



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**FERROSEN BİRİMİ İÇEREN
BENZİMİDAZOL TÜREVLİ BİLEŞİKLERİN
DNA BAĞLANMA, DNA KESİM VE
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ**

Şeyda AKKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON – 2016

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Şeyda AKKAYA'nın hazırladığı “Ferrosen Birimi İçeren Benzimidazol Türevli Bileşiklerin DNA Bağlanma, DNA Kesim ve Antioksidan Aktivitelerinin Tayini” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER

Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Tarih: .../.../2016

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

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

11/12/2015

Şeyda AKKAYA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi ve deneyimlerini aktaran, her konuda bana yardımcı olmaya çalışan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL'e en içten dileklerim ile teşekkür ederim.

Tez çalışmasında kullanılan kompleks ve ligandları bana temin eden Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Kerim SERBEST ve ekibine teşekkür ederim. Uv-vis spektroskopi deneylerinde cihaz kullanımı için KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümünden Arş. Gör. Ümit DEMİRBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca bana her türlü konuda destek olan KTÜ Eczacılık Fakültesi tüm personeli ve hocalarıma minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim aileme ve manevi destekleriyle tüm arkadaşlarıma hep yanımda oldukları ve bana güvendikleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şeyda AKKAYA

İÇİNDEKİLER**Sayfa****KABUL ve ONAY****BEYAN****TEŞEKKÜR****TABLolar DİZİNİ****vii****ŞEKİLLER DİZİNİ****viii****KISALTMALAR ve SEMBOLLER DİZİNİ****xi****1. ÖZET****1****2. SUMMARY****2****3. GİRİŞ ve AMAÇ****3****4. GENEL BİLGİLER****6**

4.1. Schiff Bazları ile İlgili Genel Bilgiler

6

4.1.1. Schiff Bazları ve Geçiş Metal Kompleksleri

7

4.1.2. Ferrosenler ile İlgili Genel Bilgiler

10

4.1.3. Benzimidazoller ile İlgili Genel Bilgiler

12

4.2. DNA ile İlgili Genel Bilgiler

15

4.2.1. DNA'nın Farklı Sarmal Formları

17

4.2.2. DNA ile Küçük Moleküllerin Etkileşimi

18

4.2.2.1. Dış Elektrostatik Etkileşimler

19

4.2.2.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimleri

20

4.2.2.3. İnterkalasyon Etkileşimleri

21

4.3. DNA Kesim (Nükleaz) Etkinliği

23

4.4. Serbest Radikaller

25

4.4.1. Serbest Radikaller ve Etkileri

27

4.5. Antioksidanlar

28

5. GEREÇ ve YÖNTEM**32**

5.1. Gereç

32

5.1.1. Kullanılan Cihazlar

32

5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

32

5.1.3. Çözeltiler

34

5.2. Yöntem	35
5.2.1. DNA Bağlanma Deneyleri	35
5.2.1.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonları	35
5.2.1.2. UV ile Yarışmalı Etidyum Bromür (EB) Bağlanması Çalışmaları	36
5.2.1.3. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi	36
5.2.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi	37
5.2.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi	37
5.2.2.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Oksidatif Kesimi	38
5.2.2.3. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi	38
5.3. Antioksidatif Aktivite Çalışmaları	38
5.3.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	39
5.3.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi	39
6. BULGULAR	41
6.1. DNA Bağlanma Çalışmaları	41
6.1.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonları	41
6.1.2. UV ile Yarışmalı Etidyum Bromür (EB) Bağlanması Çalışmaları	45
6.1.3. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi	49
6.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi	49
6.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi	50
6.2.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Oksidatif Kesimi	54
6.2.3. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi	56
6.3. Antioksidatif Aktivite Çalışmaları	58
6.3.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	58
6.3.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi	61
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
8. KAYNAKLAR	70
9. ÖZGEÇMİŞ	84

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Reaktif Oksijen Türleri	27
Tablo 2. Reaktif Azot Türleri	27
Tablo 3. Antioksidanların Sınıflandırılması	29
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	32
Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Ligand ve Komplekslerin Kısa Kodları, Molekül Formülleri ve Kimyasal Yapıları	33
Tablo 6. Ligand ve Komplekslerin DNA ile Etkileşimi ve Gözlenen Değişimler	45
Tablo 7. Komplekslerin ve Ligandların <i>T_m</i> Değerleri	49
Tablo 8. Kompleks ve Ligandların Radikal Süpürme Kapasiteleri (SC ₅₀ µM)	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Bir Schiff bazı sentezine bir örnek	6
Şekil 2. Schiff bazlarının oluşum mekanizmaları	7
Şekil 3. Ferrosen bileşiğinin molekül yapısı	10
Şekil 4. Tamoksifen ve ferrosifen bileşikleri	11
Şekil 5. Benzimidazol yapısı	12
Şekil 6. Benzimidazol'un bazik yapısı	12
Şekil 7. Benzimidazol rezonans formülleri	13
Şekil 8. Benzimidazol redüksiyon reaksiyon denklemi	13
Şekil 9. DNA molekülünde yer alan bazlar	15
Şekil 10. Watson-Crick DNA modeli	17
Şekil 11. A-T ve C-G arasındaki Watson-Crick hidrojen bağları	17
Şekil 12. DNA'nın farklı sarmalları	18
Şekil 13. DNA ile küçük moleküllerin etkileşimi	19
Şekil 14. DNA ile küçük moleküllerin dış elektrostatik etkileşimi	20
Şekil 15. DNA ile oluğa bağlanma	21
Şekil 16. DNA ile interkalasyon	22
Şekil 17. DNA ile EB'nin interkalasyonu	22
Şekil 18. Serbest radikallerin hücresel hedefleri	27
Şekil 19. E vitamini [5,7,8-trimetiltokol (α - <i>tokoferol</i>)]'nin formülü	31
Şekil 20. Kompleks 1'in DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	42
Şekil 21. Kompleks 2'nin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	42
Şekil 22. Kompleks 3'ün DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	43
Şekil 23. Ligand 1'in DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	43
Şekil 24. Ligand 2'nin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	44

Şekil 25. Ligand 3'ün DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	44
Şekil 26. EB'ün DNA bağlanmasının kompleks 1'in yokluğunda ve artan kompleks konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu	46
Şekil 27. EB'ün DNA bağlanmasının kompleks 2'nin yokluğunda ve artan kompleks konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu	46
Şekil 28. EB'ün DNA bağlanmasının kompleks 3'ün yokluğunda ve artan kompleks konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu	47
Şekil 29. EB'ün DNA bağlanmasının ligand 1'in yokluğunda ve artan ligand konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu	47
Şekil 30. EB'ün DNA bağlanmasının ligand 2'nin yokluğunda ve artan ligand konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu	48
Şekil 31. EB'ün DNA bağlanmasının ligand 3'ün yokluğunda ve artan ligand konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu	48
Şekil 32. Kompleks ve ligandların pH'a bağlı kesim aktiviteleri	51
Şekil 33. Kompleks ve ligandların konsantrasyona bağlı kesim aktiviteleri	53
Şekil 34. Kompleks ve ligandların indükleyici ajan varlığında oksidatif kesimi	55
Şekil 35. Kompleks ve ligandların nükleaz etkinliklerinin UV ışığı altındaki değişimi	57
Şekil 36. Kompleks 1'in %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	59
Şekil 37. Kompleks 2'nin %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	59
Şekil 38. Kompleks 3'ün %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	59
Şekil 39. Ligand 1'in %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	60
Şekil 40. Ligand 2'nin %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	60
Şekil 41. Ligand 3'ün %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	60

Şekil 42. Kompleks 1'in % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	62
Şekil 43. Kompleks 2'nin % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	62
Şekil 44. Kompleks 3'ün % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	62
Şekil 45. Ligand 1'in % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	63
Şekil 46. Ligand 2'nin % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	63
Şekil 47. Ligand 3'ün % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri	63

KISALTMALAR ve SEMBOLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AA	Askorbik asit
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmis hidroksitoluen
CAT	Katalaz
CT-DNA	Calf Thymus – deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMF	N,N-dimetilformamit
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazin
EB	Etidyum Bromür
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
ME	β-merkatoetanol
O₂^{·-}	Süperoksit Radikali
OH[·]	Hidroksil radikali
PG	Propilgallat (PG)
SOD	Süperoksit Dismutaz
-SH	Sülfhidril
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TBHQ	ter-bütil Hidrokinon
Tris	(tris-hidroksimetil)-aminometan
UV-Vis	Ultraviyole Visible

Semboller

Å	Angstrom
mM	Milimolar
μL	Mikrolitre
nm	Nanometre
Tm	Erime Sıcaklığı

1. ÖZET

Ferrosen Birimi İçeren Benzimidazol Türevli Bileşiklerin DNA Bağlanma, DNA Kesim ve Antioksidan Aktivitelerinin Tayini

Son zamanlarda, kemoterapötik maddelerin tasarlanmasındaki büyük öneminden dolayı nükleik asitler ile geçiş metali komplekslerinin etkileşimi çok dikkat çekmektedir. Geçiş metalleri biyolojik sistemlerde bulunmaktadır ve sentezlenen komplekslerde metal varlığının ilaç etkinliğini artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle, geçiş metal komplekslerinin potansiyel ilaç olarak değerlendirilmesi şaşırtıcı değildir. DNA önemli bir hücresel reseptördür ve çoğu antiviral ve antikanser terapinin birincil hücre içi hedefidir. Bu nedenle, DNA'ya bağlanabilen veya DNA'yı kesebilen yeni moleküllerin tasarlanması ve geliştirilmesi gereklidir. Biyolojik özellikleri dikkate alındığında geçiş metal kompleksleri hastalıklara karşı mücadelede yeni ilaçların geliştirilmesi için potansiyel ajanlardır. Bu yüzden, geçiş metalleri ve komplekslerinin DNA ile etkileşimlerinin araştırılması oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, ferrosen birimi içeren benzimidazol türevli komplekslerin DNA ile etkileşimleri UV-Vis absorpsiyon titrasyonları ve termal denatürasyon yöntemleri ile incelendi. Komplekslerin DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yoluyla yerleştiği belirlendi. Agaroz jel elektroforezi kullanılarak, hidrolitik kesim etkinliğinin pH 7 değerinde olduğu ve konsantrasyonun nükleaz aktiviteyi nasıl etkilediği tespit edildi. Çeşitli aktivatörler (H_2O_2 (0,4 M), 2-Merkaptoetanol (0,4 M) ve askorbik asit (2.5mM)) varlığında kesim aktivitelerinde önemli derecede artış görüldüğü belirlendi. Süperoksit dismutaz (SOD) ve 2,2-Difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi testleri kullanılarak antioksidan aktiviteler belirlendi. Kompleks 1 (K1)'de belirgin olmakla beraber komplekslerin tümünde iyi derecede süpürme aktivitesi gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: Antikanser, Antioksidan, Benzimidazol, DNA bağlanma, DNA kesim

2. SUMMARY

Investigation of DNA Binding, DNA Cleavage and Antioxidant Activities of Benzimidazole Derivatives Compounds With Ferrocene Unit

Recently, interaction of transition metal complexes with nucleic acids have gained much attention due to their great importance in the design of chemotherapeutic agents. There are transition metals in biological systems and metal ions present in synthesized complexes were known to accelerate drug efficiency. Thus, it is not surprising that transition metal complexes to evaluation as potential drugs. DNA is an important cellular receptor and DNA is a primary intracellular target for many antiviral and anticancer therapies. Therefore, designing and development of new molecules capable of binding to DNA or cleavage to DNA is required. When biological properties are taken into account, transition metal complexes are the potential agents for the development of new drugs in the struggle against diseases. Hence, investigation of the interaction of transition metals and their complexes with DNA is quite important.

In this study, interaction of benzimidazole derivatives complexes containing ferrocene unit complexes with DNA were examined by UV-Vis absorption titrations and thermal denaturation methods. These assays demonstrated that complexes were localized by intercalation between the base pairs of DNA. Using agarose gel electrophoresis, it was determined that complexes of hydrolytic activity was at pH 7 and it was identified how to affect the concentration of the nuclease activity. Remarkably increased activity was determined in cleavage experiments performed in the presence of various activators such as H_2O_2 (0.4 M), ascorbic acid (2.5 mM) and mercaptoethanol (0.4 M). The antioxidant activities were performed by 2,2-Diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging and superoxide dismutase (SOD) activity tests. Especially complex 1 (K1), all complexes have exhibited good free radical scavenging activity.

Key Words: Anticancer, Antioxidant, Benzimidazole, DNA binding, DNA cleavage

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, dünya ve Türkiye üzerinde en önemli sağlık sorunlarından olup kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedenidir. Kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücreler selim veya malign tümörlere dönüşürler. Selim tümörler metastaz yapmazken, kansere neden olan malign tümörler çok hızlı çoğalarak diğer dokularda ve organlarda anormal hücre gelişimine yol açarlar (1). Kanser hücrelerinin çoğalmasını önlemek ve yayılmasını yavaşlatmak adına cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarına başvurulmaktadır. İlkinde tümörlü doku veya organın uzaklaştırılması, son ikisinde ise kanser hücrelerinin öldürülmesi hedeflenmektedir (2, 3).

Günümüzde kanserin doğası anlaşılmış, tedavide çok önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Geliştirilen tedavi yöntemleri ile hastaların yaşam sürelerinin uzatılması ve daha nitelikli yaşamaları amaçlanmaktadır. Ancak kullanılan yöntemle ilgili olarak tedavi ile ilgili zorluklar (tedaviye uyum ve tedaviyi sürdürmede yetersizlik gibi) ve toksik etkiler (saçlarda dökülme, bulantı, kusma ve kısırlık gibi) de söz konusudur (4). Bu yüzden ideal bir kanser terapisi hücresel çoğalmayı azalttığı gibi yan etkileri de en aza indirecek şekilde tasarlanmalıdır.

DNA (Deoksiribonükleik asit), insan hayatında önemli bir rol oynar ve DNA ile küçük moleküllerin etkileşimi üzerine yapılan çalışmaların yeni farmasötik moleküllerin tasarlanmasında büyük önemi vardır (5). DNA hücresel sistemlerde olan çoğu biyokimyasal süreçleri düzenlediği için antikanser ilaçların birincil hücre içi hedefidir. DNA; gen ekspresyonu, transkripsiyonu, mutagenез, karsinogenez gibi çeşitli düzenleyici işlemlerden sorumludur. Çoğu kemoterapik ajan, hücresel replikasyondaki baskın rolü yüzünden DNA'ya bağlanarak veya DNA'yı keserek tümör hücrelerini etkisiz hale getirirler (6). Bu nedenle, bir ilaç özellikle DNA'ya bağlanacak şekilde tasarlanmalıdır. İlaçların DNA'ya bağlanması, DNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonunu inhibe ederek (DNA bükülmesi, DNA sarmalının tek veya çift dizisinin kırılması, DNA hasarı gibi) DNA'da yapısal ve konformasyonel değişikliklere neden olur. Genel olarak, kompleksler minör oluğa bağlanarak veya baz çiftleri arasına interkalasyon yaparak DNA ile etkileşirler. DNA'ya bağlanmaya ve DNA'yı kesmeye uygun olan geçiş metal kompleksleri, nükleik asit kimyasının farklı uygulamalarına bağlı olarak dünya çapında ilgi çekmektedir (7, 8). Bu nedenle, böyle metal

komplekslerini hazırlamak oldukça önemlidir. Düzlemsel heterosiklik bazlı geçiş metal kompleksleri, farklı kimyasal reaktivlikleri, sıra dışı elektronik özellikleri ve DNA ile nonkovalent etkileşimi sonucu oluşan özgün yapıları açısından nükleik asit kimyasında önemli ölçüde dikkat çekmektedir. Özellikle bazı metal iyonları ile farmakolojik ajanların kombinasyonu daha çok gelişmektedir.

Vücudumuz normal fonksiyonlarını yerine getirmek için enerji üretirken, aynı zamanda milyonlarca serbest radikalın oluşmasına sebep olurlar. Bu serbest radikallerin artmasına sebep olan birçok etken vardır. Bu etkenlerden bazıları, kimyasal maddeler, çevre kirliliği, UV ışınları, X-ışınları, ilaçlar, virüsler, stres, sanayi atıkları, egzoz gazları ve sigara dumanı vs. olarak örneklendirilebilir (9). Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren kimyasal yapılardır. Böyle bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapıli bir organik molekül olabilir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir (10). Serbest radikaller lipidleri, proteinleri ve DNA'yı olumsuz etkileyerek çeşitli hastalıklara sebep olabilirler ve ayrıca yaşlanma sürecini hızlandırırlar. Serbest radikal reaksiyonları sonrasında nükleik asitlerde baz değişimleri, DNA'da zincir kırılmaları meydana gelir ve tamir sistemlerindeki yetersizlik sonucu mutasyonlar meydana gelebilir. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (11). Antioksidanlar bu reaktif türlerini önleme, durdurma ve hasar onarımı yönünden nötrleme yeteneğine sahiptirler (12). Serbest radikallerin sebep olduğu düşünülen bu tür hastalıkların tedavisi radikal süpürücü ve toksik olmayan maddelerin üretimine bağlıdır.

Koordinasyon kimyasında ligand olarak kullanılan, azometin ($-CH=N$) grubu içeren ve genel olarak $R-CH=NR$ formülü ile gösterilen Schiff bazlarının oldukça geniş çalışma alanları bulunmaktadır. Schiff bazları ligand oluşumu ve çok yönlülüğü nedeniyle en yaygın kullanılan ligandlardandır ve bunlar kolayca geçiş metallerinin çoğu ile kararlı kompleksler oluşturabilir. Schiff bazı metal kompleksleri ile ilgili araştırma alanında kısmen biyoorganik kimya, kataliz ve mıkknatis kimyası içeren disiplinler arası alanlarda bir dizi potansiyel ilgi nedeniyle çok geniş yer tutmaktadır (13). Son zamanlarda bazı metal kompleksleri, ilaç sanayiinde, hastalıkların teşhis ve

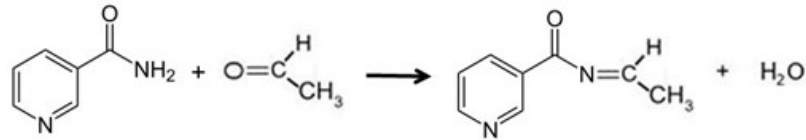
tedavisinde önem kazanmaya başlamıştır. Özellikle kükürt içeren Schiff bazı metal komplekslerinin antikanser özelliğinin ortaya çıkarılmasından sonra bu komplekslere olan ilgi daha da artırmıştır (14-16). Schiff bazı komplekslerinin antikanser aktivitesine sahip olmasından dolayı tıp dünyasındaki önemi giderek artmakta ve kanserle mücadelede reaktif olarak kullanılması araştırılmaktadır (17). Geçiş metalleri yaşayan organizmaların normal fonksiyonları için gereklidir. Biyolojik aktiviteler komplekslerin redoks aktiviteleri ile ilişkili olabilir. Çok yönlü redoks ve spektroskopik özellikleri ile geçiş metal kompleksleri, kimyasal nükleazlar olarak metal bazlı terapötik ajanların tasarlanması için uygundur (18). Bu kompleksler arasında bakır (II) kompleksleri geniş biyolojik aktiviteye sahiptir ve bu komplekslerin bazılarının antitümör, antiviral ve anti-inflamatuar ajanlar olduğu bilinmektedir (19). Komplekslerdeki bakır iyonlarının varlığı ilacın ve organik terapötik ajanların etkinliğini artırdığı gözlenmiştir (20). Ayrıca bu kompleksler kimyasal oksidanlar varlığında DNA'nın oksidatif kesimine yol açabilir. Son 10 yılda, güçlü DNA bağlanma ve kesim kabiliyetine sahip birçok bakır (II) kompleksi sentezlenmiştir. Bunların çoğu mükemmel antikanser ve apoptoz düzenleyici etki göstermektedir (21). Geçiş metali içeren kompleksler göz önüne alındığında, geçiş metali içeren ve biyolojik sistemlerdeki fonksiyonları nedeniyle önemli bir bileşik sınıfını oluşturan heterosiklik bileşikler dikkat çekmektedir. Bu bileşikler içinde benzimidazoller biyolojik aktivitelerinin çeşitliliği nedeniyle ayrı bir yer tutar. Benzimidazol türevi bileşikler, antiülseratif, antihelmintik, antihistaminik, antiinflamatuar ve antioksidan gibi pek çok etkisi nedeniyle ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadır (22).

Bu tez kapsamında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Kerim SERBEST ve ekibi tarafından sentezlenen benzimidazol türevli ligandların ve onların bakır (II) komplekslerinin ilgi çeken özelliklerinin incelenmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla, çalışmanın ilk aşamasında komplekslerin DNA ile etkileşip etkileşmedikleri UV spektrofotometri yöntemi ile incelenecektir. Bunun yanı sıra nükleaz etkinlikleri agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilecektir. Ayrıca bağlanma modunun tam olarak belirlenebilmesi için termal denatürasyon çalışmaları yapılacaktır. İncelenecek ferrosen birimi içeren benzimidazol türevli komplekslerinin antioksidatif etkinliklerinin tespit edilmesi amacıyla DPPH radikal süpürme aktivitesi ve süperoksit dismutaz aktivitesi testleri gerçekleştirilecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Schiff Bazları ile İlgili Genel Bilgiler

Merkezinde bir metal iyonu ile buna bağlanmış değişik sayıda yüklü veya yüksüz gruplardan oluşan bileşikler koordinasyon bileşikleridir. Merkezdeki metal iyonuna bağlanan yüklü veya yüksüz gruplar ligand olarak adlandırılmaktadır. Schiff bazları koordinasyon kimyasında en sık kullanılan ligandlardır ve bunlar geçiş metallerinin çoğu ile kararlı kompleksler oluşturabilir. Schiff bazlarının eldesinde en yaygın kullanılan metod, alifatik yada aromatik aldehit veya ketonların alifatik yada aromatik primer aminlerle kondenzasyon reaksiyonudur (23). Schiff bazları, ilk kez 1864 yılında Alman Kimyager H. Schiff tarafından sentezlenmiştir. H. Schiff anilinin asetaldehit, valeraldehit, benzaldehit ve sinnemaldehit ile reaksiyonlarını çalışmış ve imin olarak adlandırdığı bileşik sınıfını bulduğu çalışması “Yeni Bir Seri Organik Bazlar (Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen)” adlı makale ile yayınlamıştır (Şekil 1), (24).

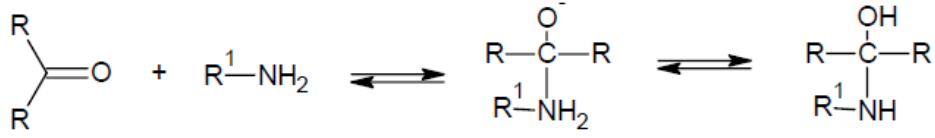


Şekil 1. Bir Schiff bazı sentezine bir örnek

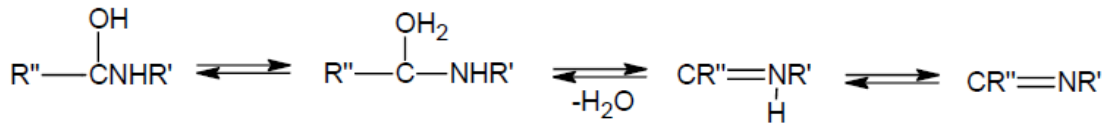
Karbonil bileşikleriyle primer aminlerin reaksiyonu ile elde edilen Schiff Bazlarının sentezi iki ana basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, primer aminle karbonil grubunun kondenzasyonundan bir karbinolamin ara bileşiği meydana gelir. İkinci basamakta ise bu karbinolamin ara bileşiğinin dehidratasyonu sonucunda Schiff Bazı oluşur (Şekil 2).

Schiff bazları iyi bir azot donör ligandı olarak da bilinmektedir. Bu ligandlar koordinasyon bileşiğinin oluşması sırasında metal iyonuna bir veya daha çok elektron çifti vermektedir. Schiff bazlarının oldukça kararlı 4, 5 veya 6 halkalı kompleksler oluşturabilmesi için azometin grubuna mümkün olduğu kadar yakın ve yer değiştirebilir hidrojen atomuna sahip ikinci bir fonksiyonel grubun bulunması gereklidir (25).

1. Basamak: katılma



2. Basamak: ayrılma



Şekil 2. Schiff bazlarının oluşum mekanizmaları (Ceylan'dan, 23)

4.1.1. Schiff Bazları ve Geçiş Metal Kompleksleri

Schiff bazlarında bulunan C=N grubunun en karakteristik özelliklerinden birisi metallerle kompleks oluşturmalarıdır. Amin ve/veya karbonil bileşiklerinin metal iyonuyla kararlı bileşik yapabilmesi beşli veya altılı şelat halkası oluşturabilecek bir yapıya sahip olmalarındandır. Azot atomunun bir çift bağ ile bağlanmış olduğu azometin sistemi de π orbitalleri sayesinde geri bağlanmaya uygun d-metal iyonları için koordinasyon bölgesi olabilir. Bu durum, Schiff bazlarının oluşturduğu metal komplekslerinin yüksek kararlılıklarının diğer bir nedenidir (26). Kompleks bileşiklerinin özellikleri kullanılan ligand ve metal iyonuna bağlı olarak değişim göstermektedir. Kararlılığı etkileyen bir diğer etmen kompleks oluşumunda kullanılan metal iyonunun büyüklüğü, yükü ve iyonlaşma gerilimidir (27). Kompleks bileşiklerin oluşumu esnasında kullanılan Schiff Bazı ligandlarında eğer iki veya daha fazla koordinasyona giren grup bulunursa “şelat” denilen halkalı kompleks bileşikler meydana gelmektedir. Metal-şelat oluşumu birçok önemli biyolojik işlevlerde yer almaktadır. Özellikle kemoterapi alanında, bazı kimyasal reaksiyonlarda çeşitli substratlara oksijen taşıyıcı olarak aromatik aminlerin Schiff Bazı kompleksleri tercih edilmektedir (28). Ayrıca bunların kompleksleri tarım sahasında, polimer teknolojisinde, polimerler için anti-statik madde olarak kullanılmaktadır (29, 30). Jack-

Bean'in yaptığı çalışmada üreaz enzimi ve bazı hidrojenaz enzimleri içerisinde çok az miktarda Schiff Bazı Ni(II) komplekslerine rastlanmıştır (30, 31).

Geniş spektroskopik özellik göstermeleri sebebiyle geçiş metali içeren schiff bazı komplekslerinin sentezine olan ilgi oldukça fazladır. Birçok araştırmacı çeşitli yöntemlerle çok sayıda schiff bazı ligandları elde etmiş ve ligandları metal iyonları ile etkileştirerek pek çok geçiş metalinin Schiff bazı komplekslerini hazırlamıştır (32). Antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antibakteriyel ve antikanser özellikleri bulunan schiff bazlarının sentezi bu açıdan oldukça önemlidir (33-36). Schiff bazlı bileşiklerin metal kompleksleri renkli maddeler olduklarından, boya endüstrisinde ve özellikle tekstil boyacılığında pigment boyarmaddesi olarak da kullanılmaktadır (37). Amino grubunda bulunan azot atomundaki serbest elektron çifti vasıtasıyla Schiff bazları birçok metale bağlanabilmektedir (38). Son zamanlarda bazı metal kompleksleri, ilaç sanayinde, hastalıkların teşhis ve tedavisinde önem kazanmaya başlamıştır. Özellikle kükürt içeren Schiff bazı metal komplekslerinin antikanser özelliğinin ortaya çıkarılmasından sonra bu komplekslere olan ilgi daha da artmıştır (14).

