

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMİDAZO(1,2-*a*)PİRİDİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
DNA ETKİLEŞİMLERİNİN ÇALIŞILMASI**

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHAR CAYMAZ

OCAK 2019

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMİDAZO(1,2-*a*)PİRİDİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
DNA ETKİLEŞİMLERİNİN ÇALIŞILMASI**

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahar CAYMAZ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Burak ÇOBAN

ZONGULDAK

Ocak 2019

KABUL:

Bahar CAYMAZ tarafından hazırlanan “İmidazo(1,2-*a*)piridin Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve DNA Etkileşimlerinin Çalışılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 07/01/2019

Danışman: Doç. Dr. Burak ÇOBAN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü



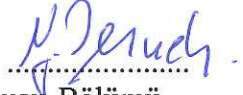
Üye: Prof. Dr. İrfan KANDEMİR

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü



Üye: Doç. Dr. Zuhale GERÇEK.

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2019



Prof. Dr. Ahmet ÖZARSLAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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

Bahar CAYMAZ



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İMİDAZO(1,2-*a*)PİRİDİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE DNA ETKİLEŞİMLERİNİN ÇALIŞILMASI

Bahar CAYMAZ

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Burak ÇOBAN

Ocak 2019, 117 sayfa

Bu çalışmada, İmidazo(1,2-*a*)piridinil-8-benzimidazol (1) ve 2,2'-bis(imidazo[1,2-*a*]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol (2) ligantlarının sentezi, karakterizasyonu ve DNA etkileşimleri üzerinde çalışılmıştır. Elde edilen ligandların karakterizasyonu FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-MS analiz yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin DNA etkileşimleri UV-Vis titrasyonu, floresans, viskozimetri, erime noktası değişimi ve agaroz jel elektroforezi metotlarıyla çalışılmıştır.

UV-Vis titrasyonu sonuçlarına göre her iki bileşiğin de DNA'ya oyuk bağlayıcı olarak bağlandığını göstermektedir. Bağlanma sabitleri sırasıyla $3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 'dir. Yapılan viskozimetri ve erime noktası değişimi çalışmaları da bu sonucu desteklemektedir.

Floresans çalışmalarına göre bileşiklerin zayıf oyuk bağlayıcı oldukları tespit edildi ve L2'nin minör oyuktan Hoechst-33258 boyasına göre daha zayıf bağlandığı görülmüştür. Elektroforez çalışmalarında her iki bileşik de ortamda hiçbir aktivatör yokken DNA üzerinde herhangi bir

ÖZET (devam ediyor)

kırılma gerçekleştirememiştir. Ancak L2 bileşiği yüksek konsantrasyonda DNA'nın eksi yükünü nötralize ederek jel üzerinde DNA'nın çökmesine neden olmuştur. Peroksid varlığında ise L2 L1'den daha yüksek DNaz aktivitesine sahiptir.

Anahtar Kelimeler: imidazo(1,2-*a*)piridin, benzimidazol, DNA, oyuk bağlayıcı, elektroforez, nükleaz aktivitesi, erime noktası değişimi

Bilim Kodu: 405.05.01



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND DNA INTERACTION OF IMIDAZO(1,2-*a*)PYRIDINE DERIVATIVES

Bahar Caymaz

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

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Burak ÇOBAN

January 2019, 117 pages

In this work, imidazo(1,2-*a*)pyridinyl-8-benzimidazole and 2,2'-bis(imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazole synthesis, characterization and DNA interactions of ligands were studied. The characterization of the obtained ligands was carried out by FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-MS analysis methods. DNA interactions of the complexes were studied by UV-Vis titration, fluorescence, viscosimetry, melting point change and agarose gel electrophoresis methods.

UV-Vis titration results show that both compounds bind to DNA as groove binders. The binding constants are $3.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectively. Viscosity and melting point studies also support this result. According to the fluorescence studies, the compounds were found to be weak groove binders and L2 binds weaker than the Hoechst-33258 dye from the minor groove. In electrophoresis studies, both compounds failed to perform any breaks on DNA while no activators were present in the medium. However, the L2 compound neutralized the negative charge of DNA in high concentration and caused DNA to collapse on the gel. In the presence of peroxide, L2 has a higher DNase activity than L1.

ABSTRACT (continued)

Key words: imidazo(1,2-*a*)pyridine, benzimidazol, DNA, groove binding, gel electrophoresis, nuclease activity, DNA melting studies

Science Code: 405.05.01



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında hep daha fazlasını öğrenmemi ve kendimi geliştirmemi sağlayan, tecrübesiyle bana yol gösteren, akademik bilgi birikimini her daim benimle paylaşan, birlikte çalışmaktan son derece mutluluk duyduğum akademisyen ve insan olarak çok değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. Burak ÇOBAN'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca hoşgörü, anlayış, en önemlisi göstermiş olduğu sabırla her aksilikte yardımını isteyebildiğim ve sadece akademik olarak değil her alanda verdiği destekten dolayı, yol gösterici değerli hocam Arş. Grv. Dr. Ufuk YILDIZ'a,

Çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için gerekli olan laboratuvar ve cihaz desteğini sağlayan Prof. Dr. Abdurrahman ŞENGÜL'e, çekinmeden yardımını isteyebildiğim ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Arş. Grv. Fatih PEKDEMİR'e,

Çalışmalarım süresince gerekli maddelerin temininde emeği geçen, laboratuvar ve her türlü alandaki bilgi birikimini esirgemeyen, çok sevdiğim hocam Doç. Dr. Zuhale GERÇEK'e

Bu zorlu akademik serüvenin daha kolay geçmesini sağlayan, laboratuvar çalışmalarımız ve sosyal yaşantımda birlikte olmaktan çok keyif aldığım, her konuda bana yardımcı olan Biyokimya çalışma grubu üyeleri; Yük. Kim. Bahruz ABULHASANOV, Engin SAKA ve Sedef ŞENTÜRK'e, ayrıca çeşitli anabilim dallarından olan ve her konuda desteklerini hissettiğim çok değerli meslektaş ve arkadaşlarım Melike EREN ve Yük. Kim. Gözde DURSUN ve Hüseyin KORKMAZ'a,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu dönemde de beni koşulsuz destekleyen ve çalışmalarım sürecince zaman zaman ihmal ettiğim ailem; Songül CAYMAZ, Pınar CAYMAZ, Engin CAYMAZ ve Ayla ALTINTAŞ'a

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışmaya maddi kaynak sağlayan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederim. (İmidazo(1,2-*a*)piridin Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve DNA Etkileşimlerinin çalışılması 2017-72118496-03'nolu BEUN araştırma Fonu Projesi).



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
 BÖLÜM 1 GİRİŞ	 1
1.1 AMAÇ VE KAPSAM	1
1.2 DNA VE YAPISI	2
1.3 DNA NEDEN İLAÇ HEDEFİDİR.....	11
1.4 KANSER NEDİR VE NASIL OLUŞUR.....	12
1.4.1 Kanser Hücresi ve Normal Hücre Arasındaki Farklar	14
1.4.2 Kanser Tedavisi	14
1.5 DNA-İLAÇ ETKİLEŞİM YOLLARI	15
1.5.1 Kovalent Bağlanma	16
1.5.2 Kovalent Olmayan Bağlanma	18
1.5.2.1 Oyuğa Bağlanma	18
1.5.2.2 İnterkalasyon	20
1.5.2.3 Elektrostatik Etkileşim	23
1.6 DNA'YA BAĞLANAN DİĞER İLAÇLAR	24
1.7 LİĞANTLARIN DNA İLE ETKİLEŞİM TÜRLERİNİN BELİRLENMESİNDE	
KULLANILAN TEKNİKLER.....	26
1.7.1 UV Titrasyon Yöntemi.....	26
1.7.2 Floresans Spektroskopisi.....	30
1.7.3 Yarışmalı Floresans Spektroskopisi	32

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	Sayfa
1.7.4 Viskozimetri	35
1.7.5 Agaroz Jel Elektroforezi.....	36
1.7.6 Erime Noktası Değişimi	39
1.8 İMİDAZO(1,2- <i>a</i>)PİRİDİN	41
1.9 BENZİMİDAZOL	49
 BÖLÜM 2 MATERYAL VE METOD	 67
2.1 MATERYALLER	67
2.1.1 Çözücü ve kimyasallar	67
2.2 KULLANILAN CİHAZLAR	68
2.2.1 Infrared Spektrofotometresi: Jasco FT/IR-300 E	68
2.2.2 ¹ H-NMR Spektrofotometresi: Bruker Ultra Shield Plus, Ultra long hold time 400MHz NMR.....	68
2.2.3 UV/Vis Spektrofotometresi: Carry VinUV 100 Bio, Varian	68
2.2.4 Floresans Spektrometresi: Perkin Elmer LS 55	68
2.2.5 ESI-MS: Tandem Gold.....	68
2.2.6 Jel Elektroforez: Thermo Electron Corporation EC-330 Midicell Primo	68
2.3 LİGANDLARIN SENTEZİ	68
2.3.1 İmidazo(1,2- <i>a</i>)piridinil-8-benzimidazol sentezi.....	68
2.3.2 2,2'-bis(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol Sentezi	69
2.4 UV TİTRASYONU	70
2.5 FLORESANS TİTRASYONU	70
2.5.1 Floresans Değişimi	70
2.5.2 EtBr ile Yarışmalı Floresans Çalışması	70
2.5.3 DAPI ile Yarışmalı Floresans Çalışması.....	71
2.5.4 Hoechst 33258 ile Yarışmalı Floresans Çalışması	71
2.6 VİSKOZİTE ÇALIŞMASI.....	71
2.7 ERİME NOKTASI DEĞİŞİMİ	72
2.8 AGORUZ JEL ELEKTROFOREZ ÇALIŞMASI.....	72

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

BÖLÜM 3 SONUÇLAR.....	75
3.1 SENTEZ	75
3.1.1 İmidazo(1,2- <i>a</i>)piridinil-8-benzimidazol sentezi.....	75
3.1.2 2,2'-bis(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol (L2) Sentezi.....	79
3.2 LİĞANTLARIN DNA İLE ETKİLEŞİMLERİ	83
3.2.1 UV Titrasyon Sonuçları	83
3.2.2 Floresans Titrasyon Sonuçları.....	86
3.2.2.1 Floresans Değişimi	86
3.2.3 Yarışmalı floresans spektroskopisi sonuçları.....	88
3.2.3.2 EtBr ile Yarışmalı Floresans	89
3.2.3.3 DAPI ve Hoechst-33258 ile Yarışmalı Floresans	91
3.2.4 Viskozite Sonuçları	95
3.2.5 Erime Noktası Değişimi	96
3.2.6 Elektroforez Sonuçları.....	97
3.3 SONUÇ.....	98
KAYNAKLAR.....	101
ÖZGEÇMİŞ	117



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Watson- Crick DNA modeli.	2
Şekil 1.2 Nükleotit yapısı ve DNA bazları.	3
Şekil 1.3 A-T ve G-C bazları arasındaki hidrojen bağları.	4
Şekil 1.4 DNA sarmalının 5'→3' yönde oluşumu.	5
Şekil 1.5 DNA konformasyonları.	6
Şekil 1.6 DNA sarmalının bir parçası.	7
Şekil 1.7 DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu.	8
Şekil 1.8 DNA'nın replikasyonu.	9
Şekil 1.9 Replikasyon mekanizması.	10
Şekil 1.10 Gen ekspresyonu (Santral dogma).	11
Şekil 1.11 Hücre döngüsü.	12
Şekil 1.12 Programlı hücre ölümü (Apoptoz).	13
Şekil 1.13 Mutasyon geçiren hücrenin kanserleşmesi	13
Şekil 1.14 Küçük moleküllerin replikasyona ve translayona müdahale ettiği bölgeler.	15
Şekil 1.15 DNA-ilaç etkileşim yolları.	16
Şekil 1.16 Cis-Platin'in kovalent olarak bağlanması.	17
Şekil 1.17 Tümör hücrelerine etki eden mustard türevleri.	17
Şekil 1.18 Bazlar ile kovalent bağlanma.	18
Şekil 1.19 Distamisin ve Netropsin bileşiklerinin yapısı.	19
Şekil 1.20 Oyuğa bağlanan a) Netropsin, b) Netropsin bileşiğinin 3 boyutlu görüntüsü. c) Rutenyum, d) Nikel ve Kobalt kompleksleri.	20
Şekil 1.21 İnterkalasyon yapan bileşikler	21

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 1.22 Epirubisin bileşiğinin yapısı.....	21
Şekil 1.23 a) Ru(Phen), b) Ru(Phen) kompleksinin 3 boyutlu görüntüsü c) Kobalt ve Bakır komplekslerinin DNA baz çiftleri ile interkalasyonu,.....	22
Şekil 1.24 İnterkalasyon modları: a) klasik interkalasyon, b) majör ya da minör oyuk üzerinden interkalasyon c) bis-interkalasyon.	23
Şekil 1.25 Aktinomisin bileşiğinin yapısı.	23
Şekil 1.26 Elektrostatik bağlanma.....	24
Şekil 1.27 DNA'ya bağlanabilen diğer kemoterapi ilaçları.....	24
Şekil 1.28 UV-Vis spektrumunda oluşan kaymalar.	27
Şekil 1.29 Bağlanma sabiti (K_b) hesaplamak için kullanılan örnek grafik.....	28
Şekil 1.30 a) GMB bileşiği, b) GMB bileşiğine ait UV-Vis spektrumu	29
Şekil 1.31 a) Flumethrin bileşiği, b) Flumethrin bileşiğine ait UV-Vis spektrumu.....	29
Şekil 1.32 a) Singla ve grubu tarafından sentezlenen bileşik, b) Bileşiğe ait UV-Vis spektrumu.	30
Şekil 1.33 Bağlanma sabiti (K_{sv}) hesaplamak için kullanılan örnek grafik.....	31
Şekil 1.34 Oyuk bağlayıcı bileşikler a) EtBr b) DAPI c) Hoechst 33258 d) Metilen mavisi e) Akridin oranj.....	32
Şekil 1.35 a) Hoechst-33258 üzerine artan DNA çözeltisi eklenmesi ile oluşan floresans değişimi, b) Hoechst-33258-DNA kompleksine ilaç molekülü eklendikçe oluşan floresans değişimi.....	33
Şekil 1.36 a) Kumarin, b) Kumarine ait UV-Vis spektrumu.....	33
Şekil 1.37 Kumarin bileşiği için yapılan yarışmalı titrasyon sonucu elde edilen floresans spektrumları; a) EtBr b) Akridin oranj c) Hoechst 33258 ve d) Bağlanma sabitleri.	34
Şekil 1.38 Levotirasetam bileşiğinin DNA viskozitesine etkisi.	35
Şekil 1.39 Plazmid DNA formları ve elektrofez üzerinde göç hızları.	37
Şekil 1.40 pBR322 direnç bölgeleri.	37
Şekil 1.41 Artan madde derişimi ile plazmid DNA üzerinde oluşan kırılmaları gösteren elektroforez görüntüsü.	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 1.42 Artan DNA derişimi ile DNA nötralizasyonunu elektroforez görüntüsü.	38
Şekil 1.43 DNA için erime eğriler.	39
Şekil 1.44 a) DNA ve b) DNA-ADMQ kompleksine ait erime eğrisi.	40
Şekil 1.45 a) DNA ve b) DNA-Ru(II) komplekslerinin erime eğrisi.	40
Şekil 1.46 İmidazo[1,2- <i>a</i>]piridin sentez şeması.	41
Şekil 1.47 İmidazo[1,2- <i>a</i>]piridin aktif bölgeleri.	42
Şekil 1.48 Tıpta kullanılan çeşitli imidazo[1,2- <i>a</i>]piridin türevleri.....	43
Şekil 1.49 Huq ve grubu tarafından sentezlenen Platin kompleksleri.....	43
Şekil 1.50 Seferoğlu ve grubu tarafından sentezlenen imidazo[1,2- <i>a</i>]piridin türevleri.	44
Şekil 1.51 Dar ve arkadaşları tarafından sentezlenen imidazo[1,2- <i>a</i>]piridin türevleri.	45
Şekil 1.52 Dahan-Farkas ve grubu tarafından sentezlenen imidazopiridin türevleri.	46
Şekil 1.53 Dam ve grubu tarafından sentezlenen imidazopiridin türevleri.....	46
Şekil 1.54 Bosch ve arkadaşları tarafından sentezlenen imidazopiridin türevleri.	47
Şekil 1.55 Bosch ve grubu tarafından sentezlenen 2 bileşiğinin molekül modelleme çalışması.	48
Şekil 1.56 Mukherjee ve grubu tarafından sentezlenen imidazopiridin kompleksi.	48
Şekil 1.57 Benzimidazol yapısı.	49
Şekil 1.58 Benzimidazol yapısının amfoterik yapısı.....	49
Şekil 1.59 Hegde ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevi.	50
Şekil 1.60 Wang ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevleri.	50
Şekil 1.61 Rodriguez ve grubu tarafından sentezlenen a) Benzimidazol ligantı ve b).Zn kompleksi.	51
Şekil 1.62 Singla ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevleri.	52
Şekil 1.63 Farahat ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevleri.....	53
Şekil 1.64 Mahmood ve grubu tarafından sentezlenen a) Benzimidazol ligantı ve b) Ligantın metal kompleksleri.....	53
Şekil 1.65 Wang ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevi.	54

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 1.66 Mao ve grubu tarafından sentezlenen Gümüş kompleksleri.	55
Şekil 1.67 Sentezlenen Gümüş komplekslerinin viskozite görüntüsü.	56
Şekil 1.68 Bostock-Smith ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevleri.....	57
Şekil 1.69 Chessari ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevleri.....	58
Şekil 1.70 Joubert ve grubu tarafından sentezlenen a) bis-benzimidazol türevi ve b) moleküler modelleme çalışması.	58
Şekil 1.71 Aki ve grubu tarafından sentezlenen ter-benzimidazol türevleri.	59
Şekil 1.72 Cheng ve grubu tarafından sentezlenen bis-imidazol türevleri.....	60
Şekil 1.73 Bistrovic ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevleri.	61
Şekil 1.74 Özkay ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevleri.	62
Şekil 1.75 Huang ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol ve benzo-bisimidazol türevleri.	63
Şekil 1.76 Neidle ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevleri.	64
Şekil 1.77 Chattopadhyay ve grubu tarafından sentezlenen bakır kompleksi.....	65
Şekil 1.78 Nair ve grubu tarafından sentezlenen Rutenyum kompleksleri.	65
Şekil 1.79 Sunita ve grubunun sentezlediği bakır kompleksleri.	66
Şekil 2.1 İmidazo(1,2- <i>a</i>)piridinil-8-benzimidazol sentezi.	68
Şekil 2.2 2,2'-bis(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol sentezi.	69
Şekil 2.3 Ubbelohde vizkozimetresi.....	72
Şekil 3.1 L1 ve L2 bileşiklerinin sentez şeması.	75
Şekil 3.2 L1 ligandının IR spektrumu	76
Şekil 3.3 L1 ligandının kütle spektrumu.	77
Şekil 3.4 L1 ligandının ¹ H NMR spektrumu.....	78
Şekil 3.5 L1 ligandının ¹³ C NMR spektrumu.....	78
Şekil 3.6 L2 ligandının IR spektrumu	80
Şekil 3.7 L2 ligandının kütle spektrumu	81

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 3.8 L2 ligandının ^1H NMR spektrumu.....	82
Şekil 3.9 L2 ligandının ^{13}C NMR spektrumu.....	82
Şekil 3.10 L1 (20 μM) çözeltisinin DNA çözeltisi (0-12 μM) ile titrasyonu sonucu UV-Vis spektrumunda oluşan değişim.	83
Şekil 3.11 L2 (30 μM) çözeltisinin DNA çözeltisi (0-24 μM) ile titrasyonu sonucu UV-Vis spektrumunda oluşan değişim.	84
Şekil 3.12 Bileşiklere ait [DNA] değerlerine karşı [DNA]/($\epsilon\text{A} - \epsilon\text{f}$) grafiği.....	85
Şekil 3.13 L1 (0,5 μM) çözeltisinin DNA çözeltisi (0-30 μM) ile titrasyonu sonucu floresans spektrumunda oluşan değişim.	86
Şekil 3.14 L2 (40 μM) çözeltisinin DNA çözeltisi (0-20 μM) ile titrasyonu sonucu floresans spektrumunda oluşan değişim.	87
Şekil 3.15 Bileşiklere ait Stern-Volmer grafikleri.	88
Şekil 3.16 EtBr-DNA kompleksinin (20 μM EtBr ve 100 μM DNA) L1 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.	89
Şekil 3.17 EtBr-DNA kompleksinin (20 μM EtBr ve 100 μM DNA) L2 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.	90
Şekil 3.18 DAPI-DNA kompleksinin (1 μM DAPI ve 6 μM DNA) L1 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.	91
Şekil 3.19 DAPI-DNA kompleksinin (1 μM DAPI ve 6 μM DNA) L2 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.	92
Şekil 3.20 Hoechst-33258-DNA kompleksinin (1,25 μM Hoechst-33258 ve 12,5 μM DNA) L1 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.	93
Şekil 3.21 Hoechst-33258-DNA kompleksinin (1,25 μM Hoechst-33258 ve 12,5 μM DNA) L2 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.	94
Şekil 3.22 L1 ve L2 bileşiklerinin 100 μM DNA viskozitesine etkileri.	95
Şekil 3.23 L1 ve L2 (15 μM) bileşiklerinin DNA'nın (60 μM) erime noktası üzerine etkisi. DNA'nın L1/L2 varlığında ve yokluğunda erime noktası değişim grafiği.	96
Şekil 3.24 a)Aktivatör yokluğunda ve b) Aktivatör varlığında pBR322 ve artan L1 karışımına ait elektroforez görüntüsü.	97
Şekil 3.25 a)Aktivatör yokluğunda ve b) Aktivatör varlığında pBR322 ve artan L2 karışımına ait elektroforez görüntüsü.	97



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Dam ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkileri.....	47
Çizelge 1.2 Rodriguez ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin ayrıntılı UV titrasyon sonuçları.	52
Çizelge 1.3 Mahmood ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin ayrıntılı UV titrasyon sonuçları.	54
Çizelge 1.4 Wang ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkisi.	55
Çizelge 1.5 Bostock-Smith ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin ayrıntılı UV titrasyon ve erime noktası değişimi sonuçları.	57
Çizelge 1.6 Aki ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkileri.....	59
Çizelge 1.7 Cheng ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkileri.	61
Çizelge 1.8 Özkay ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkileri.	62
Çizelge 1.9 Neidle ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkisi.	64
Çizelge 3.1 Sentezlenen bileşiklerin fiziksel özellikleri	83
Çizelge 3.2 Bileşiklerin UV titrasyonu sonuçları.....	85
Çizelge 3.3 Bileşiklerin floresans titrasyonu sonuçları.	88
Çizelge 3.4 Bileşiklere ait bağlanma sabiti değerleri.	94



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

Å	: Amstrong
nm	: Nanometre
π	: Pi bağı
γ	: Frekans
μM	: Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
μl	: Mikrolitre

KISALTMALAR

Akridin Oranj	: 3,6-Bis(dimetilamino)akridinyum klorid hemi(çinko klorid tuz)
DAPI	: 4',6-Diamidin-2-Fenilindol
ES/MS	: Elekransprey iyonizasyonlu kütle spektrometresi
EtBr	: Etidyum Bromür
FBE	: Fen Bilimleri Enstitüsü
FT-IR	: Fourier transformlu infrared spektrofotometre
Hoechst-33258	: 2'-(4-hidroksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol
Metilen Mavisi	: 3,7-bis(Dimetilamino)fenazationyum klorür
MIC_{50}	: İlacın hücrelerin %50'sini öldürebildiği konsantrasyon değeri
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
UV	: Ultraviyole



BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 AMAÇ VE KAPSAM

DNA, tüm proteinlerin ve enzimlerin sentezi için gerekli kalıtsal bilgi kodlarını taşıdığından biyolojik süreçlerde önemli rol oynar. DNA yapısının keşfedilmesinden bu yana, doğrudan veya dolaylı olarak hücrenin yapısını ve fonksiyonunu kontrol ettiği için antikanser ilaçlardan antibiyotiklere kadar farklı ilaç sınıflarına ait, terapötik açıdan önemli çeşitli küçük moleküller için ana hedef olmuştur. Küçük moleküller DNA ile ilişkili proteinlerle etkileşime girmekten ya da DNA-RNA hibritleriyle etkileşime girmekten başka, doğrudan DNA sarmalına bağlanabilir. Bu tür etkileşimler, hücrenin yapısını ve fonksiyonlarını değiştirebildiği takdirde önemli enzimlerin ve proteinlerin aktivitesine müdahale edebilir. Bu yüzden DNA'ya bağlanabilen küçük moleküllerin tasarımına önem verilmiştir [1]. DNA'ya bağlanabilen birçok molekül sınıfı mevcuttur. Bunların içinde imidazopiridin [2] ve benzimidazol [3] sınıfı bileşikler biyolojik olarak aktif önemli bileşiklerdir. DNA'ya minör oyuk üzerinden bağlandığı bilinen bis-benzimidazol türevi Hoechst-33258 bunlardan biridir [4]. Çalışma kapsamında sentezlenen bileşikler Hoechst-33258 ile benzerlik gösterdiği ve terapötik ilaçların bir özelliği olan protonlanabilir azot içermeleri nedeniyle DNA ile etkileşime girebilecekleri düşünülmüştür [5]. UV-Vis ve floresans titrasyon yöntemi, viskozite, DNA erime noktası değişimi ve jel elektroforez teknikleri kullanılarak sentezlenen bileşiklerin DNA ile etkileşimleri anlaşılmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmada DNA'ya bağlanabileceği düşünülen bileşikler sentezlenerek, karakterize edilmiştir ve DNA ile etkileşimleri araştırılmaya çalışılmıştır. Etkileşimler sırasında bağlanma özellikleri, ilaçların işlevsel mekanizmasını anlamada yardımcı olabilmesi ve DNA'ya hedeflenen yeni ilaçların geliştirilmesi için teorik bir temel sağlaması amaçlanmıştır [6, 7].

