülün diğer ucunda bulunan karboksil grubunda bulunan H ile B zincirinde bulunan sitozin (:PMT:O - B:DC23:O2) yapısındaki H arasında gerçekleşmiştir. Bu durum Şekil 4.24'de tasvir edilmiştir. Şekildeki kırmızı dairesel halkalar bahsi geçen nükleotidleri temsil ederken yeşil halkalar klasik H bağları yapan nükleotidleri temsil etmektedir. PMT için, molekülün küçük oluk boyunca bağlanma yeteneği sergilemek üzere konformasyonunda önemli bir değişiklik meydana gelmiştir ve bu konformasyonel değişiklik, DNA küçük oluğunun yapısı ile yakından ilişkilidir. Ayrıca bu durum PMT-DNA kompleksinin oluştuğunun önemli bir göstergesi olarak nitelendirilebilir. PMT-DNA kompleksi için nükleotidler ve PMT arasında oluşan bağları, bağ tiplerini ve bağ uzunluklarını gösteren veriler Çizelge 4.9'da özetlenmiştir.

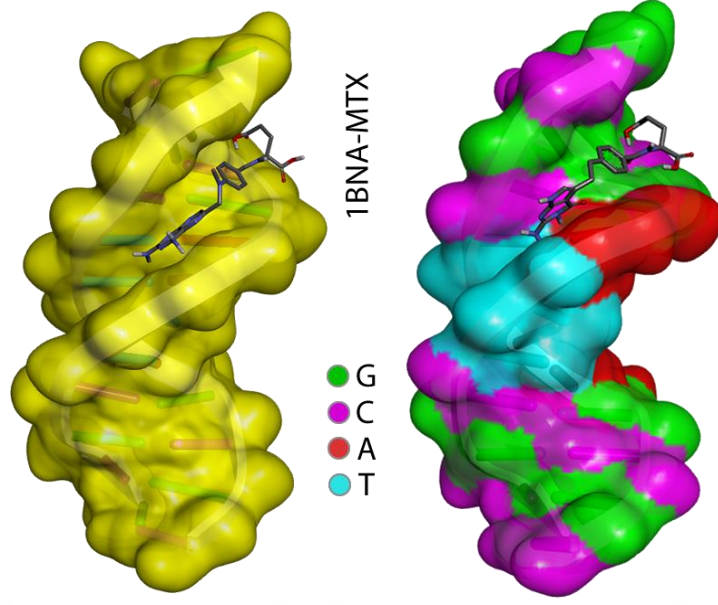


Şekil 4.24. PMT-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde 2 boyutlu bağlanma pozu

Çizelge 4.9. PMT-DNA kompleksine ait etkileşim verileri

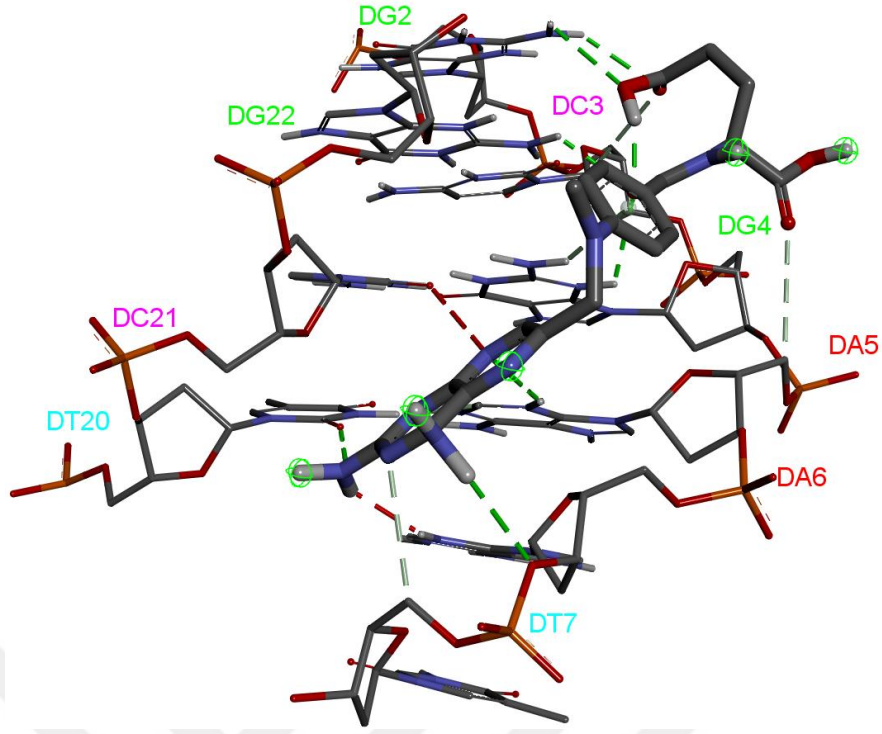
Etkileşim	Bağ Uzunluğu (Å)	Bağ Türü
:PMT:H - B:DT20:O2	2.78972	H bağı
:PMT:H - :PMT:O	2.10783	H bağı
:PMT:H - A:DC3:O2	2.51538	H bağı
A:DG2:H21 - :PMT:O	2.47698	H bağı
A:DG2:H22 - :PMT:O	2.5544	H bağı
A:DG4:H22 - :PMT:O	3.03715	H bağı
A:DG4:H3 - :PMT:O	2.5361	H bağı
A:DA5:H3 - :PMT:O	2.10598	H bağı
B:DG22:H22 - :PMT:O	2.59519	H bağı
A:DG4:H22 - :PMT	2.59562	H bağı