İlk kez Furst tarafından 1963 yılında kansere karşı gösterdikleri iyileştirici etkileri belirlenen metal şelatları kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. 1969 yılında Rosenberg tarafından platin bileşiklerinin antitümör aktivite gösterdiklerini belirlemesiyle metal komplekslerinin biyolojik aktiviteleri üzerine çalışmalar büyük hız ve önem kazanmıştır (39, 40). Cis-platin özellikle yumurtalık ve testis kanseri için kullanılan kanser ilaçlarından biridir. Kemoterapide cis-platinin kullanımı ile testis kanserindeki başarı oranı yaklaşık %90 civarındadır. Fakat cis-platinin kazanılmış ilaç direnci, bulantı, kemik iliği baskılanması, nefrotoksite gibi önemli yan etkileri vardır. Bu yan etkilerden ötürü cis-platin yerine geçiş metali kompleksleri tercih edilmektedir. Çok yönlü redoks ve spektroskopik özellikleri ile geçiş metal kompleksleri, kimyasal nükleazlar olarak metal bazlı terapötik ajanların tasarlanması için uygundur (41). Bakır, platinyum, rutenyum gibi farklı geçiş metallerini içeren sentetik veya doğal ligandlı birçok kompleksin nükleolitik aktivitesi yoğun şekilde araştırılmıştır (19). Bu geçiş metallerinden bakır yaşam için önemli bir iz elementtir. Bazı bakır komplekslerinin elektrokimyasal özellikleri üzerine yapılan çalışmalar düşük indirgeme potansiyeline sahip komplekslerin biyolojik aktiviteyi artırdığını göstermiştir (42). Bakır(II) kompleksleri geniş biyolojik aktiviteye sahiptir ve bu komplekslerin bazılarının

antitümör, antiviral ve anti-inflamatuar ajanlar olduğu bilinmektedir (19). Komplekslerdeki bakır iyonlarının varlığı ilacın ve organik terapötik ajanların etkinliğini artırdığı gözlenmiştir (20). Ayrıca bu kompleksler kimyasal oksidanlar varlığında DNA'nın oksidatif kesimine yol açabilir. Son 10 yılda, güçlü DNA bağlanma ve kesim kabiliyetine sahip birçok bakır (II) kompleksi sentezlenmiştir. Bunların çoğu mükemmel antikanser ve apoptoz düzenleyici etki göstermektedir (43). Bu yüzden yeni kanser ilacı geliştirmek için DNA ile kompleksin bağlanma mekanizması da çalışılmalıdır. Geçiş metal kompleksleri, kovalent, interkalasyon, oluğa veya elektrostatik bağlanma gibi farklı bağlanma modları aracılığıyla DNA ile etkileşir. DNA'ya küçük moleküllerin bağlanma çalışmaları DNA yapı çalışmaları, spesifik sıra kesim ajanları ve potansiyel antitümör ilaçları olarak kullanımları açısından oldukça önemlidir (44). Böyle araştırmalar yüksek antitümör aktiviteye sahip yeni moleküllerin modellenmesi ve onların biyolojik etkilerinin moleküler temelde anlaşılması için imkan sağlar (45). Geçiş metal kompleksleri çift sarmal DNA baz çiftleri arasına interkalasyon yapabilir. Bu durum DNA'nın sıradan davranışını genel olarak etkileyen ve değiştiren bir etkileşimdir (46). DNA baz çiftleri içine interkalasyon yeteneği ligand düzlemselliğine bağlıdır. Üstelik, düzlemsel heterosiklik ligandlı kompleksler sıradışı elektronik özellikleri ve çeşitli kimyasal reaktiviteleri sayesinde iyi şekilde araştırılmıştır (47). Son zamanlarda, bimetalik komplekslerin sentezi artmıştır. Bimetalik kompleksler ilgi çekici antitümör özellik göstermektedir ve moleküler hedef bölgelere çift modlu bağlanmayı sağlayarak artan kemoterapik etkiye sahiptir. Metal kompleksleri, DNA'nın polianyonik yapısındaki oksijen atomuna doğru bir seçicilik gösterir, fosfat iskeletinin negatif yükünü nötralize eder ve böylece DNA'da konformasyonel değişikliklere neden olur (48).

Reedjik ve çalışma arkadaşları lösemi (HL 60) kanser hücreleri üzerinde yeni bakır schiff bazlı kompleksin DNA bağlanma ve kesim yeteneğini belirlemişlerdir. Son zamanlarda, Lou ve çalışma arkadaşları insan meme kanser hücreleri (MCF-7) üzerinde güçlü antitümör aktivite sergileyen schiff bazı ligandlı bakır kompleksi hazırlamışlardır (49).

Nükleik asitlerle etkileşime girebilen yeni moleküllerin araştırılması ve tasarlanması günümüzde araştırmacıların üzerinde çok çalıştığı konulardan biridir. Geçiş metali içeren Schiff bazları çeşitli biyolojik aktiviteleri sebebiyle önemli bir

bileşik sınıfıdır. DNA'ya bağlanabilen veya DNA'yı kesebilen yeni moleküllerin tasarlanması ve geliştirilmesi açısından geçiş metali içeren Schiff bazları önemlidir.

Schiff bazlarının ve geçiş metal komplekslerinin bazı özelliklerinden ve kullanım alanlarından bahsedilmiştir. Bu bilgiler ışığında çalışmamız, elde edilecek yeni tür Schiff bazı ve komplekslerinin daha ilginç özelliklere ve kullanım alanlarına sahip olabilecekleri düşüncesi ile planlanmıştır.

4.1.2. Ferrosenler ile İlgili Genel Bilgiler

Ferrosen Sandviç kompleksleri denilen organometalik bileşiklerin ilk örneğidir. Bütün sandviç yapısındaki bileşiklerde aromatik halka bir geçiş metaline bağlanır. Bu bağlanmada metalin bütün karbon atomlarına uzaklığı yaklaşık aynıdır. Metal her iki halkadaki karbon atomu ile etkileşime girer ve böylece son derece kararlı bileşikler ortaya çıkar (Şekil 3).

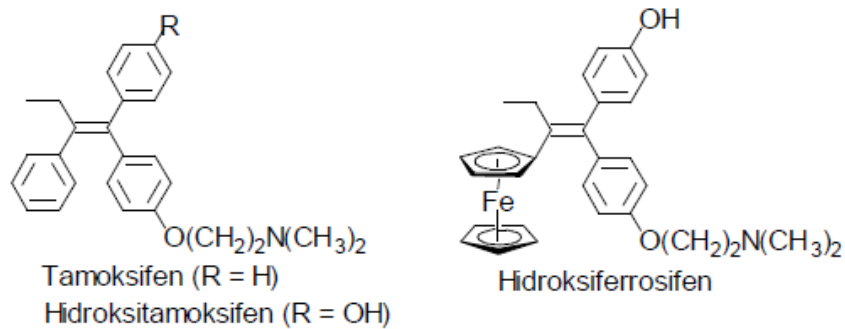


Şekil 3. Ferrosen bileşiğinin molekül yapısı

Ferrosen'in ilk bulunuşu ve yapı karakterizasyonunun belirlenmesi 1950 yılların başlarındadır (50). Ferrosenin kendine özgü sandviç yapısının oluşu hidrokarbonlarla d-bloğu metal bileşiklerin ortaya çıkmasına öncülük etmiştir. Böylece, organometalik bileşiklerde d blok metal karbon bağlarıyla ilgili çalışmalara daha büyük ilgi gösterilmiştir. Ferrosenin bulunmasıyla d blok organometalik sentez ve karakterizasyonu üzerine yapılan araştırmalarda artış olmuştur. Ferrosenin 1951 de bulunuşundan sonra benzer aromatik bileşiklerde bulunmuştur. Genellikle 5 ve 6 üyeli aromatik halkaları ve zirkonyum, mangan, kobalt, nikel, krom ve uranyum gibi metalleri içeren bu tür bileşikler "Metalosen" olarak da bilinmektedirler (51-53). Ferrosenin dışındaki disiklopentadienil türevleri çok kararlı aromatik bileşikler olmamakla beraber asite, baza ve neme karşı hassas bileşiklerdir. Bu yüzden bu bileşiklerin yeni türevlerinin yapılması için pek çalışılmamıştır.

1954 yılında ferrosen'in sandviç yapısı IR, NMR ve X-ray çalışmaları ile belirlenmiştir. X-ray analizi sonuçlarında ferrosen, demir(II) iyonunun iki siklopentadienil halka arasında yer aldığı bir bileşik olarak tanımlanmıştır. Ferrosendeki C-C bağ uzunluğu 1.40 Å ve C-Fe uzunluğu hepsinde 2.04 Å'dur. Ferrosenin yapısının açıklanmasındaki en büyük kanıt halka karbonları ve demir atomu arasındaki eşit bağ uzaklığıdır. Her halkadaki 5 karbon atomu demir atomuyla eşit etkileşim içindedir (54).

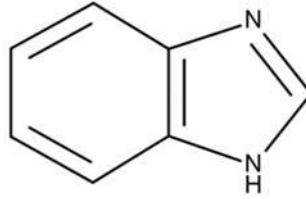
Dünyanın her tarafında süren organometalik bileşiklerle ilgili bir çok çalışmada oldukça önemli aşamalar kaydedilmiş ve 1974 yılında Ernst Fisher ve Geoffrey Wilkinson'a bu alandaki başarılarından dolayı Nobel ödülü verilmiştir (55). Daha sonra yapılan çalışmalar biyoorganometalik kimyanın da yükselişi ile ferrosen türevlerine dikkat çekmiştir. Ferrosenin sulu ve aerobik ortamlardaki kararlılığı ve çok çeşitli türevlerinin hazırlanabilmesi, ferrosen ve türevlerini biyolojik uygulamalar için ilgi çekici moleküler arasına katmıştır. Son zamanlarda, ferrosenin DNA, RNA, protein ve karbonhidratlar gibi pek çok molekülle etkileşimi sonucu birçok türevi sentezlenmiştir (56, 57). Birçok ferrosenli yapıların ve ferrosenin yükseltgenmiş formuna sahip ferrosenyum tuzlarının anti tümör etkisi belirlenmiştir (58, 59). Tamoksifen ve türevleri meme kanseri tedavisinde kullanılan başlıca ilaçlar olmasına rağmen uzun süreli kullanımı etkisini yitirmesine neden olabilmektedir. Bu yüzden tamoksifen içeren ilaçların geliştirmesinde ferrosen içeren analogların, "ferrosifenlerin" çok iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (Şekil 4), (60).



Şekil 4. Tamoksifen ve ferrosifen bileşikleri (Gürcan'dan, 39)

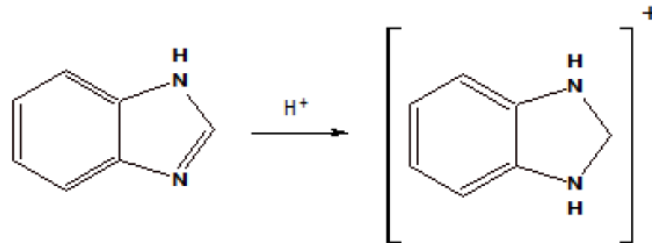
4.1.3. Benzimidazoller ile İlgili Genel Bilgiler

Benzimidazol, benzen ve imidazol halkalarının kondenzasyonundan oluşmuş bir halka sistemidir (Şekil 5). Benzimidazol halka sistemi iki farklı yapıda azot atomu içermektedir. Üzerinde hidrojen atomu taşıyan azot “imino azotu” veya “pirol azotu”, tersiyer yapıdaki diğer azot ise “piridin azotu” veya “tersiyer azot” olarak adlandırılmaktadır (61).



Şekil 5. Benzimidazol yapısı

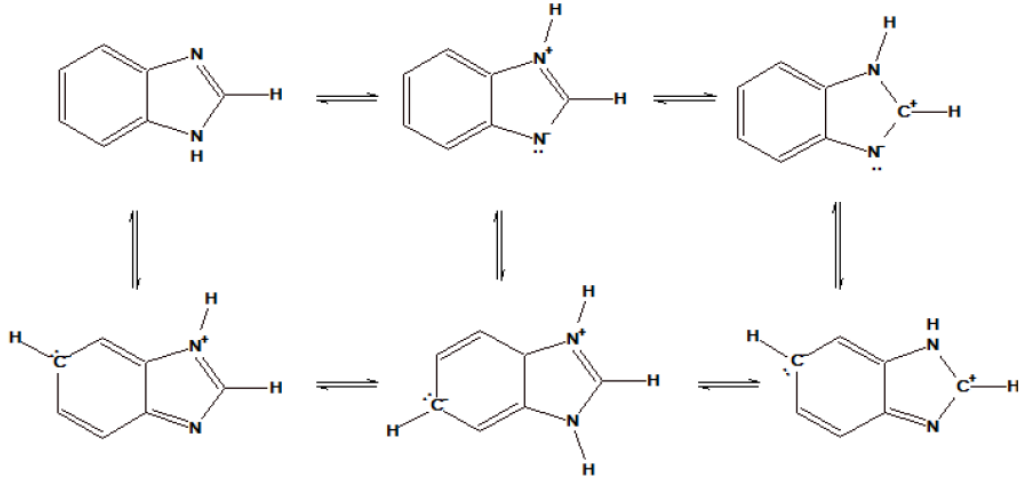
İlk keşfedilen benzimidazol bileşiği, 1872 yılında Hoebrecker’in 2-nitro-4-metilasetanilidi kalayla indirgenmesi ile elde ettiği 2,5(2,6)-dimetilbenzimidazol bileşiğidir (62). Benzimidazoller genel olarak kristal yapılı, suda az, alkolde ise kolayca çözünebilir, yüksek erime ve kaynama noktasına sahip katılardır. Bazik özelliği asit özelliğinden daha baskın amfoterik karaktere sahip benzimidazoller, metal ve asitlerle tuz oluştururlar (63). Üzerindeki ortaklanmamış elektron çifti bulundurmasından, reaksiyona girdikleri atom veya gruba elektron verebilen tersiyer azot atomu içermesinden ötürü bazik karakterlidir (Şekil 6). İmino hidrojeni ise yapıya asidik özellik kazandırmaktadır. Ayrıca elektronegatif gruplara sahip benzimidazoller asidik karakteri artırmaktadır (64).



Şekil 6. Benzimidazol’un bazik yapısı (Yılmaz’dan, 63)

Benzimidazol ($pK_a=5.5$), imidazole ($pK_a= 7.0$) göre daha zayıf bir baz olmasının sebebi imidazol ve benzen halkaları arasındaki konjugasyondur. Benzimidazol halkası içerisindeki konjugasyonun olması yapının kararlılığını arttıran bir etkidir. Benzen

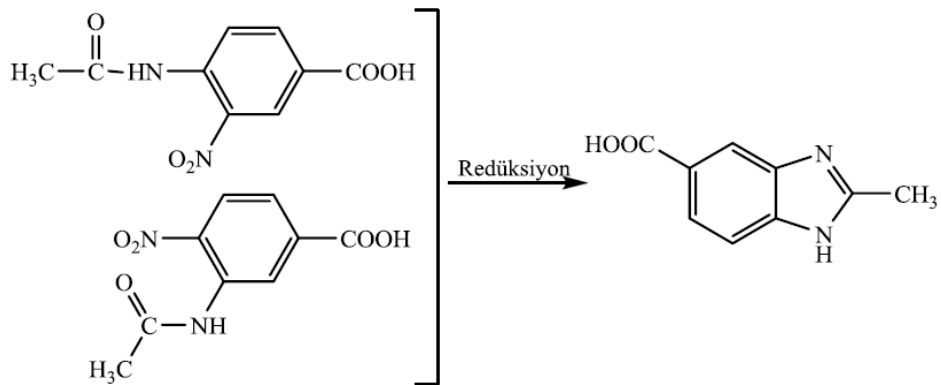
halkası üzerindeki sübstitüe grupların bulunması bazik gücü etkilemektedir. Elektron çekici gruplar bazik gücü azaltırken, elektron salıcı gruplar bazik gücü arttırmaktadır (Şekil 7) (65).



Şekil 7. Benzimidazol rezonans formülleri (Yılmaz'dan, 63)

Rezonans formüllerinden de görüldüğü üzere, azot üzerindeki elektronların benzen halkasına geçmesiyle oluşan yapılar, 5(6) konumunun elektrofilik sübstitüsyona karşı reaktif olmasını sağlamaktadır. Çok güçlü asidik şartlarda bile, elektrofilik sübstitüsyon, heterosiklik halkaya değil, 5 numaralı karbona doğru gerçekleşir ve 5-monosübstitüe benzimidazol türevi elde edilir (66).

Serbest imino hidrojeni içerdiği için benzimidazoller, tautomerik sistemlerdir. Green ve Day, 1942 yılında 3-nitro-4-asetamido-benzoik asit ve 4-nitro-3-asetamidobenzoik asitin redüksiyonu ile aynı benzimidazolü elde etmişlerdir, bu durum benzimidazolün tautomerik karakterini göstermek adına faydalı olmuştur (Şekil 8) (67).



Şekil 8. Benzimidazol redüksiyon reaksiyon denklemi (Küçük'ten, 67)

Benzimidazollerin en belirgin özelliklerinden biri kimyasal dayanıklılı olmalarıdır. Asitler ve bazlarla muamele edildiğinde bile direnç gösterirler. İmidazol halkası yükseltgenmeye karşı çok dirençlidir. Benzimidazol, KMnO_4 ile etkileştirildiğinde benzen halkası yükseltgenerek parçalanır ve 4,5-imidazolkarbosiklik asit oluşur. Benzimidazoldeki imidazol halkası indirgenmeye karşı da çok dirençlidir. Hatta benzen halkası bile indirgenmeye karşı biraz direnç gösterir. Benzimidazoller Ni ve hidrojenle indirgenmezken, 2-metil-2-etil-ve 1,2-dimetilbenzimidazol buzlu asetik asit içinde platin oksit üzerinde hidrojenlendiği zaman karşılık gelen tetrahidro türevlerine dönüşür. 2-Fenilbenzimidazol bu koşullarda 2-sikloheksil-4,5,6,7-tetrahidrobenzimidazol verir. Benzimidazolün kimyasal etkinliği, azotların tuz oluşumu, açillenme ve alkillenme tepkimeleri ile benzen halkasının elektrofilik süstitasyon tepkimesinden oluşmaktadır (68).

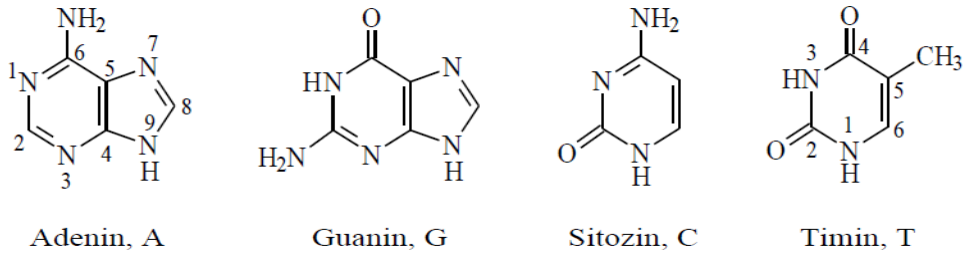
Benzimidazol halka sistemi nükleotit bazlarının yapısını oluşturan pürin halkasına olan benzerliği ve biyolojik olarak aktif birçok bileşiğin yapısında bulunan önemli bir farmakofor grup olması nedeniyle ilaç keşfinde anahtar rol oynayan önemli bir yapıdır (69). Literatürdeki birçok çalışmada, farklı heterosiklik halkaları ile benzimidazol türevlerinde, etkiden sorumlu grubun benzimidazol halkası olduğu bildirilmiştir (70). Benzimidazol halkasını taşıyan antikanser ilaçlar sayıca az olmasına rağmen halka sisteminin antikanser etkinliği üzerinde literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır (71, 72). Ayrıca, yeni antimikrobiyal etkili bileşiklerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalarda, dikkat çeken yapılardan birisi de benzimidazol halkası taşıyan bileşiklerdir. Benzimidazol türevli bileşikler, antiülseratif, antihelmintik, antihistaminik, antiinflamatuvar ve antioksidan gibi pek çok etkisi nedeniyle ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadır (73).

Benzimidazol, vitamin B12 ve birçok doğal bileşiğin bileşeni olarak anti-tümör etki (74), nükleik asit sentezinin inhibisyonu (75) gibi çok geniş farmakolojik özellikler gösterir. Anti-kanser ilaçlardan imet 3393 (cytostasan) yapısında benzimidazol halkasına sahiptir (76). Bazı benzimidazol türevlerinin metal kompleksleri metalloenzimler (77) ve serine proteases (78) gibi birçok biyolojik molekül için model bileşik olarak kullanılır. Ayrıca benzimidazol türevleri anti-viral, anti-fungal etki göstermektedir (79). Benzimidazol ve türevleri bakteri ve maya gelişimini engellediği bilinmektedir. Alkil süstitüe benzimidazoller grip hastalığına sebep olan Lee

bakterisinin çoğalmasını engellemektedir (80). 4 -(benzo [d] imidazol/oksazol-2-il) benzamidler bileşiği analjezik etkiye sahiptir (81).

4.2. DNA ile İlgili Genel Bilgiler

DNA molekülünün yapısı ilk kez 1950’li yıllarda Watson ve Crick tarafından yapılan deneyler sonucunda aydınlatılmıştır (82). Bir nükleotit olan DNA, bir purin veya pirimidin türevi olan azot içeren bir baz, bir pentoz şekeri ve bir veya birden fazla fosfat grubundan oluşmaktadır. Temel iskelet şeker–fosfat birimlerinden oluşurken, bu moleküllerin birbirlerine bağlanmasını fosfodiester bağları sağlar. DNA zincirlerinde şeker-fosfat iskeletinin sadece yapı görevi bulunurken herhangi bir genetik bilgi içermez. DNA molekülünde, genetik bilginin depolanmasından sorumlu yapı bazlardır ve DNA’da yer alan purin bazları adenin (A), guanin (G) ve primidin bazları sitozin (C), timin (T) şeklindedir (Şekil 9), (83).



Şekil 9. DNA molekülünde yer alan bazlar (Gürcan’dan, 39)

Nükleik asitlerin primer yapısı, bir nükleotitteki 5'-fosfat gruplarıyla diğer nükleotitteki 3'-hidroksi grupları yönünde kovalent bağlarla birbirine bağlanmaları ile oluşur, basit bir şekilde nükleotitlerin sırasıdır. DNA zincirlerinin şeker ve fosfat grupları hidrofilik olup, şeker birimlerindeki hidroksil grupları su molekülleri ile hidrojen bağları oluştururlar. Nükleik asitler, fizyolojik pH değerlerinde fosfat grubu üzerindeki zayıf asidik gruplar iyonlaşmış olduğundan, bir polianyon karakteri taşırlar (84).

1953’te iki genç araştırmacı, James Watson ve Francis Crick, DNA’nın yapısının ikili sarmal şeklinde olduğunu önermiştir. Bu önerilerini “Nature” dergisinde “Nükleik Asitlerin Moleküler Yapısı: Deoksiriboz Nükleik Asiti İçin Bir Yapı” adlı kısa bir makale ile yayınlamışlardır. Watson ve Crick’in önerilerini geliştirmesi için kritik olan

bulgular, başlıca iki kaynaktan gelmektedir. Bunlardan ilki, hidroliz edilmiş DNA örneğinin baz kompozisyon analizi iken, ikincisi DNA'nın X kırınım çalışmalarıdır.

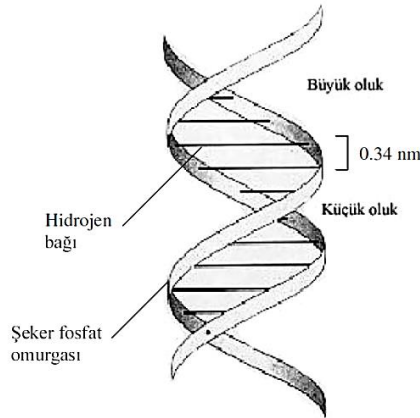
Baz kompozisyonu çalışmaları, Erwin Chargaff ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. 1949-1953 yılları arası birçok organizmadan elde edilen DNA örneklerinden dört bazı ayırmak için kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Daha sonra nicel yöntemleri kullanarak her bir örnekteki dört bazın miktarını tayin edilmiştir. Elde edilen verilere göre, DNA molekülünün baz kompozisyonunun kesin profili çıkarılmıştır.

X kırınımı analizi çalışmaları DNA'nın yapısının aydınlatılması adına çok faydalı olmuştur. DNA zincirleri X-ışını bombardımanına tutulduğunda, molekülün atomik yapısına göre ışınlar saçılarak, saçılım profili, fotoğraf filmi üzerinde lekeler halinde belirtilerek, özellikle moleküldeki düzenli yapılar ve genel görünümün incelenmesi mümkün olmuştur. 1950-1953 yılları arası, Maurice Wilkins'in laboratuvarında DNA'nın X-ışını kırınımı çalışan Rosalind Franklin, daha saf DNA örneklerinden, daha gelişmiş X-ışını verilerini elde etmiştir.

Watson ve Crick bu verilerden faydalanarak 1953'te DNA'nın yapısını belirlemişlerdir. DNA sarmalını Watson-Crick modeli ile açıklamışlardır. Bu modele göre;

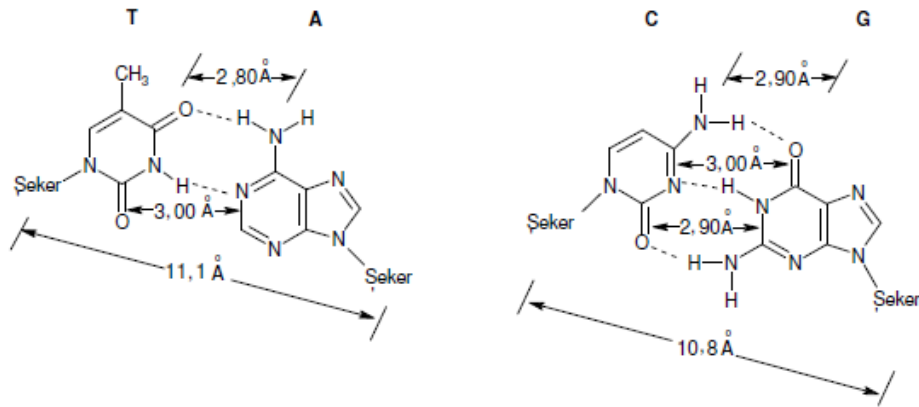
1. İki uzun polinükleotit zinciri bir merkez eksen etrafında kıvrılarak, sağ el ikili sarmal yapısını oluşturur.
2. İki zincir birbirine antiparaleldir; yani, iki zincirin C-5' ucundan C-3'ucuna doğru olan yönleri birbirine göre terstir.
3. Her iki zincirin bazları düzlemsel yapıdadır ve düzlemli eksen diktir; bazlar arasında $3,4 \text{ \AA}$ (0,34 nm) mesafe olacak şekilde birbiri ardına istiflenir ve sarmalın içinde yer alır.
4. Karşı zincirlerdeki azotlu bazlar, hidrojen bağları ile bağlanarak birbirleri ile eşleşirler; DNA'da sadece A ile T ve G ile C eşleşmesi mümkündür.
5. Sarmalın her bir tam dönüşü $34 \text{ \AA}$ (3,4 nm)'dir; böylece her bir dönüşte 10 baz yer alır.
6. Molekülün herhangi bir bölümünde, eksen üzerinde sıra ile daha geniş olan büyük oluklar ve daha dar olan küçük oluklar yer alır.

7. Sarmalın çapı 20 Å (2 nm)'dir (Şekil 10) (85).



Şekil 10. Watson-Crick DNA modeli (Öner'den, 84)

DNA'nın Franklin tarafından çekilen ilk X-ray fotoğrafından DNA bazlarının birbirleriyle sıkıca istiflendiği anlaşılmıştır ve DNA molekülünün bir sarmal olacağı sonucuna ulaşılmıştır. Watson ve Crick, bu X-ray fotoğrafından faydalanarak ve bu konuyla ilgili yapılan diğer çalışmalarının sonuçlarını da değerlendirerek Adenin ile Timin, Sitozin ile Guanin arasında Hidrojen bağları olduğunu ileri sürmüşlerdir (Şekil 11) (86, 87).