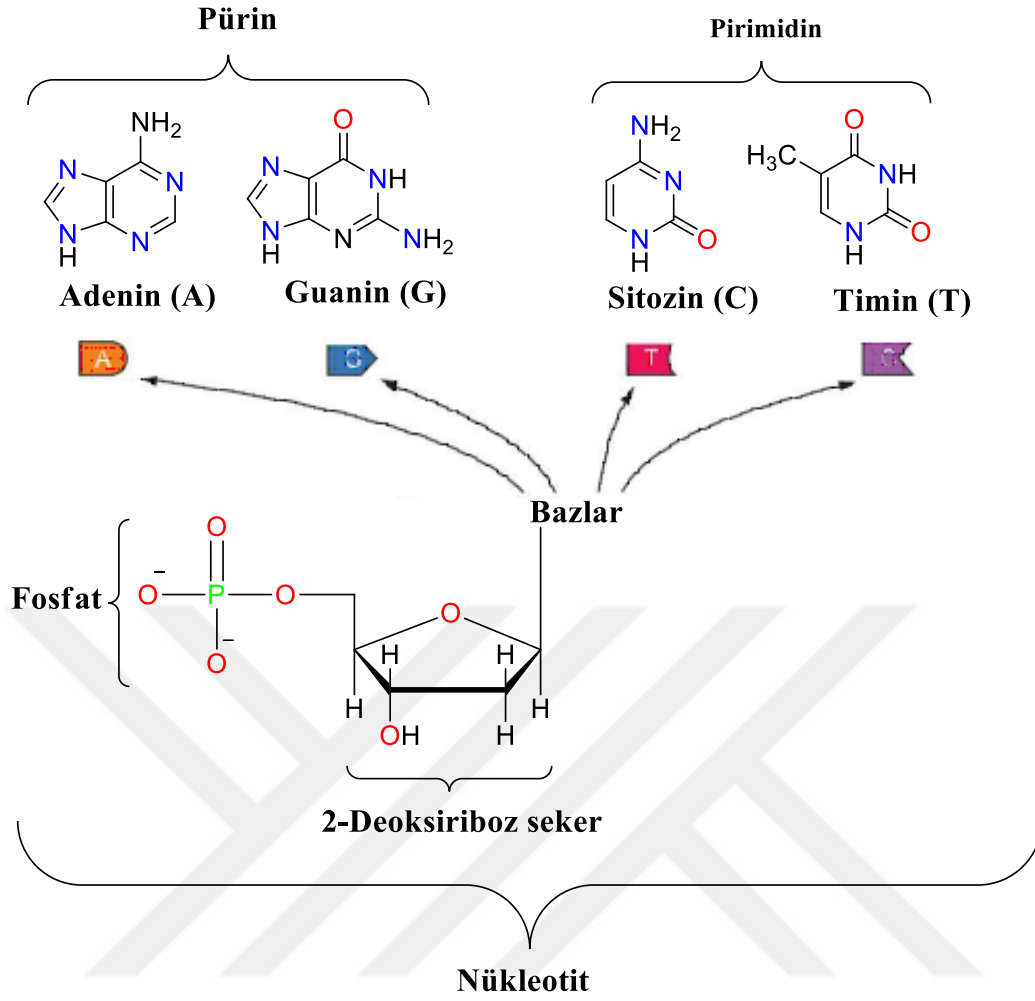
1.2 DNA VE YAPISI

İsveçli kimyager Friederich Meischer 1869 yılında bandajdan aldığı irinden beyaz kan hücrelerini izole etmeye çalışırken çözelti içinde proteinlerden farklı bir madde tespit etmiştir. Fakat bu yeni keşfedilen maddenin genetik materyal olduğunu bilememiştir [8]. Meischer'in çalışmasının ardından Avery ve arkadaşları DNA'nın kalıtsal bilgileri taşıyan bir molekül olduğunu iddia etmişlerdir. Ancak DNA'nın yapısını aydınlatamamışlardır [9]. Watson ve Crick DNA ile ilgili yapılan bu çalışmaları birleştirip yorumlayarak DNA'nın bugün bilinen üç boyutlu halini ortaya çıkarmışlardır (Şekil 1.1) [10].



Şekil 1.1 Watson- Crick DNA modeli.

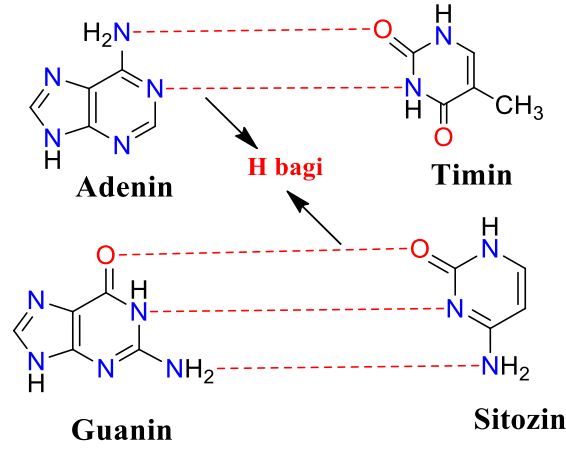
DNA; nükleotit adı verilen birimlerin fosfodiester bağlarıyla birleşmesiyle oluşan anti paralel iki polinükleotit zincirin birbirini tamamlayan anti paralel iki sarmal zincirden oluşmuştur. Nükleotitler; 2-Deoksiriboz şeker, bir fosfat grubu ve bir azotlu bazdan oluşur. Azotlu bazlar iki gruptur. İki halkalı Pürin bazları (Adenin (A) ve Guanin (G)) ve tek halkalı Pirimidin bazları (Timin (T) ve Sitozin (C)) (Şekil 1.2). DNA'ya özgünlüğünü veren değişen bu baz dizileridir.



Şekil 1.2 Nükleotit yapısı ve DNA bazları.

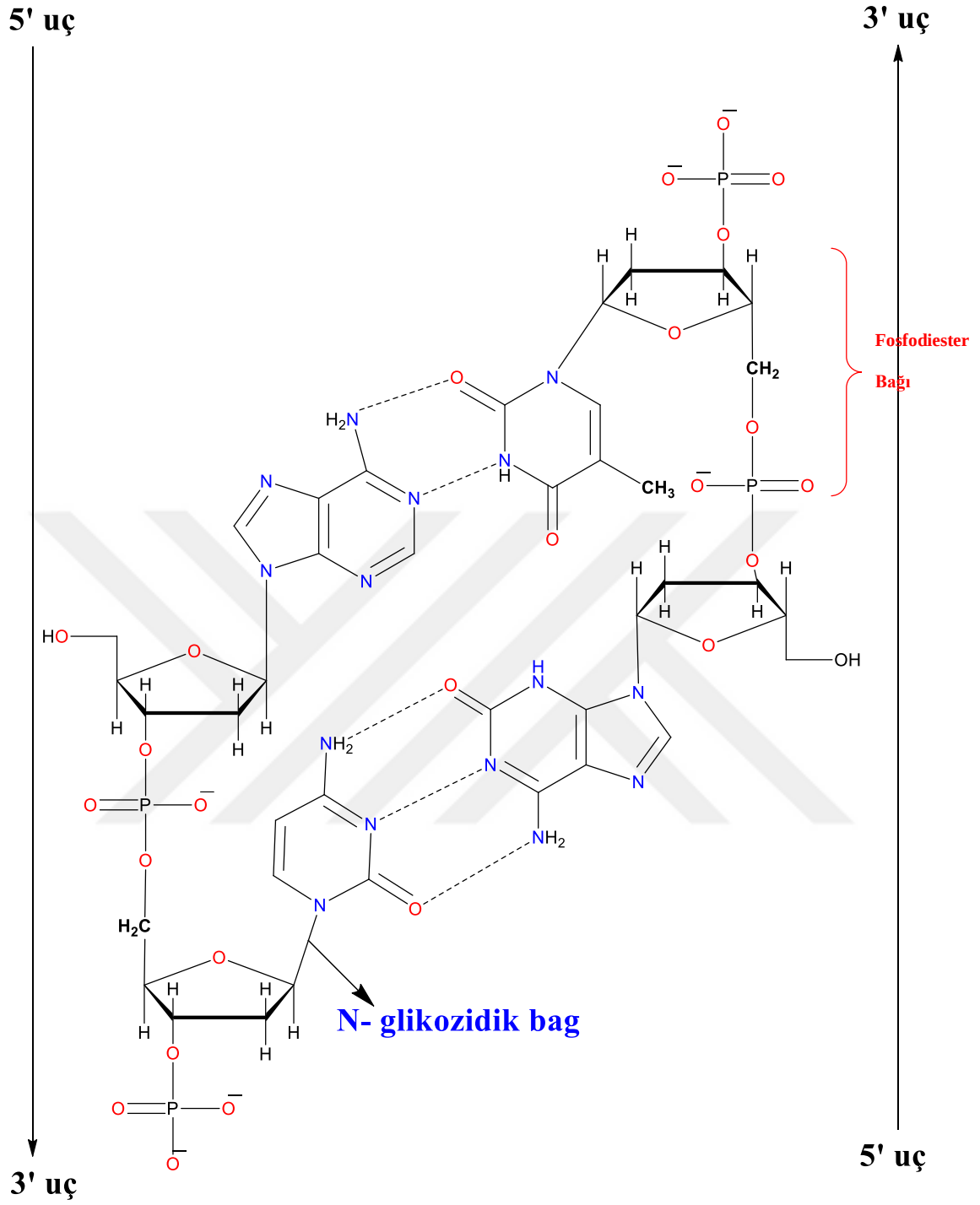
Nükleotit yapısının bazık olmasına rağmen omurgada bulunan fosforik asit grubu, nükleotit zincirlerinin asidik özellik göstermesine neden olur.

Her azotlu bazın birbirinden farklı kimyasal yapısı, bazlara hidrojen bağı oluşturma özgünlüğü sağlar. Zıt nükleotid zincirlerinde her zaman A ile T ve G ile S bağlandığından dolayı DNA üzerinde her zaman Adenin sayısı Timine, Guanin sayısı Sitozine eşittir [11]. Adenin ile Timin arasında iki hidrojen bağı, Guanin ile Sitozin ise arasında üçlü hidrojen bağı (Şekil 1.2) yaparak birbirini tamamlar [12].



Şekil 1.3 A-T ve G-C bazları arasındaki hidrojen bağları.

Deoksiriboz ile fosfat grupları ester bağlarıyla birbirlerine bağlanmıştır. Fosfodiester bağı şekerlerin 5' ve 3' C atomlarını bağladığı için yapı 5'→3' fosfodiester bağı (Şekil 1.4) veya kovalent ester bağı olarak adlandırılır. Bu bağlar son derece kuvvetlidir. Fosfodiester bağlarının varlığı DNA molekülünün tek zincirli yapı halindeyken bile dayanıklı ve kararlı yapıda olmasını sağlar. Baz ve şeker birbirine kuvvetli kovalent bağ ile bağlıdır. Bu bağ şekerde bulunan karbon atomu ve bazlarda bulunan azot atomu arasında olduğu için N-glikozidik bağ olarak adlandırılır (Şekil 1.4).

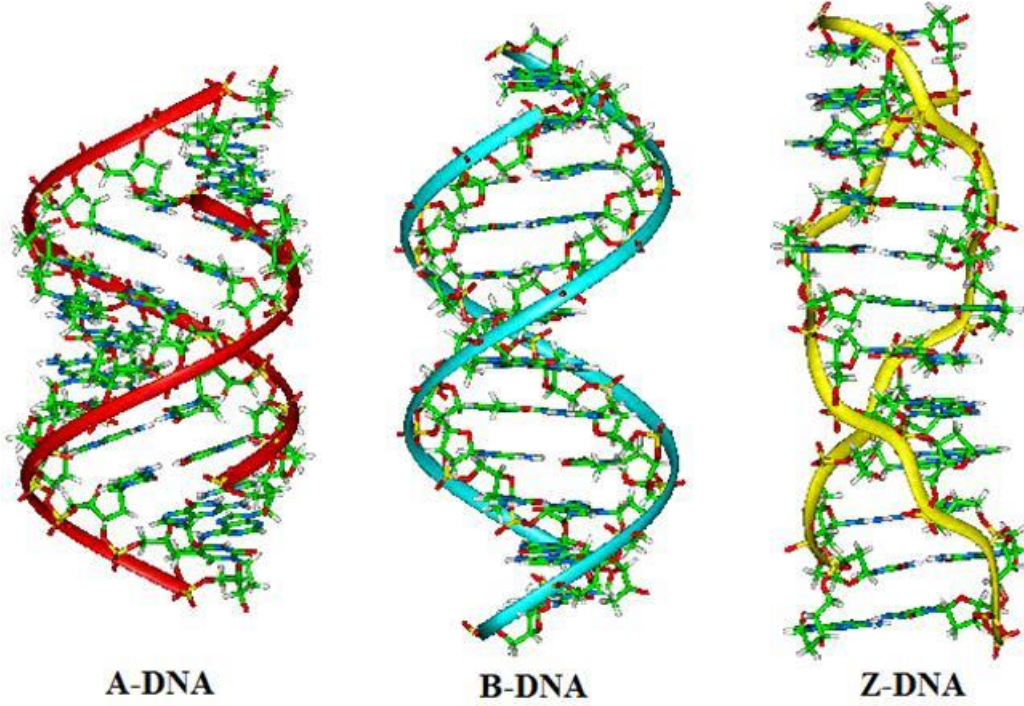


Şekil 1.4 DNA sarmalının 5'→3' yönde oluşumu.

Çift kollu heliks yapısında bazlar iç kısımda, şeker molekülleri ise dış kısımda yer alır. Bu nedenle heliksin iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir.

Baz çiftleri arasındaki glikozidik bağlar belli bir açı ile bir araya gelirler [13-14] Bu açı farklarından farklı DNA konformasyonları meydana gelir (Şekil 1.5). Bu formlardan insanlarda

görülenleri, A-DNA, B-DNA (sağ el heliks) ve Z-DNA'dır (sol el heliks) [16]. Tüm konformasyonlar iki antiparalel polinükleotid zincirin hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlanmasıyla oluşur.

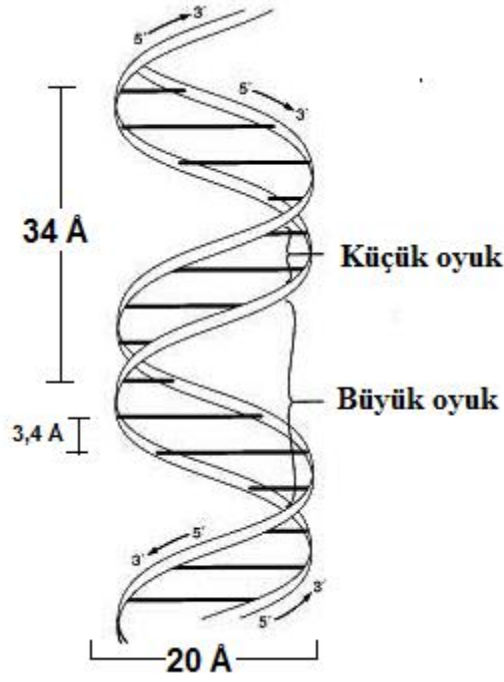


Şekil 1.5 DNA konformasyonları.

A-DNA, B-DNA'ya göre biraz daha düzensiz ve sıkışık bir formdur. Sarmalın bir tur dönüşü 11 nükleotid çifti içerir. B-DNA'dan su çıktığı zaman fosfat grupları arasındaki elektrostatik çekimden dolayı yapısal değişikliğe uğrayarak A-DNA adını alır. A-DNA sağa doğru yöneliktir. Çift sarmalın çapı, pentoz gruplarının konumlanmasıyla genişlediği için A-DNA'nın boyu daha kısadır [17].

B-DNA metilasyonla kimyasal değişime uğradığı zaman Z formu oluşur. Z-DNA'da 12 nükleotid çifti zikzak şeklinde konumlanmıştır. Diğer iki formdan farklı olarak sola doğru dönüşlüdür ve sadece minör oyuk bulunur [13].

Franklin ve Wilkins'in DNA konformasyonunu modellemeye çalışmışlarsa da B-DNA formunu ilk keşfeden Watson ve Crick olmuştur [10, 18]. Bugün bilinen DNA yapısını net bir biçimde açıklamışlardır. En baskın form B-DNA'dır. B-DNA sağa doğru dönüşlüdür. Heliksin her dönüşü 10 baz çiftine denk gelir ve bu dönme sonucu DNA üzerinde majör ve minör oyuk oluşur [19, 20].



Şekil 1.6 DNA sarmalının bir parçası.

B-DNA’da sarmalın çapı 20 Å, aynı polinükleotid zinciri üzerindeki bazlar arasındaki mesafe 3,4 Å dur. B-DNA 10 nükleotid çiftinde bir kendini tekrarladığı için boyu 34 Å dur (Şekil 1.6).

Moleküler seviyede her oyuğun çevresi farklılık gösterir [21]. Majör oyuk 11,6 Å genişliğe ve 8,5 Å derinliğe sahiptir [16]. Büyük olduğu için birden fazla etkileşim alanı gösterir. Genelde büyük moleküller (proteinler) ve ilaçlarla kuvvetli bağ oluşturur. Minör oyuklar ise 8,2 Å kadar bir derinliğe sahip olduğu için majör oyuğa nazaran daha az bağlantı alanı sağlarlar ve küçük moleküllere bağlanırlar [22-24]. DNA sarmalının majör ve minör oyukları ile etkileşen moleküller genellikle bu oyukları tamamlayacak şekilde hilal formundadır ve DNA’ya Van der Waals bağları ile bağlanırlar [25]. DNA birçok antibiyotik ve antikanser ilaçlar da küçük moleküller olduğundan minör oyuklar bunların ana bağlanma kısımlarıdır [16, 26].

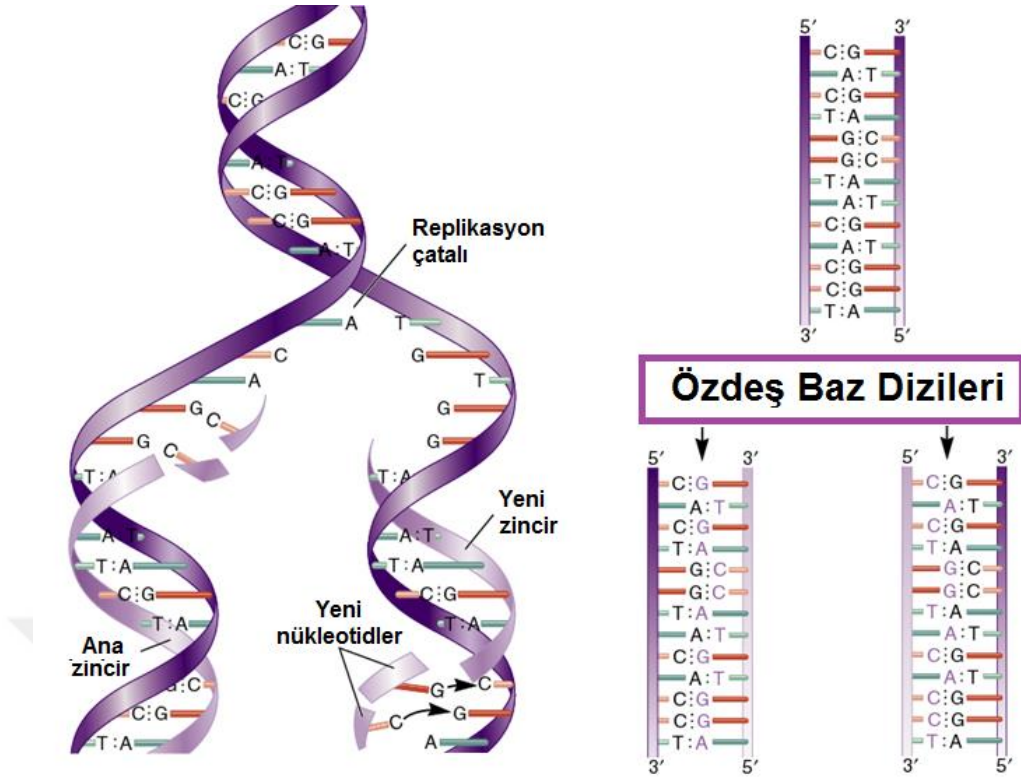
Zıt nükleotid zincirindeki bazlar arasındaki hidrojen bağları ve aynı nükleotit zincirinde bulunan bazlar arasındaki π - π etkileşimi DNA’nın sıkı istiflenmesine ve heliks yapısının oluşmasını sağlar. Çift sarmallı DNA’da bulunan bazlar arasındaki H-bağları zayıf bağlar oldukları için DNA ısıtıldığında nükleotidler arasındaki kovalent bağlar kopmadan bu bağlar kolayca açılır ve çift sarmal heliks yapısı bozulur. Buna denatürasyon denir [27]. Bozulmuş DNA uygun şartlar altında tekrar eski haline gelebilir. Buna renatürasyon denir [28] (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu.

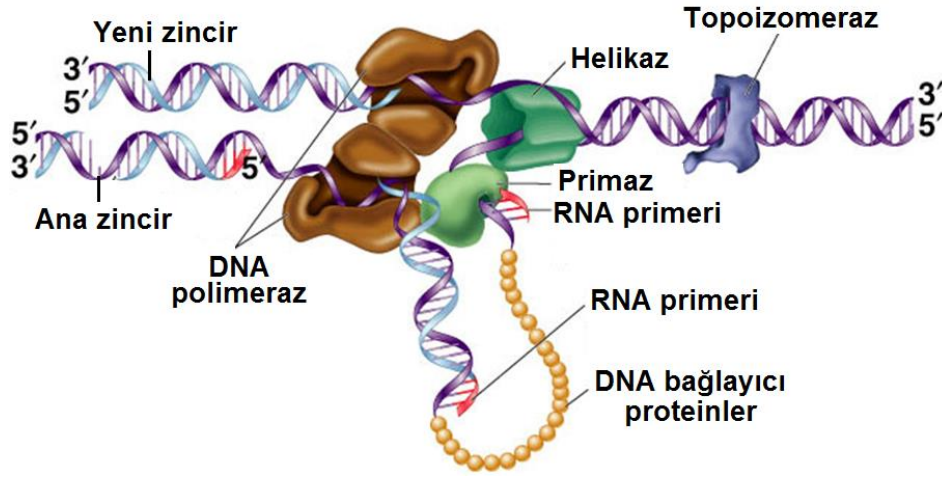
Ayrıca, çift sarmallı DNA molekülünde yapıyı bir arada tutan hidrojen bağları pH 4,0 ile 11,0 arasında kararlı bir yapı gösterdiği için, bu pH limitleri dışında DNA kararsız hale gelmekte ve çift sarmal açılmaktadır [25]. Çift sarmallı DNA molekülünü oluşturan zincirlerin birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilir ve yeniden bir araya gelebilir yapıda olması, protein sentezi ve DNA replikasyonuna olanak tanır [29].

DNA'nın replikasyonu (Şekil 1.8), DNA molekülünün, sakladığı genetik bilgilerin sonraki nesillere aktarılması için kendi kopyasını oluşturmasıdır. Bir DNA molekülünün iki kolundan her biri yeni bir DNA kolu sentezi için bir kalıp olarak görev görür ve sonuçta meydana gelen iki yeni DNA molekülü yeni ve eski kollar içerirler. DNA'nın ikili sarmalı birbirinden ayrıldığı zaman, kural olarak sitoplazmada bulunan adenin grubu timin grubuyla, guanin grubuyla sitozin grubuyla birleşerek yerlerini alırlar, diğerleri uymadıkları için geri çevrilirler. Yine aynı şekilde, eski zincirdeki adeninler timinlerle, sitozinler guanin gruplarıyla ikili sırayı tamamlamak için birleşirler. Bütün nükleotidler eşlendiğinde ise, yeni zincir oluşturulmuş, DNA kendini eşlemiştir. Kopyalanan yeni DNA iplikleri tamamen aynıdır [30].



Şekil 1.8 DNA'nın replikasyonu.

Replikasyonun başlaması için bazı enzimlere ihtiyaç vardır. Önce helikaz, çift sarmal DNA zincirlerini birbirinden ayırır. Ayrılan DNA zincirlerinin tekrar birleşmesini engelleyen tek zincire (SSB) DNA bağlayıcı proteinler bağlanır. Böylece tek zincir kopyalanmaya hazırlanır. Zincirler açılırken oluşan süper sarmallar DNA Topoizomeraz enzimi ile çentiklenir ve yeniden kapatılır. Daha sonra primaz enzimi: kalıp DNA'da özel bir bölgeye komplementer olan primer RNA denen kısa bir RNA dizisini sentezler. DNA polimeraz etkisiyle yeni oluşan zincirler uzamaya başlar. Zincir uzaması 5'→3' yönünde devam eder. Sentez tamamlandıktan sonra DNA polimeraz I'in 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi vasıtasıyla RNA primeri çıkarılır; DNA ligaz, kalan çentikleri kapatır. Yeni bir DNA şeridinin sentezi tamamlandıktan sonra DNA giraz, replike olmuş DNA'nın tekrar doğal haline kıvrılmasına yardımcı olur (Şekil 1.9).

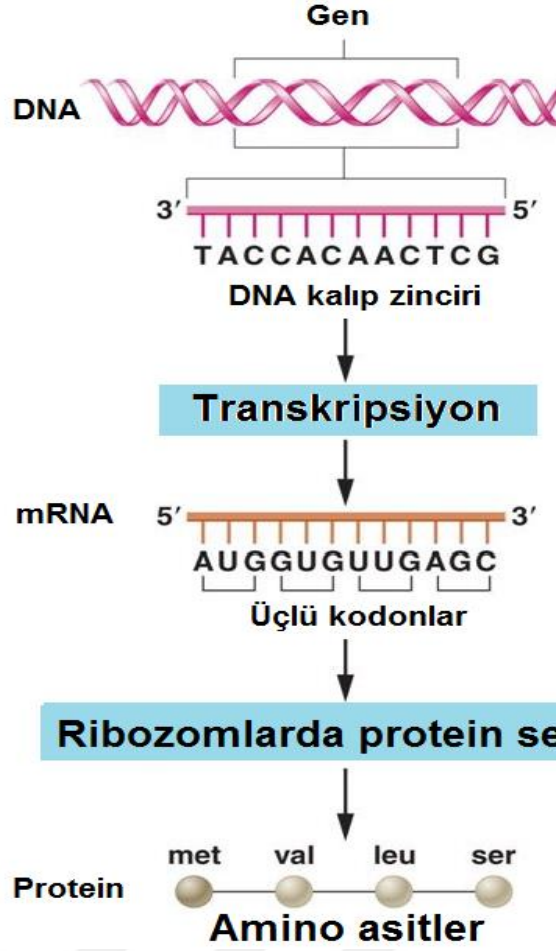


Şekil 1.9 Replikasyon mekanizması.