Çalışmada kullanılan diğer molekül MTX ile yapılan kenetlenme işleminde bağlanma enerjisi (kenetlenme skoru) -9.2 Kcal/mol olarak bulunmuştur. Etkileşime ait 3 boyutlu bağlanma pozu Şekil 4.25’de verilmiştir.



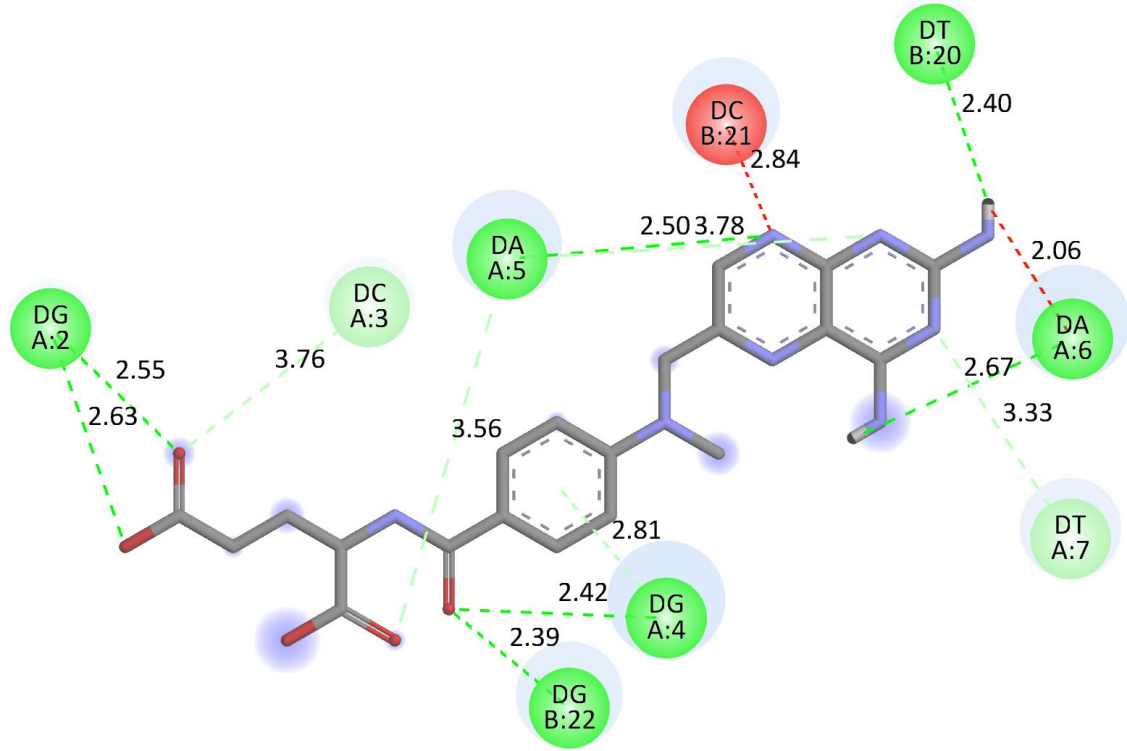
Şekil 4.25. MTX-DNA kompleksinin 3 boyutlu bağlanma pozu

MTX-DNA kompleksinin 3 boyutlu bağlanma pozu incelendiğinde PMT’de olduğu gibi DNA’nın küçük oluğunu bağlanma bölgesi olarak tercih ettiği görülmüştür. MTX ile DNA etkileşiminde PMT’ye göre etkileşen nükleotid sayısı daha fazla olmakla birlikte, bu durum DNA küçük oluğuna bağlanma eğilimi yüksek olan ve yapısal konformasyonu değişen MTX’in sıkıca yerleştiği pozisyonda kararlı bir şekilde tutunduğunu göstermektedir. MTX, DNA küçük oluğunda bağlandığı pozisyonda bulunan hem A hem de B zincirinde tüm nükleotidlerle etkileşmiştir. Bu etkileşimler MTX’in DNA ile sıkıca etkileştiğinin önemli bir göstergesidir. Bu durum nükleotid düzeyinde 3 boyutlu bağlanma pozu ile Şekil 4.26’da açıkça görülmektedir.