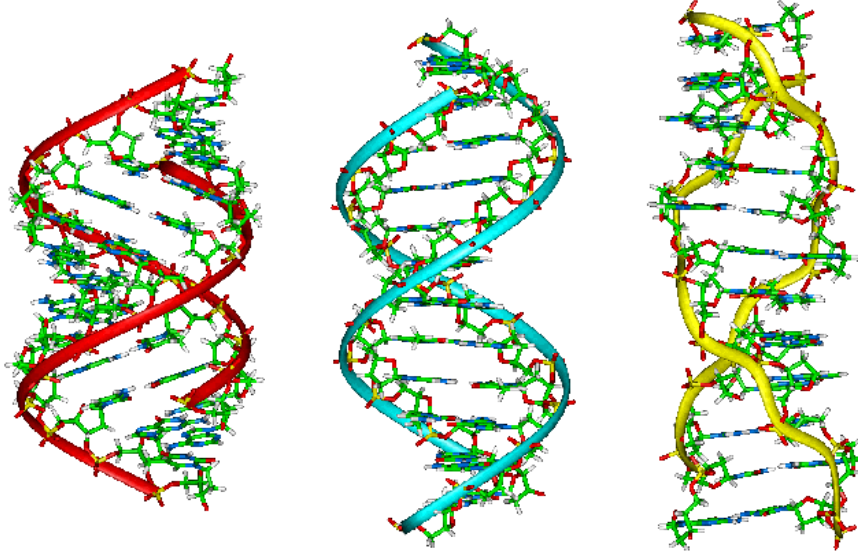


Şekil 11. A-T ve C-G arasındaki Watson-Crick hidrojen bağları (Öner'den, 84)

4.2.1. DNA'nın Farklı Sarmal Formları

Değişik izolasyon koşullarına göre, DNA'nın farklı konformasyonel formları tanımlanmıştır. DNA sarmal yapısı ile ilgili üç farklı konformasyonel yapı saptanmıştır. Bu konformasyonlar; A-DNA, B-DNA ve Z-DNA şeklindedir (Şekil 12). Birbirleri ile hidrojen bağlarıyla eşleşen purin ve pirimidin bazları ise sarmalın iç kısmında, sarmalın

uzun eksenine dik bir düzlem üzerinde ve her bir eşleşmiş baz çifti birbiri üzerine istiflenmiş olarak düzenlenirler. Böyle bir istiflenme ise eşleşmiş bazların kuvvetli Van der Waals etkileşimleri yapmalarını sağlar. Ayrıca, sarmalda yer alan iki zincir birbirine göre antiparalel olarak yönelmişlerdir (88).



Şekil 12. DNA'nın farklı sarmalları: A-DNA, B-DNA, Z-DNA

Her üç konformasyon iki tane antiparalel polinükleotit zincirinin hidrojen bağları ile bağlanması ile oluşur, fakat sarmal şekilleri birbirinden farklıdır. A-DNA sarmalı sıkı bir yapıda olup olukların derinlikleri birbirine benzerdir. A-DNA yüksek tuz veya dehidrasyon koşullarında baskın olan yapıdır. Bu formun çapı 23 Å olup her dönüşünde 11 baz çifti yer alır. En baskın form olan B-DNA formunda büyük oluk ve küçük oluk olmak üzere iki farklı oluk bulunur. Bu form, düşük tuz derişiminin olduğu sulu ortamda bulunan formudur ve biyolojik olarak önemli olduğuna inanılan konformasyondur. B-DNA'nın çapı 34 Å 'dur ve her dönüşte 10 baz çifti bulunur. Z-DNA ise daha farklı bir yapıdadır. Sarmalın çapı 18 Å olup her bir dönüşte 12 baz çifti içerir ve zikzak konfigürasyona sahiptir. Z-DNA'da büyük oluk neredeyse yok gibidir (89, 90).

4.2.2. DNA ile Küçük Moleküllerin Etkileşimi

Nükleik asitler; su, küçük organik moleküller, metal iyonları ve komplekslerini de içeren pek çok kimyasal tür ile dönüşümlü olarak etkileşirler. Bu dönüşümlü etkileşimler DNA yapı ve fonksiyonu için oldukça önemlidirler ve nükleik asitlerin çeşitli konformasyonlarının kararlı kılınması bu moleküllerle sağlanır. DNA ile etkileşen suyun

konsantrasyonu, tuz konsantrasyonundaki (iyonik güç) değişmeler ve organik moleküllerle etkileşimler sonucu nükleik asitlerde inanılmaz yapısal değişimler görülür (91). Bu değişimler, nükleik asitlerin yapısı ve fonksiyonu için oldukça önemlidir. Nükleik asit konformasyonları; su, metal iyonları veya organik katyonlarla tersinir etkileşimler aracılığıyla dengelenir. Ayrıca, viral hastalıklar ve kansere karşı kullanılan ilaçların en önemlileri nükleik asitlerle tersinir etkileşenlerdir. Nükleik asitlerle küçük moleküllerin etkileşimi üzerine yapılan çalışmalarda DNA'nın tercih edilme sebebi, DNA'nın hücrel sistemlerde olan çoğu biyokimyasal süreçleri düzenlenmesinden kaynaklanır (92, 93).

Moleküllerin ve iyonların çift sarmal nükleik asitlerle etkileşimi üç sınıfa ayrılır: Dış elektrostatik etkileşimler, oluğa bağlanma etkileşimleri ve interkalasyon (Şekil 13). Alkali ve toprak alkali metal iyonları ile çeşitli organik moleküllerin katyonları DNA ile dış iskelet üzerinden elektrostatik olarak etkileşirler. Nükleik asitlerin büyük veya küçük oluklarında yer alan baz çiftlerinin dışa yönelik kısımlarıyla moleküllerin doğrudan etkileşimlerini içeren oluğa bağlanma etkileşimleri, çeşitli fonksiyonel gruplara sahip organik sistemler ile DNA arasında gerçekleşir. İnterkalasyon ile gerçekleşen etkileşimler ise baz çiftleri arasına düzlemsel veya düzlemsel yakın aromatik halkalı sistemlerin veya böyle geometriye sahip metal komplekslerinin girmesi ile oluşurlar (94).

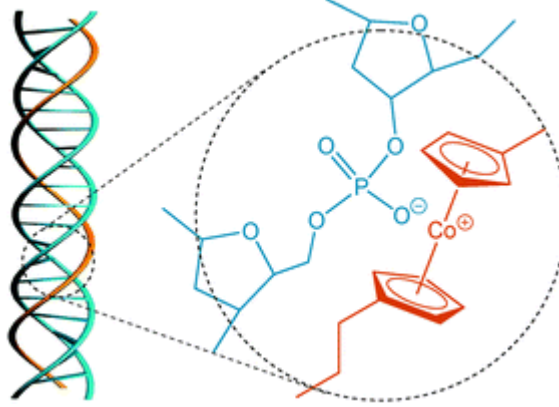


Şekil 13. DNA ile küçük moleküllerin etkileşimi: Dış elektrostatik etkileşim, oluğa bağlanma, interkalasyon (Ağır'dan, 94)

4.2.2.1. Dış Elektrostatik Etkileşimler

Nükleik asitler, anyonik fosfat gruplarının negatif yüklü olmasından ötürü yüksek derecede yüklü polielektrotlardır. Alkali metaller gibi katyonlarla kuvvetli bir şekilde etkileşebilirler (95, 96). Küçük katyonlardan büyük proteinlere kadar çeşitli iyonik türlerin bağlanma serbest enerjisinin önemli bir kısmı kompleksteki nükleik asit yüklerinin nötralleşmesine sebep olur. Ayrıca karşı iyonların salıverilmesine uygun entropik etki

oluşur. Sabit bir sıcaklıkta, bu entropik etki nükleik asit denatürasyonuna sebep olduğu gibi çözeltinin tuz konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak da katyonik ligandların bağlanmasını artırır. (Şekil 14), (97).



Şekil 14. DNA ile küçük moleküllerin dış elektrostatik etkileşimi

Geçiş metalleri kısmi olarak dolu d-orbitallerine sahip oldukları için serbest radikal oluşturabilirler. Su moleküllerini kolaylıkla verebilen geçiş metalleri, iç küre koordine kompleksler oluşturabilir. Geçiş metalleri genellikle bazlarla doğrudan etkileşimlerine rağmen fosfat gruplarına dolaylı olarak bağlanır. Çoğu geçiş metalleri, pürin bazlarının N7 ile veya pirimidin bazlarının N3 atomu ile reaksiyona girerek çift sarmal yapıyı bozarlar. Nükleik asitlerin dış yüzeyi boyunca su molekülleri bağlanır. Nükleik asit konformasyonlarının kararlılığında su moleküllerinin yüklü fosfat grupları ile spesifik etkileşimleri kadar bazlardaki polar gruplarla ve şekerlerle spesifik etkileşimleri de etkilidir (39).

Bir başka dış elektrostatik etkileşim türü de spesifik olmayan etkileşimlerdir. Düzlemsel aromatik moleküller ve dimerler daha yüksek yığınlar oluşturmak için birbirlerinin üstüne istiflenebilirler. Bir madde molekülleri yüklü olduğunda, elektrostatik olarak birbirlerini iterler. Oysaki, eğer katyonlar anyonik DNA şeker-fosfat zinciri ile etkileşerek zincir eksenini boyunca istiflenirse yük itmesi azalır ve bu tip bağlanma çift zincir boyunca düzlemsel katyonların spesifik olmayan dış istiflenmelerine sebep olur (98).

4.2.2.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimleri

Nükleik asitlerin büyük veya küçük oluklarının birinde yer alan baz çiftlerinin oluğa bakan fonksiyonel grupların oluşturduğu kısımları ile diğer moleküllerin doğrudan etkileşimleri oluğa bağlanma etkileşimleridir (Şekil 15) (95). Oluğa bağlanma hayli güçlü bir bağlanma çeşididir ve bu bağlanma, bir molekül, DNA'nın oluklarının

birine uygun büyüklük ve şekilde ise gerçekleşir (99). Oluğa bağlanarak etki gösteren ilaçlar; biyolojik etkilerini, DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyonu ve mitoz sırasındaki kromozom ayrılması gibi hücrel genetik işlemlerde çok önemli görevleri olan enzimlerle, DNA'nın etkileşimini engelleyerek gösterdikleri bilinmektedir. Oluğa bağlanma, DNA konformasyonunda küçük değişikliklere neden olmakta, DNA'nın doğal şeklini önemli ölçüde bozmamaktadır (100).



Şekil 15. DNA ile oluğa bağlanma (Gökçe'den, 89)

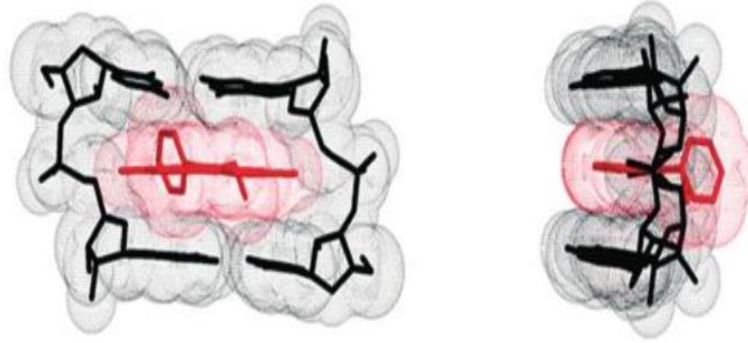
Tipik olarak, pirol, furan veya benzen gibi basit aromatik halka sistemlerine sahip moleküller küçük oluğa bağlanabilir. Küçük oluğun sarmal şeklindeki kavisine uymak için moleküldeki bu halkaların uygun bir şekilde bükülmesi ve su ile yer değiştirmesi ile mümkün olur. Küçük olukta A:T bölgelerinin genişlik açısından daha uygun olması sebebiyle aromatik moleküllerin bu bölgeyle etkileşimi daha kolaydır ve oluğun dış yüzeyini oluşturan sarmal zincirlerle van der Waals etkileşimleri yapar (101).

4.2.2.3. İnterkalasyon Etkileşimleri

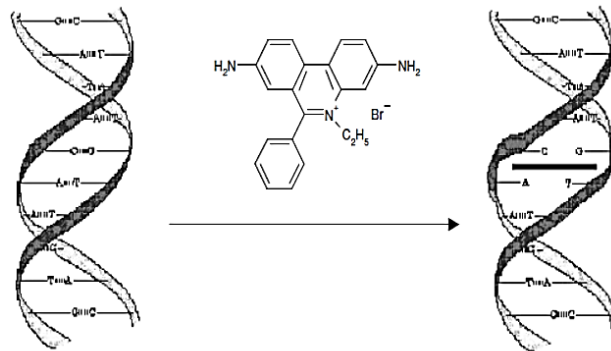
DNA ile poliaromatik moleküllerin interkalasyonu ilk kez Lerman tarafından önerilmiştir (101). İnterkalasyon sürecinde, aromatik bileşiği bazlar arası boşluğa uydurmak için şeker–fosfat bağlarına ait bükülme açılarında değişiklikler meydana gelir. DNA omurgasındaki bükülme, bağların rotasyonunun bir sonucu olarak interkalasyon bölgesinin oluşumu, interkalasyon bölgesindeki helikal dönmenin azalması ve çift sarmalın uzaması ile baz çiftlerinin ayrılmasına neden olur (39, 93). Etkili interkalatörler düzlemsel olmalı ve sıklıkla üçlü birleşmiş 6 üyeli halkaları içermelidir. Geometri, elektron yapı, konformasyon, stabilite ve interkalatör moleküllerin etkileşim mekanizmasının araştırılması kuantum kimyasının önemli

araştırma konusudur. Böyle araştırmalar yüksek antitümör aktiviteye sahip yeni moleküllerin modellenmesi ve onların biyolojik etkilerinin moleküler temelde anlaşılması için imkan sağlar (45). İnterkalasyon, düzlemsel aromatik bir sübstitüentin DNA baz çiftlerinin arasına girmesi ve bunun sonucunda doğal olarak DNA sarmal yapının açılması ve uzaması ile sonuçlanmaktadır (102).

Etidiyum bromür gibi heterohalkalı organik sistemlerin DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlandığı bilinmektedir (Şekil 16, Şekil 17) (103). Bu molekülün doygun konsantrasyonu ile DNA interkalasyonunda her bir baz çifti arasını doldurduğu X-ışını yapı çalışmaları ile ortaya konmuştur ve bu etkileşimde etidiyum bromür moleküllerinin eşleşen baz çiftleri arasındaki 10.2 Å'luk bir boşluğu doldurduğu tespit edilmiştir.



Şekil 16. DNA ile interkalasyon (Gökçe'den, 89)



Şekil 17. DNA ile EB'nin interkalasyonu (Gökçe'den, 89)

Düzlemsel aromatik hetero halkalı organik yapılar yanında azot içeren heterohalkalı ligandların düzlemsel katyonik metal komplekslerinin de DNA ile interkalasyon yaptığı tespit edilmiştir. Platin kompleksleri en bilinen örnekleridir ve içerdikleri halka sistemleri DNA ile interkalasyon yoluyla bağlanmayı kolaylaştıran bir

etmemidir. Ayrıca DNA ile interkalasyon için uygun yapısal fonksiyonlara ve geometrilere sahip, rutenyum, bakır ve mangan içeren komplekslerin bu özellikleri de çeşitli yöntemlerle analiz edilmiştir.

Bisinterkalatörler iki ayrı interkalasyon yapan düzlemsel (kromofor) halka sistemine sahiptirler ve halka sistemleri birbirlerine uzunluk ve rijitlikçe değişebilen zincirlerle bağlanırlar. Bisinterkalatörlerin monomerik olanlara göre çeşitli potansiyel avantajları vardır. İnterkalasyonu sağlayan birimlerin sayısı DNA ile bağlanma ilgisini oldukça artırır (104, 105).

4.3. DNA Kesim (Nükleaz) Etkinliği

DNA kesme, birçok biyolojik süreci ve ayrıca genetik materyallerin biyoteknolojik manipülasyonunu da kapsayan önemli bir enzimatik reaksiyon olarak kabul edilir. Örneğin, topoizomeraz enzimleri, DNA'nın bir ya da her iki dizisini keserek, replikasyon, transkripsiyon ve diğer hücrel transaksiyonlarda oluşan DNA problemlerini ortadan kaldırır. Diğer bir örnek yabancı DNA kesmesi ya da etkilenmiş hücrenin apoptozisi (programlanmış hücre ölümü) sırasında hücrel DNA' nın degrade olmasıyla, virüs enfeksiyonlarına karşı hücreyi koruyan restriksiyon enzimleridir (39).

Biyoteknoloji ve ilaç sanayinde yapay kimyasal nükleazların geliştirilmesi son derece önemlidir. Seçici DNA kesme nükleazların dizayn edilmesi kemoteropik ajanların ve antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesine öncülük edecektir. Bunun yanı sıra yapay nükleazlar biyologlar için DNA manipülasyonu için önemli ve yeni araçlar sunacaktır. Bu amaçla geçiş metal kompleksleri yapısal zenginliği ve reaktivitesi nedeniyle son yıllarda dikkat çekici bir rol almaktadır. Örneğin 1,10-fenantrolinin bir bakır kompleksi DNA-protein etkileşimlerinin detaylı bir şekilde çalışılması için gerekli olan DNA-parmak izi deneyleri için kullanılmaktadır. Geçiş metal kompleksleri çok çeşitli yapısal özellikleri ve kontrol edilebilir redoks potansiyelleri nedeniyle yapay nükleaz uygulamaları için çok uygundur. Ayrıca ligandlar metalloproteinlerdeki aktif gruplara benzer şekilde biyolojik gruplar ve metal iyonları olacak şekilde tasarlanabilir. DNA kesmenin etkinliği, metal komplekslerini DNA'ya ilgisini arttırarak genişletilebilir. Bu iş için uygun olan koordinasyon bileşiklerinin DNA' ya bağlanabilen bir gruba sahip olması gerekir. Böylelikle metal kompleksin DNA'ya odaklanma yeteneği arttırılabilir (89).

DNA kesme mekanizması oksidatif ya da hidrolitik yolla olabilirken oksidatif kesme şeker veya nükleobazlarda meydana gelir. Buna karşılık hidrolitik kesme DNA'nın fosfodiester bağından meydana gelir. DNA'nın omurgası biyolojik sistemlerde sık rastlanan bir kimyasal bağ olan fosfodiester zincirleriyle oluşmuştur. Bu yüzden DNA'nın hidrolizi çok önemli bir enzimatik reaksiyondur. Ancak DNA'nın hidrolize olan olağanüstü kararlılığı nedeniyle bu reaksiyon oldukça zordur. Fosfodiester bağlarını hidroliz eden enzimler çoğunlukla aktif bölgelerinden Mg^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} ve Fe^{+2} gibi katalitik metal iyonlarını içerirler. Bu yüzden metal kompleksleri fosfodiester bağının kesilmesi için çok uygun bir araçtır (39).

Çift sarmallı (double stranded) DNA'nın fosfodiester bağının hidrolizi ile yürüyen hidrolitik kesmesi, deoksiriboz şeker kısmından veya guanin bazından meydana gelen oksidatif DNA kesmesi ile karşılaştırıldığında hücre açısından çok daha fazla avantajlıdır.

DNA'nın kovalent modifikasyon mekanizmaları iki kategoride sınıflandırılır:

- Elektrofillerin DNA'nın nükleofilik kısımlarıyla reaksiyonu
- Radikallerin DNA ile reaksiyonu.

Elektrofiller, DNA yapısındaki farklı nükleofilik kısımlarla etkileşebilir. Kimyasal yapılarına bağlı olarak DNA'nın belli nükleofilik kısımlarına seçicilik gösterirler. DNA da guaninin N7, N3 ve ekzosiklik N2 amino grubu ile adeninin N7 ve N3 kısımları doğal ürünlerle en çok modifikasyona uğrayan kısımlarıdır. Pürin kalıntılarının N7 ya da N3 pozisyonundan elektrofilik modifikasyonu glikozidik bağın zayıflamasıyla sonuçlanır. Bunun sonucunda abazik bölge oluşur ve nötral şartlarda bu bölgeler hidrolizlenerek DNA kesimi gerçekleşir. DNA bazlarındaki ekzosiklik azot ve karbonil oksijenleri ya da DNA omurgasındaki fosfat oksijenleri ile elektrofilik türlerin reaksiyonu genellikle kararlı ürünler oluşturur. Bazı radikal türleri DNA ile değişik pozisyonlarda etkileşirler. DNA'nın radikaller tarafından hasara uğratılmasında en önemli yol deoksiribozdan hidrojen atomu kopartılmasıdır. Deoksiriboz şekerinden hidrojen atomu koparılması şeker fosfat omurgasının kırılmasına sebep olur. Şeker fosfat omurgasına etkimeye ek olarak bazı radikaller de DNA bazları ile etkileşirler. Bu reaksiyonlar şeker fosfat omurgasının kırılmasına sebep olmazlar fakat DNA yapısındaki modifikasyonlar biyolojik olarak önemlidirler. Spesifik bir bağlanma

olmadığı zaman DNA kesimi genelde küçük dizilerle ya da baz özgünlüğüyle meydana gelir. Bunun aksine alkilleyici ajanlarla DNA kesimi bir veya daha fazla DNA bazı için selektivite gösterir (89).

Birçok kesim maddesi, kapalı çift zincir DNA molekülleri ile etkileşerek süpersarmal çift zincir DNA moleküllerini süpersarmal formdan (Form I) kırık forma (Form II) ve lineer formlara (Form III) ve en sonunda da küçük DNA parçalarına dönüştürür. Çoğu antikanser ilaçları hücre DNA'sı ile etkileşerek hücre hasarı gösterirler. Eğer bir ilaç, şeker-fosfat zincirinde tek bir kırık oluşturursa molekül, süpersarmal formdan (Form I) kırık forma (Form II) veya doğrusal forma (Form III) dönüşür. Eğer ilk kırılmanın olduğu zincirin karşısındaki zincirde ilk kırılmaya yakın bir yerde ikinci bir kırılma olursa DNA molekülü doğrusal forma dönüşür. Dolayısıyla, her iki DNA zincirini karşılıklı zincirlerden kesen bir ilaç, Form I'in doğrudan Form III'e dönüşmesine sebep olur.

4.4. Serbest Radikaller

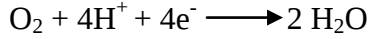
Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren kimyasal yapılardır. Böyle bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapıli bir organik molekül olabilir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler (10).

- Kovalent Bağların Homolitik Kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500 - 600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Paylaşılmamış elektron taşıyan türler radikalik özellik gösterirler.
- Nötr Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi: Radikal özellik göstermeyen bir molekülden elektron kaybı sonucu dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur. Örneğin, askorbik asit ve tokoferol gibi hücresel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.

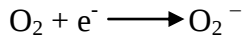
- Nötr Bir Moleküle Elektron Transferi: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidi oluşturur.

Hücresel koşullarda önemli miktar ve çeşitlilikte serbest radikal üretilir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen ve azottan oluşan radikallerdir. Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulundurlar. Bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronun varlığı serbest radikali manyetik alanda kısmen paramanyetik kılarken bazen bu türlerin kimyasal reaktivitesi çok yüksek olur. Kimya ve biyolojide yukarıdaki tanımlamaya uygun pek çok serbest radikalin var olabileceği tartışılmaktadır (106).

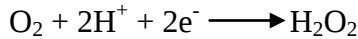
İnsan vücudunda da radikalik veya radikalik olmayan reaktif türler vardır. Bu reaktif türlerin bir kısmı normal biyokimyasal reaksiyonlar sırasında kaza ile meydana gelir. Örneğin aerobik canlıların mutlaka kullanılması gereken O_2 tam indirgenme sonucu,



reaksiyonu gereğince suya dönüşürken; tek elektronlu indirgenme ile:



süperoksit radikaline veya iki elektronlu indirgenme ile:



hidrojen peroksit dönüşür. Tam indirgenme ürünü olan su hücre için toksik etki göstermez ancak süperoksit radikali, hidroksil radikali ve H_2O_2 hücre için toksik etki gösterirler. Bunlar arasında en toksik özelliğe sahip olan hidroksil radikali (107).

Reaktif oksijen (Tablo 1) ve Reaktif azot (Tablo 2) türlerinin önlemeyen oluşumları yanında canlı sistemlerde istemli üretimleri de gerçekleşir. Örneğin savunma hücreleri (fagositler) yabancı organizmalara karşı O_2^- ve H_2O_2 üretirler. Ancak, bu üretimin fazlası canlının kendisine de zarar verebilir.

Tablo 1. Reaktif Oksijen Türleri

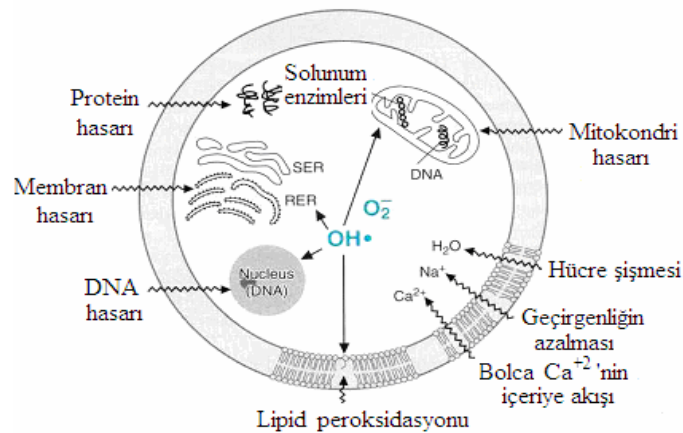
Radikaller	Radikalik olmayanlar
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen Peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Hipokloröz Asit, $HOCl$
Peroksil, $RO_2^{\cdot}$	Hipobromöz Asit, $HOBr$
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Ozon, O_3
Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$	

Tablo 2. Reaktif Azot Türleri

Radikaller	Radikalik olmayanlar
Nitrik oksit, $NO^{\cdot}$	Nitröz Asit, HNO_2
Azot Dioksit, NO_2	Diazot Tetra Oksit, N_2O_4
	Diazot Tri Oksit, N_2O_3

4.4.1. Serbest Radikaller ve Etkileri

Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron taransferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Ama, eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Nitekim, serbest radikallerin biyomoleküllerle reaksiyona girerek oluşturdukları bileşikler çoğu kez toksik özellik taşımaktadır. Reaktivitesi yüksek serbest radikaller, atomlar ve moleküller ile rahat bir şekilde tepkimeye girmektedir. Metabolizmada gerçekleşen olayların sonucunda oluşan serbest radikaller, gen mutasyonuna, hücrelerde hasara, doku tahribatına ve canlının erken yaşlanmasına yol açtığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Şekil 18), (108).

**Şekil 18.** Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Burnaz'dan, 9)

Serbest radikallerin proteinlere, nükleik asitlere, DNA'ya, membran lipidlerine (lipid peroksidasyonu) ve karbohidratlara önemli etkileri vardır. Hücresel metabolik faaliyetler sürekli serbest radikaller üretirken, aynı zamanda bu radikalleri bertaraf edecek hücresel mekanizmaları da içerir. Ancak bu savunma mekanizmalarının bir kapasitesi vardır ve kapasite aşıldığında “Oksidatif Stres” açığa çıkar (109). Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur. Hücrede normal şartlar altında prooksidan ve antioksidanlar dengede bulunmaktadır. Ancak bu denge reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması veya antioksidan miktarındaki azalma nedeniyle prooksidanlar yönüne kaymaktadır (39). Nihayetinde serbest radikaller reaktif oksijen türevleridir ve lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein ve karbohidratların oksidasyonuna yol açacak hücresel yaşlanma, kanser, inflamasyon, romatoid artrit'e yol açmakta ve hatta hücre ölümü gerçekleşmektedir (109).

Serbest radikaller aynı zamanda hücrelerin genetik kodunu içinde taşıyan, hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan nükleik asitlere (DNA) de etki eder. Hücreler genetik kodları değiştiğinde ölebilirler. İyonize radyasyondan kaynaklanan hücre mutasyonları ve ölüm, serbest radikallerin DNA ile olan reaksiyonuyla oluşabilir. Serbest radikal reaksiyonları sonrasında nükleik asitlerde baz değişimleri, DNA'da zincir kırılmaları meydana gelir. Tamir sistemlerindeki yetersizlik sonucu mutasyonlar meydana gelişir. Serbest radikallerin karbohidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik olaylarda önemli rol oynarlar (11).

4.5. Antioksidanlar

Serbest radikaller potansiyel olarak toksik oldukları için organizmalar bunları etkisiz hale getirmek amacıyla savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bu savunma sistemleri kısaca “antioksidanlar” olarak adlandırılırlar (Tablo 3). Antioksidanlar, hücrelere zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girip onları etkisiz hale getirerek, kanser, kalp hastalıkları, diyabet ve komplikasyonları başta olmak üzere birçok

hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonları önleyen, yok eden veya etkilerini azaltan moleküllerdir (110, 111).