Vücutta bir proteine gereksinim olduğunda o proteini kodlayan gen aktif hale geçerek üzerindeki şifre, m-RNA adı verilen bir yapı şeklinde kopyalanır. Bu kopyalanmaya transkripsiyon adı verilir. Kopyalanan bu yapı hücre sitoplazmasındaki ilgili birimlere gelerek kalıp vazifesi görür ve kalıp üzerinden yapımı istenen protein üretilir. Protein üretimine ise translasyon adı verilir. Transkripsiyon ve translasyon olaylarının toplamı, gen ifadesi (gen ekspresyonu) olarak tanımlanır (Şekil 1.10). Her gen kendine özgü ve diğerlerinden farklı bir nükleotid dizilimi (şifre) içerir ve farklı bir proteini kodlar.

Normal hücrelerin tümör hücresine dönüşmesinde mekanizmayı anlamaya odaklanmış araştırmalar, farklı tip mutasyonların ve DNA'nın hücre çekirdeği içerisinde yeniden düzenlenmesinin, gen ekspresyonunu ve diğer biyokimyasal süreci etkileyebileceğini göstermiştir [31, 32].

DNA'yı hedef alan ilaçlar DNA'ya bağlanarak onun kararlılığını artırır ve replikasyon ve transkripsiyonda görev alan bazı enzimlerin DNA'ya bağlanmasını engeller. Bu sayede replikasyon engellenir ve hücre bölünmesi önlenir [33-35].



Şekil 1.10 Gen ekspresyonu (Santral dogma).

1.3 DNA NEDEN İLAÇ HEDEFİDİR

Canlı organizmaların yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirebilmesi ve kalıtsal bilgileri nesilden nesile aktarabilmelerini sağlayan deoksiribonükleik asit (DNA), başta antikanser ve antiviral ilaçlar olmak üzere şu anda klinik kullanımda olan veya ileri klinik çalışmalarda bulunan birçok ilacın farmakolojik hedefidir [21, 36-39]. İlaçların DNA'ya bağlanması, transkripsiyonunu, replikasyonunu ve hücrelerdeki genetik bilginin ekspresyonunu etkiler. Böylece DNA fizyolojik fonksiyonunu yerine getiremez. Bu da hücrenin ölümüyle sonuçlanır. Hücre ölümü hastalıklı özellikle kanserli hücrelerin çoğalmaması ve yok olması için istenen bir şeydir ve bu DNA'ya bağlanan küçük moleküller ile mümkündür. Küçük moleküller ve DNA arasındaki etkileşim, rasyonel ilaç tasarımı için yapısal bir kılavuz sağlar. Farmakolojik ajanların DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi, onların etki mekanizmalarını ve bağlanma reaksiyonlarının yapısal özgünlüğünü anlamak için de gereklidir [40].

Sonuç olarak, etkili bilgiyi elde etmek ve hastalık mekanizmasını açıklamak için ilaç-DNA'yı çevreleyen sıcak bir araştırma konusu gerçekleştirilmiştir. Farklı bağlanma çalışmaları, klinik kullanım için daha düşük toksik ilaçların tasarlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [37]. Etkileşimler sırasında reaksiyon modları ve bağlanma özellikleri, ilaçların işlevsel mekanizmasını anlamada yardımcı olabilir ve DNA'ya hedeflenen yeni ilaçların geliştirilmesi için teorik bir temel sağlayabilir [6, 7].

1.4 KANSER NEDİR VE NASIL OLUŞUR

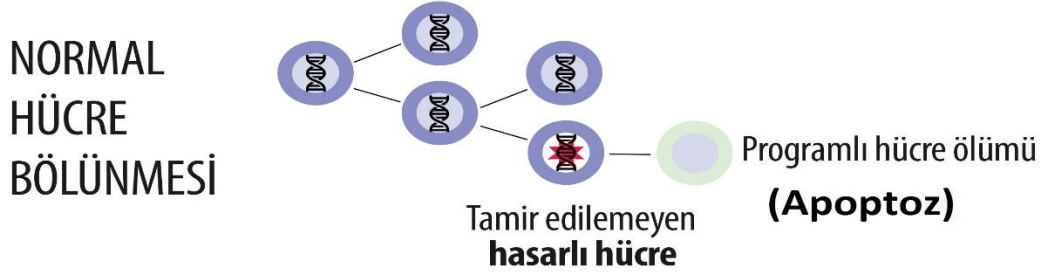
Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen, sonucu bazı türler için maalesef ölümle biten ve bu nedenle de tedavisi için en çok araştırma yapılan ve çok çeşitli yöntemler denenilen bir hastalıktır [41].

Normal olarak hücrelerin çoğalması hücre döngüsünün bir düzen içerisinde gerçekleşmesiyle olur.



Şekil 1.11 Hücre döngüsü.

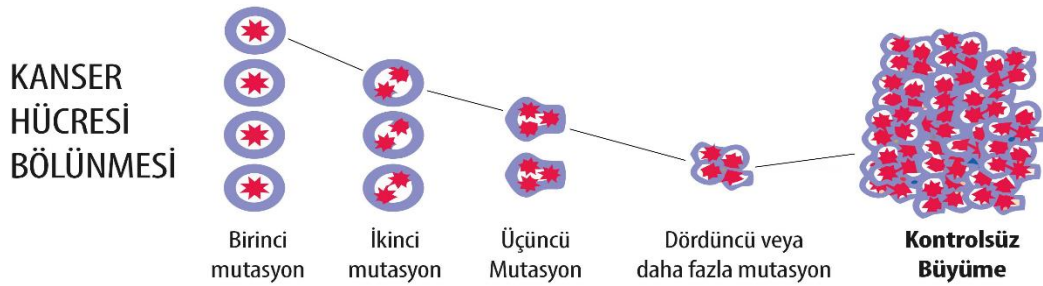
Hücre döngüsünün düzenli bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kontrol noktaları vardır (Şekil 1.11). Bu noktalarda meydana gelen mutasyonlar hücrenin kanserleşmesine neden olan etmenlerden biridir [42]. Bir diğer kanserleşme nedeni ise normal hücrelerin sınırlı bölünmesiyle ilgilidir. Normal hücreler kromozomların ucunda bulunan telomerler nedeniyle belirlenmiş sayıda bölünmektedir. Telomerler, bölünmeyle uzaklaşan DNA tekrarlarından oluşur. Tekrarlar bittiğinde hücre bölünme özelliğini yitirmiş yaşlı hücre halini alır. Kanserli hücrede telomeraz enzimi kromozoma yeni tekrarlar ekleyerek bölünme özelliğinin ortadan kalkmamasını sağlar ve hücre programlandığından çok daha uzun bir süre boyunca bölünür [43, 44].



Şekil 1.12 Programlı hücre ölümü (Apoptoz).

Hücre mutasyona uğrayarak bölünmeye devam ettiği takdirde, hücresel replikasyon işlemi durur, bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse kontrollü bir biçimde hücre ölümü gerçekleşir. Bu olaya apoptoz adı verilmektedir (Şekil 1.12) [45].

Apoptoz işlemi aktive edildikten bir saat sonrasında DNA’da tek iplikte bir çentik ile başlayan karakteristik ve geri dönüşsüz bir parçalanma görülür. Bu çözülmenin apoptozda anahtar bir rolü olduğu düşünülmektedir [46].



Şekil 1.13 Mutasyon geçiren hücrenin kanserleşmesi

Apoptozun gerçekleşemediği durumlarda ise hücre kontrolsüz bir biçimde büyümeye devam eder ve kanser hücresine dönüşür (Şekil 1.13) [47].

Günümüzde, bulundukları organa ve köken aldıkları hücre türüne göre farklı isimler alan 100’den fazla sayıda kanser çeşidi tanımlanmış ve tahmini kanser çeşidinin 200’den fazla olabileceği ileri sürülmüştür [48]. Oldukça karmaşık bir hastalık olan kanser, popülasyonlardan, bireylere, moleküler düzeyden genetik materyaldeki değişikliklere kadar birçok seviyede farklılıklar göstermektedir [49].

1.4.1 Kanser Hücresi ve Normal Hücre Arasındaki Farklar

Sağlıklı hücelere kıyasla kanser hücrelerinde çeşitli yapısal ve biyokimyasal değişiklikler vardır. Kanser hücrelerinde, DNA ve RNA oluşum hızı yüksektir. Hem aerobik hem anaerobik solunum olduğundan glikoliz hızı yüksektir. Hücre yüzeyindeki glikoprotein ve glikosfingolipid bileşim oranı sağlıklı hücreye göre daha yüksektir. Bunun bir sonucu olarak artan Sialik asid konsantrasyonuna bağlı, membranın (-) yükü artar. Ribonükleotid redüktaz aktivitesi yüksek ve pirimidin yıkımı azdır [50, 51].

1.4.2 Kanser Tedavisi

Kanserin tanısı, kanser tedavisinin ilk adımıdır. Tedavi kanser çeşidine göre yöntemlerden biri ya da bir kaçının birlikte kullanılmasıyla devam eder [52] Tedavi yöntemleri olarak; cerrahi girişim, radyoterapi ve kemoterapi sıralanabilir. Cerrahi girişim: Kanserli hücrelerin başka dokulara yayılmadığı, ilk evre kanser hücrelerinin tamamen dokudan çıkarılabileceği durumlarda uygulanan tedavi yöntemidir. Cerrahi yöntemle birlikte diğer kemoterapi yöntemlerinde birlikte kullanılması tümörden kurtulmada daha iyi sonuçlar vermektedir.

Radyoterapi: Radyoterapi tek başına uygulandığında bile bazı tümör hücrelerinde hastalığı iyileştirici özelliğe sahiptir. Fakat çoğu zaman diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılır. Sadece hedef hücreye erişim açısından önemli bir tedavi yöntemidir.

Kemoterapi ise oluşan tümör hücrelerine karşı yok edici etkisi olan doğal ya da sentetik kimyasallar kullanılarak yapılan iyileştirici bir yöntemdir. 1960'lı yıllara kadar kemoterapi hastanın yaşam kalitesini yükseltmek amacıyla kullanılmıştır. Ancak gelişen teknolojiyle beraber tedavi yöntemlerinin bir arada kullanılması birçok kanser türünde iyileşme oranını artırmıştır. Kanser kemoterapisinde amaç; tümörün büyümesini, yayılmasını ve farklı yerlerde nüksetmesini engelleyecek sitotoksik etkiyi sağlamaktır [53].

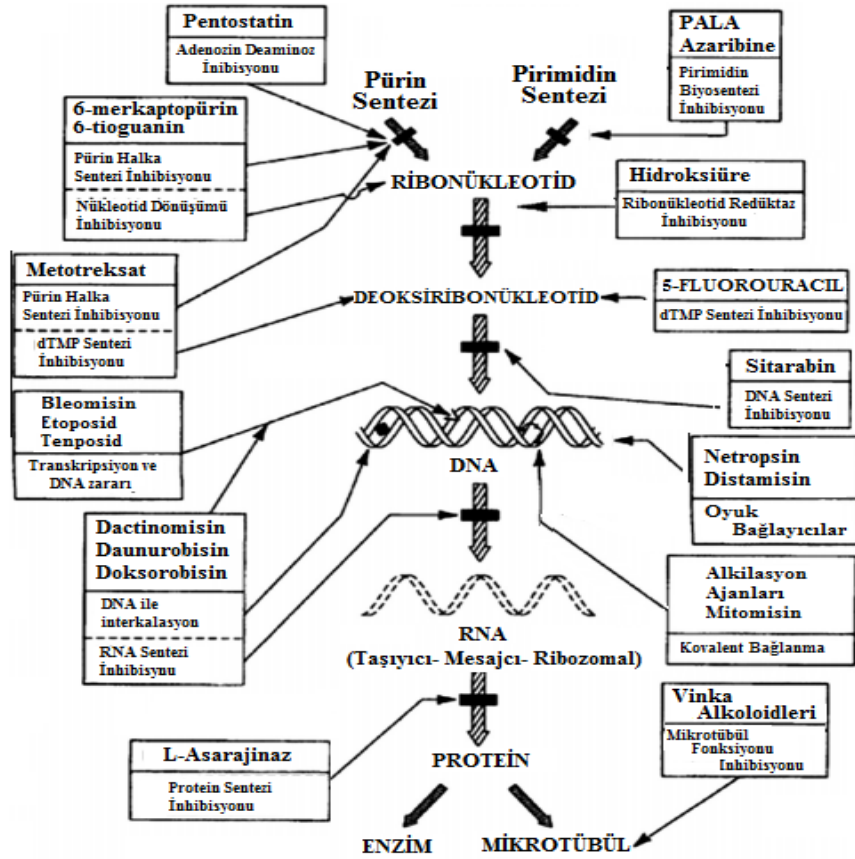
Genel olarak bütün bu ilaçların sadece malign hücreleri etkilemesi amaçlanır. Ancak pratikte ilaçlar kanser hücrelerine seçici etki göstermemekte ve proliferen olan tüm normal ve anormal hücreleri ise etkilemektedir [54].

1.5 DNA-İLAÇ ETKİLEŞİM YOLLARI

Kemoterapötikler; farklı mekanizmalarla tümör hücreleri üzerine etki gösterirler (Şekil 1.14).

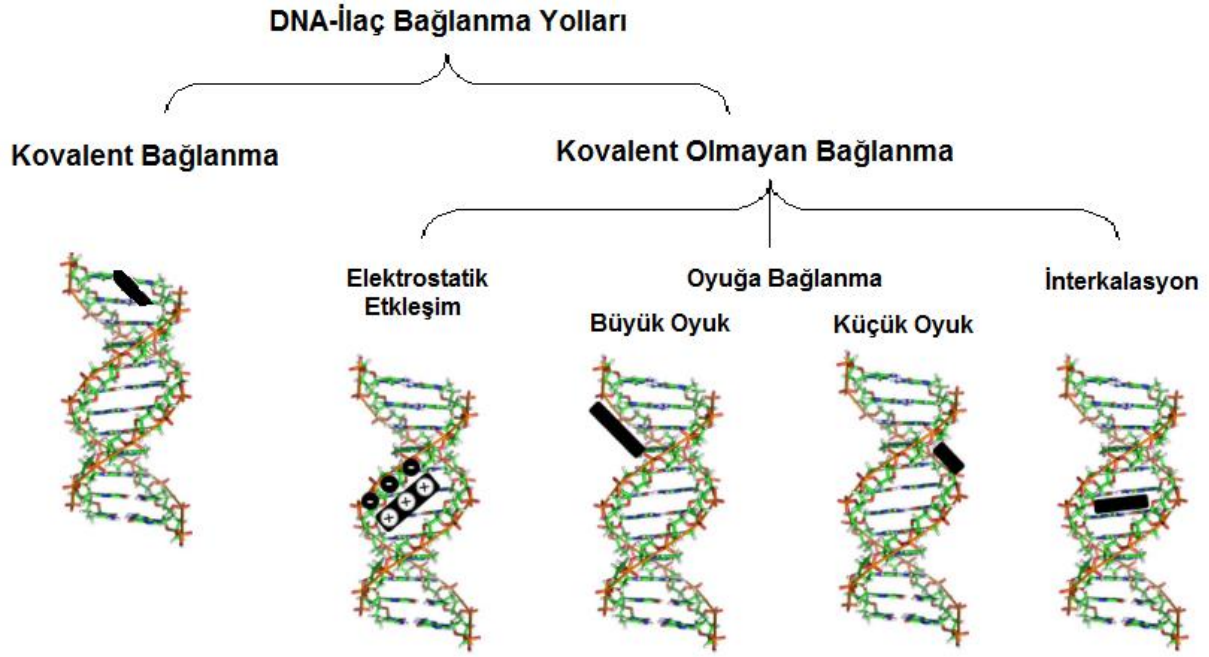
Bu ilaçların bazıları;

- 1) DNA'ya bağlanan proteinlerle etkileşime girerek, transkripsiyon faktörlerini ve polimerazları kontrol edilmesi ile
- 2) Transkripsiyon aktivitelerine müdahale eden DNA-RNA hibritlerinin oluşumu yoluyla,
- 3) Küçük moleküllerin DNA çift sarmalına bağlanması ile [55],
- 4) Mikrotübüllerin polimerize ve depolimerize şekilleri arasındaki dengeyi bozarak etki gösteren ilaçlardır [54, 56].



Şekil 1.14 Küçük moleküllerin replikasyona ve translayona müdahale ettiği bölgeler.

Küçük moleküllerin DNA ile etkileşimleri, kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimler olarak iki ana sınıfta karakterize edilir. Kovalent olmayan bağlanma ile ilaç molekülleri DNA'nın fosfat-şeker omurgası ile elektrostatik olarak etkileşerek, DNA baz çiftleri arasına interkalasyon yaparak veya DNA üzerinde bulunan majör ve minör oyuklara bağlanarak DNA'ya etki edebilirler (Şekil 1.15) [57].

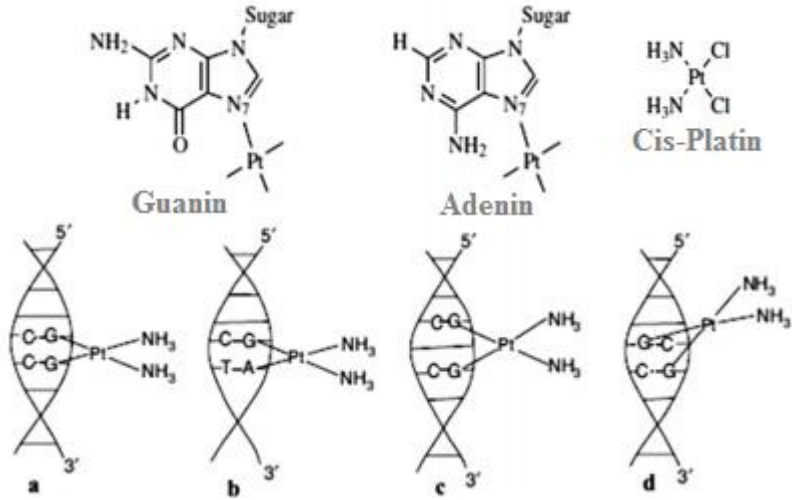


Şekil 1.15 DNA-ilaç etkileşim yolları.

1.5.1 Kovalent Bağlanma

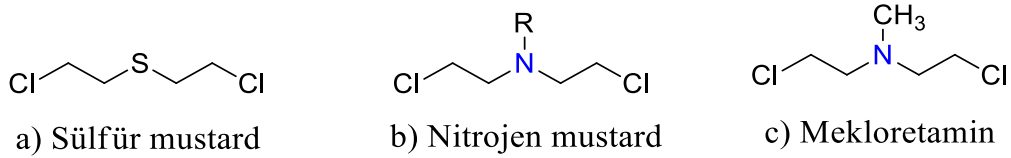
İlaç-DNA'nın kovalent bağlanma şekli geri dönüşümsüzdür ve değişmez bir şekilde DNA işlemlerinin ve ardından hücre ölümünün gerçekleşmesine neden olur (eğer reaksiyon doğrudan kimyasal olarak tersine çevrilemezse). DNA'nın her bir yerinde meydana gelebilir, şekerleri, bazları ve fosfat gruplarını güçlü bir şekilde bağlarlar [58]. Kovalent bağlayıcıların önemli bir avantajı, yüksek bağlanma dayanımıdır. Dahası, kovalent bağlanan moleküller DNA omurgasında distorsiyona neden olabilir, bu da protein kompleksi alımını bozarak, hem transkripsiyonu hem de replikasyonu etkileyebilir [59].

En bilinen kovalent bağlı kanser ilacı cis-platindir (sis-diamindikloroplatin). DNA bazındaki nitrojen ile klor grupları arasında çapraz bağlanma yaparak DNA biyosentezini engeller (Şekil 1.15) [60].



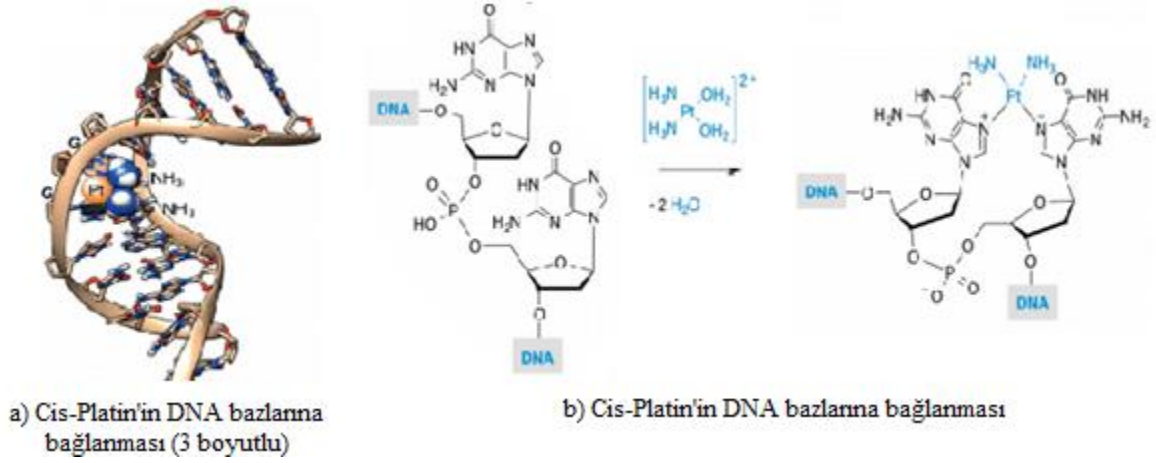
Şekil 1.16 Cis-Platin'in kovalent olarak bağlanması.

Birinci Dünya Savaşı'nda Almanlar tarafından kimyasal silah olarak kullanılan “kükürtlü hardal (sulphur mustard, dikloroetilsülfür, Yperite) maddesinin insanlarda lenfoid doku ve kemik iliğine toksik olduğunun saptanması, daha sonraki yıllarda azotlu hardal bileşiklerinin hem kimyasal silah olarak kullanılması hem de hayvan tümör modellerinde denenmesine yol açmıştır (Şekil 1.16) [61].



Şekil 1.17 Tümör hücrelerine etki eden mustard türevleri.

Mustardların etki mekanizması elektrofilik azidinyum iyonunun klorid tarafından değiştirilmesiyle başlar. Azidinyum iyonu kolaylıkla nükleofilik DNA bazları tarafından saldırıya uğrayabilir ve ikinci kez çapraz bağlanma oluşturabilir [13].



Şekil 1.18 Bazlar ile kovalent bağlanma.

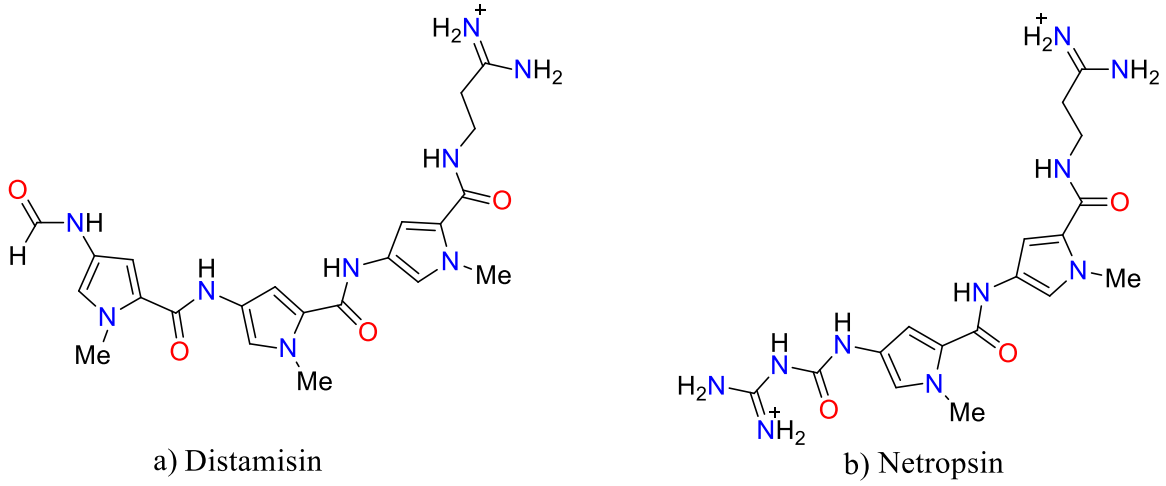
1.5.2 Kovalent Olmayan Bağlanma

1.5.2.1 Oyuğa Bağlanma

DNA zinciri boyunca majör ve minör olmak üzere iki derin yarık bulunur. Bu etkileşim yolu DNA üzerindeki belirgin boşlukları doldurarak enzimlerin bu bölgelere bağlanmasını engellemesi esasına dayanmaktadır. Protein gibi büyük moleküller genelde majör yarıktan etkileşmesine rağmen, ilaç molekülleri gibi küçük moleküller minör yarıktan bağlanmayı tercih eder.

Oyuk bağlayıcılar, DNA'ya bağlanmak için genelde A-T dizilerinin zengin olduğu bölgeleri tercih ederler. Bunu nedeni Timinin C2 karbonil oksijeni veya Adenin N3 nitrojeni ile oyuk bağlayıcıların yaptığı hidrojen bağıdır. Bu yapılar G-C dizilerinde de mevcuttur fakat Guaninin amino grubu, Guaninin N3'ü ve Sitozinin C2 karbonil oksijeni ile oyuk bağlayıcıların hidrojen bağı yapmasını sterik olarak engeller. Ayrıca, A-T bölgelerinin G-C bölgesine göre daha büyük negatif elektrostatik potansiyele sahip olması nedeni ile de, A-T bölgelerinin katyonik moleküller için daha fazla seçiciliği vardır.

Bununla birlikte, GC ve CG bölgeleri için özgünlüğe sahip olan, lexitropsinler ve imidazol-pirol poliamidler gibi sentetik poliamidler de tasarlanmıştır [55].