Şekil 4.26. MTX-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde 3 boyutlu bağlanma pozu

Şekil 4.27’de verilen MTX-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde iki boyutlu bağlanma pozu gösterimi incelendiğinde ise oluşan etkileşimlerin 3 Å civarında olması ve MTX’in kimyasal yapısı göz önüne alınarak şekil detaylı olarak incelendiğinde, molekülün nükleotidler ile çevrenmesi MTX ve DNA arasında oluşan güçlü ve kararlı etkileşimin başka bir sonucudur. Oluşan etkileşimlerde H bağlarının baskın bir karakter sergilediği görülmüştür. MTX-DNA kompleksi için nükleotidler ve MTX arasında oluşan bağları, bağ tiplerini ve bağ uzunluklarını gösteren veriler Çizelge 4.10’da özetlenmiştir.



Şekil 4.27. MTX-DNA kompleksinin nükleotid düzeyinde 2 boyutlu bağlanma pozu

Çizelge 4.10. MTX-DNA kompleksine ait etkileşim verileri

Etkileşim	Bağ Uzunluğu (Å)	Bağ Türü
:MTX:H - B:DT20:O2	2.39639	H bağı
:MTX:H - A:DA6:O3'	2.666	H bağı
:MTX:H - :MTX:O	1.95425	H bağı
A:DG2:H21 - :MTX:O	2.54801	H bağı
A:DG2:H22 - :MTX:O	2.62925	H bağı
A:DG4:H3 - :MTX:O	2.42207	H bağı
A:DA5:H3 - :MTX:N	2.50271	H bağı
B:DG22:H22 - :MTX:O	2.39484	H bağı
A:DC3:C1' - :MTX:O	3.76209	H bağı
A:DA5:C5' - :MTX:O	3.55883	H bağı
A:DA5:C2 - :MTX:N	3.77782	H bağı
A:DT7:C5' - :MTX:N	3.33426	H bağı
A:DG4:H22 - :MTX	2.81164	H bağı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sitotoksisite ve genotoksisite, herhangi bir kimyasal maddenin özellikle in vitro çalışmalarda biyolojik olarak değerlendirmesi için en önemli ölçütler olarak karşımıza çıkmaktadır. Tıp, kimya, biyoloji, çevre bilimleri ve farmakoloji disiplinlerinin ortak kesişim kümesi düşünüldüğünde ise bu durumun çevre, halk ve insan sağlığı açısından önemi daha kritik ve daha anlamlı bir seviyede ortaya çıkmaktadır. Özellikle sağlık ve çevre söz konusu olduğunda bir ilaç etken maddesinin, kozmetik bir ürünün içindeki kimyasal bileşenin veya çevresel bir kimyasal maddenin (zirai ilaçlar, ağır metaller, kimyasal atıklar) ilk aşamada in vitro testleri kullanarak sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi hayati bir önem taşımaktadır.

Bu tez çalışması özelinde ise kanser tedavisinde yüksek seviyede kullanımı olan folik asit analogu Pemetrekset ve Metotreksat ilaç etken maddeleri ile çalışılmıştır. Bu iki etken madde için sitotoksisite ve genotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir.

PMT ve MTX etken maddelerinin insan periferik lenfositlerindeki genotoksik ve sitotoksik etkisinin araştırıldığı bu çalışmada; dört farklı konsantrasyon ile in vitro koşullarda 24 ve 48 saat muamele sonucu KA ve MN değerleri incelenmiştir. Daimî hale getirilen preparatlarda yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda KA/Hücre, %AH, MI, %MN, %BNMN ile NBI değerleri saptanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırılan verilerden elde edilen sonuçlar; PMT ile 24 saat ve 48 saat muamele sonucunda ve tüm konsantrasyonlarda KA/Hücre ve AH frekanslarında kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli değişiklik gözlenmezken, MTX ile 48 saatlik muamele verilerinde ise; anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen kromozomal anormallik oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalnızca en yüksek 2 dozda (0,181 µg/mL - 0,090 µg/mL) istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırdığı diğer konsantrasyonlarda herhangi bir fark gözlenmediği saptanmıştır.

PMT'nin, mitotik indeks ve nükleer bölünme indeksi gibi hücre bölünme indekslerinde, kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalmalara neden olmuştur. Bu düşüşler PMT'nin sitotoksik potansiyeli ile ilgili önemli ipuçları vermektedir.