Antioksidanlar başlıca dört yolla radikalleri etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi: Radikalleri daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve moleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi: Radikallere bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler ve flavonoidler bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır metaller radikalleri kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar (112).

Tablo 3. Antioksidanların Sınıflandırılması

Doğal		Yapay
Enzimler	SOD	BHT
	Katalaz	BHA
	Glutasyon peroksidaz	Trolox
	Glutasyon S transferaz	SOD mimikleri
	Sitokrom oksidaz	Çeşitli şelat oluşturuç maddeler
Enzim Olmayanlar		
Endojen	Glutasyon	
	Seruloplazmin	
	Bilirubin	
	Ferritin	
	Laktoferrin	
	Ürik asit	
	Haptoglobulinler	
	Albumin	
Ekzojen	E vitamini	
	β -karoten	
	Askorbik Asit	
	Flavonoidler	

Antioksidanları öncelikle doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar (ilaçlar) şeklinde sınıflandırmak daha doğru olacaktır. Doğal antioksidanlar, endojen ve eksojen

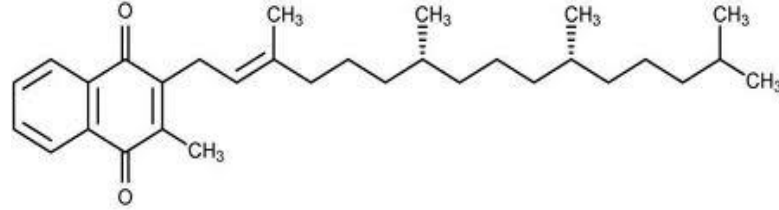
antioksidanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Endojen antioksidanlar, enzimler ve enzim olmayanlardır. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidroperoksidaz enzimlere; melatonin, seruloplazmin, transferin ve miyoglobin ise enzim olmayanlara örnek olarak verilebilir. Endojen antioksidanlar bulundukları ve etkinliklerini yerine getirdikleri yerlere göre de hücre içi (intraselüler), membranal ve hücre dışı (ekstraselüler) antioksidanlar olarak üç sınıf altında toplanabilir.

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanlarıdır. Vitamin olan eksojen antioksidanlar; α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, Askorbik asit (vitamin C) ve Folik asit (folat) tir. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar; ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri ve Troloks örnek olarak verilebilir. Gıdaların korunmasında en çok kullanılan sentetik antioksidantlar bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propilgallat (PG) ve ter-bütıl hidrokinon (TBHQ)'dur. Ayrıca Tokoferoller de gıdalarda antioksidant olarak kullanılır. Bunların düşük etkisi, yüksek maliyeti olmasına rağmen tokoferol gibi alternatif, doğal ve güvenilir daha fazla gıda antioksidantlarının tanımlanması gerekmiştir.

Enzimatik olmayan endojen antioksidanlardan glutatyon (GSH) bir peptit olup hücre içinde en önemli antioksidan moleküldür ve hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Melatonin (MLT) en zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini (OH•) ortadan kaldıran güçlü bir antioksidandır ve günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir. Ürat; hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler ve C vitamininin oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır. Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır. Albümin LOOH ve HOCl toplayıcısıdır ve plazma osmotik basıncını düzenler. Aynı zamanda kan, bilirubin, hormon, aminoasit, steroid, yağ asitleri ve ilaçların taşınmasında rol oynar (113).

Süperoksit radikali dışında diğer bir indirgeyici hücresele ajan olan askorbik asit (C vitamini), zincir kırıcı antioksidan etki gösteren ve okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilen α -tokoferol (E vitamini) (Şekil 19), radikal toplayıcı etkisi bulunan β -karoten (A vitamini)

(Şekil 20) ve polifenoller gibi moleküller insan ve hayvan organizmasında sentezlenemeyen bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen maddeler olup radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında son derece etkili birer antioksidantlardır ve etkinliklerini enzimatik olmayan yolla sürdürürler (114, 115). Bunlardan E ve A vitaminleri membranda bulunan antioksidantlardır.



Şekil 19. E vitamini [5,7,8-trimetiltokol (*α-tokoferol*)]'nin formülü (İskefiyeli'den, 108)

Süperoksit anyonunun temizlenmesinde en etkili antioksidan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi olup glutatyon, flavonoidler ve çeşitli polifenoller de etkin rol oynamaktadır. Sentetik olarak üretilen ve çoğunlukla antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılan Trolox, rutin, butillenmiş hidroksi tolue (BHT), butillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi antioksidanlar da vardır. Peroksi radikaliyle iki aşamada etkileşerek onu çok daha az reaktif ürünlere dönüştüren 2,6 di-tert-butil-4 metil fenol [butillenmiş hidroksi tolue (BHT)] önemli sentetik antioksidandır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

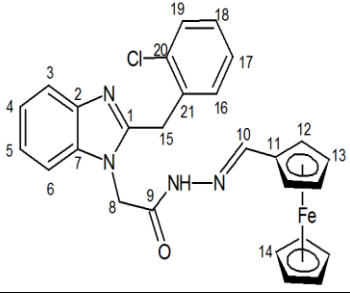
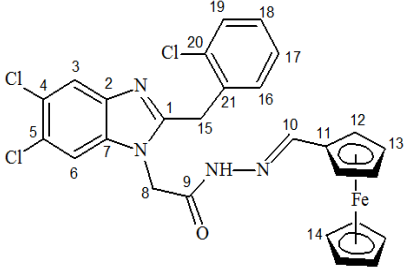
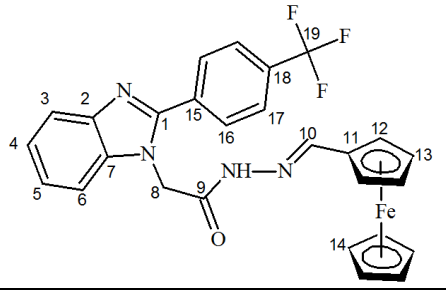
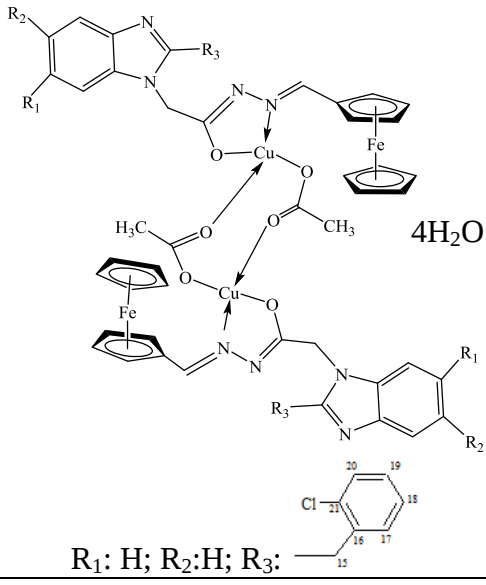
Cihazın Adı	Model	Firma
Su banyolu çalkalayıcı	WNB 7-45	MEMMERT
Vorteks	WM-10 WİSD	WİSEMİX
Terazi	PA 2140	OHAUS
Yatay DNA elektroforezi	Wide Mini-Sub Cell GT System	BIORAD
Güç kaynağı	Bio Rad Power Pac™ Basic	BIORAD
Isıtıcı	MSH-20A	WİSD HOTPLATE
Buzdolabı	190507962400	İNDESİT
Isıtıcılı sallayıcı kuru blok	MS-100	THERMO-SHAKER
Spektrofotometre	UV-1800	SHİMADZU
Jel görüntüleme sistemi	Universal Hood imager gel doc™	BIORAD
Saf su cihazı	61316	BİOTECH
pH metre	Starter 3000	OHAUS
Steril kabin	MN120	BİO RAD
Magnetik karıştırıcı	MS-H-Pro	DRAGON LAB
UV kabin lamba		CAMAG

5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

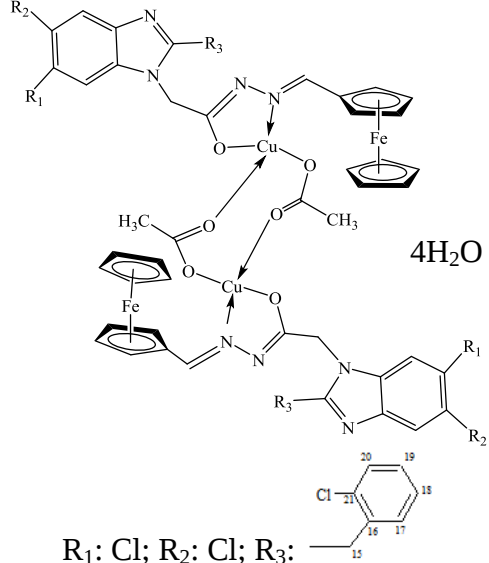
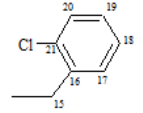
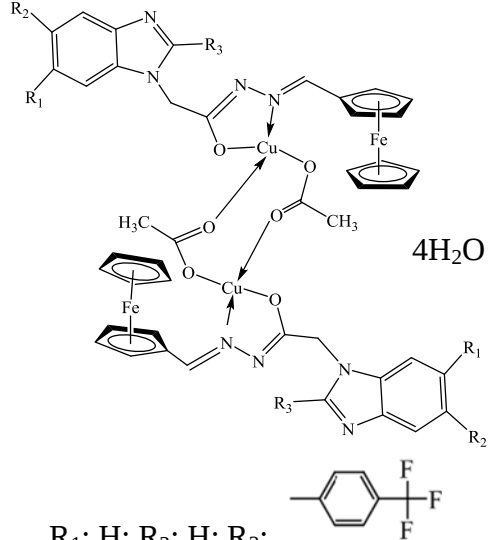
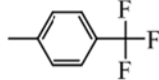
Bu tez çalışmasında kullanılan bütün kimyasallar Sigma’dan temin edildi. DNA bağlanma çalışmalarında kullanılan dana timusundan elde edilmiş DNA (CT-DNA) ticari olarak satın (Sigma) alındı. DNA kesim aktivitesi denemelerinde de ticari olarak satın alınan (Thermo Scientific) %90’dan fazlası süpersarmal formda olduğu bilinen, 4361 baz çifti içeren, 2,83x106 Da moleküler ağırlığında olan çift sarmal kapalı halkalı pBR322 plazmid DNA’sı kullanıldı. Bu çalışma için, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Kerim Serbest ve ekibi tarafından sentezlenen ligand ve kompleksler temin edildi. İncelenen

ligand ve komplekslerin, isimleri, kimyasal yapıları, moleküler ağırlıkları ve kısa kodları Tablo 5’ de verildiği gibidir.

Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Ligand ve Komplekslerin Kısa Kodları, Molekül Formülleri ve Kimyasal Yapıları

Kısa Kod	Molekül Formülü	Kimyasal Yapı
L1	$C_{27}H_{23}ClFeN_4O$	
L2	$C_{27}H_{21}Cl_3FeN_4O$	
L3	$C_{27}H_{21}F_3FeN_4O$	
K1	$C_{58}H_{50}Cl_2Cu_2Fe_2N_8O_6 \cdot 4H_2O$	 $R_1: H; R_2: H; R_3: \text{---}$

Tablo 5'in Devamı

K2	$C_{58}H_{460}Cl_6Cu_2Fe_2N_8O_6 \cdot 4H_2O$	 $R_1: Cl; R_2: Cl; R_3:$ 
K3	$C_{58}H_{46}Cu_2F_6Fe_2N_8O_6 \cdot 4H_2O$	 $R_1: H; R_2: H; R_3:$ 

5.1.3. Çözeltiler

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

Etidyum Bromür (EB) Çözeltisi: Yarışmalı EB bağlanma çalışmasında kullanılmak üzere 0.3 M stok EB çözeltisi su içerisinde hazırlandı. Agaroz jel elektroforezi çalışmaları için 5 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan stok çözelti kullanıldı.

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

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

Agaroz Jel Hazırlanması: 0.8 g agaroz tartılarak 100 ml seyreltilmiş TAE içinde kaynatılarak çözüldü, elle tutulabilecek ısıya gelince 7µl EB (5mg/mL) eklenerek hazırlandı. Tarak yerleştirilmiş cam tabakaya döküldü. Jel donması için oda sıcaklığında 30-35 dakika bekletildi.

5.2. Yöntem

5.2.1. DNA Bağlanma Deneyleri

5.2.1.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonları

DNA bağlanma deneyleri için en uygun metod UV-absorpsiyon metodu olarak belirlenmiştir. İlk olarak, optimum şartları belirlemek amacıyla bazı ligand ve komplekslerle ön denemeler yapılarak çözeltilerin ve yöntemin uygulanabilirliği test edilmiştir. Ön denemeler sonucunda, bu deneylerin pH 7.2 olan tris-HCl tamponu (50mM) kullanılarak yapılması uygun görülmüştür.

DNA bağlanma deneyleri için, CT-DNA çözeltisi 5 mM Tris / 50 mM NaCl içinde hazırlandı ve HCl ile pH'sı 7.2 olarak ayarlandı. CT-DNA çözeltisinin 260 ve 280 nm'lerdeki absorbans oranının 1.8-1.9:1 olduğu belirlendi, bu durum DNA'nın protein yabancı maddelerinden yeterince uzak olduğunu göstermektedir. 260 nm 'de CT-DNA'nın konsantrasyonu UV-Vis absorbans değeri ve molar soğurma katsayısı $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak belirlendi (39). Uygun miktarlarda DMF içinde hazırlanan stok ligand ve komplekslerin konsantrasyonu sabit tutularak ve CT-DNA konsantrasyonu değiştirilerek (2.5-5.0-7.5-10.0-12.5-15 µM) deneyler gerçekleştirildi. İlk olarak, 200-600 nm aralığında ligand ya da kompleks çözeltisinin (25 µM) UV spektrumu 0.5 nm'de bir değer verebilecek şekilde kaydedildi. Ardından ilk CT-DNA

ilavesi yapılmış (nihai 2.5 µM olacak şekilde), oda sıcaklığında 10 dakikalık inkübasyon sonrası, belirtilen dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumu kaydedildi. Bu işlem yapılırken referans çözelti üzerine de eşit miktarda CT-DNA ilave edilerek CT-DNA'nın absorbansı elimine edildi. Bu işleme DNA konsantrasyonu aşamalı olarak artırılarak son konsantrasyon 15 µM oluncaya kadar devam edildi. UV-vis absorpsiyon titrasyon verilerinden, CT-DNA içeren komplekslerin bağlama sabiti (K_b) aşağıdaki denklem 5.1'deki eşitlik kullanılarak saptanmıştır (116).

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (5.1)$$

Absorbans şiddetindeki değişim (% H) ise yüzde oranlarıyla verilmiş ve denklem 5.2' deki eşitlik kullanılmıştır. Bu eşitlikte ise A_i, DNA eklenmeden önce bileşiğin absorbans şiddetini ifade ederken, A_s ise maksimum konsantrasyonda DNA ilave edildikten sonra bileşiğin absorbans şiddetini gösterir (39).

$$\%H = [(A_i - A_s) / (A_i)] \times 100 \quad (5.2)$$

5.2.1.2. UV ile Yarışmalı Etidyum Bromür (EB) Bağlanması Çalışmaları

Komplekslerin DNA ile etkileşiminin daha iyi şekilde belirlenmesi için, iyi bilinen bir interkalatör olan etidyum bromür (EB) kullanılarak yarışmalı bağlanma çalışmaları yapıldı. 480 nm civarında maksimum absorbans gösteren EB, DNA ile etkileştiğinde absorbanstaki düşmeye neden olurken absorbansı daha yüksek dalga boyuna kaymaktadır. Bu durum, EB'nin DNA baz yığınları arasına interkalasyon yaptığının bir kanıtıdır.

Bu bilgilere dayanarak, konsantrasyonu sabit tutulan EB'nin (40 µM) maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun ve absorbansının değişim DNA ilave edilerek (40 µM) incelenmiştir. Ardından DNA ve kompleksin (5-15 µM aralığında) aynı anda ilavesiyle bu değişimin incelenmiştir. Tüm çalışma 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir (39).

5.2.1.3. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi

DNA erime çalışmaları, nükleik asitlerle küçük moleküllerin etkileşimi hakkında önemli bilgiler vermektedir. Çift sarmalın tek zincirli DNA'ya denatüre olması ile erime sıcaklığının yükselmesi, küçük moleküllerin DNA çift sarmalına interkalasyonun bir

sonucudur. Sarmalın erimesi 260 nm’de DNA bazlarının molar absorblama katsayısının çift sarmal formda tek zincirli forma göre daha düşük olması sebebiyle 260 nm’de absorpsiyonun artışına neden olur (117). Bu çalışmalar, Varian Cary Temperature Controller ünitesine sahip Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer cihazı kullanılarak ve [DNA]/[ligand/kompleks] oranı farklı olacak şekilde çeşitli denemeler yapılarak gerçekleştirildi. Denemeler, 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) tamponu içerisinde yapıldı. Küveti içeren hücrenin sıcaklığı dakikada 1 °C arttırılarak 50-100 °C aralığında her 0.5 °C’de 260 nm’de absorbans ölçüldü. CT-DNA’nın ligand/kompleks varlığında ve yokluğunda 260 nm’deki absorbansına bağlı olarak çizilen t(°C)-Absorbans eğrisinden faydalanılarak Tm değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

5.2.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi

DNA kesim çalışmaları, süpersarmal pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemi ile yapıldı. Kesim aktivitesi, süpersarmal DNA formu (Form I)’nın kırık form (Form II) ve lineer form (Form III)’a dönüştürülmesi ile değerlendirildi. Agoroz jel elektroforezinde bu formlar farklı hızlarda hareket ederler. DNA, elektroforeze tabi tutulduğunda, bozulmamış süpersarmal form (Form I) en hızlı, çeşitli maddelerle etkileşim ile oluşan kırık form (Form II) en yavaş hareket eder. Her iki zincirin kesilmesi ile oluşan lineer form ise (Form III) bu iki form arasında hareket eder.

5.2.2.1. pBR322 Plazmid DNA’sının Hidrolitik Kesimi

Plazmid (pBR322) DNA’sının kesim aktivitesinin çeşitli parametrelere bağlılığını belirlemek için hidrolitik koşullarda şu denemeler gerçekleştirildi.

pH’nın DNA Kesim Aktivitesine Etkisi

Bu denemede, pH 5-9 aralığında Tris-HCl (50mM) tamponları kullanılarak komplekslerle plazmid DNA’nın etkileştiği optimum pH değeri belirlendi. Uygun konsantrasyonlarda (100 µM) DMF içerisinde hazırlanmış kompleksler, 250 ng pBR322 DNA ve Tris-HCl tamponu ile hazırlanan reaksiyon karışımı 1 saat süreyle 37 °C’de inkübasyona tabi tutuldu. Reaksiyon karışımına jel yükleme boyası ilave edilerek kesim reaksiyonu durduruldu. Bu karışım % 0.8’lik agaroz jele (0.25 µg/mL EB içeren) yüklendi ve 90 dakika süreyle 100 voltluk akım uygulanarak yürütme tamponu (1X

TAE) içerisinde elektroforeze maruz bırakıldı. Elektroforez işleminin bitiminde jel UV ışığı altında görüntülendi ve fotoğrafı kaydedildi.

Konsantrasyonun DNA Kesim Aktivitesine Etkisi

Madde konsantrasyonunun komplekslerin aktivitesine etkisinin belirlenmesi için her bir kompleks için belirlenen optimum pH değerlerinde ve farklı kompleks konsantrasyonlarında (10-125 μ M) kesim denemeleri gerçekleştirildi. Konsantrasyonun DNA kesim etkisini incelemek için pH denemesinde açıklanan yöntem takip edildi.

5.2.2.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Oksidatif Kesimi

Komplekslerin oksidatif kesim aktivitelerinin incelenmesi için çeşitli aktivatörler varlığında (H_2O_2 (0.4 M), AA (2.5mM), ME (0.4 M)) denemeler gerçekleştirildi. 50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu içerisinde 250 ng pBR322 plazmid DNA'ya bu aktivatörler ilave edildi ve 1 saat süreyle 37 °C'de reaksiyonların gerçekleşmesi sağlandı. Bu şekilde oksidatif kesim etkinlikleri belirlendi.

5.2.2.3. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi

Komplekslerin fotodinamik terapi için uygunluğunun değerlendirilmesi amacıyla pBR322 plazmid DNA'sının komplekslerle etkileşimi UV ışık altında incelendi. Bunun için, 50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu, 250 ng DNA ve 100 μ M kompleks ile oluşturulan karışım 30 dakika süreyle 366 nm'de UV ışığına maruz bırakıldı. Daha sonra, karışımlar 1 saat süreyle 37 °C'de karanlıkta inkübe edilerek yukarıda izlenen yöntemlerle reaksiyonlar durduruldu. Kesim ürünleri agaroz jel üzerinde UV ışığı altında incelendi (118).

5.3. Antioksidatif Aktivite Çalışmaları

Literatürde bazı geçiş metal komplekslerinin antioksidan aktivite gösterdikleri rapor edilmişti. Bu sebeple incelenen ligand ya da komplekslerin radikal süpürme özelliklerine sahip olup olmadıklarını incelemek üzere bir çalışma yapıldı. Bu amaçla ligand ve komplekslerin süperoksit ve DPPH süpürme aktiviteleri UV-spektrofotometre kullanılarak incelendi.

5.3.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

Komplekslerin hidrojen atomu veya elektron verebilme yatkınlıkları 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) in metanoldeki çözeltisinin mor renginin açılmasıyla     lmektedir. 54 mM DPPH   zeltisi kararlı radikal olarak kullanılacaktır (119) ve 1mL DPPH   zeltisinin 517 nm deki absorbansı     lecektir ($A_{k r}$). DPPH   zeltisi   zerine değişik konsantrasyonlardaki kompleks çözeltilerinden 1 er mL ilave edilerek karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonun ardından 517 nm de absorbans     lecektir ($A_{ rnek}$). DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi, DPPH radikallerinin inhibisyonu (%SC₅₀)   klinde farklı kompleks konsantrasyonları için aşağıdaki Denklem 5.3'deki   kilde hesaplanacaktır (120).

$$\% SC_{50} = (A_{k r} - A_{ rnek})100/A_{k r} \quad (5.3)$$

SC₅₀ değerleri, kompleks konsantrasyonuna karşı % SC₅₀ değerleri grafiğe geçirilerek hesaplanacaktır. Ayrıca bilinen antioksidanlardan askorbik asit (AA) ve BHA ile de aynı testler gerçekleştirilerek bunlara ait SC₅₀ değerleri de hesaplandı ve bu değerler komplekslerin etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanıldı.

5.3.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (121) tarafından geliştirilen nitro mavisi tetrazolyum (NBT) indirgeme metodu kullanılarak belirlenecektir. O₂^{  }'nin miktarı ve baskılanma oranı 560 nm deki absorbans     lerek belirlenecektir. Süperoksit radikalleri (O₂^{  }) 0,1 mM EDTA, 2   M riboflavin, 13 mM L-metiyonin ve 75  M NBT içeren 50 mM fosfat tamponundan (pH 7.8) oluşan sistem ile   retilcektir. Komplekslerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış çözeltileri radikal öğreten bu çözelti sistemlerine ilave edilerek her bir reaksiyon karışımı 10 dakika floresan ışığında inkübe edildikten sonra örneklerin absorbansı 560 nm de     lecektir. Test edilen kompleksi içermeyen karışımın absorbansı k r olarak kullanılacaktır. NBT indirgenmesinin yüzde inhibisyonu (% SC₅₀) yukarıdaki Denklem 5.3 ile hesaplanacaktır.

SC₅₀ değerleri, kompleks konsantrasyonuna karşı % SC₅₀ değerleri grafiğe geçirilerek hesaplanacaktır. Aynı denemeler doğal SOD enzimi ile tekrarlanarak elde

edilen SC₅₀ değeri kompleks için elde edilen değerle karşılaştırılarak kompleksin SOD eşdeğeri olabileceği değerlendirilecektir.

6. BULGULAR

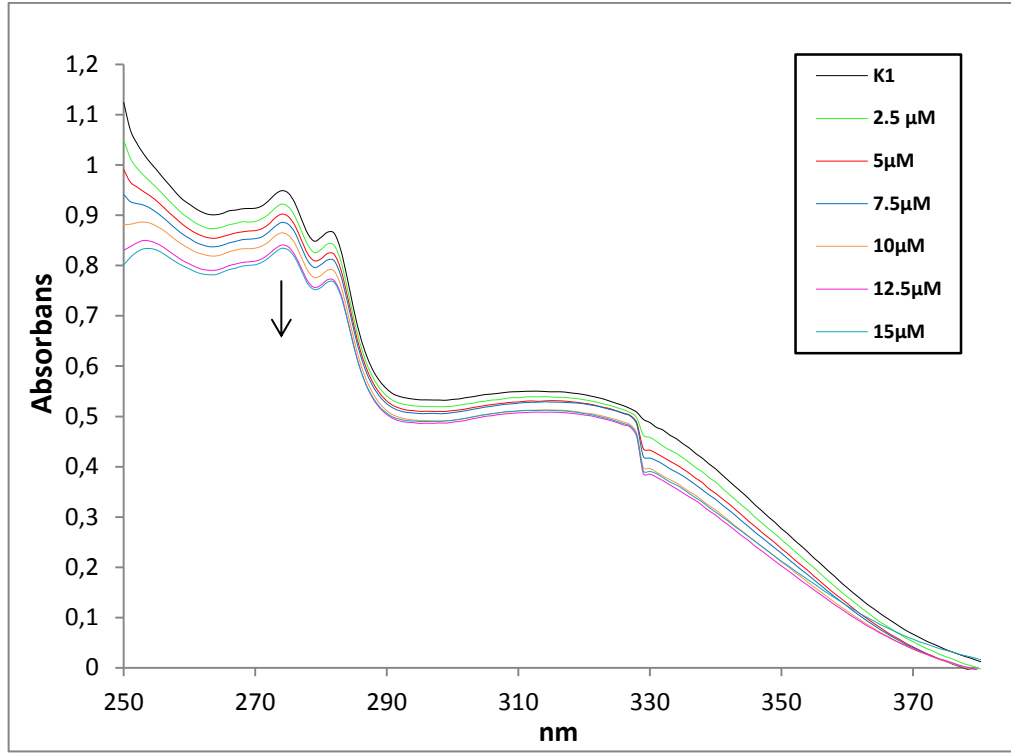
6.1. DNA Bağlanma alışmaları

6.1.1. UV–Vis Absorpsiyon Titrasyonları

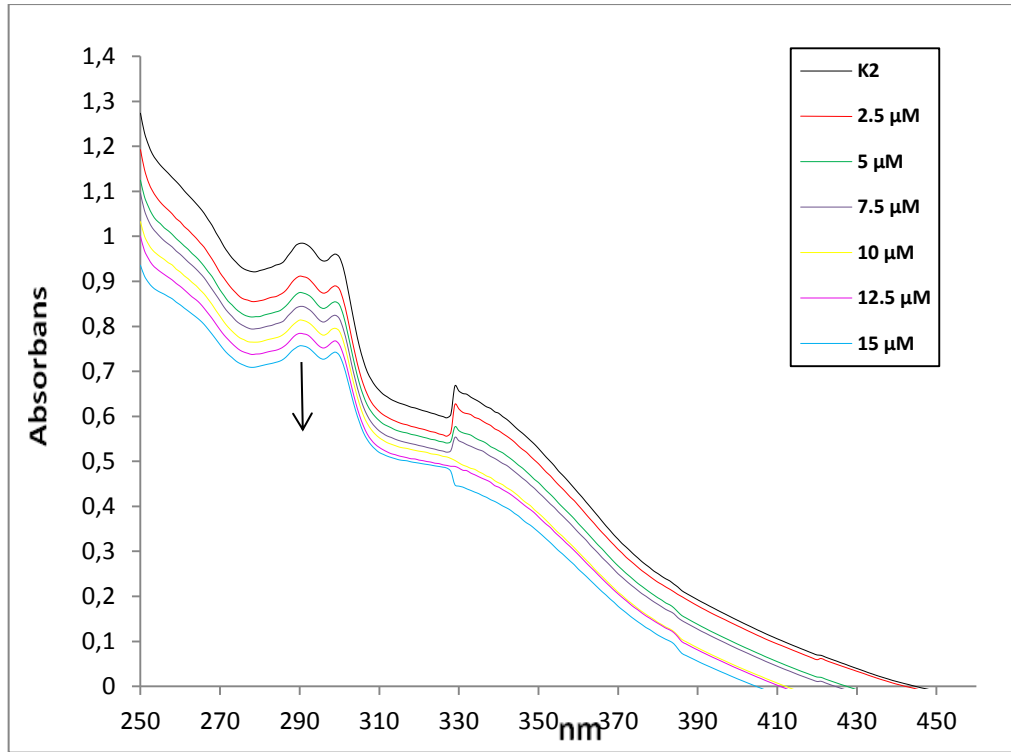
Tez kapsamında incelenen komplekslerin (K1, K2 ve K3) ve ligandların (L1, L2 ve L3) CT-DNA'ya bağlanması UV/Vis absorpsiyonu kullanılarak çalışıldı. Sabit konsantrasyonda tutulan kompleks/ligand özeltisi (25µM) üzerine kademeli olarak artırılarak CT-DNA özeltisi (2,5-15 µM) ilave edildi ve absorpsiyon spektrumlarındaki değişiklikler kaydedildi.