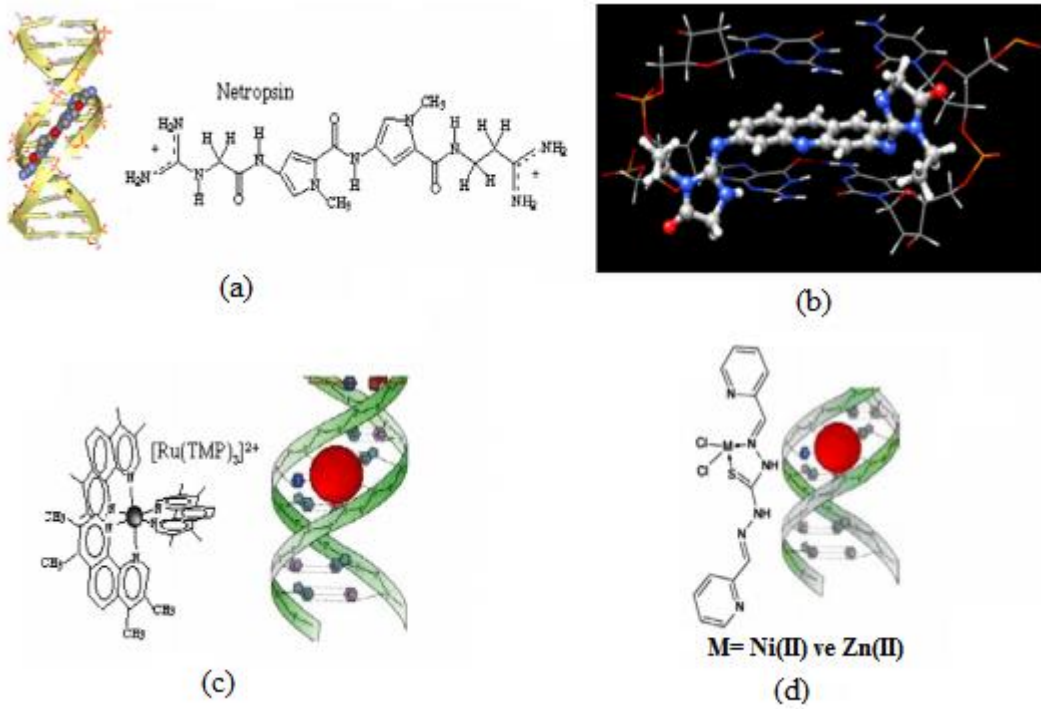


Şekil 1.19 Distamisin ve Netropsin bileşiklerinin yapısı.

Distamisin ve netropsin (Şekil 1.19), DNA’da hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları kurarak A-T dizilerinin zengin olduğu bölgelerle etkileşim yapar. Molekölün terminal amido grubu ilaç molekülünü DNA’nın fosfodiester omurgasına çekmek için görev yapar. Netropsin pirol halkaları adeninlerin C2 pozisyonlarına karşı paketlenir, bu da guanin amino grubuna yer bırakmaz, böylece netropsin A-T dizileri için yapısal olarak seçicilik sağlamış olur. Netropsin bağlanması, çift sarmalın ne gevşemesini ne de uzatmasını sağlar, fakat AATT bölgesindeki minör oyukun (0,5–2,0 Å) genişlemesine ve heliks ekseninin (8°) bükülmesine neden olur.

Minör oyuk üzerinden yapılan bağlanmalarda yapı, DNA fosfat gruplarıyla yapılan elektrostatik etkileşimler, bazlar üzerinde bulunan elektronegatif atomlar sayesinde yapılan hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleri sayesinde daha kararlı hale gelmektedir.

Boşluk bağlama yoluyla yapılan etkileşimin özellikleri bu tür etkileşimlerin DNA üzerinde interkalasyon yapan moleküller kadar bozulma yaratmadığı görülmektedir.



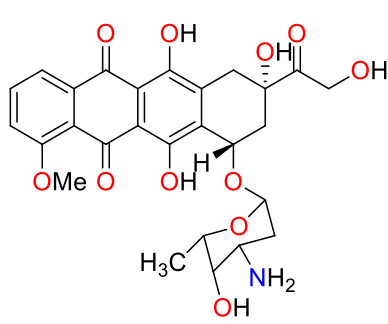
Şekil 1.20 Oyuğa bağlanan a) Netropsin, b) Netropsin bileşiğinin 3 boyutlu görüntüsü. c) Rutenyum, d) Nikel ve Kobalt kompleksleri.

1.5.2.2 İnterkalasyon

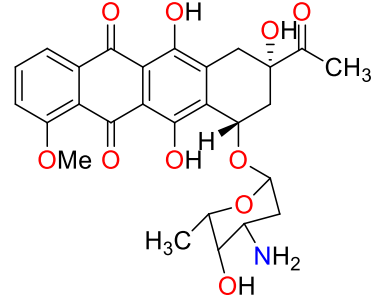
Düzlemsel organik bileşiklerin DNA'ya interkalasyonu ilk olarak Lerman tarafından, DNA için akridinler gibi belirli heterosiklik aromatik boyaların güçlü afinitesini açıklamak için önerilmiştir [62]. İnterkalatörler, kovalent bağ oluşturmada, bazlar arasındaki hidrojen bağlarını parçalamadan; Van der Waals, hidrojen bağı, hidrofobik veya elektrostatik kuvvetler ya da bunların bir kaçı ile DNA omurgasına dik olarak bağlanan moleküllerdir [63-65]. DNA-İnterkalatör kompleksi, π - π örtüşmesi ile daha kararlı hale geldiği için oyuk bağlayıcı ve elektrostatik etkileşimlere göre iyonik etkilere karşı daha az duyarlıdır. İnterkalasyon yapan bileşikler, DNA çift sarmalını uzatır, güçlendirir, gevşetir ve daha kararlı hale getirir [66]. İnterkalasyon, her ilaç molekülü bağlanmasında DNA yapısını yaklaşık 3 Å kadar uzatır, topoizomerazın eylemi ile replikasyon durur ve transkripsiyon gerçekleşmez. DNA ve topoizomeraz arasında oluşan güçlü kompleks çoğalan hücreleri öldürür. Bu yüzden interkalatörler daha toksiktir [67].

Klinikte kullanılan tüm antibiyotik kökeni kemoterapötik ilaçlar *Streptomyces* mantarlarının çeşitli türlerini içerirler [68] Doksorubisin, Daunorubisin ve Epiribusin bunlardan birkaçıdır

(Şekil 1.21 ve 1.22). Çoğu interkalasyonla DNA'yı bloke eder. DNA baz çiftleri arasına girerek DNA replikasyonunu ve mRNA üretimini durdurur [69].



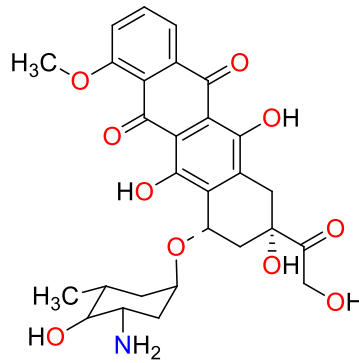
a) Doksorubisin (adriamycin)



b) daunorubisin (daunomycin)

Şekil 1.21 İnterkalasyon yapan bileşikler

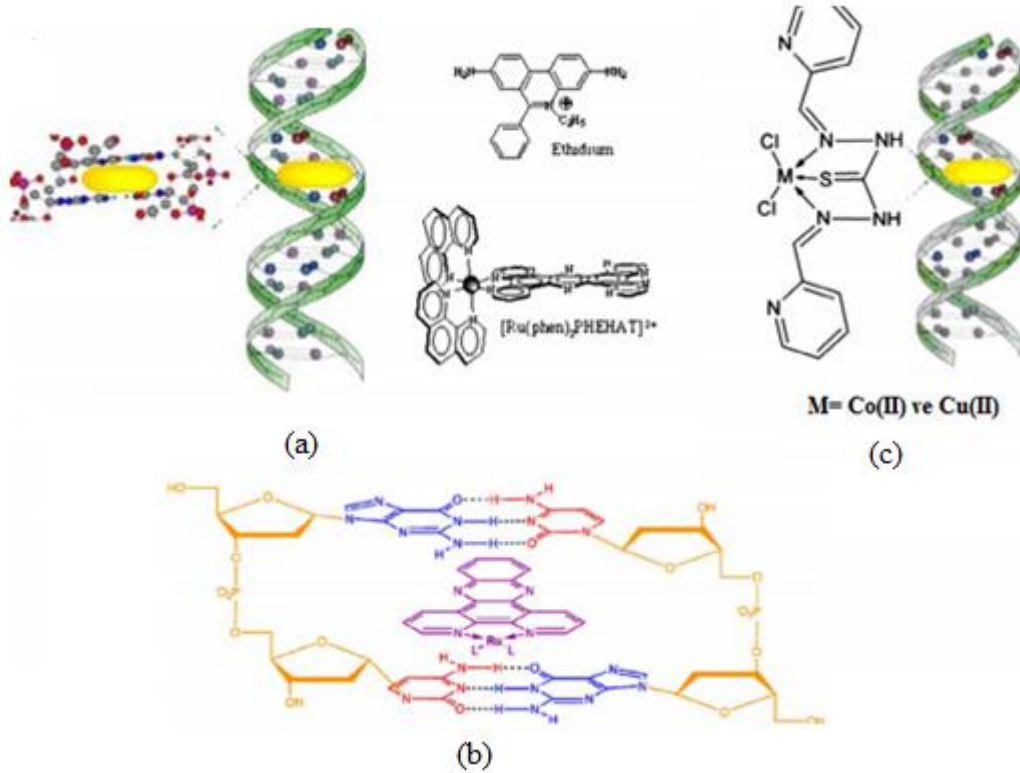
Doksorubisin ve daunorubisin bir hidroksil grubu ile farklılaşır. Her iki bileşikte protonlandığı zaman negatif yüklü fosfodiester omurgası ile iyonik etkileşim oluşturan amino grubuna sahiptir. Bu bağ aromatik halka sistemi DNA heliks içine kaydığında molekülü orada tutmaya yardımcı olur. Doksorubisin'in etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. DNA çift sarmalına interkalasyon yaptığı ve topoizomerez II aktivitesini inhibe ederek antitümör etkisi gösterdiği ya da serbest radikal oluşturarak DNA hasarı oluşturduğu düşünülmektedir [70, 71]. Daunorubisin ise minör oyuktan girerek interkalasyon yolu ile DNA biyosentezini inhibe eder [72]. İlaç DNA'ya, bu bağlanma ile topoizomerez II enzimini etkileyerek DNA'nın transkripsiyonunu engeller, böylelikle tümörlü hücrelerin çoğalması engellenmiş olur [73].



Şekil 1.22 Epirubisin bileşiğinin yapısı.

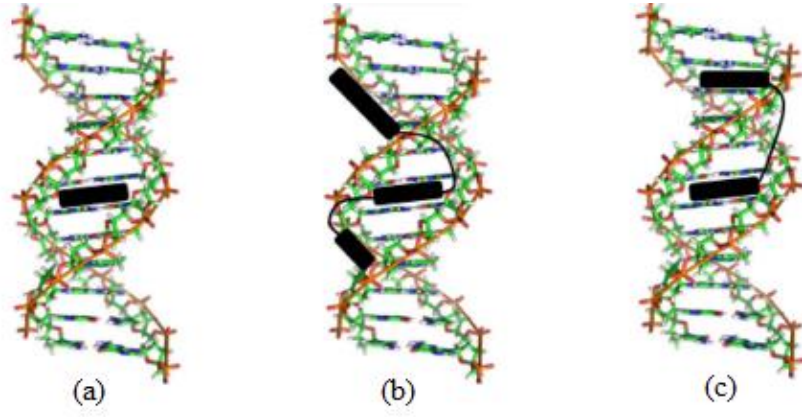
Epirubisin (4-epiadriamisin), *Streptomyces peacetius*'tan elde edilen antrasiklin türevi bir antibiyotik olan doksorubisinin (adriamisin) 4-hidroksi epimeridir. Diğer Antrasiklinler gibi

sürekli büyümeye devam eden kanser hücrelerinin topoizomeraz aktivitelerinin ortadan kaldırarak büyümelerini engellerler [74]. Bunun yanında DNA interkalasyonu yapar ve hücre membranını deforme ederler. Epirubisin aynı zamanda serbest radikaller üretir bu da hücre ve DNA hasarına neden olur. Epirubisin, 4.karbonundaki hidroksil grubunun farklı bir konformasyona sahip olması, vücuttan daha hızlı atılmasına ve daha az toksisite göstermesini sağlar. Bu yüzden en çok tercih edilen antrasiklindir.

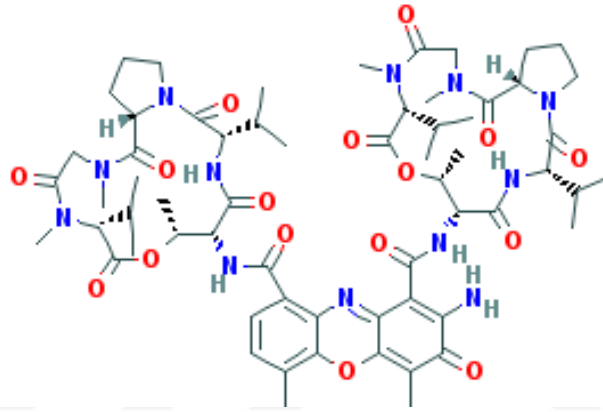


Şekil 1.23 a) Ru(Phen), b) Ru(Phen) kompleksinin 3 boyutlu görüntüsü c) Kobalt ve Bakır komplekslerinin DNA baz çiftleri ile interkalasyonu,

Tamamen düzlemsel olan moleküller DNA bazları arasına kolayca girebilirken, bazı geniş hacimli ve düzlemsel moleküller majör ya da minör yarık üzerinden DNA'ya interkalasyon yapar. Bunun yanı sıra çift taraflı düzlemsel yapılar ise bis interkalasyon yani aynı anda iki farklı baz çifti arasına girebilir (Şekil 1.24) [57].



Şekil 1.24 İnterkalasyon modları: a) klasik interkalasyon, b) majör ya da minör oyuk üzerinden interkalasyon c) bis-interkalasyon.

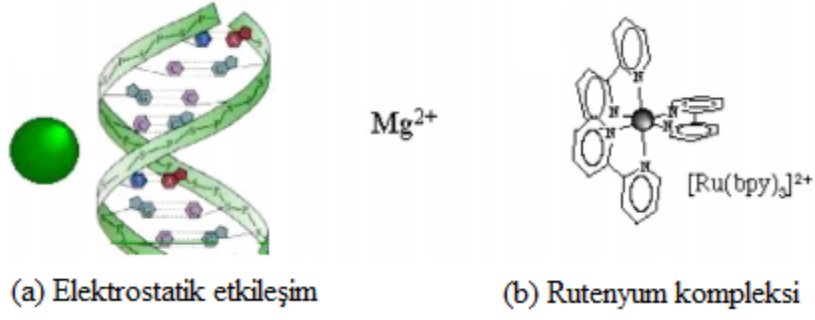


Şekil 1.25 Aktinomisin bileşiğinin yapısı.

Aktinomisin (Şekil 1.25) zincirin uzamasını engelleyerek hem DNA hem mRNA sentezini inhibe eder. G-C baz çifti ile bağlanabilmesi için guaninin 2-amino grubuna sahip olması gerekir. Entapeptidin yan zincirleri DNA'nın minör oyukları ile hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları ile etkileşirken penoksozon halkası DNA arasına kayar. Küçük molekül ve DNA arasındaki etkileşimin bu iki mekanizma (interkalasyon ve minör oyuk bağlanması) sonucunda oluşan kompleks çok karardır [75].

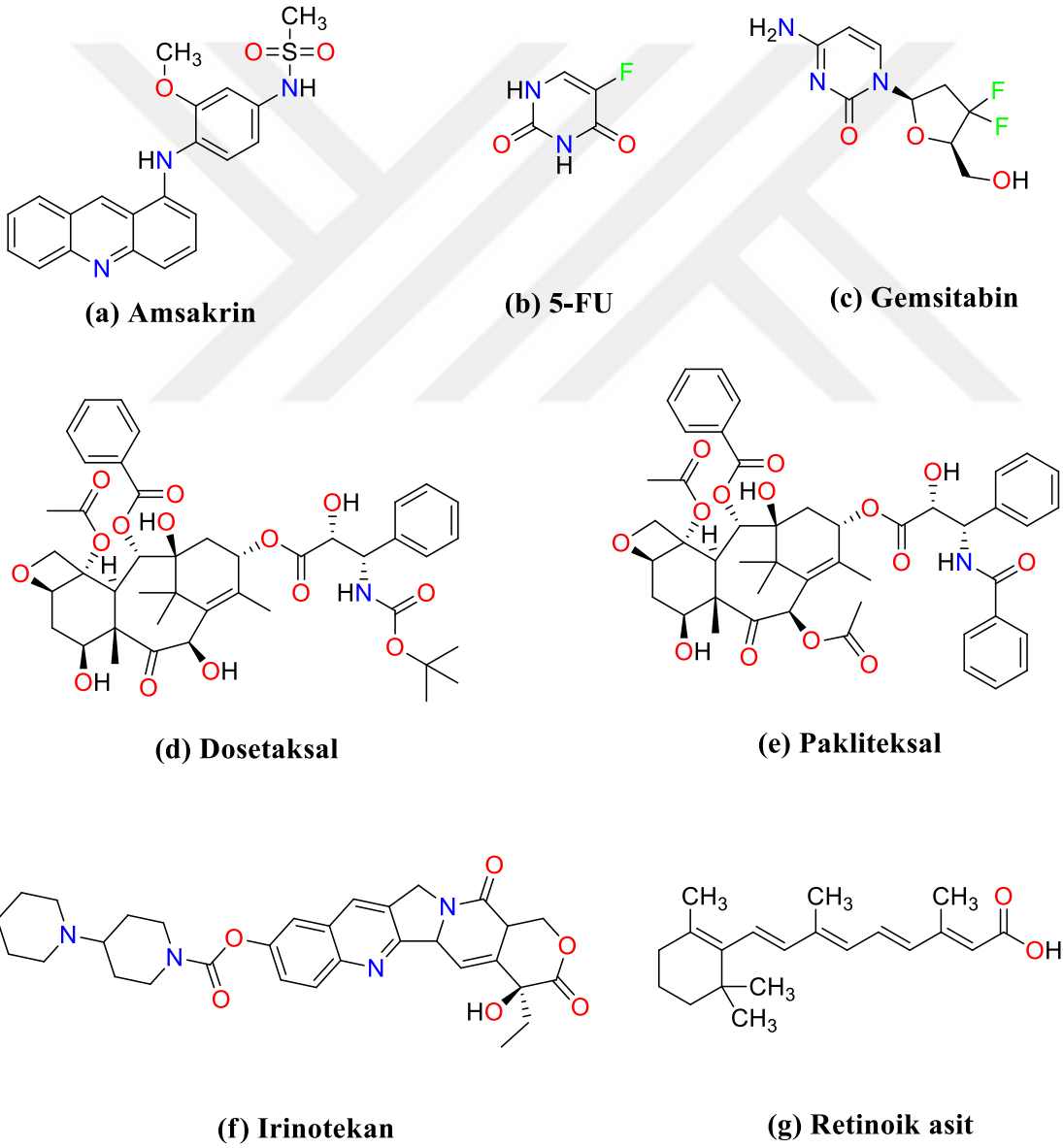
1.5.2.3 Elektrostatik Etkileşim

Elektrostatik etkileşimler ilaç molekülünün katyonik ucu ile negatif yüklü DNA fosfat omurgası arasındaki etkileşimin gerçekleştiği etkileşimlerdir. DNA'nın kararlılığını artırır. Fakat bu etkileşim, interkalasyon ve oyuğa bağlanmaya nazaran daha zayıf bir etkileşimdir. Bu yüzden fosfat gruplarının sahip olduğu negatif yük nötrale edilerek ortadan kaldırılabilir [76]. Çoğu ilaç molekülü farklı etkileşimler yapsa da elektrostatik etkileşimi bünyesinde bulundurur.



Şekil 1.26 Elektrostatik bağlanma.

1.6 DNA'YA BAĞLANAN DİĞER İLAÇLAR



Şekil 1.27 DNA'ya bağlanabilen diğer kemoterapi ilaçları.

Amsakrin (Şekil 1.27a), Aminoakridin türevi bir ilaçtır. DNA'nın interkalasyonu yoluyla yeni DNA sentezini inhibe eder [77]topoizomeraz II üzerine etkilidir [78]. 5-Florourasil adıyla bilinen (Şekil 1.27b), 5-FU başlangıç formunda aktif değildir ve sitotoksik etkilerini gösterebilmek için hücre içi aktivasyon gerektirir. Antimetabolit sınıfından fluoropirimidin analogu olan 5-FU, hücreye girdikten sonra birkaç biyokimyasal yolu takip ederek çeşitli sitotoksik nükleotid formlarına dönüşür. Hücre içinde timidilat sentaz inhibisyonu sonucu deoksitimidin trifosfatı azaltır, böylece DNA biosentez ve tamirini engellemiş olur. Ayrıca DNA ve RNA ile birleşerek onların fonksiyonlarını inhibe eder [79]. Antimetabolik 5-FU, antitümör etkisini RNA sentezi ve fonksiyonunun inhibisyonu, timidilat sentaz aktivitesinin inhibisyonu ve DNA içine yerleşerek gösterir [80, 81]. Gemcitabin (Şekil 1.27c) Pirimidin analogudur ve apoptozu tetikleyerek hücre tümör hücrelerinin büyümesini önler [82]. GEM, hücre döngüsünde faza spesifik etki göstermektedir ve S fazında hücre döngüsünü durdurarak hücrenin yaşamsal döngüsünü durdurmaktadır. Ayrıca, hücrenin büyüdüğü/DNA eşleşmesi fazı olan G1/S fazını engelleyip, hücrelerin ilerlemesini durdurarak da etkisini göstermektedir. GEM, doza ve süreye bağlı olarak sitotoksik etki göstermektedir [83-86]. Vinka alkaloidleri, hücre siklusuna özel ajanlardır ve kolşisin, podofilotoksinler ve taksanlar gibi hücre mitozunu engellerler. Vinka alkaloidlerinin biyolojik etkisi özel olarak α -tübüline bağlanabilmesi ve β -tübülin içeren mikrotübüllerin polimerizasyonunun engellenmesi ile açıklanır [87]. Dosetaksel (Şekil 1.27d), hücre içine daha kolay alınır hücre içinde yaşam ömrü daha fazladır. Paklitaksele göre antitümör hücrelerini yok etmede daha başarılıdır. Fakat uzun süreli kullanımlarında tümör hücrelerinde artış gözlenmektedir [88, 89]. Paklitaksiel (PAK) (Şekil 1.27e), 1981'de başlatılan ilk klinik deneylerde göğüs, akciğer, yumurtalık, gırtlak kanserlerine karşı etkin olduğu saptanmıştır. p53 ve antianjiogenik faktörleri etkinleştirerek tümör hücrelerini apoptoza götürür. Taksol grubu bileşiklerinden olan paklitaksiel ve dosetaksel, Metastaz fazında hücre ölümüne sebep olurlar [90]. Topoizomeraz I inhibitörleri arasında öncelikle kamptotesinler gelmektedir. İrinotekan (Şekil 1.27f), suda çözünebilen, semisentetik türevi olan bir topoizomeraz I inhibitörüdür. Topoizomeraz I tüm hücre tiplerinde, hücre siklusunun tüm evrelerinde ortaya çıkan bir enzimdir. Hücre replikasyonu sırasında topoizomeraz I; çift sarmal DNA'ya sıkıca tutunur ve bir zincirin ayrılmasına izin verir. İrinotekan ise topoizomeraz I'in güçlü bir inhibitörüdür. Topoizomeraz I ile bağlanır ve onarım esnasında zincirin ve topoizomeraz I'in ayrılmasını engeller. Replikasyon süresince gerekli kırılmayı önler ve hücre bölünemez. Malign hücreler normal hücrelerden daha fazla topoizomeraz I düzeyine sahiptir. Bu nedenle malign hücreler topoizomeraz I inhibisyonuna daha hassastır [91]. Retinoik asit (Şekil 1.27g) Fizyolojik şartlarda, embriyonel gelişmeyi kontrol eden bir düzenleyici görevini

üstlenmekte, erişkinlerde de birçok epitelyal dokunun farklılaşma mekanizmasını kontrol etmektedirler. Retinoidler ayrıca, farmakolojik açıdan bazı premalign ve malign lezyonların diferansiye olmalarını sağlamakta ve kontrolsüz bir şekilde büyümelerini engellemektedir. A vitamini türevlerinin, kanseri tedavi edici ve önleyici özelliklerinin araştırılması amacıyla halen birçok klinik araştırma sürdürülmektedir [92].

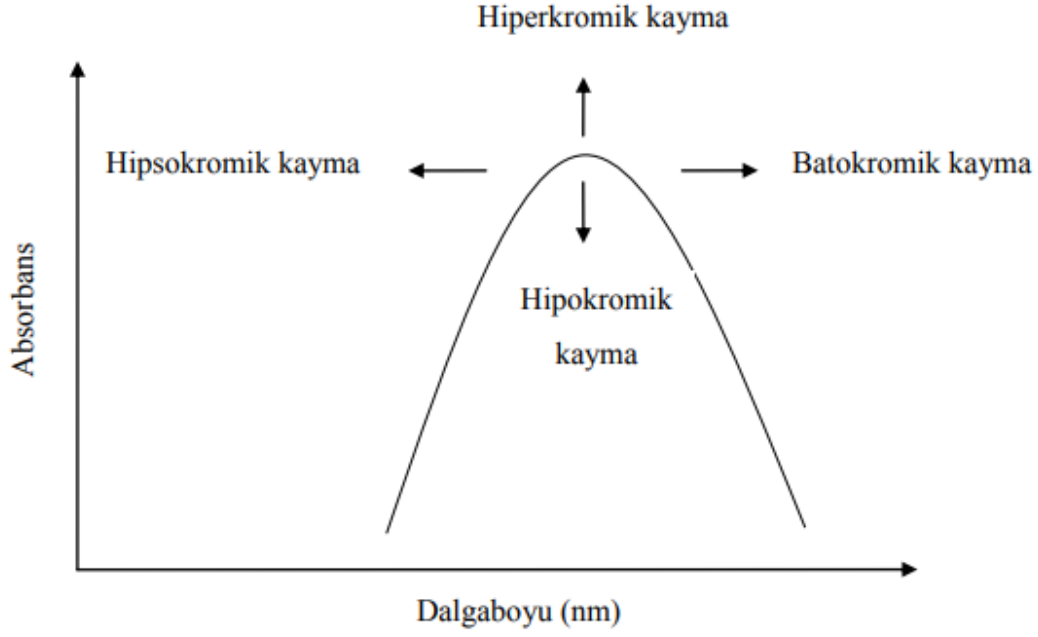
Genel olarak bütün bu ilaçların sadece malin hücreleri etkilemesi amaçlanır. Ancak pratikte ilaçlar kanser hücrelerine seçici etki göstermemekte ve proliferen olan tüm normal ve anormal hücreleri ise etkilemektedir [93].