MTX'in mitotik indeks frekansında herhangi bir değişim olmazken NBI değerinde ise her iki muamele süresinde sadece en yüksek dozlarda istatistiki düzeyde azalma olduğu tespit edilmiştir. PMT ve MTX etken maddeleri ile 24 ve 48 saatlik periyotlar sonunda tüm konsantrasyonlarda hücrelerde MN ve BNMN oranını kontrole göre herhangi bir değişim tespit edilmemiştir.

Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde; insan periferik lenfositlerinde yaptığımız çalışmalarda PMT etken maddesinin genotoksik değil ancak sitotoksik etkiye sahip olduğu saptanırken, MTX etken maddesinin yüksek dozlarda genotoksik ve sitotoksik potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, kanser tanısı konulmuş hastalara uygulanan ilaç tedavisinde uygulanan dozlara, ilaçların birbiri ile olan etkileşimine dikkat edilmesi gerektiği böylelikle kanser hastalarında meydana gelebilecek olası genotoksik ve sitotoksik etkileri en az zarar verecek şekilde kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmada elde edilen verileri desteklemek için farklı in vitro ve in vivo test sistemleri ve farklı hücre hatlarında çalışılması PMT ve MTX maddelerinin genotoksik ve sitotoksik etkisi ile ilgili daha net bilgilere ulaşılmasında yardımcı olacaktır.

Tez çalışmasının in vitro DNA etkileşim bölümünde, çeşitli spektroskopik teknikler ve moleküler kenetlenme yöntemi kullanılarak PMT ve MTX'in ve fsDNA arasındaki etkileşimleri araştırılmıştır. Hem PMT hem de MTX'in, oluk bağlama modu yoluyla fsDNA ile etkileşime girdiği bulunmuştur. UV absorpsiyon spektrumları ve floresan titrasyon sonuçları, PMT ve MTX'in fsDNA ile arasında oluşan kompleks formunu doğrulamıştır. Buna ilaveten EB ile yapılan yarışmalı yer değiştirme floresans deneylerinde her iki molekülünde birer interkalasyon ajanı olmayıp küçük oluk bağlayıcı olduğu doğrulanmıştır.

Tez çalışmasının DNA ile etkileşim analizlerinin in siliko moleküler kenetlenme yöntemi ile gerçekleştirilen analizleri doğrultusunda PMT ve MTX için bağlanma enerjileri sırasıyla -8.7 ve -9.2 Kcal/mol olarak bulunmuş, moleküllerin DNA ile bağlanma afinitelerinin yüksek olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, PMT ve MTX etken maddelerinin oluk bağlayıcılar olduğunu ve bu ilaç-DNA komplekslerinin stabilitesinde H-bağ etkileşimlerinin temel bir rol oynadığını göstermektedir. Yapılan araştırma, bağlanma etkileşimi modunun, bağlanma afinitesinin, ilaçların DNA ile ana etkileşim kuvvetlerinin ve İlaç-DNA komplekslerinin yapılarının ayrıntılarını sergilemektedir. Moleküler yerleştirme çalışmaları her iki etken maddenin de DNA yapısındaki küçük oluğa bağlandığını doğrulayan in-vitro deneysel verilerimizi güçlendirmiştir.

Bu nedenle yukarıda verilen tüm verilerden hareketle, gelecekte ilaç-DNA etkileşimi ve ilaç tasarlama amacının daha derinden anlaşılmasına katkıda bulunabilecek bu çalışma PMT, MTX özelinde folik asit ve türevleri başta olmak üzere ilgili bileşiklerin DNA ile bağlanma mekanizmalarını ve bu tür bileşiklerin farmakolojik etkilerini anlamının yanı sıra yeni ve etkili ilaç moleküllerinin yapısını tasarlamada daha fazla bilgi sağlayarak araştırmacılara katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] N.S. Duesbery, J.P. MacKeigan, Origins of cancer, *Oncogene*. 27 (2008) S2. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.347>.
- [2] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [3] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2019, *CA. Cancer J. Clin.* 69 (2019) 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- [4] R.L. Siegel, K.D. Miller, H.E. Fuchs, A. Jemal, Cancer Statistics, 2021, *CA. Cancer J. Clin.* 71 (2021) 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>.
- [5] E. Dickens, S. Ahmed, Principles of cancer treatment by chemotherapy, *Surg. (United Kingdom)*. 39 (2021) 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.01.009>.
- [6] N.N. Pavlova, C.B. Thompson, The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism, *Cell Metab.* 23 (2016) 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- [7] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [8] P. Carmeliet, R.K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature*. 473 (2011) 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.
- [9] G. Delaney, S. Jacob, C. Featherstone, M. Barton, The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines, *Cancer*. 104 (2005) 1129–1137. <https://doi.org/10.1002/cncr.21324>.
- [10] C.M. Thomas, Mucositis in cancer patients: A review, *U.S. Pharm.* 41 (2016) HS6–HS8.
- [11] R. Baskar, K.A. Lee, R. Yeo, K.W. Yeoh, Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions, *Int. J. Med. Sci.* 9 (2012) 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>.
- [12] R.A. Burrell, N. McGranahan, J. Bartek, C. Swanton, The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution, *Nature*. 501 (2013) 338–345. <https://doi.org/10.1038/nature12625>.
- [13] R. by P.J. Sadler, “Medicinal Applications of Coordination Chemistry,” Royal Society Of Chemistry, Cambridge, UK, 2008. <https://doi.org/10.1595/147106708x259497>.
- [14] E. Espinosa, P. Zamora, J. Feliu, M. González Barón, Classification of anticancer drugs - A new system based on therapeutic targets, *Cancer Treat. Rev.* 29 (2003) 515–

523. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(03\)00116-6](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(03)00116-6).
- [15] R.J. Papac, Origins of cancer therapy, *Yale J. Biol. Med.* 74 (2001) 391–398.
- [16] S. Nussbaumer, P. Bonnabry, J.L. Veuthey, S. Fleury-Souverain, Analysis of anticancer drugs: A review, *Talanta*. 85 (2011) 2265–2289. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.034>.
- [17] B.A. Chabner, D.L. Longo, *Cancer chemotherapy and biotherapy: Principles and practice*, Lippincott Williams & Wilkins, 2011. [https://doi.org/10.1016/s0960-7404\(97\)00005-4](https://doi.org/10.1016/s0960-7404(97)00005-4).
- [18] M.J. Lind, Principles of cytotoxic chemotherapy, *Medicine (Baltimore)*. 39 (2011) 711–716. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.09.009>.
- [19] V.T. DeVita, E. Chu, A history of cancer chemotherapy, *Cancer Res.* 68 (2008) 8643–8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>.
- [20] K.D. Rollins, C. Lindley, Pemetrexed: A multitargeted antifolate, *Clin. Ther.* 27 (2005) 1343–1382. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.09.010>.
- [21] J.M. Kremer, Methotrexate and leflunomide: Biochemical basis for combination therapy in the treatment of rheumatoid arthritis, *Semin. Arthritis Rheum.* 29 (1999) 14–26. [https://doi.org/10.1016/S0049-0172\(99\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(99)80034-1).
- [22] Antineoplastic Agents - LiverTox - NCBI Bookshelf, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548022/> (accessed January 12, 2022).
- [23] M.K. Temel, The development of cytotoxic chemotherapeutics in the twentieth century, *Türk Onkol. Derg.* 30 (2015) 96–108. <https://doi.org/10.5505/tjoncol.2015.1151>.
- [24] A. Lansiaux, [Antimetabolites], *Bull. Cancer*. 98 (2011) 1263–1274. <https://doi.org/10.1684/BDC.2011.1476>.
- [25] G.J. Peters, C.L. Van Der Wilt, C.J.A. Van Moorsel, J.R. Kroep, A.M. Bergman, S.P. Ackland, Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites, *Pharmacol. Ther.* 87 (2000) 227–253. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00086-3).
- [26] Antifolates for Cancer Treatment, (n.d.). <https://www.mesotheliomaweb.org/antifolates.htm> (accessed January 12, 2022).
- [27] J. Neradil, G. Pavlasova, R. Veselska, New mechanisms for an old drug; DHFR- and non-DHFR-mediated effects of methotrexate in cancer cells, *Klin. Onkol.* 25 (2012).
- [28] S. Padmanabhan, D.N. Tripathi, A. Vikram, P. Ramarao, G.B. Jena, Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and

- folinic acid, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 673 (2009) 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.11.011>.
- [29] A. Buqué, J.S. Muhialdin, A. Muñoz, B. Calvo, S. Carrera, U. Aresti, A. Sancho, I. Rubio, G. López-Vivanco, Molecular mechanism implicated in Pemetrexed-induced apoptosis in human melanoma cells, *Mol. Cancer.* 11 (2012) 25. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-25>.
- [30] K.M. Gleason, Hermann Joseph Muller's Study of X-rays as a Mutagen, (1926-1927), (2017). <https://hpsrepository.asu.edu/handle/10776/11441> (accessed January 12, 2022).
- [31] Genotoxicity | AltTox.org, (n.d.). <http://alttox.org/mapp/toxicity-endpoints-tests/genotoxicity/> (accessed January 12, 2022).
- [32] T. Chen, N. Mei, P.P. Fu, Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids, *J. Appl. Toxicol.* 30 (2010) 183. <https://doi.org/10.1002/JAT.1504>.
- [33] Genotoxicity and Carcinogenicity - BASF - The Chemical Company - Corporate Website, (n.d.). <https://archive.md/20130628173220/http://www.basf.com/group/corporate/alternatives/en/microsites/alternatives/methods-in-use/genotocity> (accessed January 12, 2022).
- [34] M. Registre, R. Proudlock, The In Vitro Chromosome Aberration Test, in: *Genet. Toxicol. Test.*, Academic Press, 2016: pp. 207–267. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800764-8.00007-0>.
- [35] L. Pro, Mutagenicity and Genotoxicity, (2016). https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Mutagenicity_and_Genotoxicity.html (accessed January 12, 2022).
- [36] A. Kumar, V.N. Dobrovolsky, A. Dhawan, R. Shanker, Mutagenicity: Assays and applications, *Mutagen. Assays Appl.* (2017) 1–330. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02617-2>.
- [37] R.J. Albertini, D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hagmar, K. Hemminki, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E.G. Shuker, R. Tice, M.D. Waters, A. Aitio, IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 463 (2000) 111–172. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00049-1).
- [38] S. Padmanabhan, D.N. Tripathi, A. Vikram, P. Ramarao, G.B. Jena, Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice, *Mutat. Res. -*

- Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 655 (2008) 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.07.003>.
- [39] R. Sundar, M.R. Jain, D. Valani, Mutagenicity testing: Regulatory guidelines and current needs, *Mutagen. Assays Appl.* (2017) 191–228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809252-1.00010-9>.
- [40] M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>.
- [41] J.A. Heddle, M. Fenech, M. Hayashi, J.T. MacGregor, Reflections on the development of micronucleus assays, *Mutagenesis.* 26 (2011) 3–10. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq085>.
- [42] S. Kharb, Nucleic Acid, in: *Mind Maps Clin. Chem.* (Part I), 2021: pp. 68–78. <https://doi.org/10.2174/9789814998574121010010>.
- [43] R. Dahm, Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research, *Hum. Genet.* 122 (2008) 565–581. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0433-0>.
- [44] Nucleic Acid topology, DNA Motif: A Critical Analysis, (2020). www.jetir.org (accessed January 13, 2022).
- [45] E. Edition, Brock Biology of Microorganisms, Cell. (2006) 1–33. <https://www.researchgate.net/publication/48363170> (accessed January 13, 2022).
- [46] S. Hardinger, *Knowing Nucleic Acids*, UCLA, University of California, Los Angeles, 2011.
- [47] L.B. Stryer, *Biochemistry*, WH Freeman, San Francisco, 2007.
- [48] S. Venna, F. Eckstein, Modified oligonucleotides: Synthesis and strategy for users, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 99–134. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.99>.
- [49] M. Wanunu, Y. Tor, *Methods for studying nucleic acid/drug interactions*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016. <https://doi.org/10.1201/b11691>.
- [50] N.A. Elmarzugi, T. Adali, A.M. Bentaleb, E.I. Keleb, A.T. Mohamed, A.M. Hamza, Spectroscopic characterization of PEG-DNA biocomplexes by FTIR, *J. Appl. Pharm. Sci.* 4 (2014) 6–10. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40802>.
- [51] L.S. Lerman, Structural considerations in the interaction of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 18–30. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80004-1).
- [52] J.M. Walker, K.R. Fox, Front matter, *Drug-DNA Interact. Protoc.* 613 (2010) 89–101. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-418-0>.

- [53] P. Baruah, P.T. Phanrang, I. Konthoujam, K. Aguan, S. Mitra, Cholinergic drugs bind at the minor groove and reverse induced oxidative stress of calf thymus DNA: a new perspective towards an unexplored therapeutic efficacy, *New J. Chem.* 45 (2021) 13925–13933. <https://doi.org/10.1039/d1nj01911b>.
- [54] Y. Sha, X. Chen, B. Niu, Q. Chen, The Interaction Mode of Groove Binding Between Quercetin and Calf Thymus DNA Based on Spectrometry and Simulation, *Chem. Biodivers.* 14 (2017). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700133>.
- [55] A. Syriopoulou, I. Markopoulos, A.G. Tzakos, T. Mavromoustakos, Ligand–Receptor Interactions and Drug Design, in: *Methods Mol. Biol.*, Humana, New York, NY, 2021: pp. 89–104. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1209-5_5.
- [56] J. de Ruyck, G. Brysbaert, R. Blossey, M.F. Lensink, Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel, *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* 9 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.2147/AABC.S105289>.
- [57] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* 7 (2011) 146. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>.
- [58] V. Salmaso, S. Moro, Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 923. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00923/BIBTEX>.
- [59] Scigenis - Yükleyenin kendi çalışması, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=45515965>, (n.d.).
- [60] S.F. Sousa, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, Protein-ligand docking: Current status and future challenges, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 65 (2006) 15–26. <https://doi.org/10.1002/prot.21082>.
- [61] E.S. İstifli, M. Topaktaş, Genotoxicity of pemetrexed in human peripheral blood lymphocytes, *Cytotechnology.* 65 (2013) 621–628. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9516-4>.
- [62] F. Barbisan, J. De Rosso Motta, A. Trott, V. Azzolin, E.B. Dornelles, M. Marcon, T.D. Algarve, M.M.M.F. Duarte, C.P. Mostardeiro, T.C. Unfer, K.L. Schott, I.B.M. Da Cruz, Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism, *PLoS One.* 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107299>.
- [63] A. Ch, M.S. Mustak, Antigenotoxic effects of Rutin against Methotrexate genotoxicity in Swiss albino mice, *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 13 (2019) 162–