CT-DNA'nın absorbansını bertaraf etmek için, referans çözelti üzerine de eşit miktarda CT-DNA ilave edildi. Bu işleme, daha fazla değişiklik olmayıncaya kadar devam edildi ve absorpsiyon spektrumları kaydedildi (Şekil 20-25). Elde edilen grafiklerde kompleks/ligand üzerine artan CT-DNA ilavesi ile absorbanslarda azalma görüldü. Komplekslerin (K1, K2 ve K3) ve ligandların (L1, L2 ve L3) absorbanslarında sırasıyla % 17.77, % 23.19, % 15.61 ve % 11.55, % 6.61,% 6.09 oranında azalma gözlemlendi.

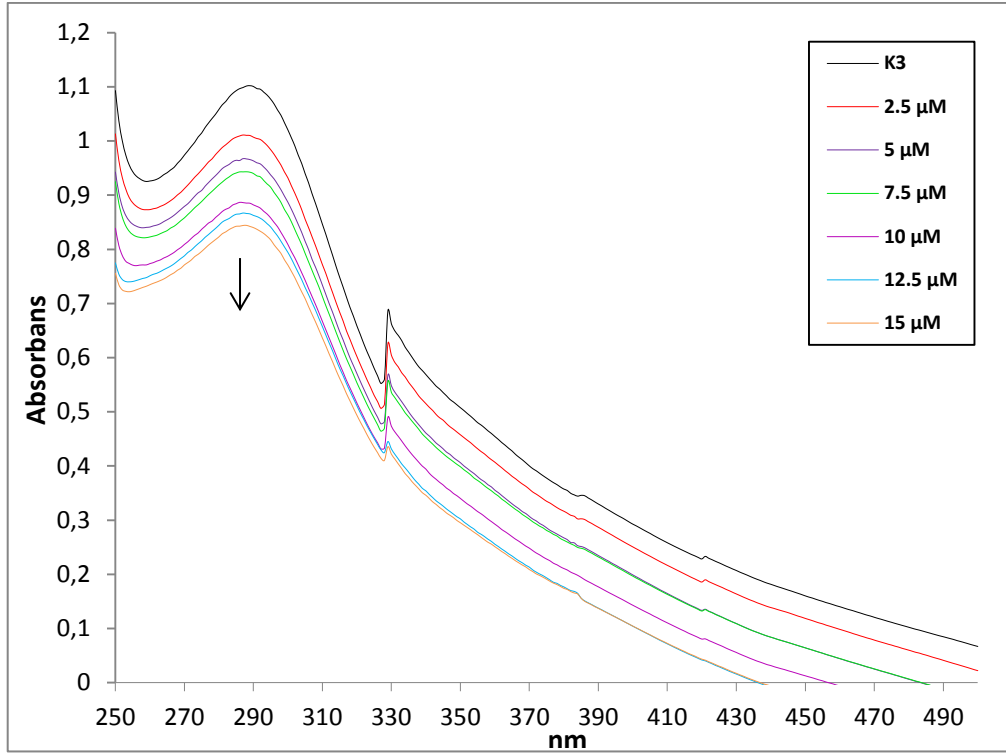
Kullanılan bu ligandların ve komplekslerin DNA etkileşimi ve gözlenen değişimler Tablo 6'da değerlendirildi.



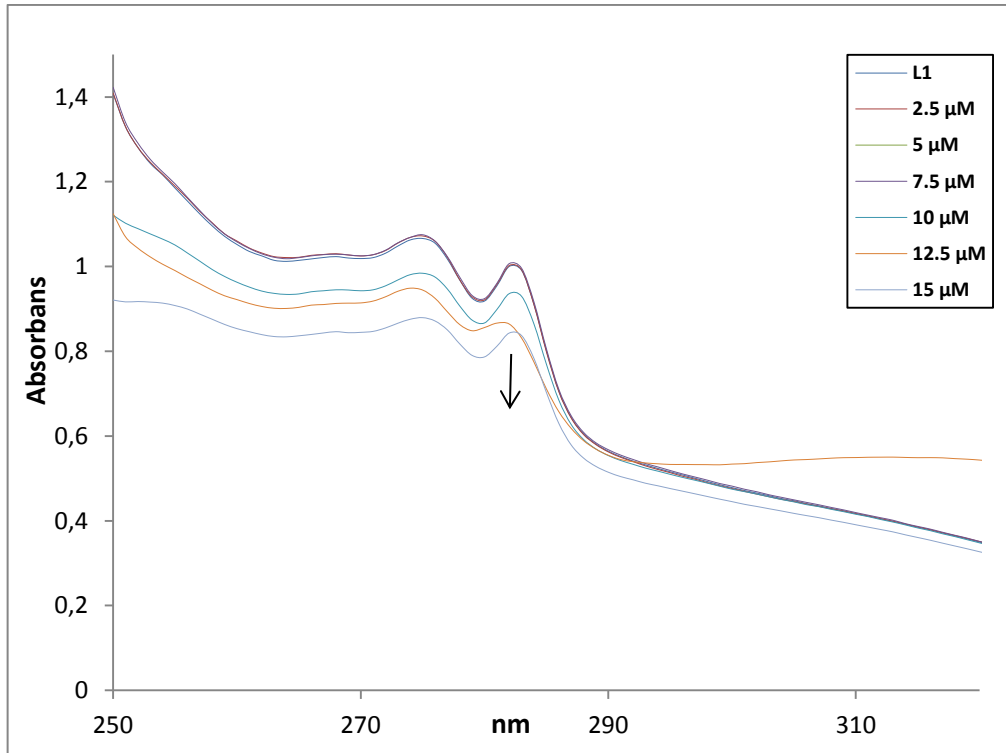
Şekil 20. Kompleks 1'in DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları



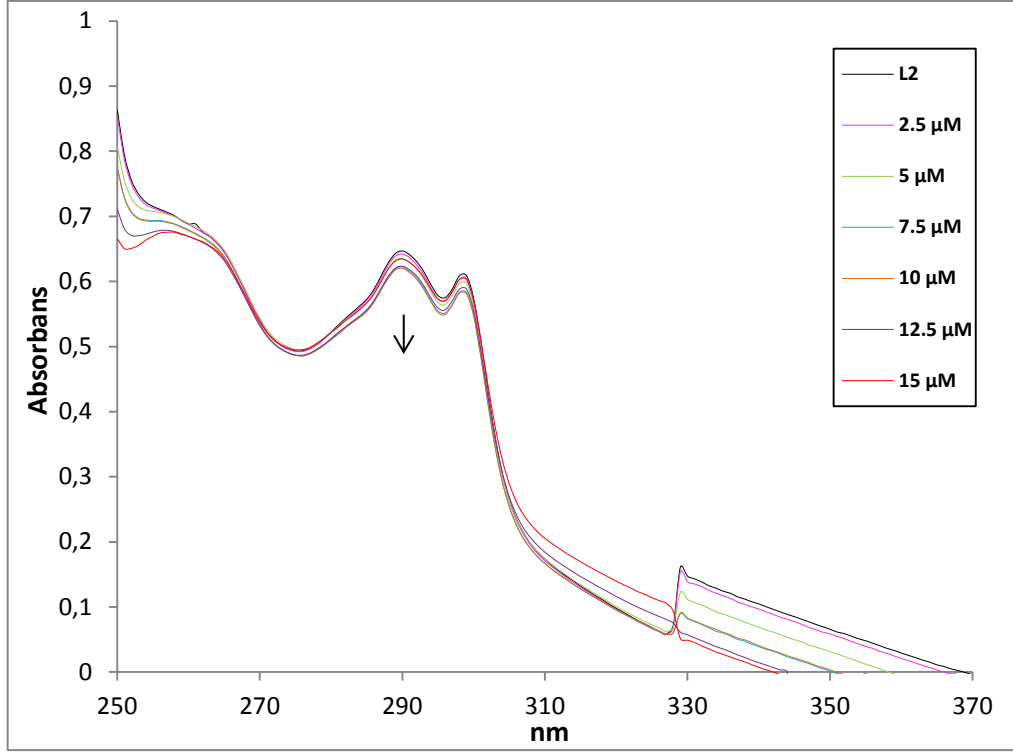
Şekil 21. Kompleks 2'nin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları



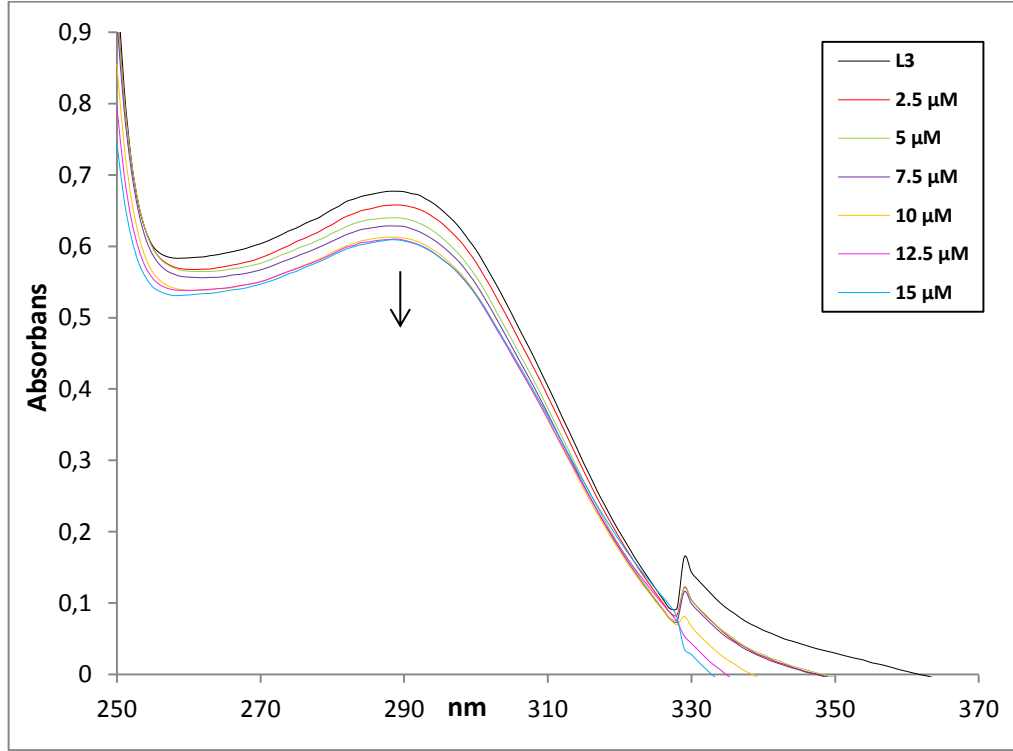
Şekil 22. Kompleks 3'ün DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları



Şekil 23. Ligand 1'in DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları



Şekil 24. Ligand 2'nin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları



Şekil 25. Ligand 3'ün DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları

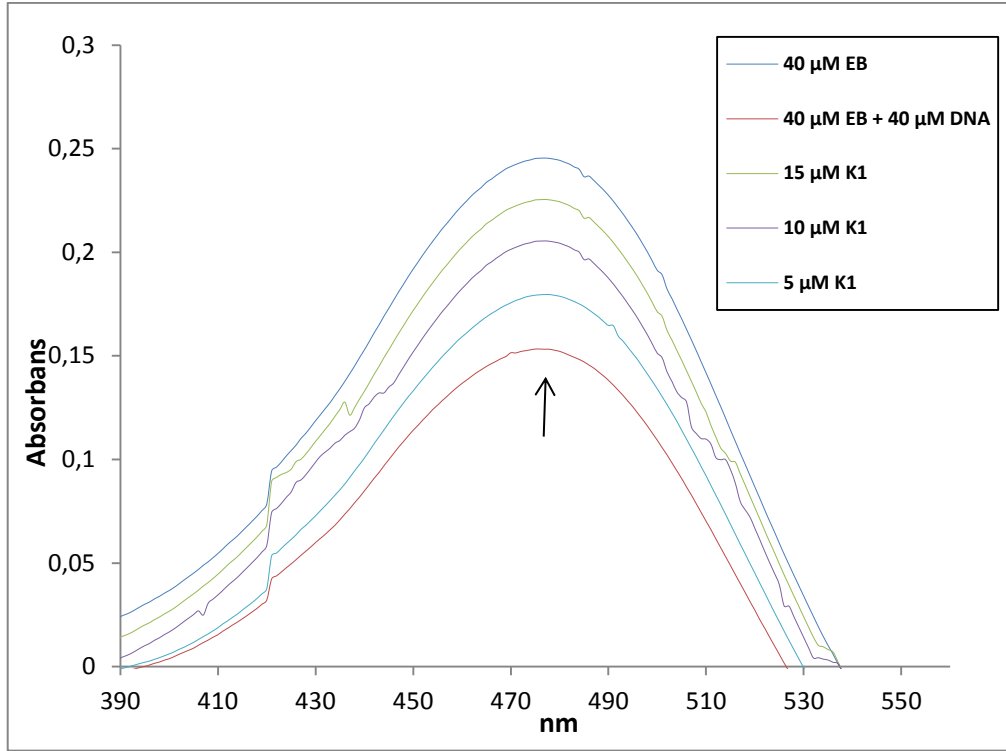
Tablo 6. Ligand ve Komplekslerin DNA ile Etkileşimi ve Gözlenen Değişimler

Kısa Kod	Dalga Boyundaki Değişim	%H	K_b
K1	274	17.77	9.65×10^4
K2	291	23.19	3.85×10^5
K3	288	15.61	5.69×10^4
L1	276	11.55	4.39×10^4
L2	263	6.61	2.36×10^4
L3	291	6.09	2.49×10^4

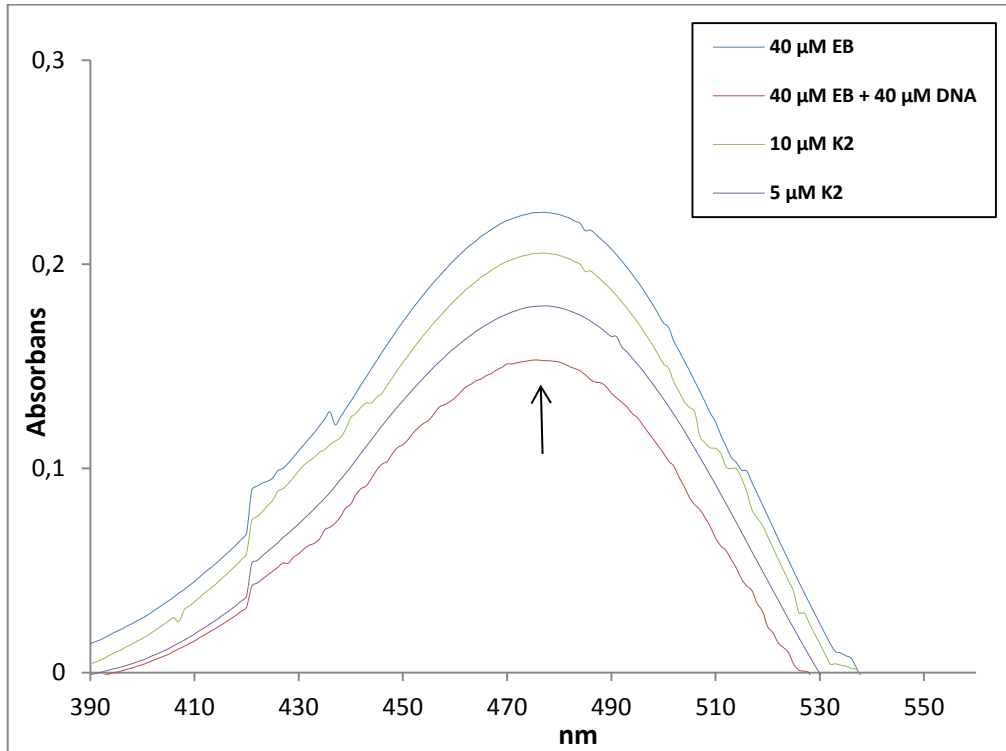
6.1.2. UV ile Yarışmalı Etidyum Bromür Bağlanması Çalışmaları

UV–Vis absorpsiyon titrasyonları verilerinden faydalanılarak komplekslerin ve ligandların DNA ile interkalasyon yoluyla etkileştikleri belirlendi. Bu yüzden iyi bilinen bir interkalator olan EB’ün kullanılarak yarışmalı bağlanma çalışmaları gerçekleştirildi. Bu denemeler sonucu ve literatürden elde edilen bilgiler ışığında, serbest EB’ün 480 nm’deki absorpsiyon maksimumunun CT-DNA ile etkileşimi sonucu absorbanstaki düşmeyle birlikte daha yüksek dalga boyuna (482 nm) kaydığı gözlemlendi (Şekil 26-31).

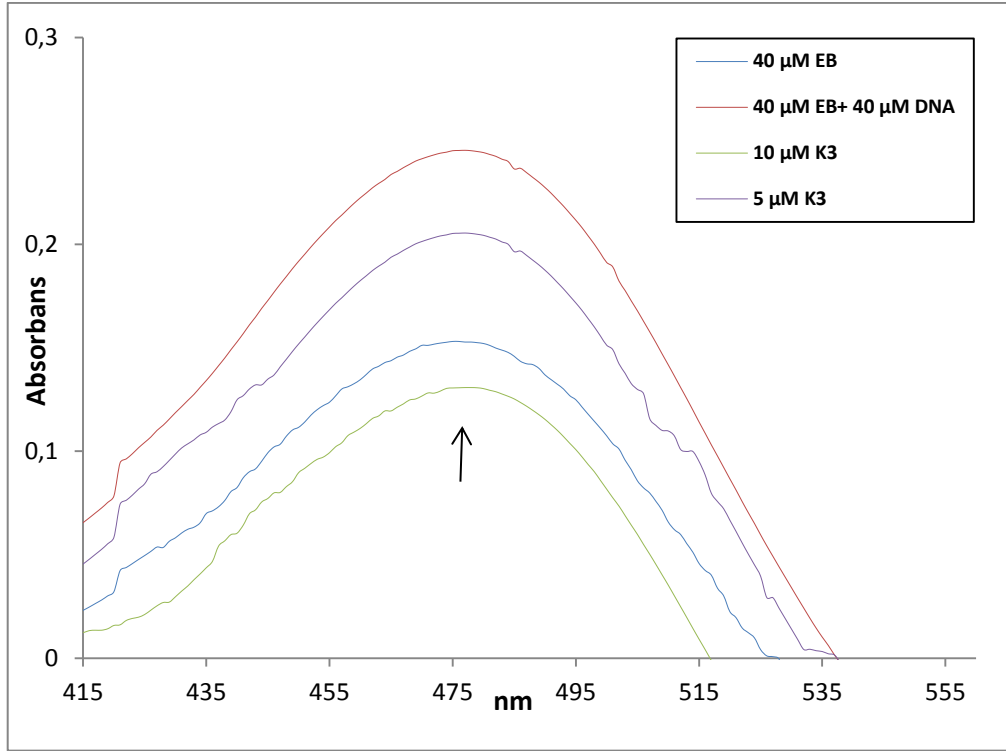
Komplekslerin (K1, K2 ve K3) veya ligandların (L1, L2 ve L3) ilavesi sonucunda ise bu maddelerin DNA ile bağlanmak için EB ile yarıştığını gösterecek şekilde absorpsiyon yoğunluğunda farklı oranlarda artma gözlemlendi (Şekil 26-31).



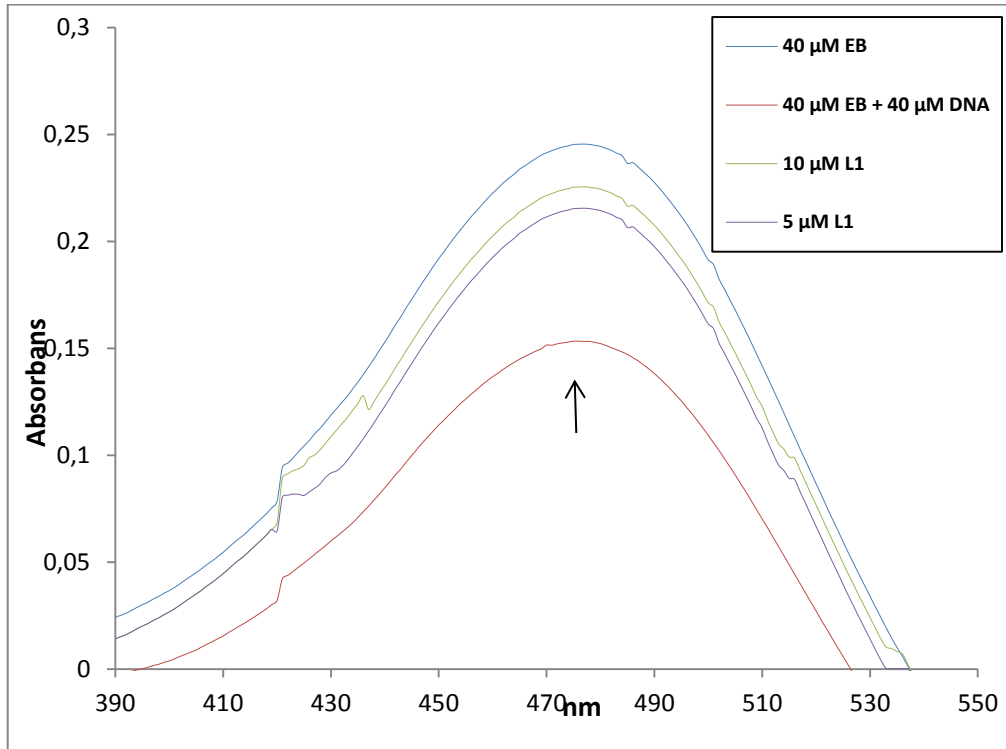
Şekil 26. EB'ün DNA bağlanmasının kompleks 1'in yokluğunda ve artan kompleks konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu



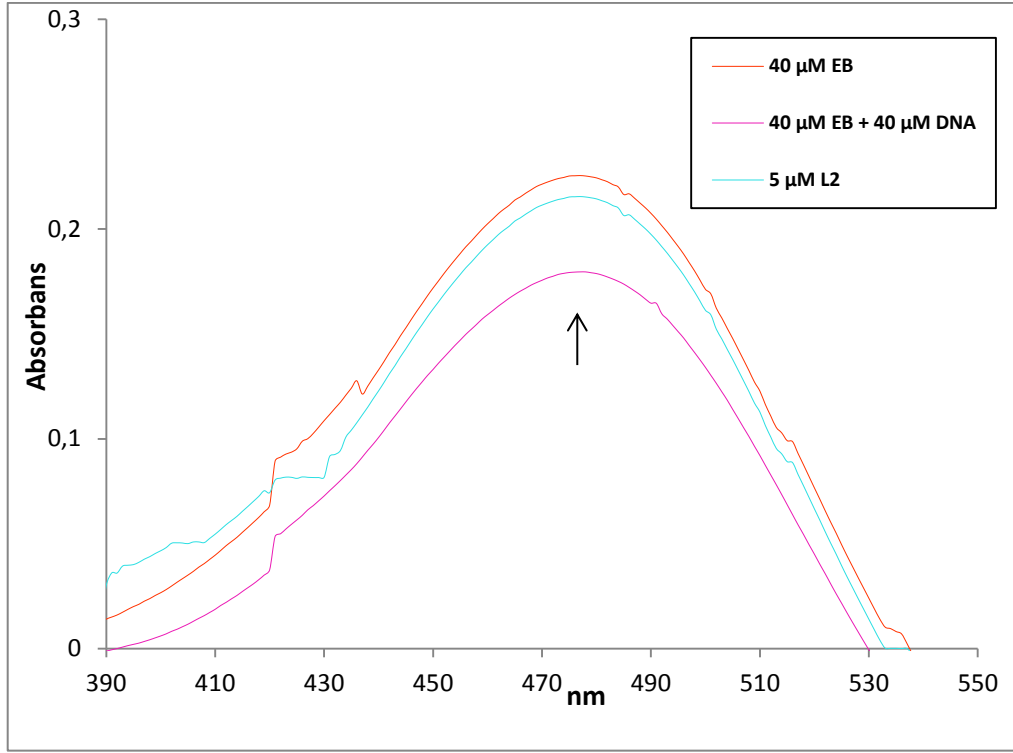
Şekil 27. EB'ün DNA bağlanmasının kompleks 2'nin yokluğunda ve artan kompleks konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu



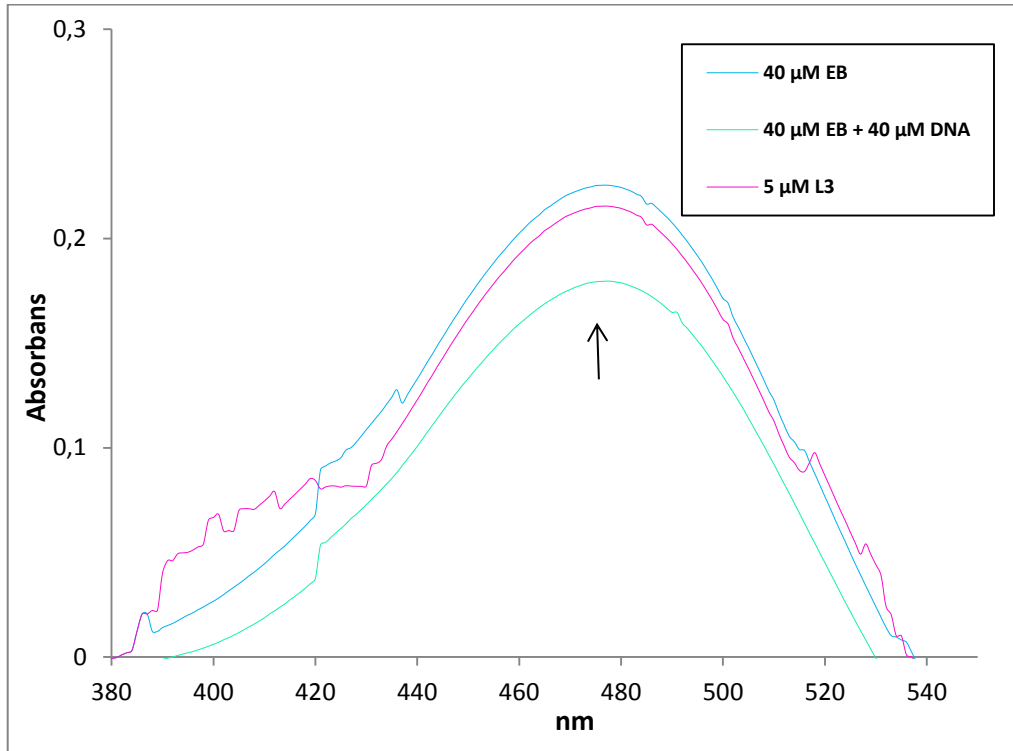
Şekil 28. EB'ün DNA bağlanmasının kompleks 3'ün yokluğunda ve artan kompleks konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu



Şekil 29. EB'ün DNA bağlanmasının ligand 1'in yokluğunda ve artan ligand konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu



Şekil 30. EB'ün DNA bağlanmasının ligand 2'nin yokluğunda ve artan ligand konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu



Şekil 31. EB'ün DNA bağlanmasının ligand 3'ün yokluğunda ve artan ligand konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu

6.1.3. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi

Bağlanma modunu (interkalasyon ya da harici olarak) ve kısmi bağlanma gücünü anlamak adına, DNA erime sıcaklığı (T_m)'nın belirlenmesi için deneyler yapıldı. T_m , çift sarmalın kararlılığı ile son derece ilişkili olup kimyasalların DNA ile etkileşimi T_m 'yi değiştirebildiği bilinmektedir.