1.7 LİGANTLARIN DNA İLE ETKİLEŞİM TÜRLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN TEKNİKLER

1.7.1 UV Titrasyon Yöntemi

DNA'nın UV-Görünür absorpsiyon spektrumu, elektronik geçişlerden sorumlu pürin (adenin ve guanin) ve pirimidin (sitozin ve timin) gruplarındaki kromoforik gruplar sayesinde 260 nm'de maksimum emilim ile 200–350 nm arasında geniş bir bant gösterir [94].

UV absorpsiyon spektroskopisi, DNA ile küçük moleküllerin etkileşimini tespit etmek için kullanılan basit ve en etkili yöntemlerden biridir. Yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA ile küçük molekülün etkileşimi sonucu oluşan kompleks absorbansta değişikliklere yol açmaktadır. Bu durumda, küçük moleküllerin artan bir konsantrasyonu sabit bir DNA konsantrasyonuna ya da sabit molekül konsantrasyonunun üzerine artan miktarda DNA eklenir. Bu sayede absorbansta oluşan herhangi bir değişikliğin kaydedilip yorumlanması ile bağlanmanın modu hakkında yorum yapılabilir. DNA'nın çift sarmal yapısında oluşan değişim nedeniyle absorbansta iki ana değişim meydana gelir; hiperkromik etki (absorbansta artış) ve hipokromik (absorbansta azalış) etki (Şekil 1.28)[95].



Şekil 1.28 UV-Vis spektrumunda oluşan kaymalar.

Genel olarak, hiperkromizm (absorbsiyon yoğunluğunda artış) ve hipokromizm (absorbsiyon yoğunluğunda azalış), DNA'nın çift sarmal yapısıyla ilgili spektral özelliklerdir. Hiperkromizm, DNA'nın ikincil yapısının kırılması anlamına gelirken hipokromizm, çift sarmal DNA'nın daha kararlı hale geldiği anlamına gelir [96, 97].

Hiperkromizm, elektrostatik bağlanma (dış temas) veya DNA'nın sarmal yapısının kısmi açılmasından kaynaklanır [98, 99]. DNA omurgasının fosfat grubuna elektrostatik çekim yoluyla bağlanan maddeler, çift sarmal yapıyı bir arada tutan hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşim kuvvetlerini bozar ve böylece DNA'nın ikincil yapısında bir hasara neden olur [100]. Çift sarmal rastgele sarılmış konformasyonda olan iki tek iplik halinde ayrılır. Bu sırada birçok baz serbest kalır ve tamamlayıcı bazlarla hidrojen bağı oluşturamadığı için baz-baz etkileşimi azalır. Bu da DNA çözeltisinin UV-Vis absorpsiyonunu artırır.

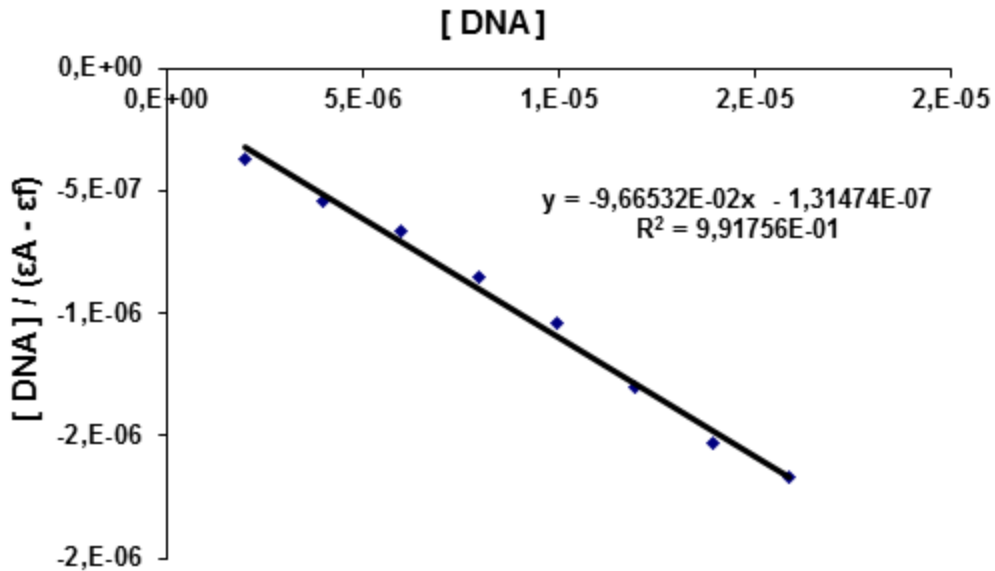
Hipokromizm ise DNA baz çiftlerinin arasına giren bir madde ile DNA bazlarının π orbitallerinin çakışmasından kaynaklanmaktadır. Bazların arasına giren madde DNA'yı kararlı hale getirir [101]. Böylece π - π geçiş enerjisi azalır ve batokromik bir kayma meydana gelir. Diğer taraftan, π yörüngesi kısmen elektronlar tarafından dolduğu için geçiş olasılıkları azalır ve absorbansta azalma meydana gelir [102].

İnterkalasyonda, % 35'den büyük hipokromizm ve 15 nm'den büyük batokromizm (kırmızıya kayma) gözlenebilir [103]. Oyuk bağlanma ya da elektrostatik etkileşimlerde ise 6–8 nm batokromizm veya hiç batokromizm görülmez [1]. Eğer zayıf bir etkileşim varsa, kaymalarda önemli değişiklikler olmaksızın sadece hipokromik veya hiperkromik etkiler gözlenir [94].

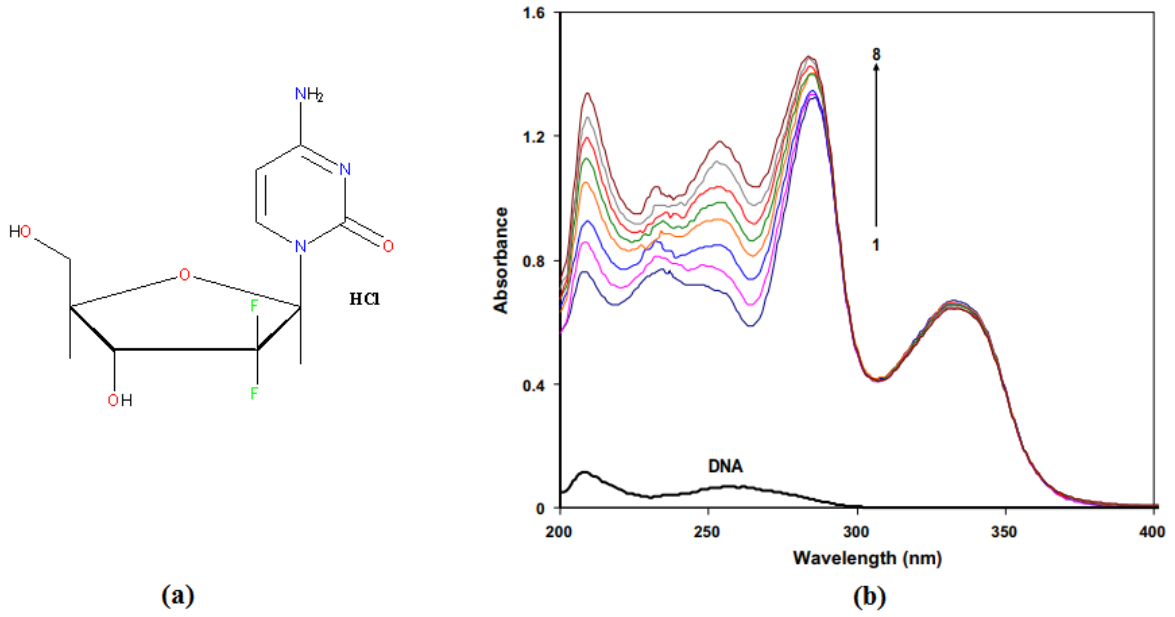
UV-Vis spektrumunda görülen bu değişimler sonucu elde edilen verilerden yararlanılarak, maddelerin DNA'ya bağlanma kuvveti, bağlanma sabiti (K_b) hesaplanır. Bu farklı maddeler arasında kıyaslama yapabilmek için önemli bir parametredir. Bağlanma sabiti hesabı için geliştirilen formül [104]:

$$[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_B - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_B - \epsilon_f) \quad (1.1)$$

Formülde ϵ_A ; ölçülen konsantrasyondaki sönüm katsayısı, ϵ_B ; DNA'ya tüm komplekslerin bağlanması sonrasındaki sönüm katsayısı, ϵ_f ; serbest haldeki kompleksin sönüm katsayısı olarak açıklanabilir. Bu denklemden $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ 'e karşı $[DNA]$ değerleri grafiğe geçirilir ve eğimden K_b değeri bulunur (Şekil 1.29).

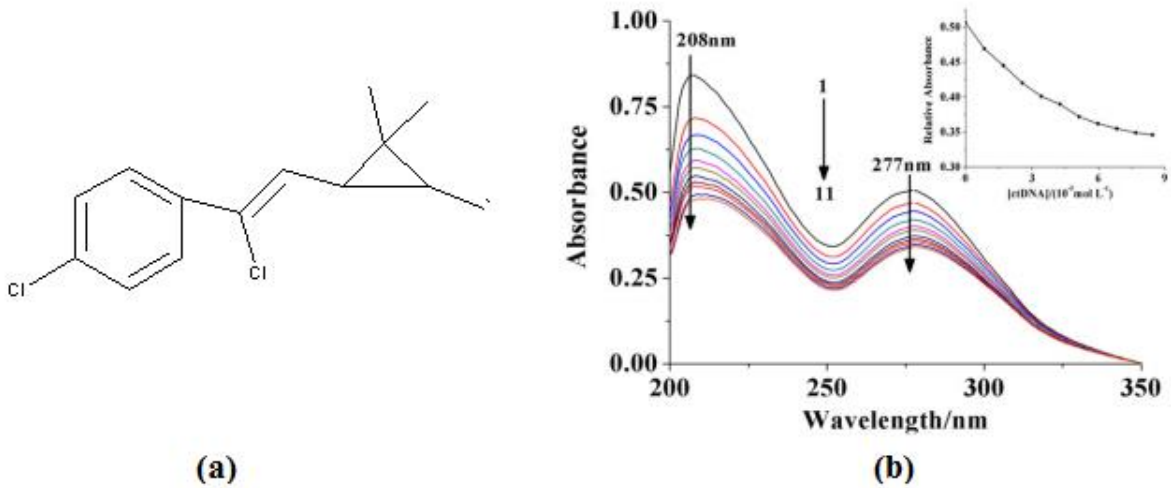


Şekil 1.29 Bağlanma sabiti (K_b) hesaplamak için kullanılan örnek grafik.



Şekil 1.30 a) GMB bileşiği, b) GMB bileşiğine ait UV-Vis spektrumu

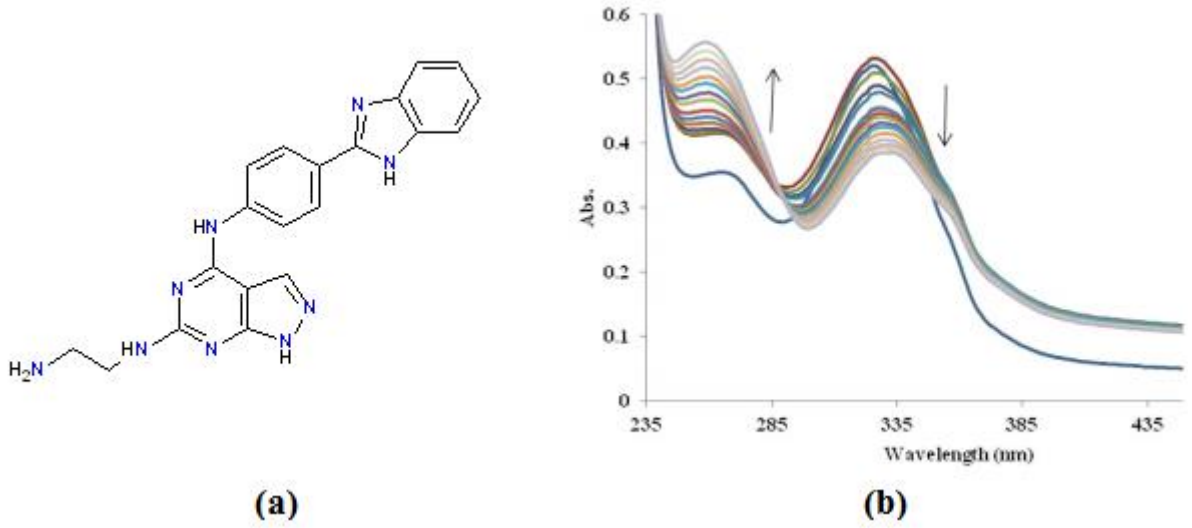
GMB bileşiğinin sabit konsantrasyonuna artan miktarda DNA çözeltisi eklendiğinde, 8 nm'den az batokromik kayma (kırmızıya kayma) ve hiperkromizm gözlenmiştir (Şekil 1.30), bu bileşiğin oyuk bağlayıcı ya da elektrostatik olarak DNA'nın fosfat omurgasına bağlanmış olabileceğini gösterir. Hiperkromizm, DNA'nın ikincil yapısının bozulmasından dolayı konformasyonundaki değişikliklerden kaynaklanır. Bileşiğin DNA'ya bağlanma kuvvetini ölçmek için hesaplanan bağlanma sabiti $1,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ dir [105].



Şekil 1.31 a) Flumethrin bileşiği, b) Flumethrin bileşiğine ait UV-Vis spektrumu

Tao ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmanın sonucuna göre UV absorpsiyonunda gözlemlenen hipokromik kaymalar (Şekil 1.31) ilk bakışta interkalasyon yoluyla bir bağlanma

olduğunu düşündürse de, 277 nm’de % 33’lük bir hipokromizm ve kayma olmaması bileşiğin interkalasyondan ziyade oyuklardan bağlanmış olabileceğini daha çok desteklemektedir [106].



Şekil 1.32 a) Singla ve grubu tarafından sentezlenen bileşik, b) Bileşiğe ait UV-Vis spektrumu.

Singla ve arkadaşlarının sentezlediği pirazolprimidin-benzimidazol türevi bileşik (Şekil 1.32) üzerine artan miktarda DNA çözeltisi eklenmesiyle absorbansta kademeli olarak bir düşüş ve batokromik kayma meydana gelmiştir. Gözlemlenen hipokromizm bileşiğin sahip olduğu primidin-benzimidazol yapısının DNA baz çiftleri arasına girmesiyle π elektronlarının örtüşmesinden (interkalasyon) kaynaklandığını düşündürmektedir [107].

1.7.2 Floresans Spektroskopisi

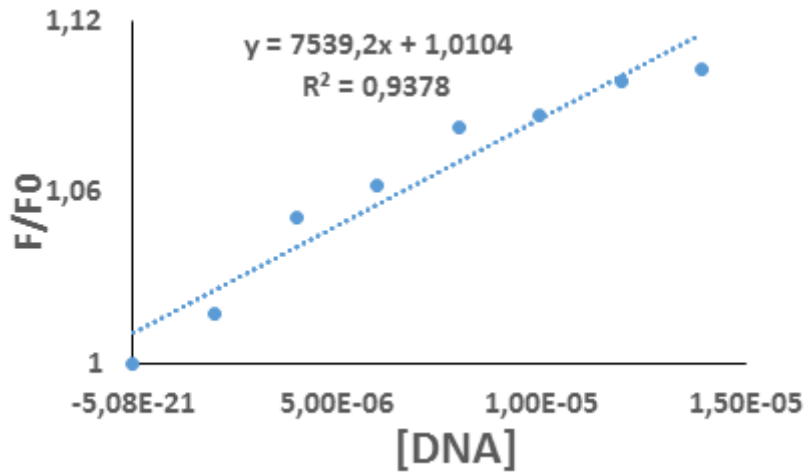
Floresans spektroskopisi, küçük ligant molekülleri ve DNA arasındaki etkileşimleri incelemek için en sık kullanılan tekniklerden biridir. Uygulamada UV-Vis spektroskopisi ile aynıdır. Artan DNA konsantrasyonuna karşı ilacın floresans yoğunluğunda oluşan değişim gözlenmektedir. Bunun nedeni DNA'nın floresan özelliğinin ihmal edilebilecek kadar az olmasıdır [1]. En yoğun ve en yararlı floresans, düşük enerjili π - π geçiş seviyelerine sahip aromatik fonksiyonel gruplar içeren bileşiklerde bulunur. Alifatik ve alisiklik karbonil yapıları veya yüksek konjuge çift bağ yapıları içeren bileşikler de floresans gösterebilir, fakat bu geçişlerin sayısı aromatik sistemdekilere kıyasla daha küçüktür [108, 109].

DNA baz çiftleri arasına ilacın girmesi (interkalasyon) güçlü bir bağlanmadır ve ilaç DNA tarafından etkin bir şekilde korunabilir, çünkü DNA sarmalının içindeki hidrofobik ortam, çözücü su moleküllerinin komplekse erişilebilirliğini azaltır ve bileşik çevresini saran sudan kurtulduğu için floresansı yükselir. Floresansda gözlemlenen hipokromizm ise kompleks DNA'ya bağlandığı zaman, bağlanma sahasındaki hareketliliği kısıtlanacağı için titreşimsel frekansı azaltır [110]. Bu da floresans yoğunluğunda düşüşe neden olur. Kısmi interkalasyon yapan bileşiklerde, bileşik aynı zamanda oyuğada bağlandığı için floresansda azalma görülebilir. Floresansda azalma çok yaygın bir durumdur ve enerji transferi, moleküler yeniden düzenlenme ve çeşitli moleküler etkileşimlerden ya da her birini içeren bir sistemden kaynaklanıyor olabilir [55].

Floresansdan elde edilen verilerin Stern-Volmer grafiği ile K_{sv} hesabı yapılarak komplekslerin karşılaştırılması sağlanabilir (Şekil 1.33).

$$F/F_0 = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1.2)$$

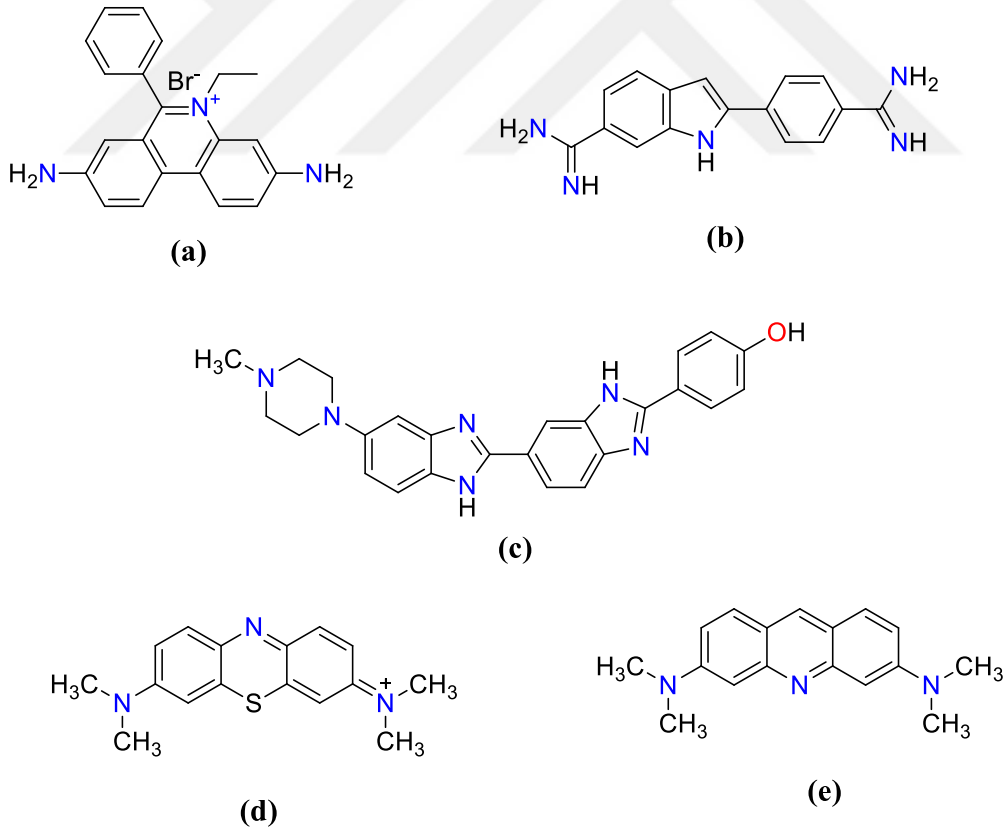
Burada F_0 DNA yokluğunda F , ilaç üzerine DNA eklendikçe değişen floresans yoğunluğunu gösterir. $[Q]$ ise DNA konsantrasyonudur. $K_{sv} [Q]$ 'ya karşı F_0/F lineer grafiğin oluşturulması ile eğim hesabından bulunur.



Şekil 1.33 Bağlanma sabiti (K_{sv}) hesaplamak için kullanılan örnek grafik.

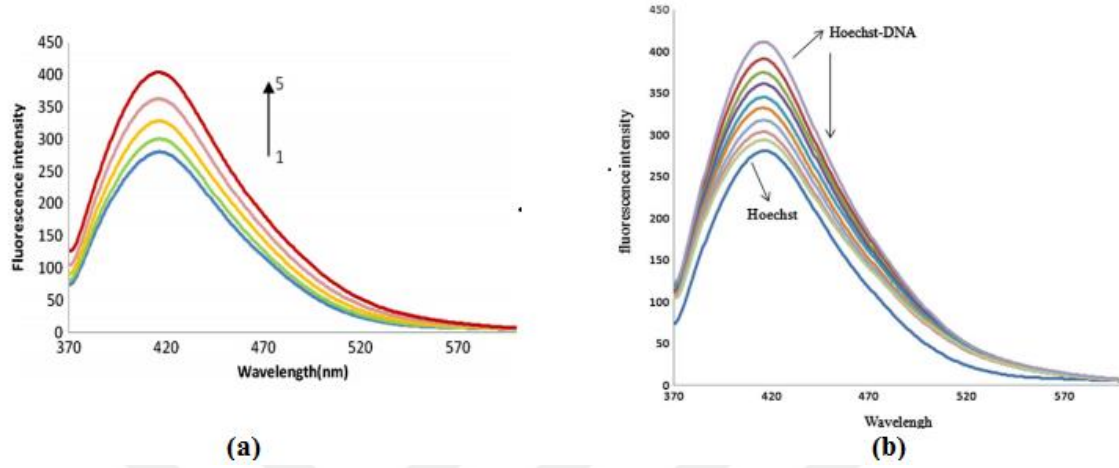
1.7.3 Yarışmalı Floresans Spektroskopisi

Yarışmalı floresans çalışması; DNA-ilaç etkileşim modunu anlamak için DNA'ya bağlanma modu iyi bilinen boyaların kullanılmasına dayanan bir tekniktir. Bu boyaların DNA'ya bağlanması iyi çalışılmış ve kanıtlanmıştır. Floresan boyalar kullanılarak gerçekleştirilen yarışmalı yer değiştirme analizlerinde, DNA önceden boya ile etkileştirilir ve floresansı kaydedilir, daha sonra denenmek istenen küçük molekül ile bu kompleks (boya-DNA) titre edilir. Eğer küçük molekül kompleksin floresans şiddetinde azalma meydana getiriyorsa bağlanmış olan boyayı yerinden çıkarttığını ve boya ile aynı mod ile DNA'ya bağlandığını düşünürüz. Yaygın olarak kullanılan boyalar etidyum bromür (EtBr) (Şekil 1.34a), DAPI (Şekil 1.34b), ve Hoechst 33258'dir (Şekil 1.34c). Sırasıyla bu boyalar, interkalatif, minör oyuk bağlayıcı ve majör oyuk bağlayıcı modda DNA ile etkileşirler. Bu boyalara ek olarak interkalasyon için metilen mavisi (Şekil 1.34d) ve majör oyuk bağlayıcı olarak akridin oranjda (AO) (Şekil 1.34e) kullanılmaktadır [111].



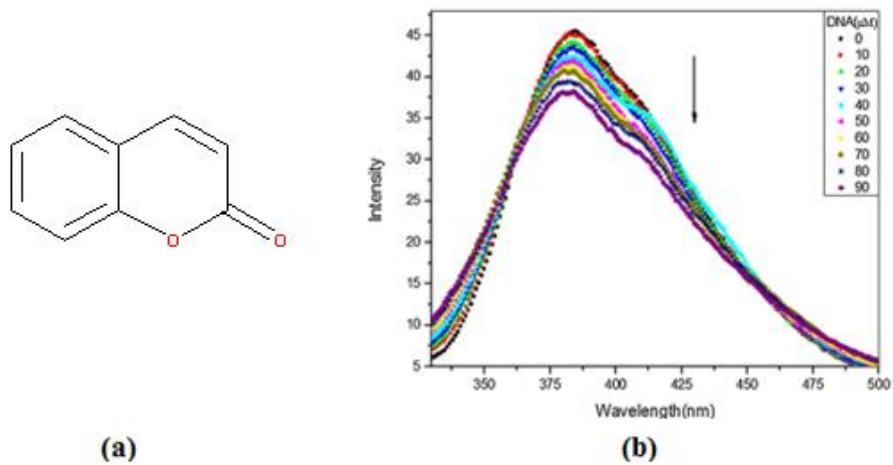
Şekil 1.34 Oyuk bağlayıcı bileşikler a) EtBr b) DAPI c) Hoechst 33258 d) Metilen mavisi e) Akridin oranj.

Hoechst 33258, EtBr ve DAPI, düşük floresans özellik gösteren boyalardır. Ancak DNA ile bağlandıkları zaman floresans özellikleri artmaktadır. Eklenen ilaç boyayı yerinden çıkarttıkça floresans özellikleri düşmeye başlayacaktır (Şekil 1.35, Şekil 1.37).