- [64] H. Çobanoğlu, M. Coşkun, M. Coşkun, A. Çayır, Evaluation of genotoxic potential of pemetrexed by using in vitro alkaline comet assay, *Marmara Pharm. J.* 21 (2017) 544–544. <https://doi.org/10.12991/marupj.318635>.
- [65] T.Y. Yang, G.C. Chang, K.C. Chen, H.W. Hung, K.H. Hsu, C.H. Wu, G.T. Sheu, S.L. Hsu, Pemetrexed induces both intrinsic and extrinsic apoptosis through ataxia telangiectasia mutated/p53-dependent and -independent signaling pathways, *Mol. Carcinog.* 52 (2013) 183–194. <https://doi.org/10.1002/mc.21842>.
- [66] E.S. İstifli, M. Topaktaş, Genotoxicity of pemetrexed in human peripheral blood lymphocytes, *Cytotechnology.* 65 (2013) 621–628. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9516-4>.
- [67] A.A. Shahin, M.M. Ismail, A.M. Saleh, H.A. Moustafa, A.A. Aboul-Ella, H.M. Gabr, Protective effect of folinic acid on low-dose methotrexate genotoxicity, *Z. Rheumatol.* 60 (2001) 63–68. <https://doi.org/10.1007/s003930170075>.
- [68] F. Ameen, S. Siddiqui, I. Jahan, S.M. Nayeem, S. ur Rehman, M. Tabish, Studying the interaction of scopolamine with calf-thymus DNA: An in-vitro and in-silico approach and genotoxicity, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 265 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120391>.
- [69] M. Farajzadeh-Dehkordi, S. Darzi, B. Rahmani, S. Farhadian, A novel insight into the cytotoxic effects of Tephrosin with calf thymus DNA: Experimental and in silico approaches, *J. Mol. Liq.* 324 (2021) 114728. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114728>.
- [70] N. Shahabadi, R. Farhadi, Multispectroscopic and molecular docking studies on DNA binding of guaifenesin drug, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 40 (2021) 317–335. <https://doi.org/10.1080/15257770.2021.1872793>.
- [71] C. Gan, X. Huang, J. Zhan, X. Liu, Y. Huang, J. Cui, Study on the interactions between B-norcholesteryl benzimidazole compounds with ct-DNA, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 227 (2020) 117525. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117525>.
- [72] J.H. Shi, Y.Y. Lou, K.L. Zhou, D.Q. Pan, Exploration of intermolecular interaction of calf thymus DNA with sulfosulfuron using multi-spectroscopic and molecular docking techniques, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 204 (2018) 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.06.054>.
- [73] C.Z. Yang, C.Y. Liang, D. Zhang, Y.J. Hu, Deciphering the interaction of

- methotrexate with DNA: Spectroscopic and molecular docking study, *J. Mol. Liq.* 248 (2017) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.10.017>.
- [74] S.T. Saito, G. Silva, C. Pungartnik, M. Brendel, Study of DNA-emodin interaction by FTIR and UV-vis spectroscopy, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 111 (2012) 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.03.012>.
- [75] R. Chatila, Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver, *J. Clin. Gastroenterol.* 31 (2000) 185. <https://doi.org/10.1097/00004836-200009000-00024>.
- [76] R. Okamoto, Y. Maeda, T. Sasaki, Hepatotoxicity of chemotherapy, *Gan To Kagaku Ryoho.* 30 (2003) 772–778. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.6-2-162>.
- [77] 15-1_Alimta- pemetrexed disodium injection, powder, lyophilized, for solution, DailyMed. (2020). <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=f5a860f3-37ec-429c-ae04-9c88d7c55c08> (accessed January 12, 2022).
- [78] S. W, Drug Discovery: A History - Walter Sneader - Google Books, Drug Discov. (2005) 1–6. https://books.google.com.tr/books?id=jglFsz5EJR8C&pg=PA251&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (accessed January 12, 2022).
- [79] NIH, Methotrexate, Assay Drug Dev Technol. April 8 (2020) 2012–2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548219/> (accessed January 12, 2022).
- [80] H.J. Evans, Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Tests, Second Edi, Elsevier Science Publishers BV, 1984. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-80519-5.50023-7>.
- [81] P.E. Perry, E.J. Thomson, THE METHODOLOGY OF SISTER CHROMATID EXCHANGES, in: Handb. Mutagen. Test Proced., Elsevier science publishers, 1984: pp. 495–529. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-80519-5.50029-8>.
- [82] E. Rencüzoğulları, M. Topaktaş, The relationship between quantities of bromodeoxyuridine and human peripheral blood with determination of the best differential staining of sister chromatids using chromosome medium-B, *Fen ve Mühendislik Bilim. Derg.* 5 (1991) 19–24.
- [83] M.L. Mace, Y. Daskal, W. Wray, Scanning-electron microscopy of chromosome aberrations, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 52 (1978) 199–206. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(78\)90141-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(78)90141-0).
- [84] R. Julian Preston, B.J. Dean, S. Galloway, H. Holden, A.F. McFee, M. Shelby,