Bu bilgilerden yararlanılarak, termal denatürasyon çalışmaları sırasında termal erime programı kullanılarak küveti içeren hücrenin sıcaklığı dakikada 1 °C artırılarak 50-100 °C aralığında her 0.5 °C'de 260 nm'de absorbans ölçüldü. CT-DNA'nın ligand/kompleks varlığında ve yokluğunda 260 nm'deki absorbansına bağlı olarak çizilen $t(°C)$ -Absorbans eğrisinden T_m değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Hesaplanan T_m değerleri Tablo 7'de verildi. Bu denemede kompleks/ligand ve DNA farklı oranlarda (1:1, 1:2 ve 2:1) kullanılarak deneme birkaç kez tekrar edildi.

Tablo 7. Komplekslerin ve Ligandların T_m Değerleri

Kompleks Kısa Kod	T_m	Ligand Kısa Kod	T_m
CT-DNA	72.72	CT-DNA	72.77
CT-DNA+K1	83.32	CT-DNA+L1	77.35
CT-DNA+K2	77.72	CT-DNA+L2	73.77
CT-DNA+K3	76.32	CT-DNA+L3	72.36

6.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi

CT-DNA ile bağlanma eğilimlerinin ortaya konulan komplekslerin metalonükleaz olarak etki etme yeteneklerini değerlendirmek amacıyla nükleaz aktivite deneyleri yapıldı ve DNA-bağlanma yetenekleri ile kıyaslandı. DNA kesim çalışmaları agaroz jel elektroforezi tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Uygun şartların sağlanmasıyla gerçekleştirilen kesim reaksiyonları sonrasında elde edilen kesim ürünleri jel üzerinde elektroforetik ayırmaya maruz bırakıldı ve jeller EB boyamasından sonra UV ışığı altında analiz edildi. Metalonükleaz aktivitesinin varlığı DNA'nın Form I (süpersarmal form)'den Form II (kırık dairesel form) veya Form III (lineer form)'e dönüşümüyle tespit edildi. Nükleaz etkinliğinin bağlı olduğu faktörleri belirlemek için farklı koşullarda (hidrolitik, oksidatif, foto indüklenmiş) deneyler gerçekleştirildi.

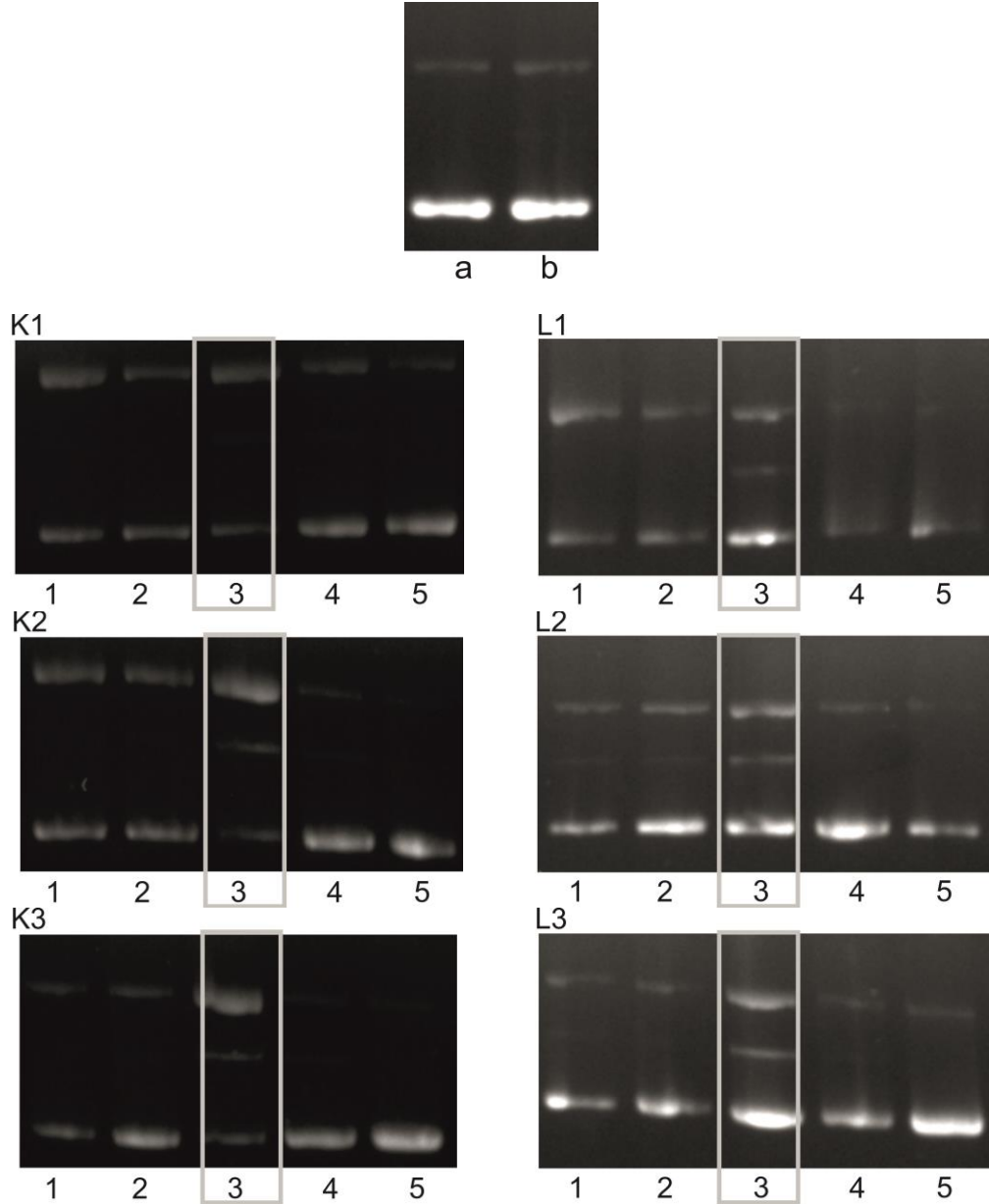
6.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi

DNA'nın hidrolitik kesimi, herhangi bir ilave ajan ve ışık gerektirmemesi açısından biyolojik öneme sahiptir. Komplekslerin DNA'yı fosfodiester bağlarının hidrolizi yoluyla kesebilme etkinliği değerlendirildi.

Komplekslerin hidrolitik DNA kesim kabiliyetini araştırmak için süpersarmal pBR322 DNA'sı sulu tampon çözelti içinde herhangi bir indirgeyici/yükseltgeyici ajan ilave etmeksizin kompleks ile inkübe edildi. Komplekslerin kesim yeteneği ilk olarak süpersarmal formun kırık dairesel ya da lineer açık dairesel DNA şekline dönüştüğü plazmid gevşeme denemesi kullanılarak izlendi.

pH'nın DNA Kesim Aktivitesine Etkisi

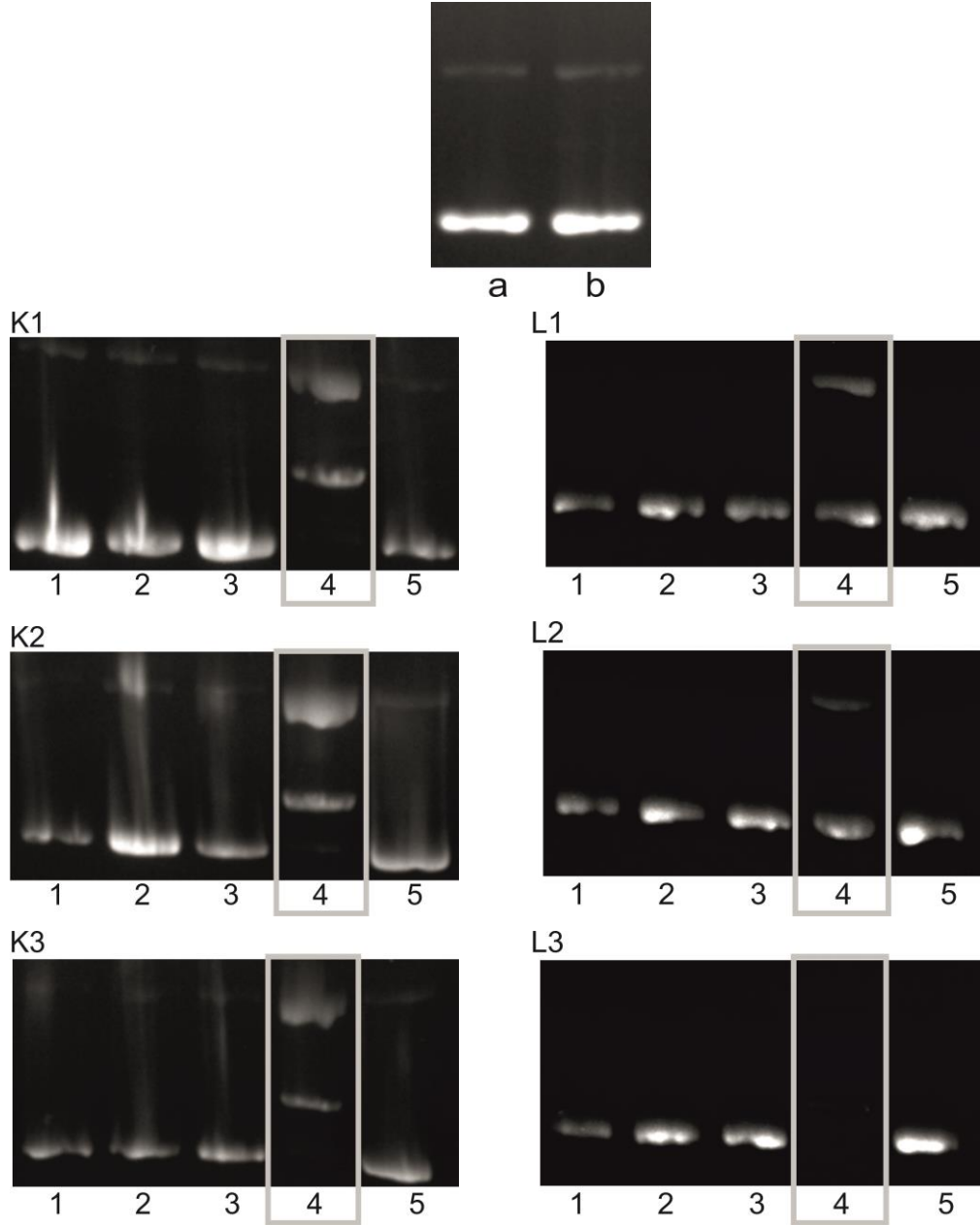
Plazmid DNA'nın kompleks/ligand tarafından kesiminin optimal şartlarını belirlemek için kesim reaksiyonlarının pH bağımlılığı incelendi. Bu denemede, pH 5-9 aralığında Tris-HCl (50mM) tamponları kullanılarak komplekslerle/ligandlarla plazmid DNA'nın etkileştiği optimum pH değeri belirlendi. Kompleks/ligand konsantrasyonları 100 µM; DNA konsantrasyonu ise 250 ng olarak belirlendi. Bu deneme için, 7,5 µL Tris-HCl (pH 5-9), 2 µL kompleks/ligand (100 µM) ve 0.5 µL DNA ile reaksiyon karışımı oluşturuldu ve 37 °C'de bir saat inkübasyona tabi tutuldu. Ardından reaksiyon jel yükleme boyası ile durduruldu ve % 0,8'lik agaroz jele yüklendi. 90 dakika süreyle 100 voltluk akım uygulanarak yürütme tamponu içinde elektroforeze maruz bırakıldı. Kesim ürünlerinin UV ışığı altında elde edilen görüntüleri Şekil 32'de gösterildi. Kuyu içerikleri bu görüntülerin altında açıklandı. Komplekslerin pH bağımlı nükleaz denemesinde kompleksler (K1, K2 ve K3) ve ligandlar (L1, L2 ve L3) için optimum pH 7 olarak belirlendi. Daha sonraki çalışmalarda bu belirlenen pH'daki tamponlar kullanıldı.



Şekil 32. Kompleks ve ligandların pH'a bağlı kesim aktiviteleri: pH 5-9 aralığında tris-HCl (50 mM) tamponu, pBR 322 plazmid DNA (250 ng) ve kompleksten/liganddan oluşan reaksiyon karışımının 1 saat 37 °C inkübasyonun ardından kesim reaksiyonunun agaroz jel elektroforezi. a kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DNA, b kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DMF + DNA, 1. kuyucuk: Tris-HCl (pH 5) + kompleks/ligand (100 μ M) + DNA, 2. kuyucuk: Tris-HCl (pH 6) + kompleks/ligand (100 μ M) + DNA, 3. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + kompleks/ligand (100 μ M) + DNA, 4. kuyucuk: Tris-HCl (pH 8) + kompleks/ligand (100 μ M) + DNA, 5. kuyucuk: Tris-HCl (pH 9) + kompleks/ligand (100 μ M) + DNA

Kompleks/Ligand Konsantrasyonunun DNA Kesim Aktivitesine Etkisi

Kompleks/ligand konsantrasyonunun nükleaz etkinliği üzerine etkisi, her bir kompleks/ligand için önceki çalışmada belirlenen etkin pH'yı sağlayan tampon sistemlerinin içinde pBR322 plazmid DNA'sını ve farklı konsantrasyonlarda kompleks/ligand bileşenlerini içerecek şekilde yapıldı. Bu deneme için, 7,5 µL Tris-HCl (pH 7), 2 µL kompleks/ligand (10-125 µM) ve 0.5 µL DNA ile reaksiyon karışımı oluşturuldu. Reaksiyon karışımlarının 37 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonucunda elektroforeze tabi tutularak konsantrasyonun kesim üzerindeki etkinliği değeriendirildi. Bu denemede komplekslerin/ligandların her biri için 10, 25, 50, 100, 125 µM konsantrasyonlarını içeren örnekler kullanıldı. Kesim ürünlerinin UV ışığı altında elde edilen görüntüleri Şekil 33'de gösterildi. Kuyu içerikleri bu görüntülerin altında açıklandı. Görüntülerin detaylı incelenmesi sonucu; komplekslerin (K1, K2 ve K3) ve ligandların (L1, L2 ve L3) 100 µM'da yüksek nükleaz aktivitesi gösterdiği belirlendi.



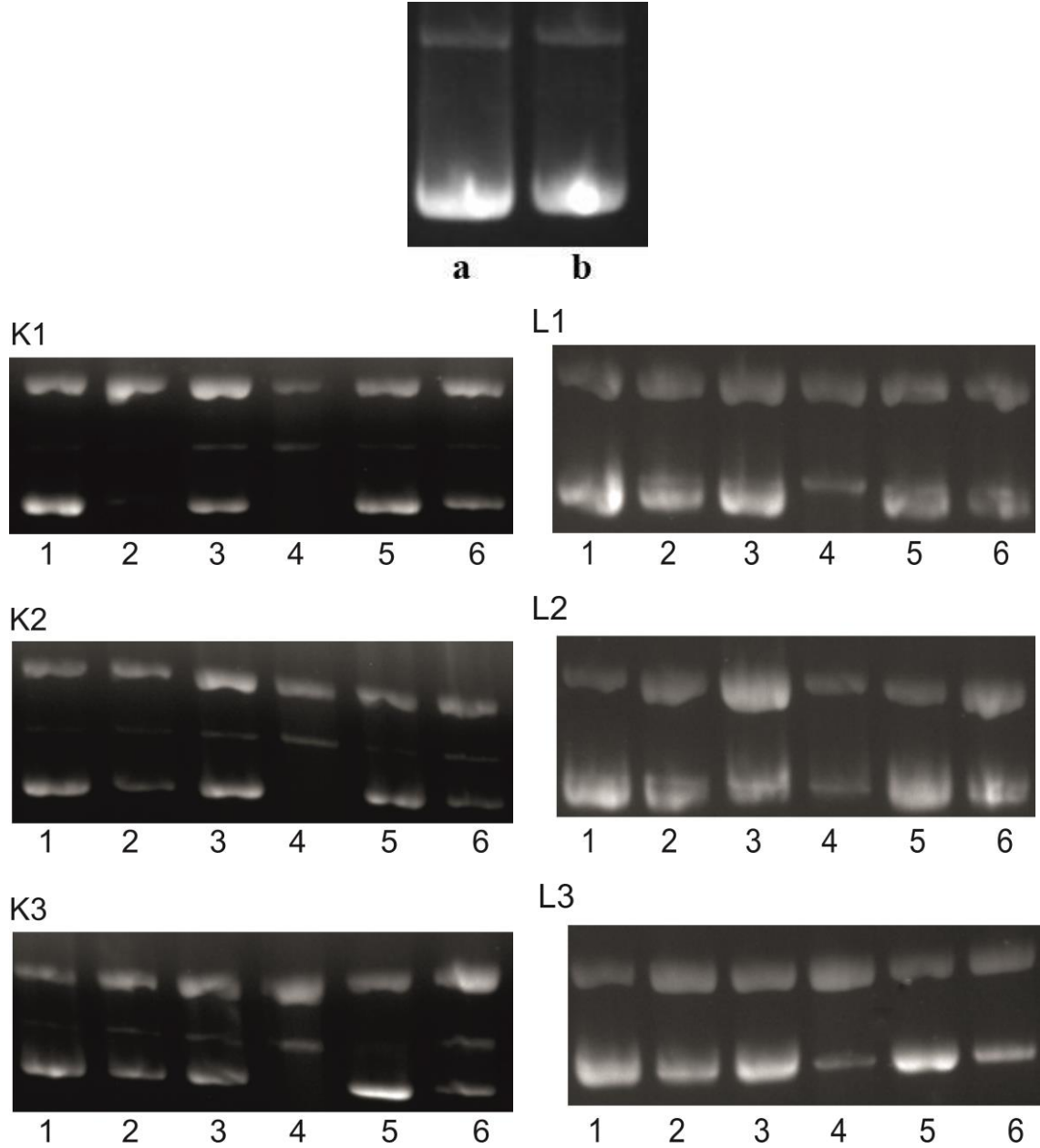
Şekil 33. Kompleks ve ligandların konsantrasyona bağlı kesim aktiviteleri: pH 7’de tris-HCl (50 mM) tamponu, pBR 322 plazmid DNA (250 ng) ve kompleksten/liganddan oluşan reaksiyon karışımının 1 saat 37 °C inkübasyonun ardından kesim reaksiyonunun agaroz jel elektroforezi. a kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DNA, b kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DMF + DNA, 1. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + kompleks/ligand (10 µM) + DNA, 2. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + kompleks/ligand (25 µM) + DNA, 3. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + kompleks/ligand (50 µM) + DNA, 4. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + kompleks/ligand (100 µM) + DNA. 5. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + kompleks/ligand (125 µM) + DNA

6.2.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Oksidatif Kesimi

Bu çalışmada komplekslerin/ligandların oksidatif kesim kabiliyetlerinin araştırılması hedeflendi. Bu yüzden, hidrojen peroksit (H_2O_2) (0.4 M), askorbik asit (AA) (2.5 mM), merkaptoetanol (ME) (0.4 M) gibi ajanların varlığında 50 mM Tris-HCl (optimum pH) tamponu içerisinde 250 ng DNA varlığında optimum konsantrasyonlarda kompleks/ligand ilavesi yapıldı. Bu deneme için, 6,5 μ L Tris-HCl (pH 7), 2 μ L kompleks/ligand (100 μ M), 1 μ L aktivatör (H_2O_2 /ME/AA) ve 0.5 μ L DNA ile reaksiyon karışımı oluşturuldu. Çözücünün etkisinin incelenmesi için de 6,5 μ L Tris-HCl (pH 7), 2 μ L DMF, 1 μ L aktivatör (H_2O_2 /ME/AA) ve 0.5 μ L DNA ile bir başka reaksiyon karışımı oluşturuldu. 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyon ile reaksiyonların gerçekleşmesi sağlandı. Bu ajanların kesime aktivatör niteliğinde etkisi olup olmadığı Şekil 34'de gösterilen jel görüntülerinin incelenmesiyle ortaya konuldu.

Ayrıca, bu çalışma sırasında H_2O_2 , ME, AA'ın yalnız başına olduğu durumlarda DNA'ya etki edip etmediğinin incelenmesi için DNA üzerine bu bileşenlerin ilave edilmesiyle denemeler aynı şartlar altında gerçekleştirildi. Kontrol denemesi ile ortamda kompleksler/ligandlar olmadığında bu bileşenlerin DNA kesimini indükleyici bir etkilerinin olmadığı belirlendi (Şekil 34). Kuyu içerikleri görüntülerin altında açıklandı.

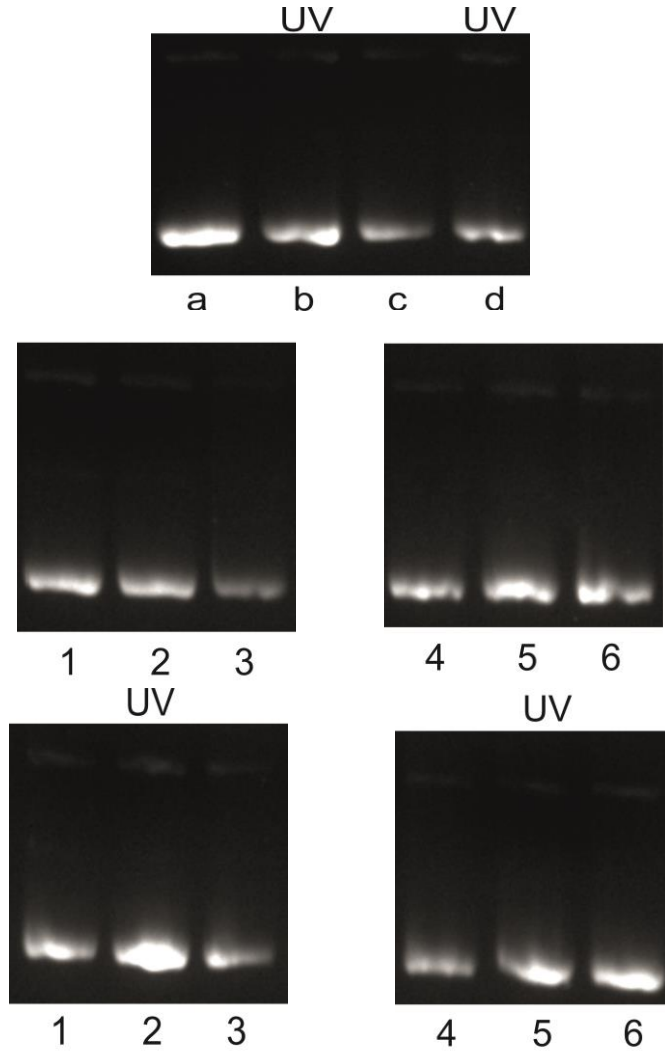
Komplekslerin görüntüleri incelendiğinde H_2O_2 'in indükleyici etkisinin en fazla K1'de olduğu gözlemlendi. ME'ün indükleyici etkisinin her üç kompleksde de eşdeğer ölçüde ve etkili olduğu belirlendi. Askorbik asit ise K2'de daha etkili indükleyici etki gösterdi. İndükleyici ajanlar arasında sıralama yapıldığında ME'ün en etkili aktivatör ajan olduğu belirlendi.



Şekil 34. Kompleks ve ligandların indükleyici ajan varlığında oksidatif kesimi: komplekslerin/ligandların pBR 322 plazmid DNA (250 ng) ile muamelesi sonucu ve çeşitli aktivatörlerin (H_2O_2 (0.4 mM), ME (0.4 mM), AA (2.5 mM)) yokluğunda ve varlığında agaroz jel elektroforezi. a kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DNA, b kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DMF+ DNA, 1. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + DMF+ H_2O_2 + DNA, 2. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + kompleks/ligand (100 μ M) + H_2O_2 + DNA, 3. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + DMF + ME+ DNA, 4. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + kompleks/ligand (100 μ M) + ME+ DNA, 5. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + DMF + AA+ DNA, 6. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + kompleks/ligand (100 μ M) + AA+ DNA

6.2.3. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi

Komplekslerin/ligandların fotodinamik terapi için uygun olup olmadığını değerlendirmek için pBR322 plazmid DNA'sının komplekslerle/ligandlarla etkileşimi UV ışık altında incelendi. Bu deneme için, 7,5 μ L Tris-HCl (pH 7), 2 μ L kompleks/ligand (10-125 μ M) ve 0.5 μ L DNA ile reaksiyon karışımı oluşturuldu. 50 mM Tris-HCl (pH 7) içerisinde hazırlanan komplekslerin/ligandların 100 μ M kompleks konsantrasyonu ile DNA'nın bulunduğu karışım başka hiçbir ilave ajan olmaksızın UV ışığı altında inkübe edildikten sonra standartize edilen yol takip edildi ve reaksiyon ürünlerinin incelenmesi neticesinde UV ışığının kompleksler (K1, K2 ve K3) ve ligandlar (L1, L2 ve L3) üzerinde önemli bir kesim aktivitesi bulunamadı (Şekil 35). Kuyu içerikleri görüntülerin altında açıklandı.



Şekil 35. Kompleks ve ligandların nükleaz etkinliklerinin UV ışığı altındaki değişimi: kompleks/ligand, pBR 322 plazmid DNA (250 ng) ve tris-HCl tamponu ile oluşturulan reaksiyon karışımının karanlıkta ve UV ışıkta 30 dakika ve 37 °C’de bir saat inkübasyonun ardından agaroz jel elektroforezi. a kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DNA, b kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DNA (UV), c kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DMF + DNA, d kuyucuğu: DNA kontrol: Tris-HCl (pH 7) + DMF + DNA (UV), 1. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + K1 (100 µM) + DNA, 2. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + K2 (100 µM) + DNA, 3. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + K3 (100 µM) + DNA, 4. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + L1 (100 µM) + DNA (UV), 5. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + L2 (100 µM) + DNA (UV), 6. kuyucuk: Tris-HCl (pH 7) + L3 (100 µM) + DNA (UV)

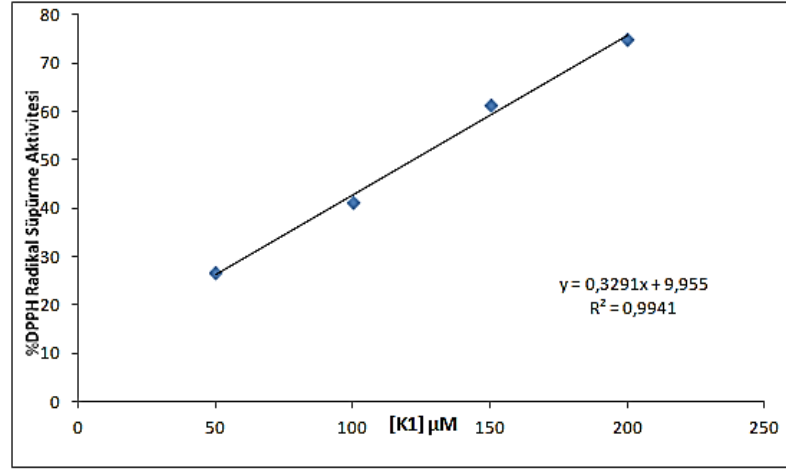
Kompleksler UV ışığı altında ve karanlıkta ayrı ayrı inkübe edilip elektroforeze tabi tutuldu.