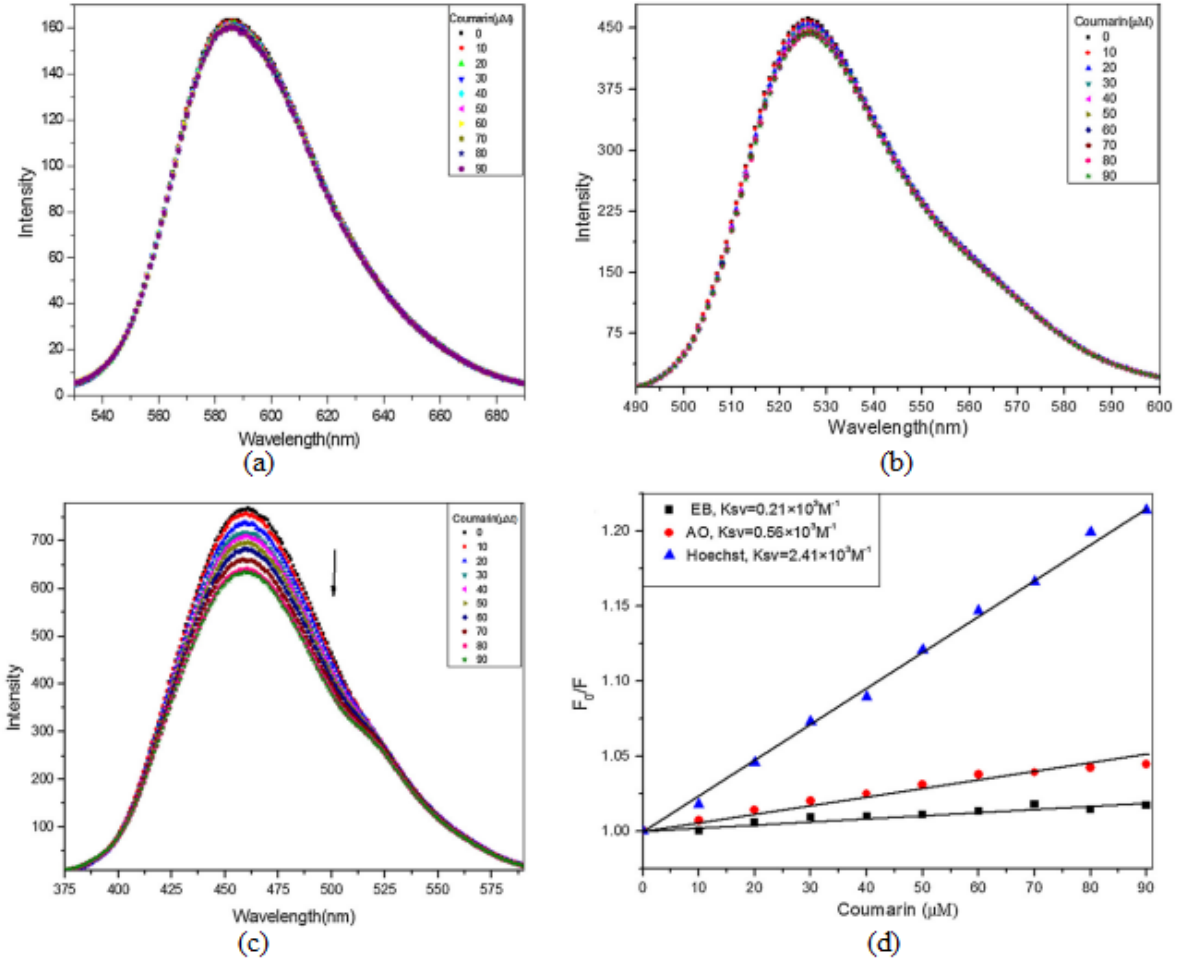
Şekil 1.35 a) Hoechst-33258 üzerine artan DNA çözeltisi eklenmesi ile oluşan floresans değişimi, b) Hoechst-33258-DNA kompleksine ilaç molekülü eklendikçe oluşan floresans değişimi.

Sarwar ve arkadaşlarının sentezlediği kumarin ile yapılan floresans çalışmasında, kumarin üzerine kademeli olarak DNA çözeltisi eklenmesiyle Kumarinin floresans yoğunluğunda düşüş meydana gelmiştir (Şekil 1.36). Bu da düşük floresans özellik gösteren DNA-Kumarin kompleksi oluşmuş olabileceğini gösterir. Genel olarak oyuk bağlayıcı bileşiklerin K_{sv} değerleri ile hesaplanan K_{sv} değerinin $1,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ aynı olması kumarin bileşiğinin oyuk bağlayıcı yolla bağlanmış olabileceğini düşündürmüştür.



Şekil 1.36 a) Kumarin, b) Kumarine ait UV-Vis spektrumu.

Bileşiğin minör ya da majör oyuktan bağlandığını göstermek için yarışmalı floresans deneyleri yapılmıştır.



Şekil 1.37 Kumarin bileşiği için yapılan yarışmalı titrasyon sonucu elde edilen floresans spektrumları; a) EtBr b) Akridin oranj c) Hoechst 33258 ve d) Bağlanma sabitleri.

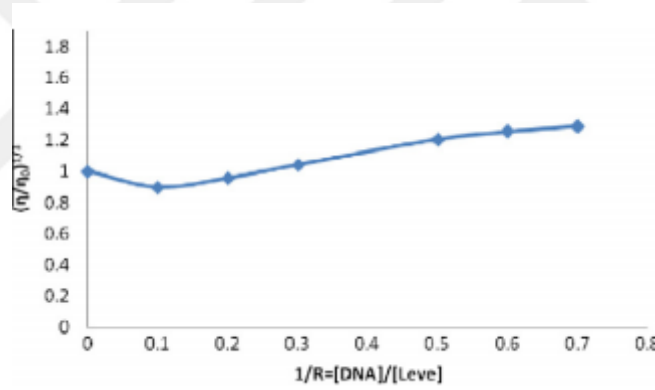
Kumarinin EtBr ve Akridin Oranj boyaları yapılan çalışmalarında DNA-EtBr ve DNA-Akridin oranj kompleksinin floresansını azaltamamıştır. Yani Kumarin DNA'ya bu boyaların bağlandığı bölgeden bağlanmamıştır. Ancak DNA-Hoechst-33258 kompleksine Kumarin ilave edildikçe floresans özellik düşmeye başlamıştır. Floresansın nispeten az düşüşü Kumarinin DNA'ya Hoechst-33258'in bağlandığını bölgeden zayıf olarak bağlandığını düşündürmektedir.

1.7.4 Viskozimetri

X-ışını kristalografisi veya NMR tekniklerinin eksikliği durumunda, hidrodinamik ölçümler DNA'ya bağlanma modunu inceleyen en etkili araçlardan biridir. Viskozite DNA'nın uzunluğunun değişmesine oldukça hassastır.

Vizkozite, hazırlanan DNA-ilaç çözeltisinin kolonun iki noktası arasından geçme süresinin ölçülmesi ile hesaplanır.

Klasik interkalasyon yapan molekül, DNA baz çiftlerinin arasına girerek DNA'nın boyunu uzatır. Bu da DNA'nın viskozitesinde belirgin bir artış meydana getirir [112]. Oyuk bağlayıcı moleküller DNA'ya bağlandıkları zaman DNA'yı bükebilirler. Bükülen DNA'nın boyu kısalır ve viskozitesinde yani akış hızında azalma meydana gelir.



Şekil 1.38 Levetirasetam bileşiğinin DNA viskozitesine etkisi.

Shababadi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre viskozite verileri (Şekil 1.38), levetirasetam ve DNA arasında en az iki bağlanma fazı olduğunu göstermektedir. İlacın daha düşük yüklemesinde, viskozite azalır ve daha sonra ilacın daha yüksek yüklenmesinde artar. Prensip olarak, bu, DNA molekülünün konformasyon, esneklik veya çözünürlüğündeki değişiklikler ile açıklanabilir. Viskozitedeki yavaş artış, minör ya da majör oyuğa bağlanmasının bir göstergesidir [99].

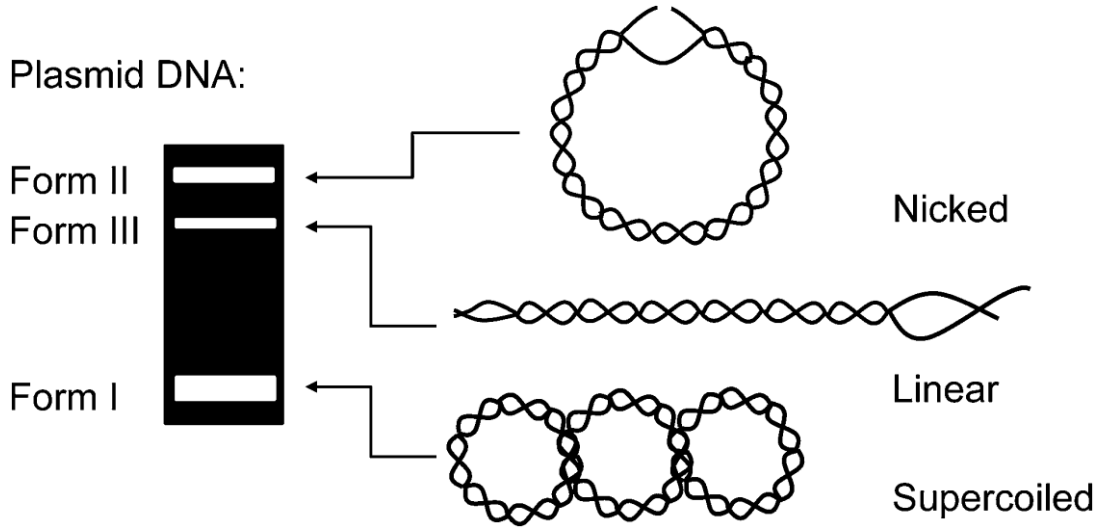
1.7.5 AgaroZ Jel Elektroforezi

Elektroforez, elektrik alandaki yüklü moleküllerin ayrıştırılmasını ve analizini sağlayan bir tekniktir. Bu teknik ilk olarak 1937'de Arne Tiselius tarafından geliştirilmiştir [113]. Elektroforetik bir sistem, "elektrolit" adı verilen iletken bir ortam ile birbirine bağlanan iki karşıt şarj elektrodundan (anot ve katot) oluşur. İyonik parçacıkların hızındaki (v) farklar ayırma etkisini belirler.

Jel elektroforezi çoğunlukla, boyut, yük veya konformasyon açısından farklılık gösteren proteinlerin ve nükleik asitlerin ayrılması ve saflaştırılması için kullanılır. Jel, poliakrilamid veya agarozdan oluşur. Deniz yosunundan elde edilen agaroz, birkaç yüz baz çiftinden yaklaşık 20 kD'ye (kilo Dalton) kadar değişen boyutlarda DNA parçalarının ayrılması için uygundur. Proteinler ve daha küçük DNA parçaları için poliakrilamid tercih edilir.

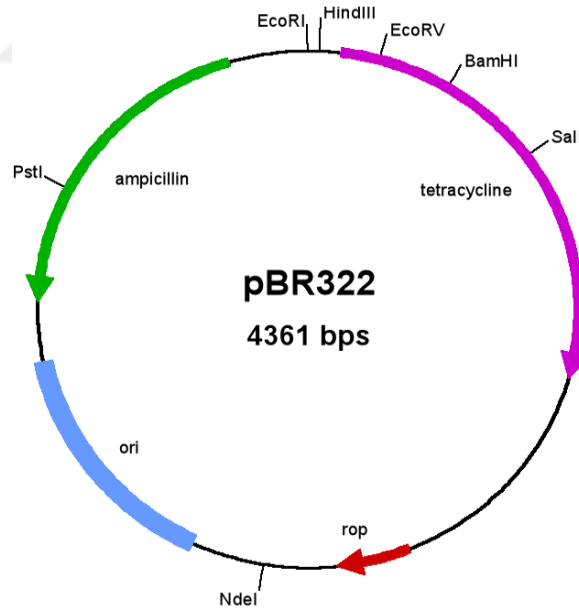
Jel elektroforez çalışmalarında kullanılan DNA türü genellikle plazmid DNA'lardır. Plazmid DNA bakterilerin çoğunda bulunan halkasal bir DNA çeşididir. Plazmid DNA dış bir etki tarafından kesildiğinde farklı konformasyonlarda bulunacaktır. Bu farklı konformasyonların elektroforezde yürüme hızı farkından DNA-ilaç etkileşimine dair yorum yapılabilir.

Plazmid DNA normalde süper-sarmal şeklinde bulunur. Bu elektroforezde en uzağa sürüklenen formdur (Form I). DNA üzerinde tek bir zincirde meydana gelen kırılma çentikli formun oluşmasını sağlar (Form II). Bu form elektroforezde en yavaş hareket eden formdur. Diğer zincir de kesildiği zaman artık süper-sarmal yapı kaybedilip lineer forma dönüşür (Form III) (Şekil 1.39) [114].



Şekil 1.39 Plazmid DNA formları ve elektrofez üzerinde göç hızları.

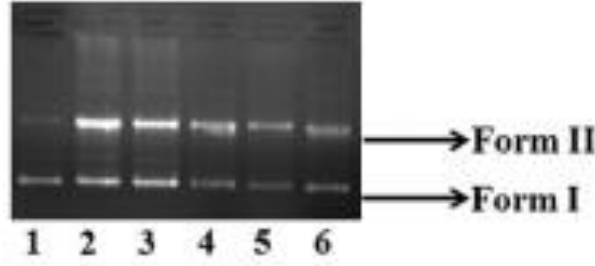
Elektroforez çalışmaları için yaygın kullanılan plazmid DNA'lardan biri pBR322'dir. 1977'de Bolivar ve Rodriguez tarafından keşfedildiği için adı pBR322 olarak kullanılır. Çift sarmal yapıda, 4361 baz çifti uzunluğunda ve $2,83 \times 10^6$ D (Dalton) ağırlığındadır. pBR322, ampisilin ve tetrasikline direnç gösteren iki farklı bölgeye sahiptir (Şekil 1.40).



Şekil 1.40 pBR322 direnç bölgeleri.

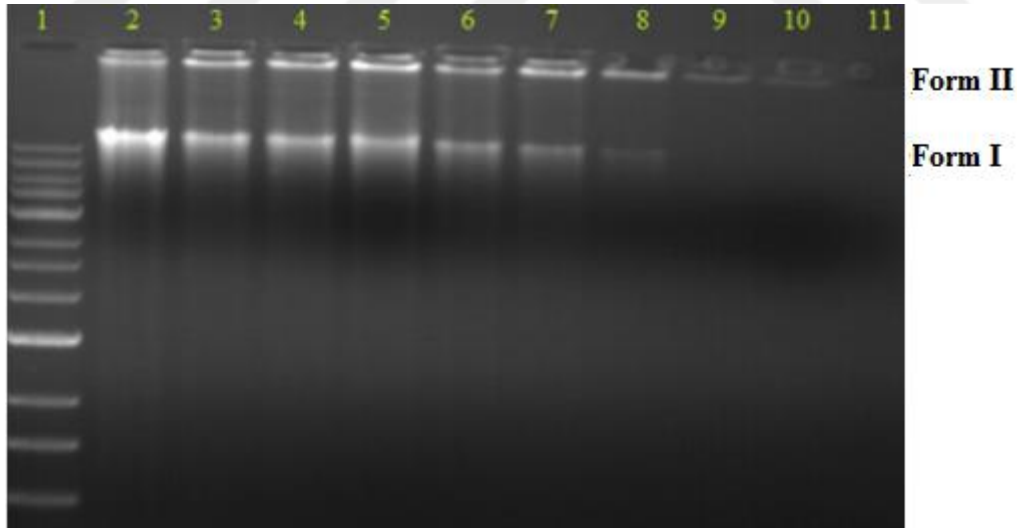
Geçiş metali kompleksleri, DNA parçalanmasını desteklemek için, metal ve dioksijenin redoks özelliklerini kullanarak reaktif oksijen türlerini üretmek üzere nükleaz benzeri aktivite

gösterebilirler. Kompleksin süper sarmal (form I) pBR322 DNA'yı parçalayabilme yeteneği, dış ajanların yokluğunda ve varlığında jel elektroforezi yardımıyla analiz edilmiştir [115].



Şekil 1.41 Artan madde derişimi ile plazmid DNA üzerinde oluşan kırılmaları gösteren elektroforez görüntüsü.

Tabassum'un çalışmasında, Sabit pBR322 konsantrasyonu üzerine artan miktarda madde eklenmesiyle plazmid DNA'nın form değişimi açıkça görülmektedir (Şekil 1.41). 1. bant sadece DNA içeren kontrol denemesidir. 2. banttan itibaren ($5 \mu\text{M}$), DNA kırılmaya başlayıp form II oluşmuştur. Konsantrasyon artışı ile form II azalmaya başlamıştır. Burada DNA'nın eş zamanlı form III'e dönüşümü olmadan madde DNA'yı jelde görünmeyecek kadar küçük parçalara ayırmıştır. (1:kontrol DNA (300 ng), 2-6: DNA + madde ($5\text{-}45 \mu\text{M}$)).



Şekil 1.42 Artan DNA derişimi ile DNA nötralizasyonunu elektroforez görüntüsü.

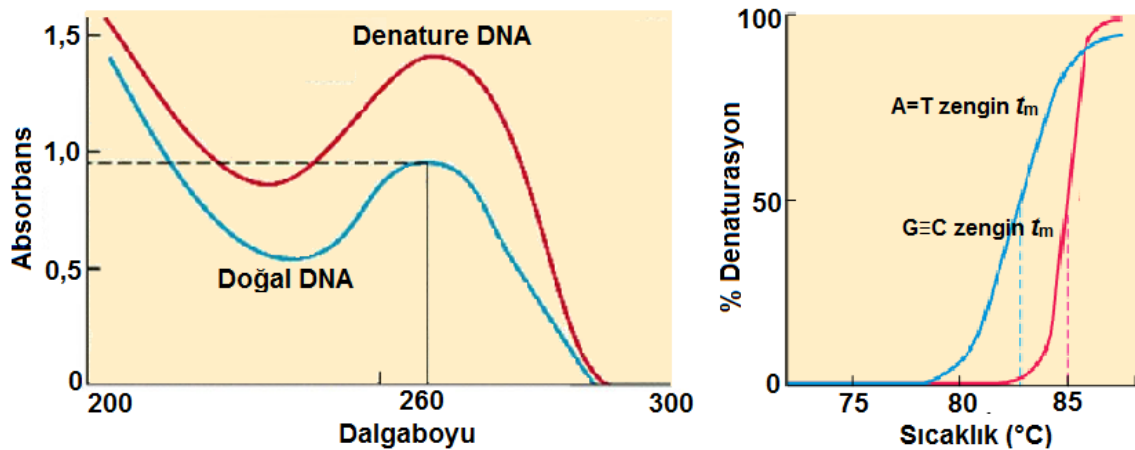
Bileşiklerin DNA ile bağlanmasını incelemenin bir diğer yolu da bileşiğin DNA'nın göç hızına etkisini araştırmaktır. Bant 1 DNA ve bant 11 sadece bileşiğe aittir. Bant 2-10 arasında bileşik ve azalan DNA konsantrasyonuna aittir. Bant 2'de görüldüğü gibi DNA konsantrasyonu yüksek olduğunda bağlanan madde miktarı az olacağından DNA göç edecektir. 2. Banttan itibaren göç

eden DNA miktarı azalmaya başlamıştır. DNA konsantrasyonu azaldıkça DNA'ya bağlanan madde miktarı artmıştır. 9. Banttan itibaren ise DNA'nın göçü durmuştur. Bu, bileşiğin DNA'ya tam olarak bağlandığını ve DNA'nın tamamen nötralize olduğunu göstermektedir [116].

1.7.6 Erime Noktası Değişimi

DNA çift sarmalı geleneksel olarak sarmal bir merdiven şeklinde gösterilir. Merdivenin basamaklarını hidrojen bağlarıyla birbirine bağlanmış baz çiftleri oluşturmaktadır. DNA çözeltileri pH veya ısı değişimlerine maruz kaldığında, DNA'nın çift sarmal yapısını oluşturan bu hidrojen bağları bozulduğu, çift sarmal yapının yarısının kaybedildiği ve tek iplikli DNA'nın olduğu sıcaklığa erime sıcaklığı (T_m) denir.

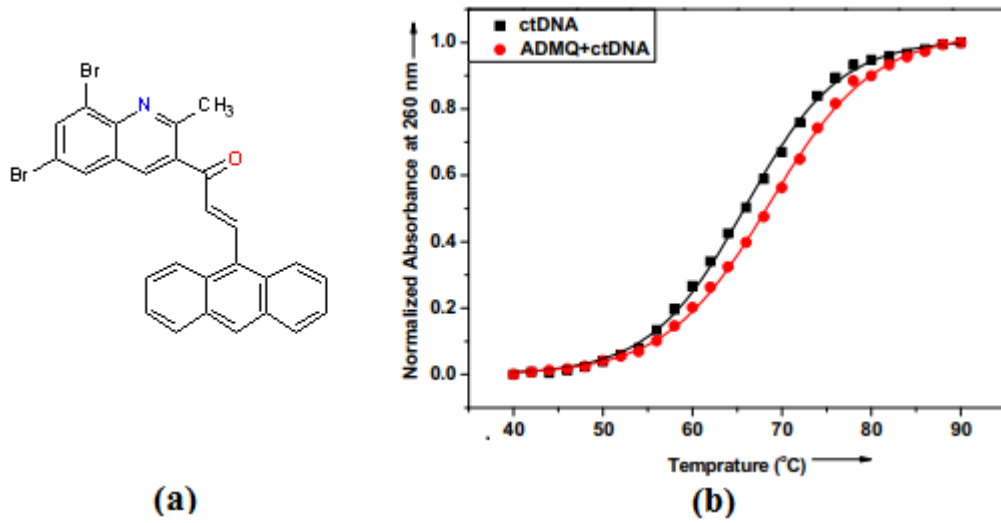
DNA sarmalının ısıtıldığında ayrılması, 260 nm dalga boyunda DNA'nın absorpsiyonu ölçülerek gözlemlenebilir. DNA'nın tek iplikçikler halinde ayrılması bazların absorpsiyon spektrumları üzerinde hipokromik bir etki yaratır. G ve C arasında üç hidrojen bağı ($G \equiv C$) bulunduğundan G ve C dizilerinin fazla olduğu DNA sarmalı daha yüksek sıcaklıkta ayrılırken, aralarında iki hidrojen bağı bulunan A ve T ($A = T$) dizilerinin fazla olduğu sarmal daha düşük sıcaklıkta ayrılır.



Şekil 1.43 DNA için erime eğrileri.

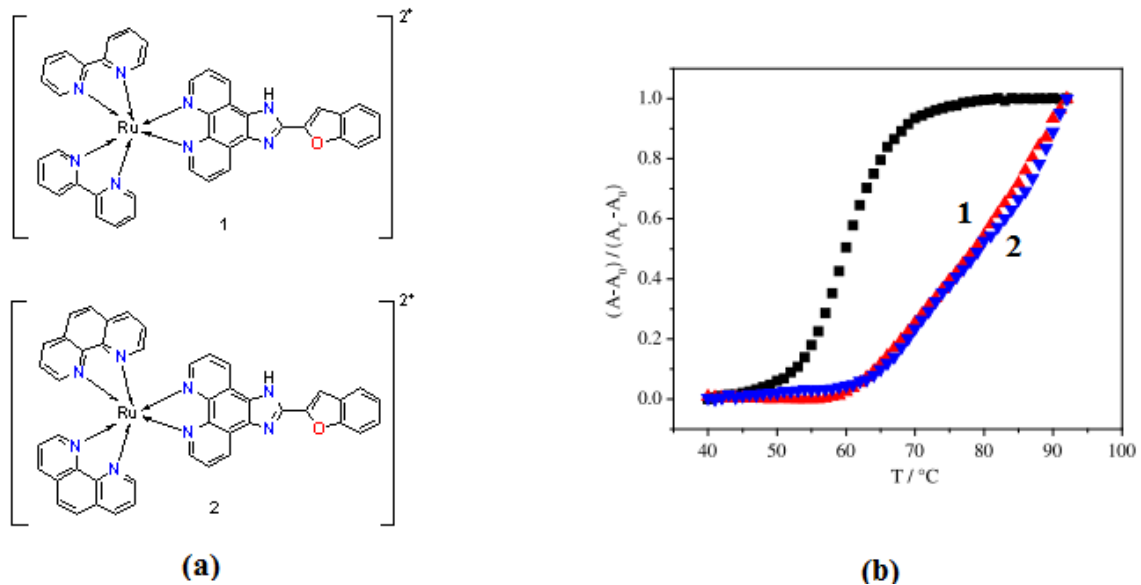
İnterkalasyon yapan bileşikler DNA baz çiftleri arasında girer ve DNA'nın baz çiftlerinde ile ilaç molekülündeki π elektronları birbiri ile etkileşerek DNA'nın kararlılığını artırırlar (Şekil

1.43). Bu da T_m değerini keskin bir şekilde 4-8 °C yükseltir. Oyuk bağlayıcı moleküllerde böyle bir etkileşim olmadığı için T_m değerinde daha düşük bir değişim (1–3 °C) olur [117].



Şekil 1.44 a) DNA ve b) DNA-ADMQ kompleksine ait erime eğrisi.

Kumar ve arkadaşlarının, ADMQ molekülü (Şekil 1.44a) varlığında ve yokluğunda yaptıkları erime noktası değişimi çalışmasında şekildeki gibi sigmoidal bir eğri ortaya çıkmıştır (Şekil 1.44b). DNA ve DNA-ADMQ kompleksi için tahmini erime sıcaklıkları sırasıyla; 65,9 °C ve 68,6 °C'dir. T_m 'de 2,71 °C'lik bir artış ADMQ molekülünün DNA'ya oyuk üzerinden bağlandığını gösterir [117].



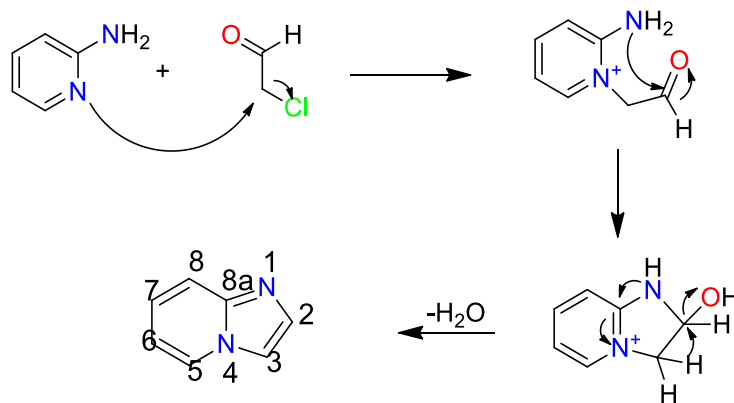
Şekil 1.45 a) DNA ve b) DNA-Ru(II) komplekslerinin erime eğrisi.