- Mammalian in vivo cytogenetic assays Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, *Mutat. Res. Toxicol.* 189 (1987) 157–165. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90021-8](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90021-8).
- [85] A. Rothfuß, P. Schütz, S. Bochum, T. Volm, E. Eberhardt, R. Kreienberg, W. Vogel, G. Speit, Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families, *Cancer Res.* 60 (2000) 390–394. <http://www.nhgri.nih.gov/Intra-> (accessed January 13, 2022).
- [86] M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, S. Kirchner, E. Lorge, T. Morita, H. Norppa, J. Surrallés, A. Vanhauwaert, A. Wakata, Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 540 (2003) 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.07.005>.
- [87] N. Titenko-Holland, G. Windham, P. Kolachana, F. Reinisch, S. Parvatham, A.M. Osorio, M.T. Smith, Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 388 (1997) 85–95. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(96\)00140-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(96)00140-4).
- [88] M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 455 (2000) 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8).
- [89] D.A. Eastmond, J.D. Tucker, Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.* 13 (1989) 34–43. <https://doi.org/10.1002/em.2850130104>.
- [90] J.J. Irwin, B.K. Shoichet, ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening, *J. Chem. Inf. Model.* 45 (2005) 177–182. <https://doi.org/10.1021/ci049714+>.
- [91] H.R. Drew, R.M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R.E. Dickerson, Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 2179–2183. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.4.2179>.
- [92] M. Wang, Y. Yu, C. Liang, A. Lu, G. Zhang, Recent advances in developing small molecules targeting nucleic acid, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17060779>.
- [93] D. Zhang, X. Zhang, Y.C. Liu, S.C. Huang, Y. Ouyang, Y.J. Hu, Investigations of the molecular interactions between nisoldipine and human serum albumin in vitro using multi-spectroscopy, electrochemistry and docking studies, *J. Mol. Liq.* 258 (2018)

- 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.010>.
- [94] X.M. Dong, Y.Y. Lou, K.L. Zhou, J.H. Shi, Exploration of association of telmisartan with calf thymus DNA using a series of spectroscopic methodologies and theoretical calculation, *J. Mol. Liq.* 266 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.057>.
- [95] J.H. Shi, K.L. Zhou, Y.Y. Lou, D.Q. Pan, Multi-spectroscopic and molecular modeling approaches to elucidate the binding interaction between bovine serum albumin and darunavir, a HIV protease inhibitor, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 188 (2018) 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.07.040>.
- [96] S. Bhaduri, N. Ranjan, D.P. Arya, An overview of recent advances in duplex DNA recognition by small molecules, *Beilstein J. Org. Chem.* 14 (2018) 1051–1086. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.93>.
- [97] I. Hussain, S. Fatima, S. Siddiqui, S. Ahmed, M. Tabish, Exploring the binding mechanism of β -resorcylic acid with calf thymus DNA: Insights from multi-spectroscopic, thermodynamic and bioinformatics approaches, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 260 (2021) 119952. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119952>.
- [98] C. Gan, X. Huang, J. Zhan, X. Liu, Y. Huang, J. Cui, Study on the interactions between B-norcholesteryl benzimidazole compounds with ct-DNA, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 227 (2020) 117525. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117525>.
- [99] J. Li, J. Wang, J. Fan, G. Huang, L. Yan, Binding characteristics of aflatoxin B1 with free DNA in vitro, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 230 (2020) 118054. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118054>.
- [100] M.K. Pal, J.K. Ghosh, Spectroscopic probe of the competitive binding of ethidium bromide and neomycin to DNA, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 51 (1995) 489–498. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(94\)E0107-L](https://doi.org/10.1016/0584-8539(94)E0107-L).
- [101] F. Ameen, S. Siddiqui, I. Jahan, S.M. Nayeem, S. ur Rehman, M. Tabish, Studying the interaction of scopolamine with calf-thymus DNA: An in-vitro and in-silico approach and genotoxicity, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 265 (2022) 120391. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120391>.