6.3. Antioksidatif Aktivite Çalışmaları

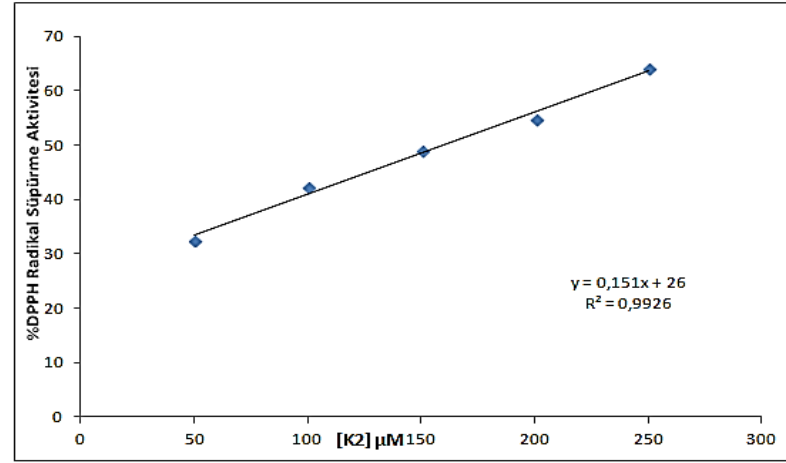
DNA etkileşme çalışmaları ile incelenen komplekslerin iyi derecede DNA bağlanma yeteneği ve iyi derecede kesim aktivitesi göstermesi sebebiyle bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri çalışmaya değer görüldü. Bu yüzden ligand ve komplekslerin antioksidan potansiyellerini incelemek için ligand ve komplekslerin DPPH ve süperoksit radikal süpürme aktiviteleri incelendi.

6.3.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

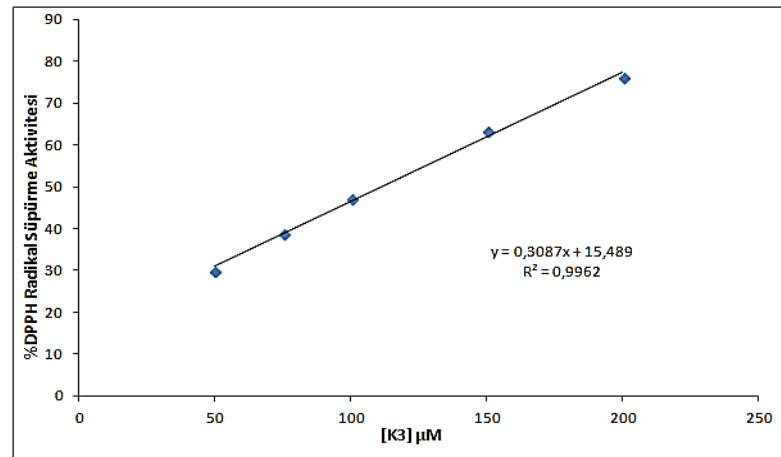
Komplekslerin ve ligandların antioksidan etkinliklerini ortaya koymak amacıyla, hızlı, basit ve uygun bir yöntem olması sebebiyle DPPH radikallerini süpürme aktivitesi incelendi. Bu amaçla metanol içerisindeki DPPH çözeltisinin absorbasındaki düşme kompleks ilavesiyle takip edildi. Absorbansın %50 oranında düşmesini sağlayan kompleks konsantrasyonu SC₅₀ değeri olarak belirlendi ve bu değer aynı şartlarda iyi antioksidan maddeler olan AA ve BHA ile yapılan denemelerden elde edilen SC₅₀ değeriyle karşılaştırıldı (Tablo 8). Bu karşılaştırma sonucunda komplekslerden K1 ve K3 ve ligandlardan L2'nin BHA'ya göre daha düşük SC₅₀ değerine sahip olduğu yani DPPH radikallerini giderme etkinliğinin daha yüksek olduğu ortaya konuldu (Şekil 36-41).



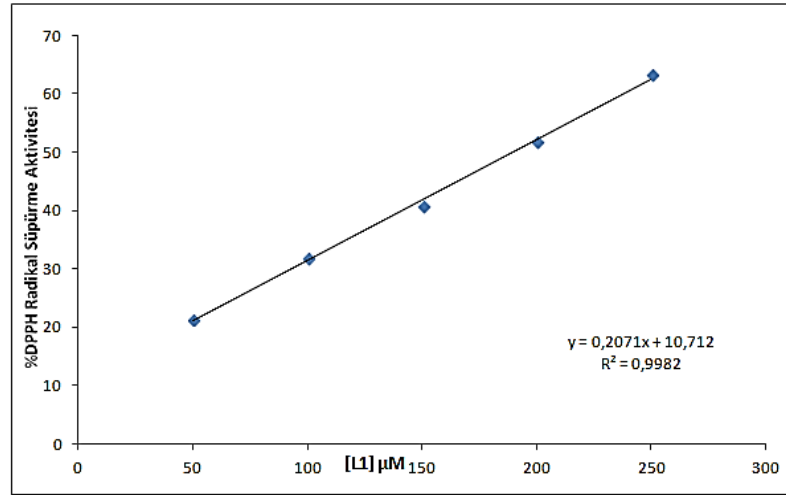
Şekil 36. Kompleks 1'in %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



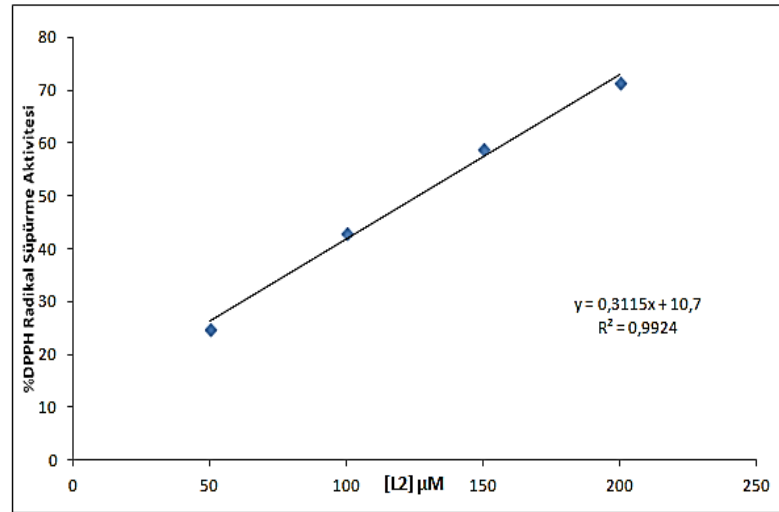
Şekil 37. Kompleks 2'nin %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



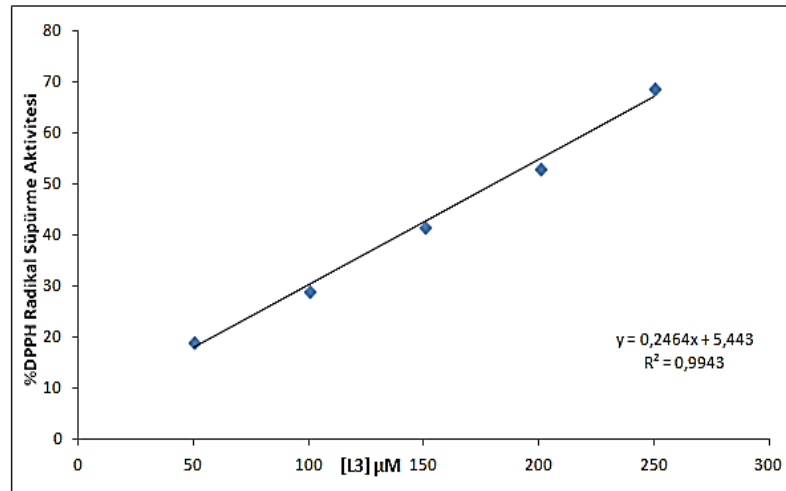
Şekil 38. Kompleks 3'ün %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



Şekil 39. Ligand 1'in %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



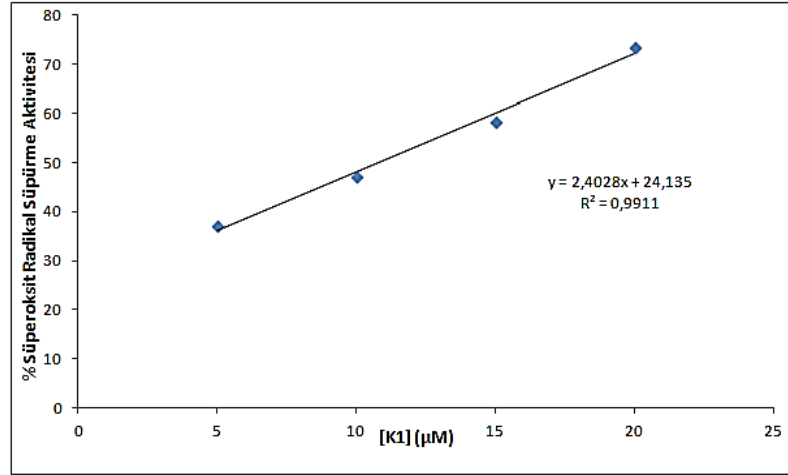
Şekil 40. Ligand 2'nin %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



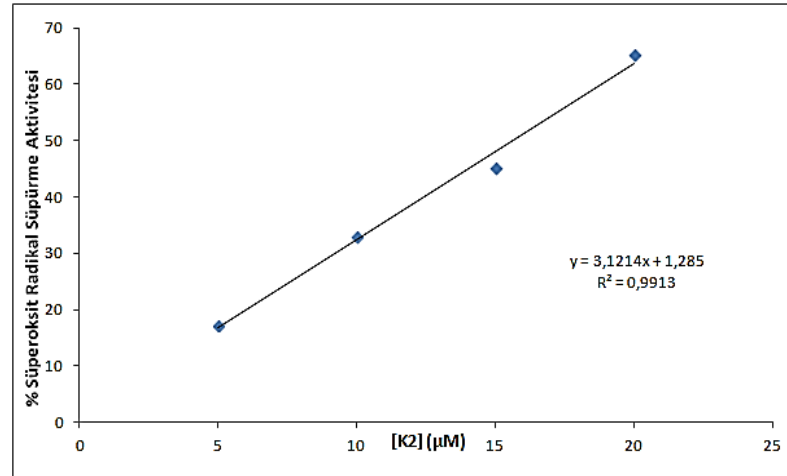
Şekil 41. Ligand 3'ün %DPPH radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri

6.3.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

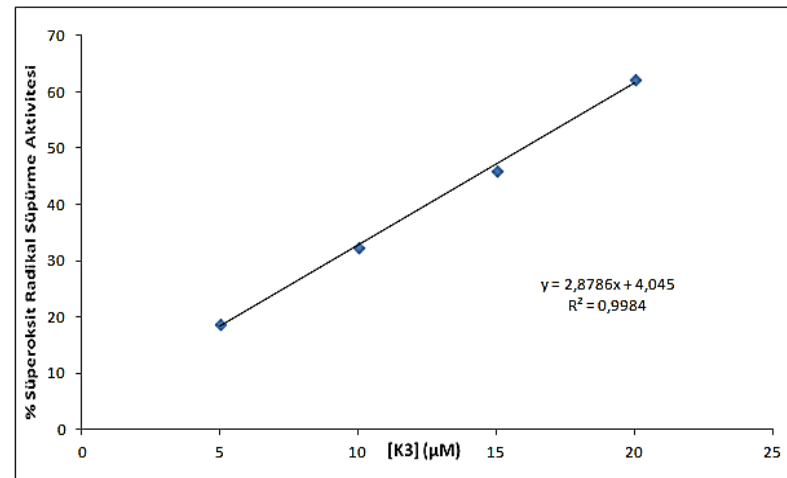
İncelenen komplekslerin ve ligandların antioksidan etkinliklerini ikinci bir yolla ortaya koymak amacıyla süperoksit dismutaz aktiviteleri incelendi. Kompleksler NBT testi ile SOD aktivitesi için biyolojik pH (pH=7.8)'da incelendi. Yapılan çalışmalar sonrasında ortamda oluşturulan süperoksit radikallerinin %50'sini süpüren kompleks konsantrasyonları hesaplanarak aynı yöntemle test edilen ticari SOD enzimi için hesaplanan SC₅₀ değeri ile karşılaştırıldı (Şekil 42-47). İncelenen komplekslerin (K1, K2 ve K3) ve ligandların (L1, L2 ve L3) süperoksit radikallerini süpürme etkinliklerinin ticari olarak temin edilen enzim kadar yüksek olmadığı gözlenirse de dikkat çekecek SC₅₀ değerleri görüldü. Elde edilen değerler Tablo 8'de özetlendi.



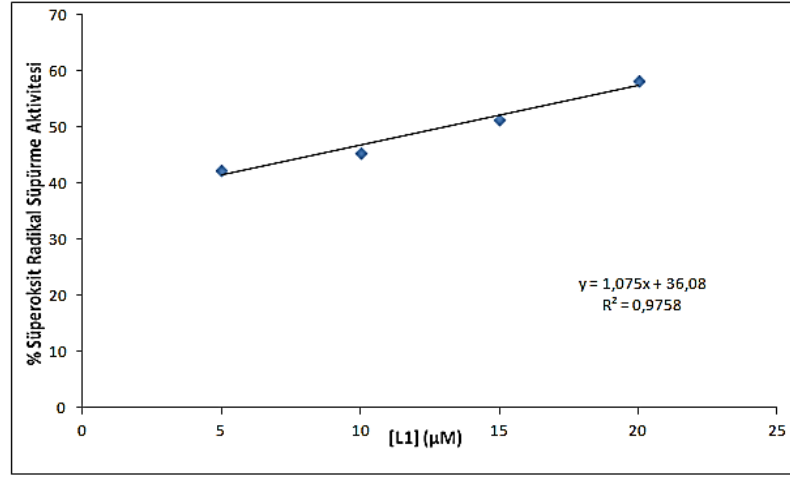
Şekil 42. Kompleks 1'in % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



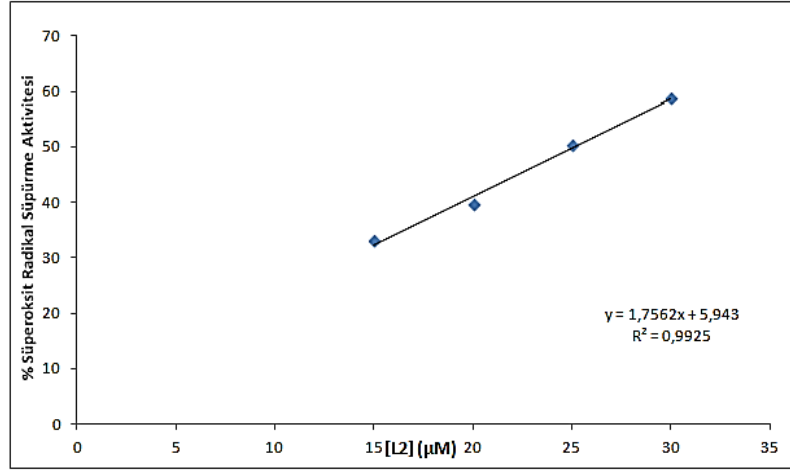
Şekil 43. Kompleks 2'nin % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



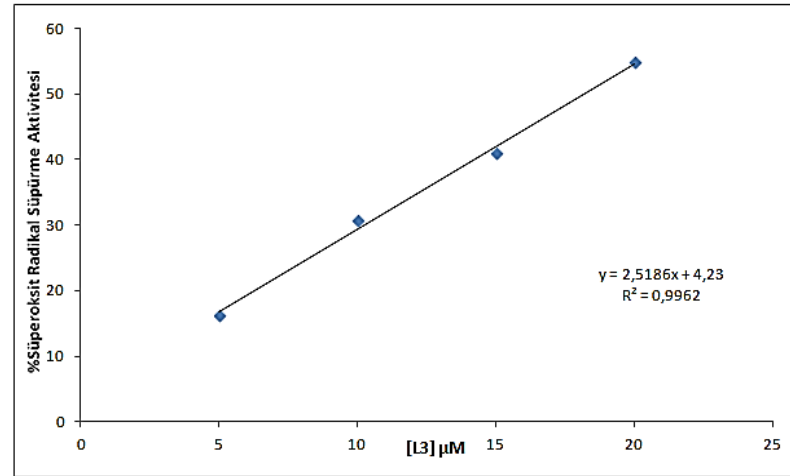
Şekil 44. Kompleks 3'ün % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



Şekil 45. Ligand 1'in % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



Şekil 46. Ligand 2'nin % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri



Şekil 47. Ligand 3'ün % süperoksit radikal süpürme aktivitesi-konsantrasyon grafikleri

Tablo 8. Kompleks ve Ligandların Radikal Süpürme Kapasiteleri (SC₅₀  M)

Kompleks Kodu	DPPH SC₅₀ (�M)	SOD SC₅₀ (�M)	Ligand Kodu	DPPH SC₅₀ (�M)	SOD SC₅₀ (�M)
K1	121.68	10.76	L1	189.70	12.05
K2	158.94	15.61	L2	126.16	20.05
K3	111.79	15.96	L3	180.83	18.17
SOD		0.026			
AA	28.05				
BHA	148.00				

SOD: S perosit dismutaz

AA: Askorbik asit

BHA: B tillenmi  hidroksianisol

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

DNA, hücresel sistemlerde olan çoğu biyokimyasal süreçleri düzenlediği için kanser ilaçlarının birincil hücre içi hedefidir. Çoğu küçük moleküller DNA ile bağlanarak antikanser aktivite gösterirler, böylece DNA replikasyonu değişir, kanser hücrelerinin bölünmesi engellenir ve sonuç olarak kanser hücreleri ölür (122, 123). Bu yüzden, çok sayıda kimyasal nükleazlar, antiviral ajan ve kanser tedavileri için antitümör ajanı olarak tasarlanmaktadır (124). Bu tez kapsamında, tüm ligand ve komplekslerin DNA bağlanma, DNA kesme ve antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve yukarıdaki bulgular elde edilmiştir.

Nükleik asitler; proteinler, su, küçük organik moleküller, metal iyonları ve komplekslerini de içeren pek çok kimyasal tür ile çeşitli şekillerde etkileşirler. Bu etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, oluğa bağlanma ve interkalasyon yoluyla etkileşimlerdir. Geçiş metal kompleksleri çift sarmal DNA baz çiftleri arasında interkalasyon yapabilir. Bu durum DNA'nın sıradan davranışını genel olarak etkileyen ve değiştiren bir etkileşimdir (125). DNA baz çiftleri içine interkalasyon yeteneği ligand düzlemselliğine bağlıdır. Üstelik, düzlemsel heterosiklik ligandlı kompleksler sıradışı elektronik özellikleri ve çeşitli kimyasal reaktiviteleri sayesinde iyi şekilde araştırılmıştır (126). DNA ile komplekslerin bağlanma modlarını incelemek için en etkili yöntem absorpsiyon titrasyon yöntemidir (127). Düzlemsel aromatik kromofor ile DNA'nın baz çiftleri arasında güçlü bir etkileşim içerdiğinden interkalasyon yoluyla bağlanan bileşikler genellikle absorpsiyon spektrumunda kırmızıya kayma yani, hipokromizm ile sonuçlanır. Absorpsiyon yoğunluğundaki artış yani hiperkromizm DNA çift zincirinin yapısının bozulmasına neden olur. Hiperkromizm elektrostatik etkileşimler, Van der Waals etkileşimi, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerin göstergesidir (128).

Çalışılan komplekslerin absorpsiyon spektrumlarında artan CT-DNA ilavesiyle meydana gelen spektral değişiklikler incelendiğinde tüm komplekslerin maksimum absorpsiyonlarında düşme (hipokromizm) gözlemlendi. Komplekslerin (K1, K2 ve K3) absorpsiyonlarında sırasıyla % 17.77, % 23.19 ve % 15.61 oranında dikkate değer ölçüde azalma gözlemlendi. Komplekslerin K_b değerleri sırasıyla 9.65×10^4 , 3.86×10^5 ve 5.69×10^4 M^{-1} şeklinde hesaplandı. Bu komplekslerin bağlanma etkinliği en fazla K2'de

görülürken en az etkinlik ise K3’de olduğu tespit edildi ve sonuçlar klasik bir interkalatör olarak bilinen EB ($K_b: 1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)’den daha düşük K_b değerlerine sahip oldukları belirlendi (129). Literatürden elde edilen bilgilere göre 10^3 M^{-1} ’den daha büyük K_b değerlerine sahip bileşiklerin ılımlı interkalatör özellik gösterdiği bilinmektedir (130). Bu sonuçlara bakılarak ve literatüre göre, bu komplekslerin ılımlı interkalatör etkinliği olduğu söylenebilir.

Komplekslerin DNA ile etkileşimini daha ileri düzeyde ortaya koymak için iyi bilinen bir interkalatör olan etidyum bromür (EB) (131) kullanılarak absorpsiyon spektroskopisi tekniğiyle yarışmalı bağlanma denemesi uygulandı. Serbest EB 480 nm civarında absorpsiyon maksimumuna sahiptir ve DNA ile etkileştiğinde maksimum absorbanısında azalma olurken daha yüksek dalga boyuna kayma görülür. Bu durum EB’nin DNA baz yığınları arasına interkalasyon yaptığının bir kanıtıdır (132). Şekil 22’de görüldüğü gibi serbest EB’nin absorpsiyon maksimumu (480 nm) DNA varlığında 482 nm’ye kaymış, EB-DNA etkileşimi ile absorbansta azalma görüldü. Çalışmada incelenen tüm komplekslerin DNA ile bağlanmak için EB ile yarıştığını gösterecek şekilde absorpsiyon yoğunluğunda farklı oranlarda artış olduğu gözlemlendi. Yukardaki bilgiler ışığında elde edilen sonuçlar komplekslerin DNA ile interkalatif yolla etkileştiğini açıkça göstermektedir.

DNA’nın termal denatürasyonu, küçük moleküller ile nükleik asitlerin arasındaki etkileşimler hakkında önemli bilgiler vermektedir. Çift sarmal DNA’nın tek zincirli nükleik asitlere dönüşümünü karakterize eden DNA’nın erime sıcaklığı (T_m) 260 nm’de sıcaklığın fonksiyonu olarak absorbanısı takip etmekle belirlenmektedir (133). T_m , DNA’daki baz çiftlerinin yarısının eşleşmemiş olduğu sıcaklık olarak tanımlanmaktadır (134).

Literatürden elde edilen bilgiler göre, doğal veya sentetik bileşiklerin DNA ile etkileşimi, istiflenme etkileşimlerini kararlaştırması sebebiyle, çift sarmalın kararlılığıyla sonuçlanır ve sonuç olarak, DNA’nın erime sıcaklığında bir artışa neden olur (135). T_m ’deki böyle bir artış komplekslerin interkalasyon yaptığının bir göstergesidir.

UV–Vis absorpsiyon titrasyonları ve yarışmalı EB bağlanma çalışmaları sonucunda DNA’ya interkalasyon yoluyla bağlandığı belirlenmiştir. Bu düşüncelerin

farklı bir teknikle bir kez daha desteklenmesi amacıyla termal erime eğrilerinin çizilmesiyle elde edilen T_m değerleri incelendi. Literatüre göre, erime sıcaklığındaki 5-12 °C arasındaki artışların bileşiklerin DNA ile interkalasyon türü bağlandığının kanıtıdır (136). Bu amaçla, incelenen kompleks ve ligandların T_m değerlerindeki artış sırasıyla K1, K2 ve K3 için 10.6, 5.0 ve 3.6 °C olarak belirlendi. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında komplekslerin CT-DNA ile ılımlı interkalasyon yaptığı desteklenmiştir.

Kimyasal nükleazlar enzimatik nükleazlarla karşılaştırıldığında bazı avantajlara sahiptir. Kimyasal nükleazlar daha küçük boyuttadırlar ve bu yüzden bir nükleik asit molekülünün sterik olarak engellenmiş bölgelerine ulaşabilirler. Ek olarak kimyasal nükleazların etkinliği önerilen nükleaz moleküllerinin türevlendirilmesiyle artabilir veya azalabilir (137). Üstelik kimyasal nükleazlar fizyolojik pH ve sıcaklıkta DNA kesimine neden olur, bu kimyasal nükleazların aktiviteleri DNA ile komplekslerin güçlü veya zayıf geri dönüşümsüz oluşumunu da içerir (138).

Komplekslerin nükleaz etkinliğini ortaya koyabilmek için yaygın olarak kullanılan agaroz jel elektroforezi yöntemi tercih edilmiştir. Elektrik alanı etkisi altında DNA negatif yüklü olması sebebiyle elektrik alanına yerleştiğinde anoda doğru hareket eder. DNA'nın göçünün boyutuna, elektrik alanının gücü, tampon ve agaroz jelinin yoğunluğu ile DNA'nın büyüklüğüne bağlı olarak karar verilir. Süpersarmal DNA formu (Form I)'nın kırık form (Form II) ve lineer form (Form III)'a dönüştürülmesi ile nükleaz aktivite değerlendirildi. Agaroz jel elektroforezinde bu formlar farklı hızlarda hareket ederler, bozulmamış süpersarmal form (Form I) en hızlı, çeşitli maddelerle etkileşim ile oluşan kırık form (Form II) en yavaş hareket eder. Her iki zincirin kesilmesi ile oluşan lineer form ise (Form III) bu iki form arasında hareket eder (139).

Bu tez kapsamında pH, konsantrasyon, çeşitli oksidatif ajanlar ve UV ışık gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak süpersarmal DNA'nın kırık, lineer hale geçişi izlendi. Eğer incelenecek komplekslerin DNA kesim aktivitesi gösterdiği ortaya konulursa kanser tedavisinde terapötik amaçla kullanılabilme imkanı bulacağı açıktır. Literatüre elde edilen bilgilere göre oksijen atomu metallerin yükseltgenmiş hallerindeki kuvvetli asit özelliği aracılığıyla DNA iskeletinin fosfat grubunun oksijeni ile koordinasyon yapabilir ve DNA'nın fosfodiester bağının kırılmasına neden olabilir (140). Kimyasal

nükleaz aktivitesi gösteren birçok kimyasal, DNA ile güçlü veya zayıf kompleksler oluşturarak kesimi gerçekleştirebilir. Oksidanlar (H_2O_2 , ME ve AA) mevcudiyetinde komplekslerin DNA zincirine saldırarak DNA zincirini kestiği bilinmektedir.

Bu bilgilerin ışığında, komplekslerin herhangi bir ilave ajan olmaksızın uygun koşullarda Form I halindeki plazmid DNA'yı Form II ve Form III'e dönüştürme yetenekleri incelendi. Tüm kompleksler için optimum pH'nın 7 olduğu belirlendi. pH çalışmalarında nükleolitik aktivite gösteren komplekslerin hangi konsantrasyonda daha etkin çalıştıkları incelendi. Tüm komplekslerde, 100 μM 'lık konsantrasyonda DNA üzerindeki nükleolitik aktivitenin etkin olduğu gözlemlendi.

Hidrolik yolla kesimi gerçekleştiren komplekslerin oksidatif ajanlar varlığında da kesim aktivitesi tespit edildi. Bu amaçla H_2O_2 , ME ve AA gibi çeşitli aktivatörlerin kullanılmasına karar verildi. Komplekslerin görüntüleri incelendiğinde, β -merkaptotanol (ME)'un aktivatör etkisinin tüm komplekslerde eşdeğer ölçüde ve çok etkin olduğu gözlemlendi. H_2O_2 'in indükleyici etkisi en fazla K1'de görülürken askorbik asit ise en fazla K2'de indükleyici etki gösterdi. İndükleyici ajanlar arasında sıralama yapıldığında ME'nin en etkili aktivatör ajan olduğu söylenebilir.

Bir diğer çalışma olarak, ışıkla indüklenmiş DNA kesimi deneyleri yapıldı. UV ışık ile oksidatif kesimin sağlandığı bu yöntem tümör tedavisindeki potansiyel kullanımı nedeniyle giderek önem kazanmıştır (141). Bu tez kapsamında incelenen kompleksler UV ışık altında pek bir etkinlik göstermediğinden fotodinamik deneyler için uygun bileşikler olmadığına karar verildi.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar geçiş metal komplekslerinin ilginç antioksidan aktiviteler gösterdiklerini öne sürmektedir (142). Bu yüzden tez kapsamında incelenen ligand ve komplekslerin potansiyel antioksidanlar olarak araştırılması önemlidir. Yapılan incelemeler sonrasında incelenen bileşiklerin dikkate değer ölçüde antioksidan aktivite gösterdikleri ortaya konuldu.