Du ve arkadaşlarının sentezlediği Ru(II) komplekslerinin (Şekil 1.45a) DNA erime noktası deneyleri yapılmıştır (Şekil 1.45b). Kompleks bileşiklerin yokluğunda DNA erime sıcaklığı $T_m = 60,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bulunmuştur. Eklenen Ru(II) komplekslerinin varlığında yapılan deneylerde DNA-Ru(II) komplekslerinin erime sıcaklığı kompleksler için sırasıyla, $78,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $79,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak bulunmuştur. DNA'nın erime sıcaklığında gerçekleşen yaklaşık $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik kayma Ru(II) bileşiklerinin DNA'ya interkalasyonla bağlandığını göstermektedir. 2. Kompleksin erime noktasını daha fazla değiştirmesi ($0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$) sahip olduğu fenantrolin halkalarının moleküle kattığı düzlemselliğin interkalasyonu daha fazla desteklemesinden kaynaklanmaktadır [118].

1.8 İMİDAZO(1,2-*a*)PİRİDİN

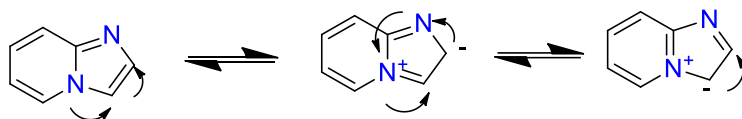
İmidazopiridin, piridin halkası ile kaynaşmış imidazol kısmından oluşan biyolojik olarak aktif önemli bir heterosiklikdir. Son yıllarda, heterosiklik bileşikler, benzersiz yapısal özellikleri ve iyi biyolojik aktiviteleri nedeniyle biyofarmasötikler, moleküler biyoloji [119, 120] ve malzeme bilimi [121] gibi birçok cepheye girmiştir. Özellikle nitrojen atomları içeren heterosiklik bileşikler, biyolojik aktiviteleri ve iyi koordinasyon özellikleri ile iyi bilinmektedir [2, 122, 123]. Çeşitli imidazopiridin türevleri arasında, imidazo[1,2-*a*]piridin parçası, doğal ürünler ve farmasötikler alanında en önemlisidir [124].

İmidazo[1,2-*a*]piridin, Şekil 1.46'da gösterilen mekanizmayla ilk olarak 1925 yılında Chichibabin tarafından 2-aminopiridin ve bir α -halojenli karbonil türevi arasındaki halka oluşum ve kondenzasyon tepkimelerini içeren bir reaksiyonla sentezlenmiştir [125].



Şekil 1.46 İmidazo[1,2-*a*]piridin sentez şeması.

Şekil 1.47 de görüldüğü gibi 1 ve 4 konumundaki azottan dolayı oluşan mezomerik etki 2 ve 3 bölgelerini diğer bölgelere göre daha reaktif yaptığı görülmüştür [126].

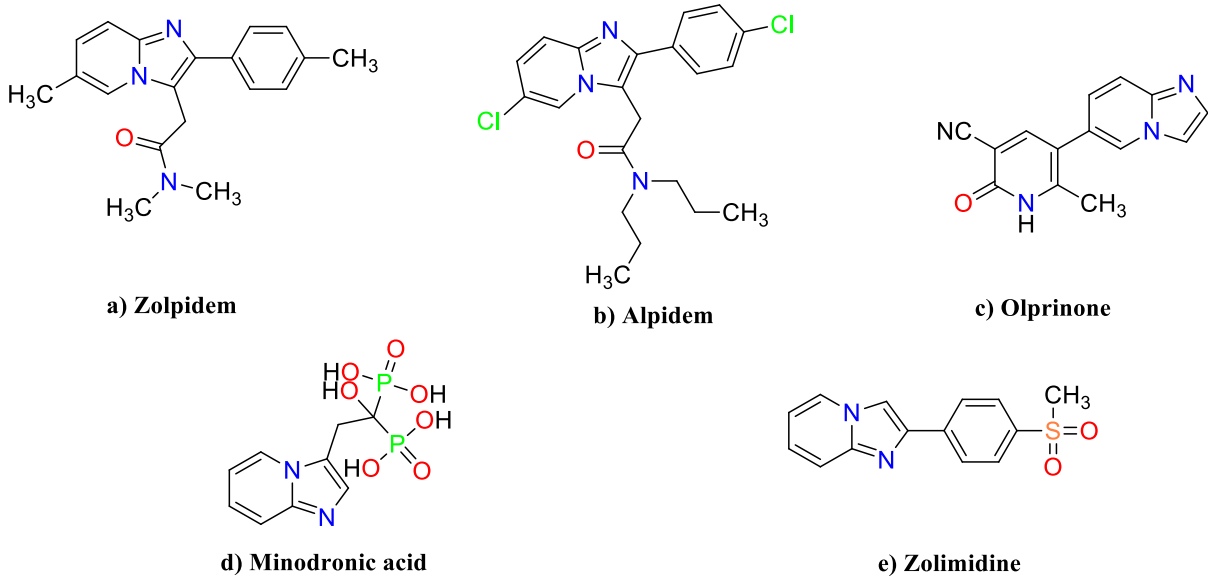


Şekil 1.47 İmidazo[1,2-*a*]piridin aktif bölgeleri.

İmidazo[1, 2-*a*]piridin, kondenzasyon, çok bileşenli, oksidatif eşleşme, tandem reaksiyon, aminooksijenasyon, hidroaminasyon gibi reaksiyonlarla, umut verici biyolojik özelliklere sahip heterosiklik bileşiklere türevlendirilebilir [124].

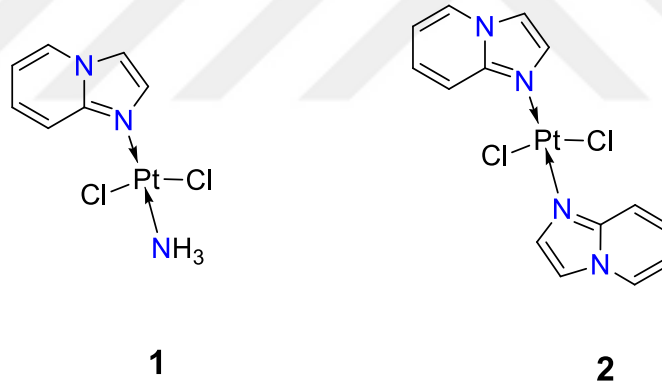
İmidazo[1,2-*a*]piridin kısmı; antiviral [127, 128], anti-inflamatuar [129], antiprotozoal [130], anti-HIV [131], antimalarial [132], hipnotik [133], analjezik [134], tüberküloz [135], antiülser [136], anksiyolitik [137], Benzodiazepin reseptörleri [138, 139] ve antikanser [140, 141] gibi çok sayıda hastalık için geniş çapta faaliyet göstermektedir.

Bunlardan ticari olarak satılan imidazo[1,2-*a*]piridinler arasında (Şekil 1.48), Zolpidem, ilk olarak bir hipnotik olarak kullanılmıştır ve dünyada yaygın olarak uykusuzluk tedavisinde kullanılmaktadır [142]. Bir benzodiazepin reseptörü ligandı olan Alpidem bir anksiyolitik olarak 1991 yılında satılmaya başlanmıştır. Fakat kısa bir zaman sonra karaciğer hasrına neden olduğu için piyasadan çekilmiştir. Zolimidin, anti ülser olarak satılmakta ve aynı zamanda osteoporoz tedavisi içinde faydalıdır. Son olarak, bir fosfodiesteraz (PDE 3) inhibitörü olan Olprinone, akut kalp yetmezliğini tedavi etmek için kullanılmaktadır [143].



Şekil 1.48 Tıpta kullanılan çeşitli imidazo[1,2-*a*]piridin türevleri.

İmidazo[1,2-*a*]piridin halkasının biyoloji aktivitesi keşfedildikten sonra ileriki zamanlarda antikanser etki gösterebilecek ilaçlar sentezlenmeye başlanmıştır.

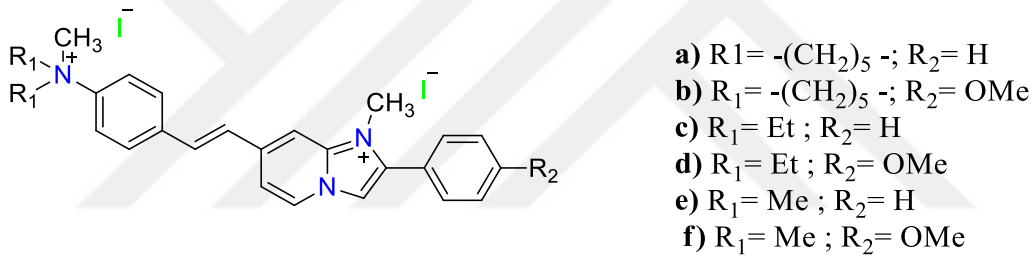


Şekil 1.49 Huq ve grubu tarafından sentezlenen Platin kompleksleri.

Huq ve arkadaşları imidazo[1,2-*a*]piridin içeren trans-Platin kompleksi sentezlemişlerdir (Şekil 1.49). Çalışmalarında, sentezlenen kompleksi cis-platin ve trans-platin kompleksiyle karşılaştırmışlardır. Karanlık ortamda artan konsantrasyonda pBR322 ile etkileştirilen 1 bileşiği ile 1 saat inkübasyondan sonra elektroforez görüntüsü kaydedilmiştir. Yapılan çalışmada DNA'da form değişimi 10 μM 'dan itibaren başlamıştır. Başka bir DNA-ilac etkileşimi anlama yöntemi de restriksiyon enzimi olarak bilinen enzimler ile çalışmaktır. Restriksiyon enzimleri bakteriler tarafından doğal olarak üretilir ve başka bir ortama ilave edildiklerinde DNA'yı keserek bloke ederler. Bu çalışmada amaç enzim restriksiyonunu ilacın hangi konsantrasyonda

azalttığını tayin etmektir. Bu konsantrasyondan sonra DNA'ya ilaç molekülü bağlandığı için enzim bağlanamamaktadır. Burada enzim olarak BamH1 kullanılmıştır. Cis-platine karşı yapılan deneylerde cis-platin ve 1 bileşiği 10 μ M konsantrasyon eklendiğinde enzimin bağlanmasını engellemişlerdir. Ancak bu bileşiğin pBR322 ile inkübasyonundan sonra elektroforez görüntüsünde DNA hasarı gerçekleştirmediği görülmüştür.

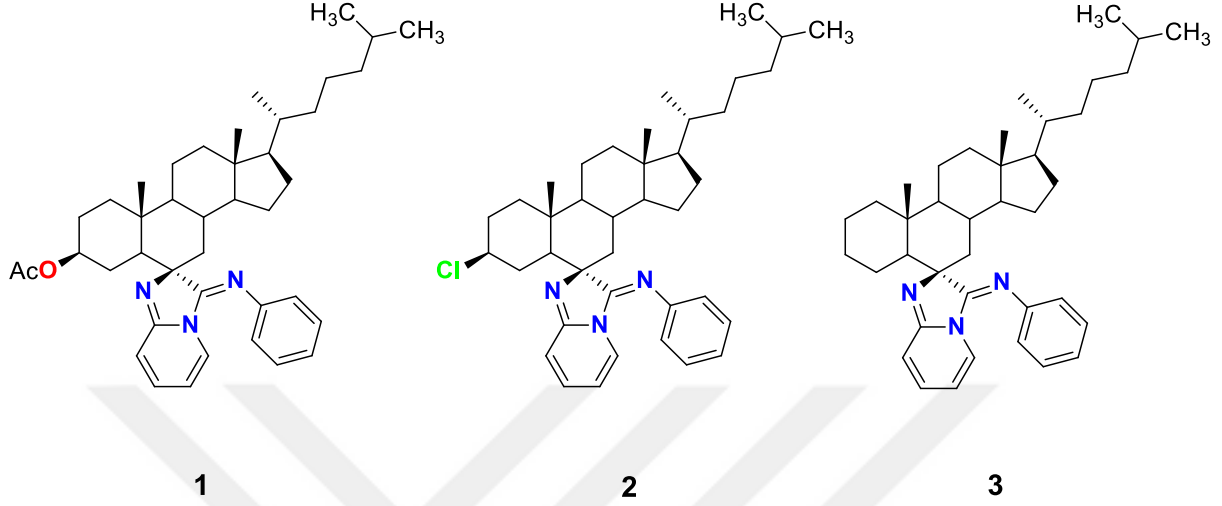
Bu çalışmadan bir sene sonra aynı grup trans konumunda bis-imidazopiridin içeren platin (2) kompleksini sentezlemişlerdir. Aynı çalışmalar 2 kompleksi içinde yapılmıştır. Ancak b kompleksinin pBR322 DNA'ya hiç hasar vermediği görülmüştür. BamH1 enzimi ile yapılan çalışmalarda; kompleks konsantrasyonu 25 μ M'dan itibaren enzimin DNA'ya bağlanmadığı görülmüştür. Enzim DNA'ya bağlanamaması, kompleksin DNA'ya bağlandıktan sonra enzimin DNA'yı tanıyamayacağı şekilde konformasyonu değiştirmesinden kaynaklanır. Bu sonuçlara bakarak 1 bileşiğinin DNA üzerine 2'den daha fazla etki gösterdiği görülmektedir [144, 145].



Şekil 1.50 Seferoğlu ve grubu tarafından sentezlenen imidazo[1,2-a]piridin türevleri.

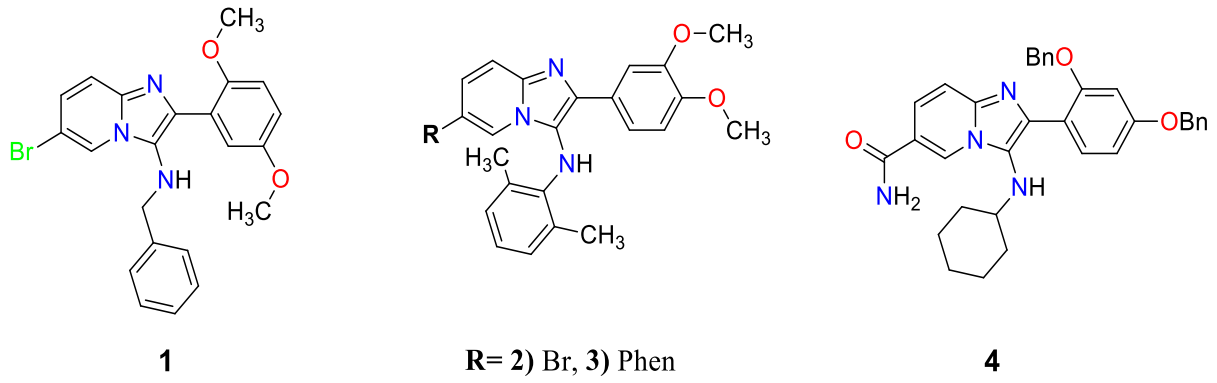
Seferoğlu ve grubu dikatyonik imidazo[1,2-a]piridin türevleri sentezlemiş (Şekil 1.50) ve DNA ile etkileşim türlerini spektroskopik ve viskozimetrik olarak araştırmışlardır. UV-Vis titrasyonu için bileşikler üzerine DNA eklendikçe 260 nm'de DNA eklenmesine bağlı olarak hiperkromizm, ligantlara ait geniş absorpsiyon pikinde hipokromizm ve batokromizm oluşmaktadır. Titrasyon sonucunda elde edilen absorbans değerlerinden hesaplanan bağlanma sabiti değerleri 10⁵-10⁶ oranındadır. Bileşikler arasında en yüksek bağlanma sabiti değerine sahip olan bileşikler b (1,7×10⁶ M⁻¹) ve e (1,1×10⁶ M⁻¹) bileşikleridir. Yapılan floresans titrasyonu çalışmalarında da aynı sonuçlar gözlenmiştir. DNA eklendikçe bileşiklerin floresansında düşme ve hipsokromik kayma gözlemlenmiştir. UV deneyleri ile paralel olarak hipsokromik kayma en fazla olan b ve e bileşikleridir (sırasıyla; 12 ve 14 nm). Floresans yoğunluğunda oluşan bu değişimler katyonlar uyarılmış ligant ve DNA bazları arasında foto-indüklenmiş elektron transferinin sonucudur. Referans olarak iyi bir interkalatör olduğu bilinen EtBr'nin kullanıldığı viskozite çalışmasında dikatyonik bileşikler DNA'nın viskozitesini çok

az yükseltmişlerdir. Ancak EtBr ile karşılaştırıldığında bu önemsenmeyecek bir değişimdir. Bu verilere bakarak bileşiklerin oyuk bağlayıcı olarak bağlanmış olabileceği düşünülmüştür. Yapılan CD çalışması da bu sonucu desteklemektedir [146].



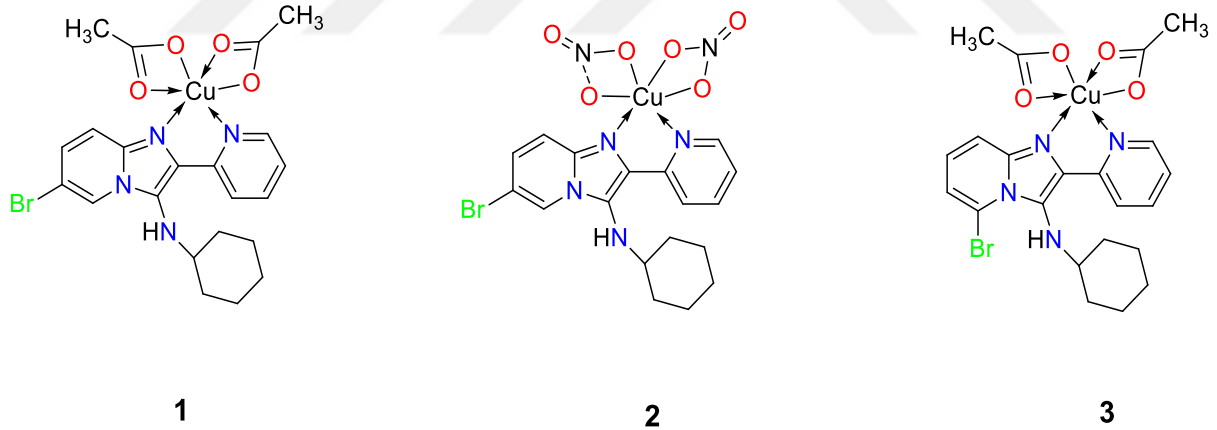
Şekil 1.51 Dar ve arkadaşları tarafından sentezlenen imidazo[1,2-a]piridin türevleri.

Dar ve arkadaşları steroidal imidazo[1,2-a]piridin türevlerini sentezlemişlerdir (Şekil 1.51). Bileşiklerin DMSO'da hazırlanan çözeltileri DNA ile titre edilerek absorbands spektrumları kaydedilmiştir. DNA eklenmesiyle bileşiklerin absorbandsında kayma olmadan hiperkromizm gözlenmiştir. Hiperkromik etki, bileşiğin DNA'ya elektrostatik olarak bağlanması ve bileşik DNA arasında oluşan hidrojen bağlarından kaynaklanır. Bileşiklerin hacimli yapısı nedeniyle de interkalasyonu engelleyerek DNA fosfat omurgasına hidrofobik etkileşimler ile bağlanmış olabileceği mantıklı bir düşüncedir. Bileşiklerin DNA'ya bağlanma kuvvetleri sırasıyla $2,3 \times 10^4$, $3,7 \times 10^4$ ve $3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 'dir ($3 > 2 > 1$). Emisyon yoğunluğundaki artış büyük ölçüde, molekülün DNA'nın hidrofobik ortamına eklenme derecesine bağlıdır. DNA sarmalının hidrofobikliği, içindeki hidrofobik ortama çözücü erişilebilirliğini ortadan kaldırır ve bileşiğin hareketliliği, bağlama bölgesinde sınırlanır, sonuçta, titreşimsel gevşeme modunda bir azalma olur ve emisyon artar. Bu genelde interkalasyon yapan bileşiklerde görülse de bileşiğin bağlanma bölgesinde hareketi kısıtlandığı için bileşiklerin çarpışma frekansını ortadan kalmış ve bu yüzden emisyon yoğunluğu azalmış olabilir. Bileşiklerin hesaplanan K_{sv} değerleri sırasıyla $2,3 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$ ve $2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 'dir. Yapılan jel elektroforez çalışmasında bileşiklerin pBR322'yi parçalama aktivitesi ölçülmüştür. 1 bileşiği $1 \mu\text{M}$, 2 ve 3 bileşiği $2 \mu\text{M}$ 'dan itibaren DNA'nın süper-sarmal yapısını bozmuştur. Ancak 3 bileşiği $3 \mu\text{M}$ 'dan itibaren DNA'yı daha fazla kırarak lineer forma dönüştürmüştür [141].



Şekil 1.52 Dahan-Farkas ve grubu tarafından sentezlenen imidazopiridin türevleri.

Dahan-Farkas ve grubu bir dizi imidazopiridin türevi sentezlemişlerdir (Şekil 1.52). Sentezlenen türevlerin kolon kanseri hücreleri (HT-29 ve Caco-2) üzerine etkileri, anti-kanser bileşiği olarak bilinen kamptotesine karşı araştırılmıştır. Bu çalışmada, HT-29 ve Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin yarısını yok ettiği konsantrasyon (IC₅₀) değeri belirlenmiştir. 1, 2, 3 ve 4 bileşikler kamptotesine göre daha düşük konsantrasyonda hücre ölümü gerçekleştirmiştir. Ayrıca bütün bileşiklerin beyaz kan hücrelerine karşı kamptotesinden daha az toksik oldukları bulunmuştur [147].



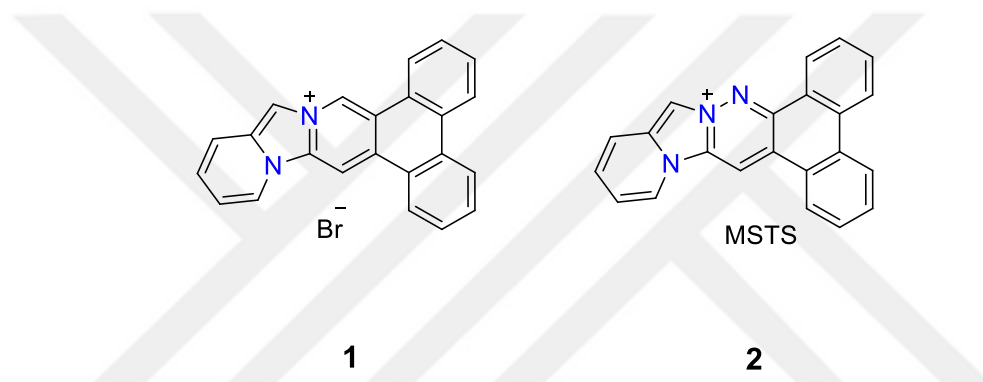
Şekil 1.53 Dam ve grubu tarafından sentezlenen imidazopiridin türevleri.

Dam ve çalışma grubu çinko ve bakır tabanlı imidazopiridin türevleri sentezlemiş, bileşiklerin göğüs, kolorektal ve lösemik kanser türlerine karşı etkilerini araştırmışlardır. Sentezlenen çinko kompleksleri kanserli hücre testlerinde düşük aktivite göstermiştir. Bakır bileşikler (Şekil 1.53) ise çinko bileşiklerinin aksine, kanser hücreleri üzerine oldukça etkilidir (Çizelge 1.1). Bu çalışma için de Kamptotesin kontrol olarak kullanılmıştır. HT-29 hücreleri (Kolon kanseri) için Kamptotesinin MIC değeri 8 µM iken a bileşiğinin 1 µM'dır (1>3>2). Aynı şekilde MCF-7 ve

MDA-MB-231 (göğüs kanseri), K562 ve HL-60 (kan kanseri) hücre hatları ile yapılan çalışmalarda en etkili bileşik **1** bileşiğidir [148].

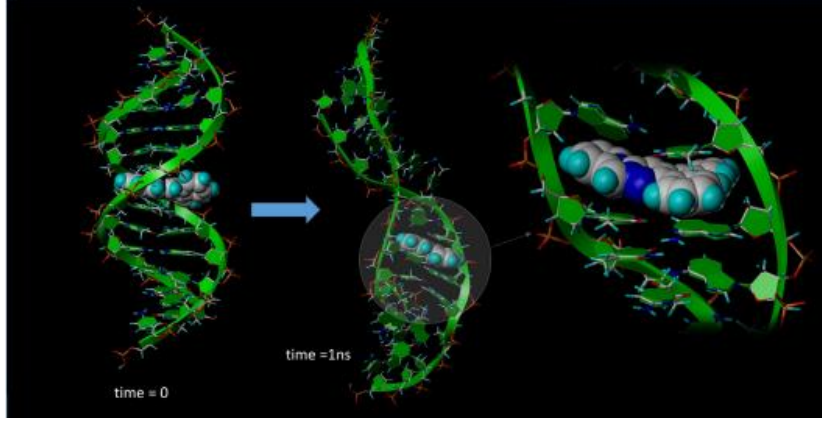
Çizelge 1.1 Dam ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkileri.

Bileşikler	IC ₅₀ (μM)				
	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	K562	HL-60
Kamptotesin	8,0	0,32	0,33	2,6	0,005
1	0,79	0,62	28	1,9	2,2
2	6,80	1,1	19	9	12
3	1,6	1,20	2,4	6,0	2,1

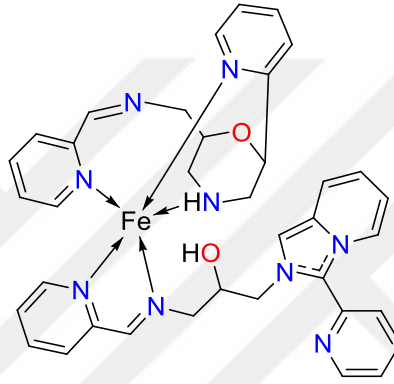


Şekil 1.54 Bosch ve arkadaşları tarafından sentezlenen imidazopiridin türevleri.