Elde edilen bulgular, incelenen komplekslerin DPPH radikallerini süpürme aktivitesi ve süperoksit radikallerini süpürme etkinlikleri incelendi. Bu deneylere göre K1 ve K3 ve ligandlardan L2'nin BHA'ya göre daha düşük SC_{50} değerine sahip olduğu yani DPPH radikallerini giderme etkinliğinin daha yüksek olduğu belirlendi. Fakat güçlü antioksidan özellik gösteren bir standart olan askorbik asitle karşılaştırıldıklarında

bu etkinin az olduğu tespit edildi. Elde edilen SC_{50} değerleri literatürde çalışılan geçiş metal kompleksleri için elde edilen bulgularla uyum göstermektedir. İncelenen komplekslerin süperoksit radikallerini süpürme etkinliklerinin ticari olarak temin edilen enzim kadar yüksek olmadığı gözlenise de dikkat çekecek SC_{50} değerleri (K1 $SC_{50}=10.76 \mu M$) belirlenmiştir. Elde edilen SC_{50} değerleri literatürde çalışılan geçiş metal kompleksleri için elde edilen bulgularla uyum gösterdiği görülmüştür. Örneğin 2, 6-di ((fenazonil-4-imino)metil)4-metilfenol ligandının Co ve Zn kompleksleri için SC_{50} değerleri sırasıyla $39.1 \mu M$ and $55.8 \mu M$ olarak bulunmuştur (143).

Sonuç olarak incelenen bu maddelerin önemli biyolojik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu alışmalar, bu komplekslerin ileride antikanser ilacı olarak değerlendirilmesine temel oluşturacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. Bozkurt A (2000). Antieoplastik ilaçlar. Farmakoloji Ders Kitabı, Gazi Yayınları, Ankara; 625-634.
2. Türker FA, Kayaalp SO (2002). Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık, Ankara; 380-415.
3. Gate L, Tew KD (2001). Glutathione S-transferases as emerging targets. Expert Opin Ther Targets 5(4): 477-489.
4. Dedeli Ö, Fadıloğlu Ç, Uslu R (2008). Kanserli bireylerin fonksiyonel durumları ve algıladıkları sosyal desteğin incelenmesi. Türk Onkoloji Dergisi 23(3):132-139.
5. Calladine CR, Drew HR, Luisi BF, Travers AA (2004). Understanding DNA: The molecule and how it works. Third edition. Elsevier Academic Press; 116-215.
6. Tabassum S, Ahmad M, Afzal M, Zaki M, Bharadwaj PK (2014). Synthesis and structure elucidation of a copper(II) schiff-base complex: In vitro DNA binding, pBR322 plasmid cleavage and HSA binding studies. J of Photochem and Photobio B: Biology 140: 321–331.
7. Öztürk F, Açık L, Şener İ, Karcı F, Kılıç E (2012). Antimicrobial properties and DNA interactions studies of 3-hetarylazoquinoline-2,4-diol compounds. Turk J Chem 36: 293–302.
8. Shao D, Shi M, Zhao Q, Wen J, Geng Z, Wang Z (2003). Synthesis, crystal structure, DNA binding, cleavage and docking studies of a novel dinuclear Schiff-base copper(II) complex. DOI: 10.1002/zaac.201400410.
9. Burnaz NA (2007). *Viburnum opulus* ve *V. orientale* bitki ekstraktlarının kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
10. Kılınç K, Kılınç A (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe T D 33(2): 110-118.

11. Kayalı R, Çakatay U (2004). Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med* 35: 83-89.
12. Chen Y, Hu L (2009). Design of anticancer prodrugs for reductive activation. *Med Res Rev* 29: 29–64.
13. Keypour H, Arzhangi P, Rahpeyma N, Rezaeivala M, Elerman Y, Khavasi HR (2011). Coordination chemistry of two new tetraaza Ni(II) and Cu(II) macrocyclic and two new Co(II) and Zn(II) macrocyclic Schiff base complexes containing piperazine moiety: X-ray crystal structure of Ni(II) and Zn(II) complexes. *Inorg Chim Acta* 367: 9–14.
14. Amirkhanov VM, Bundya EA, Trush VA, Ovchynnikov VA, Zaitsev VN (1999). Coordination compounds of Co(II), Ni(II), Mn(II), and Zn(II) with new representative of carbacylamidophosphates–potential anticancer drugs. 5th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Corfu 13-17, Greece.
15. Mirabelli CK, Hill DT, Faucette LF, McCabe FL, Girard GR, Bryan DB, Sutton BM, Bartus JO, Crooke ST, Johnson RK (1987). Antitumor activity of bis(diphenylphosphino)alkanes, their gold(I) coordination complexes, and related compounds. *J Med Chem* 30: 2181-2190.
16. Patel VK, Vasanwala AM, Jejurkar CR (1989). Synthesis of mixed schiff base complexes of Cu(II) and Ni(II) and their spectral, magnetik and antifungal studies. *Indian J of Chem* 28A: 719-721.
17. Mutterties EL, Rhodin TN, Band E, Brucker GF, Pretzar WR (1979). Clusters and surfaces. *Chem Rev* 79-91.
18. Chen Y, Hu L (2009). Design of anticancer prodrugs for reductive activation. *Med Res Rev* 29: 29–64.
19. Sağlam N, Çolak A, Serbest K, Karaböcek, S, Güner S (2004). DNA hydrolysis by homo- and heteronuclear Cu(II)–Ni(II) complexes of two diester-type ligands. *Monatshefte für Chem* 135: 1023–1031.

20. Siddiqi ZA , Khalid M, Kumar S, Shahid M, Noor S (2010). Antimicrobial and SOD activities of novel transition metal complexes of pyridine-2,6-dicarboxylic acid containing 4-picoline as auxiliary ligand. *Eur J Med Chem* 45(1): 264-269.
21. Liang JL, Wang Y, Du KJ, Li G-L, Guan R-L, Ji L-N, Chao H (2014). Synthesis, DNA interaction and anticancer activity of copper(II) complexes with 4'-phenyl-2,2':6',2''-terpyridine derivatives. *J of Inorg Biochem* 141: 17-27.
22. Pathak D, Siddiqui N, Bhrigu B, Ahsan W, Alam MS (2010). Benzimidazoles: A new profile of biological activities. *Der Pharma Lettre* 2(2): 27-34.
23. Ceylan H (2012). Bazı schiff bazı metal komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
24. Bethe HA (1928). Theory of diffraction of electrons by crystals. *Ann Physik* 87(55): 55-129.
25. Patai S (1970). Chemistry of the carbon-nitrogen double bond. *Interscience* 1: 1-61.
26. Atlan M (2012). Yeni schiff bazları ve metal kompleksleri ile polikondenzasyon yöntemiyle oligomerlerinin sentezi, karakterizasyonu, DNA ile etkileşimleri, optik ve özelliklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
27. Wasiake W, Urbaniak W (1997). Chemically bonded chelates as selective complexing sorbents for gas chromatography V. silica chemically modified by Cu(II) complexes via amino groups. *J of Chromo A* 757: 137-143.
28. Tarafder MTH, Mihail MAL (1986). Novel peroxy complexes of zirconium containing organic ligands. *Inorg Chem* 25: 2265-2268.
29. Allan JR, McCloy B (1992). Thermal, spectral and magnetic studies of the chloro complexes of manganese, cobalt, nickel and copper with 3-pyridinealdoxime. *Thermochim Acta* 211: 85-91.

30. Wei Y, Ning G, Hai-Qian Z, Jian-Guo W, Yi-Hong W, Wesche KD (2004). Microarray preparation based on oxidation of agarose-gel and subsequent enzyme immunoassay. *Sensors and actuators. B Chemical* 98(1): 83-91.
31. Costmanga J, Vargas J, Latorre R, Alvarado A, Mena G (1992). Coordination compounds of copper, nickel and iron with Schiff bases derived from hydroxynaphthaldehydes and salicylaldehydes. *Coord Chem Rev* 119: 67-88
32. Schiff H (1866). Eine neue reihe organischer diamine. *J Lies Ann Chem* 140(1): 92-137.
33. Raman N, Muthuraj V, Ravichandran S, Kulandaisamy A (2003). Synthesis, characterization and electrochemical behaviour of Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) complexes derived from acetylacetone and p-anisidine and their antimicrobial activity. *Proc Indian Acad Sci (Chem. Sci.)* 115(3): 161-167.
34. Kar DM, Sahu SK, Pradhan D, Dash GK, Misra PK (2003). Synthesis, antibacterial and anti-inflammatory activities of some novel isatinoid compounds. *J Teach Res Chem* 10: 20-24.
35. Dash B, Mahapatra PK, Panda D, Patnaik JM (1984). Fungucidal activities of schiff base derived from p-hydroxybenzaldehydes and their derivatives. *J Indian Chem Soc* 61: 1061-1064.
36. Phatak P, Jolly VS, Sharma KP (2000). Synthesis and anticancer activity of schiff base. *Orient J Chem* 16: 493-494.
37. Serin S, Gök Y (1988). Hidroksi Schiff bazı metal komplekslerinin tekstil boyamacılığında kullanılabilirliğinin incelenmesi. *Doğa* 12: 325-331.
38. Günay ZE (2013). Yeni tip asimetric Schiff bazları ve Cu(II) ve Fe(III) komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
39. Gürçan N (2014). Ferrosen aktif birimi içeren yeni azin türevlerinin DNA bağlanma, DNA kesim ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

40. Pfeiffer P, Breith E, Lübke E, Tsumaki T (1933). Tricyclische orthokondensierte nebenvalenzringe. *J Lie Ann Chem* 503(1): 84-130.
41. Chen Y, Hu L (2009). Design of anticancer prodrugs for reductive activation. *Med Res Rev* 29: 29–64.
42. Franco E, López-Torres E, Mendiola M, Sevilla M (2000). Synthesis, spectroscopic and cyclic voltammetry studies of copper(II) complexes with open chain, cyclic and a new macrocyclic thiosemicarbazones. *Polyhedron* 19: 441–451.
43. Liang JL, Wang Y, Du KJ, Li G-L, Guan R-L, Ji L-N, Chao H (2014). Synthesis, DNA interaction and anticancer activity of copper(II) complexes with 4'-phenyl-2,2':6',2''-terpyridine derivatives. *J of Inorg Biochem* 141: 17-27.
44. Ragheb MA, Eldesouki MA, Mohamed MS (2015). DNA binding, photo-induced DNA cleavage and cytotoxicity studies of lomefloxacin and its transition metal complexes. *Spectrochim Acta Part A* 138: 585–595.
45. Çolak A, Çekirge E, Karaböcek S, Küçükdumlu A, Ertunga NS, Çol M, Abbasoğlu R (2009). Investigation of DNA cleavage activities of new oxime-type ligand complexes and molecular modeling of complex--DNA interactions. *Chem Papers* 63(5): 554–561.
46. Jayaseelan P, Akila E, Rani MU, Rajavel R (2013). Synthesis, spectral characterization, electrochemical, anti-microbial, DNA binding and cleavage studies of new binuclear Schiff base metal(II) complexes derived from o-hydroxyacetophenone. *J of Saudi Chem Soc* 1319-6103.
47. Maheswari PU, Roy S, Dulk HD, Barends S, Wezel GV, Kozlevcar B, Gamez P, Reedijk J (2006). The square-planar cytotoxic [CuII(pyrimol)Cl] complex acts as an efficient DNA cleaver without reductant. *J Am Chem Soc* 128: 710–711.
48. Tabassum S, Khan RA, Arjmand F, Aziz M, Juvekar AS, Zingde SM (2011). Carbohydrate-conjugate heterobimetallic complexes: synthesis, DNA binding, studies, artificial nuclease activity and in vitro cytotoxicity. *Carbohydr Res* 346: 2886–2895.

49. Ma Z-Y, Qiao X, Xie C-Z, Shao J, Xu J-Y, Qiang Z-Y, Lou J-S (2012). Activities of a novel schiff base copper(II) complex on growth inhibition and apoptosis induction toward MCF-7 human breast cancer cells via mitochondrial pathway. *J Inorg Biochem* 117: 1–9.
50. Kealy TJ, Pauson PL, (1951). A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature* 168: 1039-1040.
51. Jaouen G, Vessières A, Butler IS (1993). Bioorganometallic chemistry: a future direction for transition metal organometallic chemistry. *Acc Chem Res* 26: 361-369.
52. Fish RH, Jaouen G (2003). Bioorganometallic Chemistry: Structural diversity of organometallic complexes with bioligands and molecular recognition studies of several supramolecular hosts with biomolecules, alkali-metal ions and organometallic pharmaceuticals. *Organometallics* 22: 2166-2177.
53. Metzler-Nolte N (2001). Labeling of biomolecules for medicinal applications-bioorganometallic chemistry at its best. *Angew Chem Int Ed* 40: 1040-1043.
54. Van Staveren DR, Metzler-Nolte N, (2004). Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem. Rev* 104: 5931-5986.
55. Wilkinson G, Rosenblum M, Whiting MC, Woodward RB (1952). The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *J Am Chem Soc* 74: 2125-2126.
56. Colacot TJ (2003). A concise update on the applications of chiral ferrocenyl phosphines in homogeneous catalysis leading to organic synthesis. *Chem Rev* 103: 3101-3118.
57. Sutcliffe OB, Bryce MR (2003). Planar chiral 2-ferrocenyloxazolines and 1,1'-bis(oxazolinyl)ferrocenes—syntheses and applications in asymmetric catalysis. *Tetrahedron Asymm* 14: 2297-2325.
58. Zeni G, Larock RC (2006). Synthesis of heterocycles via palladium-catalyzed oxidative addition. *Chem Rev* 106: 4644-4680.
59. Larock RC (2005). Palladium-catalyzed annulation of alkynes. *Top Organomet Chem* 14: 207-242.

60. Sugihara T, Copéret C, Owczarczyk Z, Harring LC, Negishi E (1994). Deferred carbonylative esterification in the Pd-catalyzed cyclic carbometalation-carbonylation cascade. *J Am Chem Soc* 116: 7923-7924.
61. Preston PN (1974). Synthesis, reactions, and spectroscopic properties of benzimidazoles. *Chem Rev* 74(3): 279-314.
62. Hobrecker F (1872). Reduction-products of nitracetamide compounds. *Chem Ber* 5: 920-924.
63. Yılmaz F (2011). Bazı yeni benzimidazol türevlerinin sentezi ve yapılarının aydınlatılması. Yüksek lisans tezi, Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.
64. Wright JB (1951). The chemistry of the benzimidazoles. *Chem Rev* 48: 397-541.
65. Rogers KS, Clayton CC (1972). Effects of pH on benzimidazole fluorescence. *Anal Biochem* 48: 199-201.
66. Ficken GE, Fry DJ (1963). The nitration of 5-nitro- and 2-methyl-5-nitrobenzimidazoles. *J of Org Chem* 28: 736-738.
67. Küçük E (2012). Bazı yeni benzimidazol türevi bileşiklerin sentezi ve biyolojik etkilerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
68. Rogers KS, Clayton CC (1972). The effects of pH on benzimidazole fluorescence. *Anal Biochem* 48: 199-201.
69. Walia R, Hedaitullah M, Naaz SF, Iqbal K, Lamba HS (2011). Benzimidazole derivatives—an overview. *Int J Res Pharm Chem* 1(3): 565-574.
70. Patel OB, Patel LJ (2011). Microwave assisted synthesis and biological evaluation of benzimidazole derivatives as anticancer agents. *Int J Pharm App Sci* 2(1): 15-19.
71. Budow S, Kozłowska M, Gorska A, Kazmierczuk Z, Eickmeier H, La Colla P, Gosselin G, Seela F (2009). Substituted benzimidazoles: antiviral activity and synthesis of nucleosides. *Arkivoc* 225-250.

72. Yılmaz A (2008). Anjiyojenez üzerine etkili olabilecek heterosiklik bileşikler üzerinde çalışmalar. Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
73. Pathak D, Siddiqui N, Bhargu B, Ahsan W, Alam MS (2010). Benzimidazoles: A new profile of biological activities. *Der Pharma Lettre* 2(2): 27-34.
74. Ram S, Wise DS, Wotring LL, Mccall JW, Townsend LB (1992). Synthesis and biological-activity of certain alkyl 5-(alkoxycarbonyl)-1h-benzimidazole-2-carbamates and related derivatives - a new class of potential antineoplastic and antifilarial agents. *J Med Chem* 35(3): 539-547.
75. Carter SB, Bucknall RA (1967). A reversible inhibitor of nucleic acid synthesis. *Nature* (213): 1099-1101.
76. Brown RS, Zamkane M, Cocho JL (1984). Tris(imidazole) containing phosphine: $M2^+$ complexes as biomimetic catalysts. Importance of a $L:M2^+-OH^-$ in the catalyzed bimolecular hydrolysis of p-nitrophenyl picolinate. *J Am Chem Soc* 106(18): 5222-5228.
77. Jones JB, Taylor KE (1977). Hydroxymethylbenzimidazole carboxylic acid models of the Asp-His-Ser charge relay system of serine proteases. *Canadian J Chem* 55(10): 1653-1657.
78. Alessio E, Macchi M, Heath SL, Marzilli LG (1997). Ordered supramolecular porphyrin arrays from a building block approach utilizing pyridylporphyrins and peripheral ruthenium complexes and identification of a new type of mixed-metal building block. *Inor Chem* 36(24): 5614-5623.
79. Tamm I, Folkers K, Horsfall FL (1953). Inhibition of influenza virus multiplication by alkyl derivatives of benzimidazole. Kinetic aspects of inhibition by 2,5-dimethylbenzimidazole as measured by infectivity titrations. *J Exp Med* 98: 219-227.
80. Singh, Gurvinder (2013). Synthesis and antimicrobial activity of benzoxazole derivatives. *International Research Journal Of Pharmacy* 4(1): 82-87.
81. Watson JD (1968). The double helix. Weidenfeld and Nicholson, LONDON.

82. Güner S (2007). Biyokimya-I, Biyomoleküllerin Yapısı ve İşlevi. KTÜ Fen Ed. Yayınları, No.224, Trabzon, 231-243.
83. Nelson DL, Cox MM (2013). Lechninger Biyokimyanın İlkeleri. 5th ed. Çeviren: Elçin M, Palme Yayıncılık, Ankara, 271-296.
84. Klug MR, Cummings MR (2002). Genetik Kavramlar. 6th ed. Çeviren: Öner C, Palme Yayıncılık, Ankara, 294-301.
85. Watson JD, Crick FHC (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171: 737.
86. Wilkins MHF (1963). Molecular configuration of nucleic acids. Science 941-950.
87. Wing R, Drew H, Takano T, Broka C, Tanaka S, Itakura K, Dickerson R, (1980). Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. Nature 287: 755-8.
88. Konuk M (2004). Moleküler Biyoloji (Çeviri Notları). Nobel dağıtım, No.121, Ankara, 31-41.
89. Gökçe C (2012). Bazı geçiş metallerinin yeni hidrazon schiff bazı ligandları ile koordinasyon bileşiklerinin hazırlanması, yapılarının aydınlatılması, dna etkileşmelerinin ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
90. Krugh TR (1994). Drug-DNA interactions. Curr Op Str Biol 4: 351-364.
91. Bailly C (2000). Topoisomerase-I poisons and suppressors as anticancer drugs. Curr Med Chem 7: 39-58.
92. Pindur U, Haber M, Sattler K (1993). Antitumor active drugs as intercalators of deoxyribonucleic acid. J Chem Edu 70: 263-272.
93. Braña MF, Cacho M, Gradillas A, Pascual-Teresa B, Ramos A. (2001). Intercalators as anticancer drugs. Curr Pharm Des 7(17): 1745-1780.
94. Ağır H (2011). Bazı Schiff bazları ve Mn(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) komplekslerinin nükleolitik aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.

95. Manning GS (1978). The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q Rev Biophys* 11: 179-246.
96. Record MT, Lohman TM, De Haseth P (1976). Ion effects on ligand-nucleic acid interactions. *J Mol Biol* 107: 145-158.
97. Papavassiliou AG (1995). Chemical nucleases as probes for studying DNA-protein interactions. *Biochem J* 305: 345-357.
98. Neidle S (2001). DNA minor-groove recognition by small molecules. *Nat Prod Rep* 18: 291-309.
99. Palchaudhuri R, Hergenrothe PJ (2007). DNA as a target for anticancer compounds: Methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotechnol* 18(6): 497-503.
100. Laveray R, Zakrzewska K, Pullman B (1986). Binding of non-intercalating antibiotics to B-DNA: A theoretical study taking into account nucleic acid flexibility. *J Biomol Str Dyn* 3: 1155-1170.
101. Lerman LS (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J of Mol Bio* 3:18–30.
102. Chaires JB (2006). A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Acc of Chem Res* 44: 349-359.
103. Chaires JB, Leng F, Przewloka T, Fokt I, Ling YH, Perez-Soler R, Priebe W (1997). Structure-based design of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *J Medic Chem* 40: 261-266.
104. Leng F, Priebe W, Chaires JB (1998). Ultratight DNA binding of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *Biochem* 37: 1743-1753.
105. Halliwell B, Gutteridge JMC (1991). Free radicals in biology and medicine. *Free Rad Bio and Med* 10(6): 449-450.

107. Halliwell B, Aruoma OI (1998). Free radicals and antioxidants: The need for in vivo markers of oxidative stress. *J of Am Oil Chem Soc* 75(2): 199–212.
108. Storz G, Imlayt JA (1999). Oxidative stres. *Curr Opin Microbiol* 2: 188-189.
109. Mantle D, Anderton JG, Falkous G, Barnes M, Jones P, Perry EK (1998). Comparison of methods for determination of total antioxidant status-application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp Biochem and Physio Biochem and Mol Biol* 121(4): 385-391.
110. Kahkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J of Agri and Food Chem* 47: 3954-3962.
111. Nagai T, Myoda T, Nagashima T (2005). Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (*tsukushi*) *equisetum arvense*. *Food Chem* 91: 389-394.
112. Gökpınar S, Koray T, Akcicek E, Göksan T, Durmaz Y (2006). Algal antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi* 23: 85-89.
113. İskefiyeli Z (2010). Ormangülü (*Rhododendron*) uçucu yağ ve ekstraktların kimyasal bileşimleri ve biyolojik aktiviteleri. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
114. Chen LH, Boissonneault GA, Glauert HP (1988). Vitamin C, Vitamin E and cancer. *Anticancer Res* 8: 739-748.
115. Edge R, Mc Garvey DJ, Truscott TG (1997). The carotenoids as antioxidants. *J Photoch Photobio* 41: 189-200.
116. Marmur J (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3: 208–218.
117. İscel C, Yılmaz VT, Ari F, Ulukaya E, Harrison WTA (2013). Trans-dichloridopalladium(II) and platinum(II) complexes with 2-(hydroxymethyl)pyridine and 2-(2-hydroxyethyl)pyridine: Synthesis, structural characterization, DNA binding and in vitro cytotoxicity studies. *Eu J of Med Chem* 60: 386–394.

118. Szaciłowski K, Macyk W, Drzewiecka-Matuszek A, Brindell M, Stochel G (2005). Bioinorganic photochemistry: Frontiers and mechanisms. *Chem Rev* 105(6): 2647–2694.
119. Burits M, Bucar F (2000). Antioxidant activity of nigella sativa essential oil. *Phytotherapy Res* 14: 323-328.
120. Türkoglu A, Duru ME, Mercan N, Kivrak I, Gezer K (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of laetiporus sulphureus (Bull.) murrill. *Food Chem* 101: 267- 273.
121. Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287.
122. Tabassum S, Ahmad M, Afzal M, Zaki M, Bharadwaj PK (2014). Synthesis and structure elucidation of a copper(II) schiff-base complex: In vitro DNA binding, pBR322 plasmid cleavage and HSA binding studies. *J of Photochem and Photobio B: Bio* 140: 321–331.
123. Chauhan M, Banerjee K, Arjmand F (2007). DNA binding studies of novel copper(II) complexes containing L-tryptophan as chiral auxiliary: In vitro antitumor activity of Cu-Sn₂ complex in human neuroblastoma cells. *Inorg Chem* 6(8): 3072-3082.
124. Chitrapriya N, Mahalingam V, Zeller M, Lee H, Natarajan K (2010). Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage studies of Ru(II) complexes containing oxime ligands. *J Mol Struct* 984(1-3): 30–33.
125. Jayaseelan P, Akila E, Rani MU, Rajavel R (2013). Synthesis, spectral characterization, electrochemical, anti-microbial, DNA binding and cleavage studies of new binuclear Schiff base metal(II) complexes derived from o-hydroxyacetophenone. *J of Saudi Chem Soc* 1319-6103.
126. Maheswari PU, Roy S, Dulk HD, Barends S, Wezel GV, Kozlevcar B, Gamez P, Reedijk J (2006). The square-planar cytotoxic [CuII(pyrimol)Cl] complex acts as an efficient DNA cleaver without reductant. *J Am Chem Soc* 128: 710–711.

127. Pyle AM, Rehmann JP, Meshoyrer R, Kumar CV, Turro NJ, Barton JK (1989). Mixed-ligand complexes of ruthenium(II): Factors governing binding to DNA. *J Am Chem Soc* 111 (8): 3051–3058.
128. Sitlani A, Long EC, Pyle AM, Barton JK (1992). DNA photocleavage by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium(III): Shape-selective recognition and reaction. *J Am Chem Soc* 114 (7): 2303–2312.
129. Dimiza F, Perdih F, Tangoulis V, Turel I, Kessissoglou DP, Psomas G (2011). Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: Synthesis, structure, DNA and albumin-binding. *J of Inorg Biochem* 15: 476–489.
130. Chin BE (2012). Synthesis, crystal structure and dna-binding properties of a new copper(II) schiff base complex. *J Struct Chem* 31: 1187-1193.
131. Wilson WD, Ratmeyer L, Zhao M, Strekowski L, Boykin D (1993). The search for structure-specific nucleic acid-interactive drugs: Effects of compound structure on RNA versus DNA interaction strength. *Biochem* 32(15): 4098-4104.
132. Li Y, Wu Y, Zhao J, Yang P (2007). DNA-binding and cleavage studies of novel binuclear copper(II) complex with 1,1'-dimethyl-2,2'-biimidazole ligand. *J Inorg Biochem* 101(2): 283-290.
133. Li ZS, Yang HX, Zhang AG, Luo H, Wang KZ (2011). pH effects on optical and DNA binding properties of a thiophene-containing ruthenium(II) complex. *Inorg Chim Acta* 370(1): 132–140.
134. Waring MJ (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Bio* 13(1): 269–274.
135. Kelly JM, Tossi AB, McConnel DJ, OhUigin CO (1985). A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nuc Acids Res* 13(17): 6017–6034.
136. Kumar CV, Punzalan EHA, Tan WB (2000). Adenine–thymine base pair recognition by an anthryl probe from the DNA minor groove. *Tetrahedron* 56: 7027-7040.

137. Bowen WS, Hill WE, Lodmell, JS (2001). Comparison of rRNA cleavage by complementary 1,10-phenanthroline-Cu(II)- and EDTA-Fe(II)-derivatized oligonucleotides. *Methods* 25: 344–350.
138. Sigman DS, Graham DR, D'Aurora V, Stern AM (1979). Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline cuprous complex. *The J of Bio Chem* 254: 12269–12272.
139. Sathiyaraj S, Sampath K, Raja G, Butcher RJ, Gupta SK, Jayabalakrishnan C (2013). DNA binding/cleavage, antioxidant and cytotoxic activities of water soluble cobalt(II) and copper(II) antipyrine complexes. *Inorg Chim Acta* 406: 44-52.
140. Reddy PR, Shilpa A (2011). Oxidative and hydrolytic DNA cleavage by Cu(II) complexes of salicylidene tyrosine schiff base and 1,10 phenanthroline/bipyridine. *Polyhedron* 30(4): 565–572.
141. Nathan JP (2008). Photophysical properties of metal complexes. *Annu Rep Sect A: Inorg Chem* 104: 498-528.
142. Ji HF, Zhang HYA (2004). Theoretical study on Cu(II) binding modes and antioxidant activity of mammalian normal prion protein. *Chem Res Toxicol* 17(4): 471–475.
143. Liu H, Shi X, Xu M, Li Z, Huang L, Bai D, Zeng Z (2011). Transition metal complexes of 2,6-di ((phenazonyl-4-imino)methyl)-4-methylphenol: structure and biological evaluation. *European J Med Chem* 46(5): 1638–47.

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Şeyda AKKAYA
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 23.11.1987 / Trabzon
Medeni hali : Bekar
Telefon : 05068917119
E-Posta : seydakkaya@hotmail.com.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı	2013-
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü	2006-2011
Lise	Trabzon Lisesi	2001-2004

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2015-

YABANCI DİL İngilizce