Bosch ve çalışma grubu katyonik imidazopiridin türevleri sentezlemişlerdir (Şekil 1.54). DNA bağlanma çalışmalarında piridin içeren pozitif yüklü katyonlar büyük önem taşımaktadır. Bu yüzden sentezlenen katyonik türevlerin umut vaat edici olduğu düşünülmektedir. Bu kapsamda yapılan DNA çalışmalarında, absorpsiyon-emisyon titrasyonu, CD, termal denaturasyon çalışmaları yapılmıştır. Emisyon titrasyon deneylerinde, 488 ve 518 nm’de bulunan iki pikte de hiperkromizm gözlenirken 2’de 538 nm’de hipokromizm gözlenmektedir. Bu spektrumlardan bağlanma sabiti değerleri ise sırasıyla, $6,7 \times 10^4$ ve $5,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ’dir. Bileşik 2 DNA’ya 1’ya göre yaklaşık 10 kat daha iyi bağlanmaktadır. Termal denaturasyon çalışmaları, yapay olarak sentezlenen AT ve GC oligonükleotidlerinin zengin olduğu iki farklı DNA dizisi için çalışılmıştır. Bileşik 2’nin AT zengin DNA dizilerinin erime noktasını daha çok yükselttiği görülmüştür. Bu da 2’nin AT dizilerinin yoğun olduğu bölgeleri tercih ettiği anlamına gelmektedir. Molekül modelleme (Şekil 1.55) çalışmalarında ile bileşiklerin interkalasyon yaparak DNA ile etkileştiği görülmüştür [149].



Şekil 1.55 Bosch ve grubu tarafından sentezlenen 2 bileşiğinin molekül modelleme çalışması.

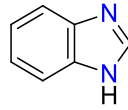


Şekil 1.56 Mukherjee ve grubu tarafından sentezlenen imidazopiridin kompleksi.

Mukherjee ve grubu tarafından sentezlenen İmidazopiridin halkası içeren üçlü demir kompleksi sentezlemişlerdir (Şekil 1.56). Kompleksin EtBr ile yarışmalı floresans çalışması yapılmış ve DNA-EtBr sisteminin üzerine kompleks ilave edildikçe, düzlemsel imidazopiridin halkasından dolayı kompleks DNA baz çiftleri arasına girerek, EtBr ile yer değiştirmiştir. Kompleksin DNA'ya bağlanma kuvveti (K_{app}) EtBr'ye göre hesaplanmıştır. EtBr'nin K_{app} değeri 10^7 M^{-1} 'dir. Bu değere göre hesaplanan bileşiğinin K_{app} değeri $4,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ bulunmuştur. Bu interkalasyon yapan bileşikler için düşük bir değerdir. Bağlanma modunu anlayabilmek için ayrıca agaroz jel üzerinde kompleksin DNA'yı parçalama aktivitesine bakılmıştır. Bunun için oyuk bağlayıcı olarak bilinen distamisin, kompleks, DNA ve H_2O_2 karıştırılarak 45 dakika karanlıkta bırakılmıştır ve jel üzerine ekilmiştir. Sonuçlar kompleksin DNA'ya oyuk üzerinden bağlandığını göstermektedir. Çünkü DNA üzerinde hiçbir kırılma gerçekleşmemiştir. Bu da kompleksin DNA'ya distamisinin bağlandığı yerden bağlandığını göstermektedir. Ayrıca artan kontrasyonlarda kompleksin DNA'ya etkisi jel üzerinde görüntülenmiştir ve kompleksin DNA'yı $10 \mu\text{M}$ gibi küçük bir derişimden itibaren bozduğunu göstermiştir [150].

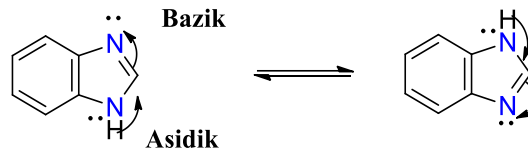
1.9 BENZİMİDAZOL

Azot atomu içeren heterosiklik bileşikler, biyolojik aktivitesi bilinen birçok doğal ve sentetik bileşik ile benzerliklerinden dolayı farmasötik kimyada oldukça öneme sahip bileşiklerdir [151]. Benzimidazol (Şekil 1.57), benzen ile imidazol halkasının 4 ve 5-pozisyonlarının kaynaşmış olduğu altı üyeli bisiklik bir heteroaromatik bileşiktir. İlk benzimidazol sentezi, 1872'de Hobercker tarafından benzen-1,2-diamin türevlerinin halka açılma reaksiyonu ile 2,5 ve 2,6 dimetilbenzimidazolün sentezidir [5].



Şekil 1.57 Benzimidazol yapısı.

Benzimidazol halkaları, amfoterik yapıdaki, yani hem asidik hem de bazik özelliklere sahip, iki azot atomu içerir. Bu halkalar, hidrojen atomunun iki azot atomundan herhangi birinin üzerine yerleştirilebileceği iki eşdeğer tautomerik formda bulunur (Şekil 1.58). Elektron bakımından zengin bir özelliğe sahip olan benzimidazol halkasının bu özel yapısal özelliği, benzimidazol türevlerinin çeşitli terapötik hedeflerle kolayca bağlanması ve böylece geniş bir farmakolojik aktivite sergilemesi için faydalıdır [152].

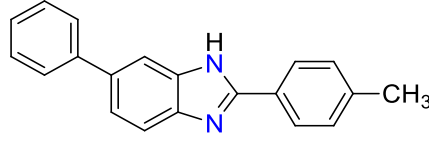


Şekil 1.58 Benzimidazol yapısının amfoterik yapısı.

1950'lerde, 5,6-dimetil-1-(α -D-ribofuranosil)benzimidazol, B12 vitamini yapısının bir parçası olduğu bulunmuştur [153]. İlerleyen zamanlarda, birçok benzimidazol türevi ilaç uygulanmasında geniş yer bulmuşlardır. Bunlara örnek olarak; antibakteriyal, antiviral, antifungal, antiprotozoal, analjezik ve antikanser ilaçlar gösterilebilir [3, 154-159].

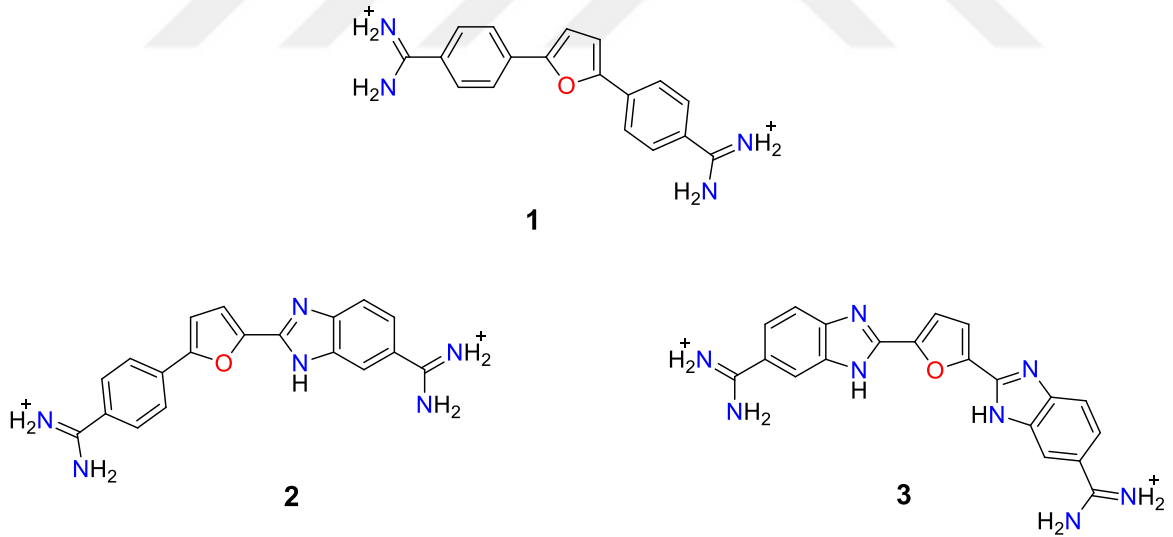
Benzimidazol yapısının amfoterik özelliklerinden ve antikanser etkisi bulunan Hoechst-33258'in yapısını oluşturmaktan dolayı terapötik çalışmalarda oldukça etkili olabileceği

düşünülmüştür. Bu yüzden birçok benzimidazol türevi sentezlenip antikanser etkileri çalışılmıştır.



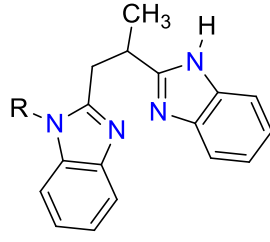
Şekil 1.59 Hegde ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevi.

Hegde ve grubu bir dizi imidazol türevi sentezlemişlerdir (Şekil 1.59). Bunların içinde en önemli olan tolüen ve benzen yan grubuna sahip olan benzimidazol türevidir. Sentezlenen benzimidazol türevi, EtBr ve Hoechst-33258 boyaları ve moleküler modelle ile çalışmaları ile incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda bileşiğin minör oyuktan bağlandığı düşünülmüştür. Bunun yanı sıra bileşik, topoizomerez I ve topoizomerez II aktivitesine de bakılmıştır. Topoizomerez II aktivitesini inhibe edebilirken topoizomerez I üzerine etkili değildir. Ayrıca diğer türevlere göre, kemik kanseri üzerine oldukça etkili ve düşük sitotoksosite seviyelerine sahiptir [160].

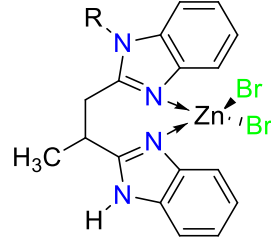


Şekil 1.60 Wang ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevleri.

Wang ve arkadaşlarının sentezlediği (Şekil 1.60) furan halkası içeren benzimidazol türevlerinin DNA etkileşimleri AT ve GC zengin DNA dizileriyle yapılmıştır. Bileşiklerin Hoechst-33258 gibi AT zengin dizileri tercih ederek GC zengin dizilere bağlanmayı genel olarak tercih etmemişlerdir. Ancak bileşiklerin GC zengin diziler ile kompleks oluşturacak biçimde dimerleşerek değişik bir bağlanma türü oluşturmuşlardır [161].



R= H, Benzen
(a)



R= H, Benzen
(b)

Şekil 1.61 Rodriguez ve grubu tarafından sentezlenen a) Benzimidazol ligandı ve b).Zn kompleksi.

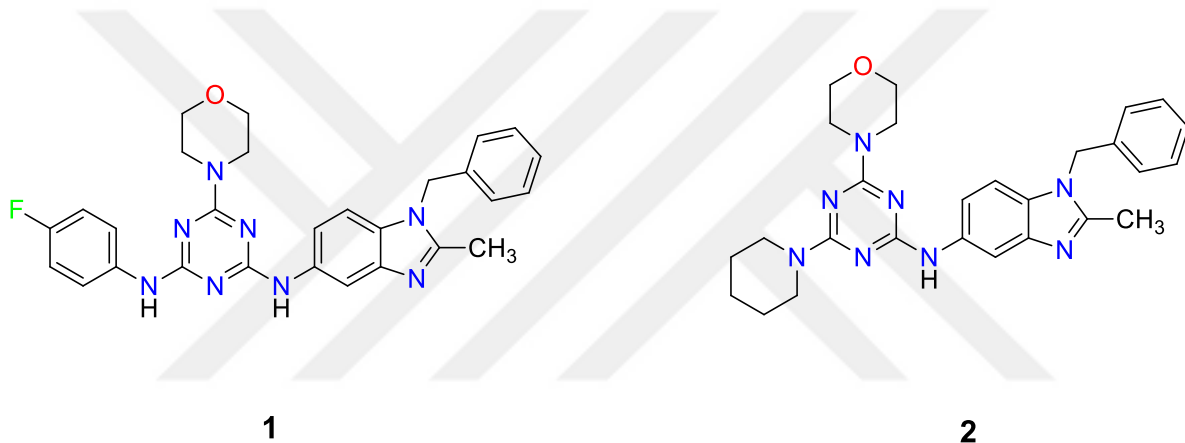
Rodriguez ve çalışma grubunun sentezlediği bis-benzimidazol türevleri (Şekil 1.61) ve onların çinko komplekslerinin DMSO ve % 3 DMSO+Tampon'da hazırlanan çözeltilerinin UV absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerlerinde oluşan değişimler ve hesaplanan bağlanma sabiti değerleri Çizelge 1.2'de görülmektedir. Bu değerlere bakıldığında, tüm bileşiklerin absorbans değişimleri (% H) ve bağlanma sabiti değerleri (K_b) % 3 DMSO+Tampon'da hazırlanan çözeltilerde daha fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuç DNA'daki çift sarmal yapıları bozan yüksek DMSO konsantrasyonuna bağlanabilir. DMSO, diğer etkileşimlere ek olarak azot bazları veya DNA'nın şeker-fosfat omurgası ile hidrojen bağları oluşturabilir, böylece bileşiklerin interkalasyon yapması engellenmiş olabilir [162].

Çizelge 1.2 de görüldüğü gibi L2 ligandının absorbans değişimi ve bağlanma sabiti her iki çözücü sisteminde de L1 ve Zn(II)L1 kompleksinden daha yüksektir. Ayrıca, Zn(II)L2 kompleksinin bağlanma sabiti DMSO sisteminde oldukça yüksektir. Bu, L2 ve Zn(II)L2 bileşiklerinin sahip olduğu fenil grubu DNA ve bileşik arasındaki π - π etkileşimlerini kolaylaştırmasından kaynaklanıyor olabilir [163].

Çizelge 1.2 Rodriguez ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin ayrıntılı UV titrasyon sonuçları.

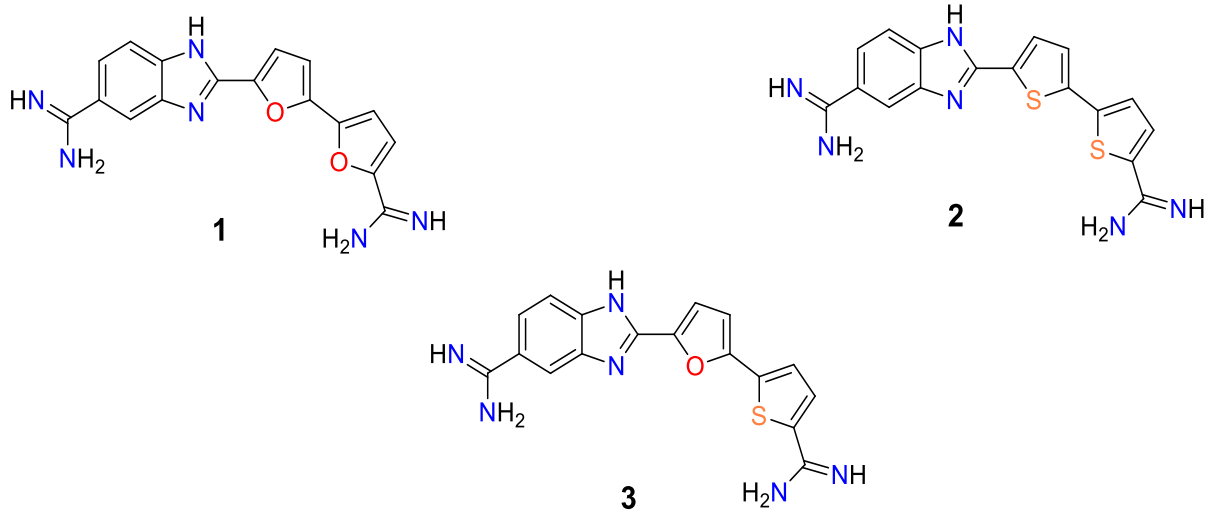
Bileşikler	% H DMSO	% H % 3 DMSO/Tampon	$K_b \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ DMSO	$K_b \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ % 3 DMSO/Tampon
L1	7,99	11,83	2,5	10,0
L2	8,54	13,33	5,6	10,2
Zn(II)L1	8,82	20,44	1,1	3,8
Zn(II)L2	9,79	22,42	550,0	1,0

Bu sonuçlar, literatürde interkalatör olarak bilinen DPPZ ile karşılaştırıldığında (DMSO: $K_b = 1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ve 3 % DMSO/Tampon: $K_b = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), DNA'ya bağlanma kabiliyetinin daha fazla olduğu görülmüştür.



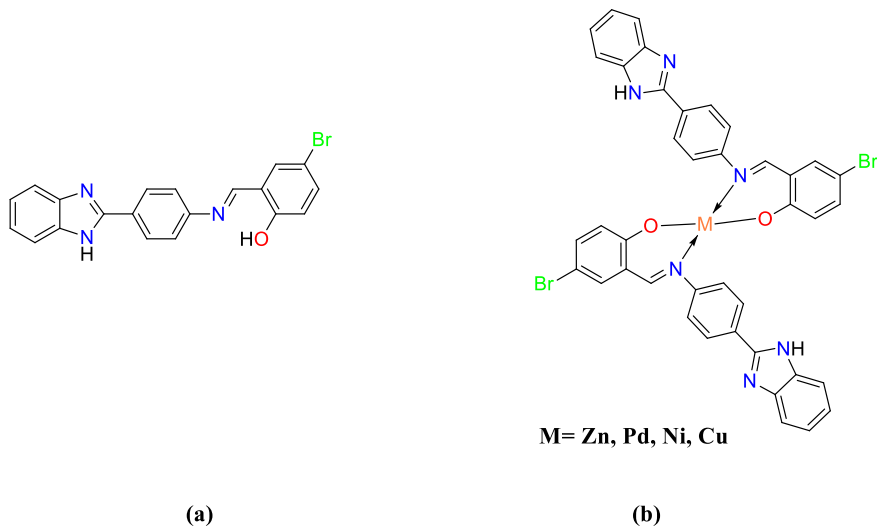
Şekil 1.62 Singla ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevleri.

Singla ve grubunun sentezlediği 4-floroanilin ve piperidin yan grubu içeren benzimidazol türevlerinin (Şekil 1.62) DNA ile etkileşimleri incelenmiştir. DNA çözeltisinin eklenmesiyle her iki bileşiğinde absorbansında azalma görülmektedir. Bu absorbans değişiminden yola çıkarak hesaplanan bağlanma sabiti değerleri 1 ve 2 bileşiği için sırasıyla $3,06 \times 10^4$ ve $3,75 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 'dir. Yapılan floresans çalışmalarında ise her iki bileşiğinde emisyon yoğunluğunda artış görülmektedir. Emisyon değişiminden hesaplanan K_{sv} değerleri ise 1 ve 2 bileşiği sırasıyla $5,46 \times 10^4$ ve $2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 'dir. Bu sonuçlar bileşiklerin DNA baz çiftleri arasına interkalasyon yapmış olabileceğini göstermektedir. Bileşiklerin bağlanma modunu daha iyi anlayabilmek için DNA'nın erime noktası değişimine de bakılmıştır. 1 ve 2 bileşiği sırasıyla DNA'nın erime noktasını 2.6°C ve 15°C arttırmıştır. Bu da 1 bileşiğinde bulunan 4-floroanilin bileşiğinin geniş hacminden dolayı 2 bileşiğinin DNA'ya daha iyi interkalasyon yaptığını göstermektedir [162].



Şekil 1.63 Farahat ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevleri.

Farahat ve grubu aromatik diamidin bileşikleri sentezlemiştir (Şekil 1.63). Aromatik diamidin bileşikleri genel olarak DNA’da A-T baz çiftlerini tercih eden oyuk bağlayıcı bileşikler olarak bilinir [164]. Bu yüzden bu bileşiklerin poli(dA-dT) zincirine afinitesi erime noktası değişimi çalışmasıyla belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun nedeni oyuk bağlayıcı bileşiklerin genelde DNA üzerinde A-T zengin bölgeleri tercih etmesidir. Bileşiklerinin A-T’den zengin olan zincirin erime noktasını değiştirmesi sırasıyla 29, 30 ve 27 °C olarak belirlenmiştir. Bu değerler A-T seçiciliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca CD ile de bileşiklerin oyuk bağlayıcı olarak DNA’ya bağlandıkları desteklenmiştir [165].



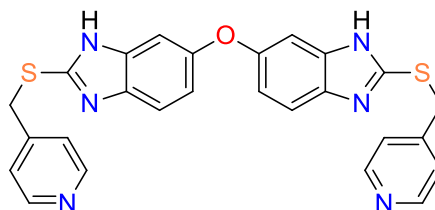
Şekil 1.64 Mahmood ve grubu tarafından sentezlenen a) Benzimidazol ligantı ve b) Ligantın metal kompleksleri..

Mahmood ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada benzimidazol ve Schiff bazı içeren ligant ve onun metal (Zn(II), Pd(II), Ni(II) ve Cu(II)) komplekslerini sentezleyerek (Şekil 1.64) DNA etkileşimlerini incelemişlerdir. DNA etkileşimlerini anlayabilmek için, UV-Vis absorpsiyon ve DNA'nın erime noktası değişimi çalışmalarından faydalanmışlardır [166].

Çizelge 1.3 Mahmood ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin ayrıntılı UV titrasyon sonuçları.

Bileşikler	$\Delta T_m (C^\circ)$	$K_b \times 10^5 (M^{-1})$	İzosbestik nokta (nm)
Ligant	3,3	1,47	338
Zn(II) Kompleksi	3,2	0,98	346
Pd(II) Kompleksi	2,3	0,6	-
Ni(II) Kompleksi	3,2	0,95	347
Cu(II) Kompleksi	2,8	0,31	353
Proflavin		1,6	

Ligant ve metal kompleksleri DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlandığı bilinen proflavin bileşiğiyle karşılaştırılmıştır. Bileşikler DNA ile titre edilerek bağlanma sabitleri ölçülmüştür. Absorpsiyon ölçümlerinde bileşik üzerine DNA eklendikçe bileşiklerde hipokromizm, bir miktar batokromizm ve Pd(II) kompleksi hariç diğer bileşiklerde izobestik nokta oluşmuştur. Görüldüğü gibi ligant DNA'ya komplekslerden daha iyi bağlanmaktadır. ligant ve Zn(II) kompleksinin daha iyi bağlanma nedeni Zn(II) kompleksinin tetrahedral geometrisinden dolayı ligantın bir kısmı DNA baz çiftleri arasına girerken diğer kısım dik olarak DNA fosfat grupları ile farklı etkileşimlerde bulunabileceği içindir. Cu(II) ve Ni(II)'nin kare düzlem geometrisi bir ligantın araya girmesine olanak sağlarken diğer ligantın farklı etkileşimler yapmasına izin vermez. Bu yüzden bağlanma sabitleri daha düşüktür. En düşük bağlanma sabitine sahip olanlar ise Cu(II) ve Pd(II) kompleksleridir. DNA'nın erime noktasını en az değiştiren Cu(II) ve Pd(II) kompleksleri olduğu için sonuçlar birbirini desteklemektedir [166].

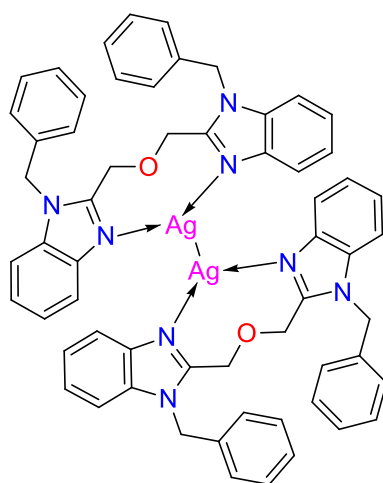


Şekil 1.65 Wang ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevi.

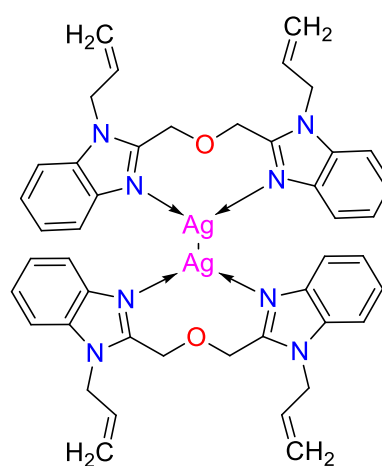
Wang ve arkadaşlarının sentezlediği 1 adlı (Şekil 1.65) bileşiği oyuk bağlayıcı olarak bilinen Hoechst-33258 ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma yapabilmek için Hoechst-33258 ve bileşiğin UV-Vis absorpsiyon spektrumları kaydedilerek bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. Hoechst-33258 ve bileşiğin DNA çözeltisi eklendikçe absorbansında hipokromizm gözlenmiştir. Hipokromizm değişimi sırasıyla % 69 ve % 65’dir. Hoechst-33258 ve bileşik için bağlanma sabitleri ise sırasıyla $7,3 \times 10^3$ ve $6,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ [161]. Görüldüğü gibi DNA bağlanma derecesi Hoechst-33258 ile oldukça yakındır. Ayrıca bileşiğin HT-60, HeLa ve U937 (rahim ağzı, meme ve lösemi kanseri hücreleri) kanser hücrelerine etkileri de Hoechst-33258, 5-FU ve Pakliteksal ile karşılaştırılarak araştırılmıştır (Çizelge 1.4). Bileşik Hoechst-33258 ve 5-FU ya göre daha düşük derişimlerde kanser hücrelerine etki göstermiştir. Ancak oldukça etkili bir antikanser ilacı olan Pakliteksal sentezlenen bileşikten yaklaşık 100 kat daha etkilidir.

Çizelge 1.4 Wang ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkisi.

Bileşikler	IC ₅₀ (μM)		
	HL60	HeLa	U937
1	9,41	5,95	5,58
Hoechst-33258	15,62	24,56	31,36
5-FU	1823	16,59	13,80
Pakliteksal	0,004	0,007	0,005



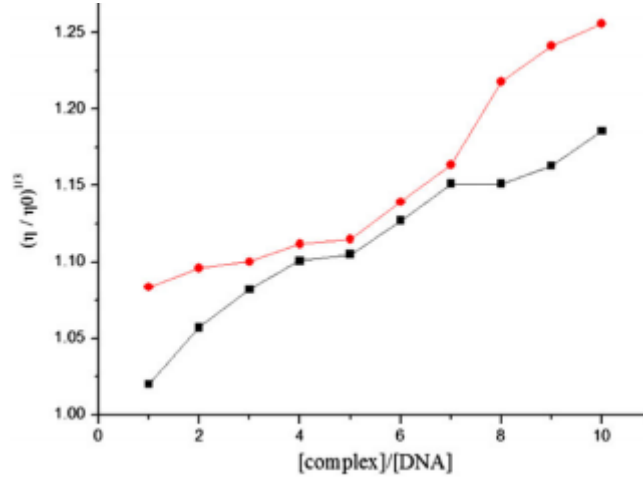
1



2

Şekil 1.66 Mao ve grubu tarafından sentezlenen Gümüş kompleksleri.

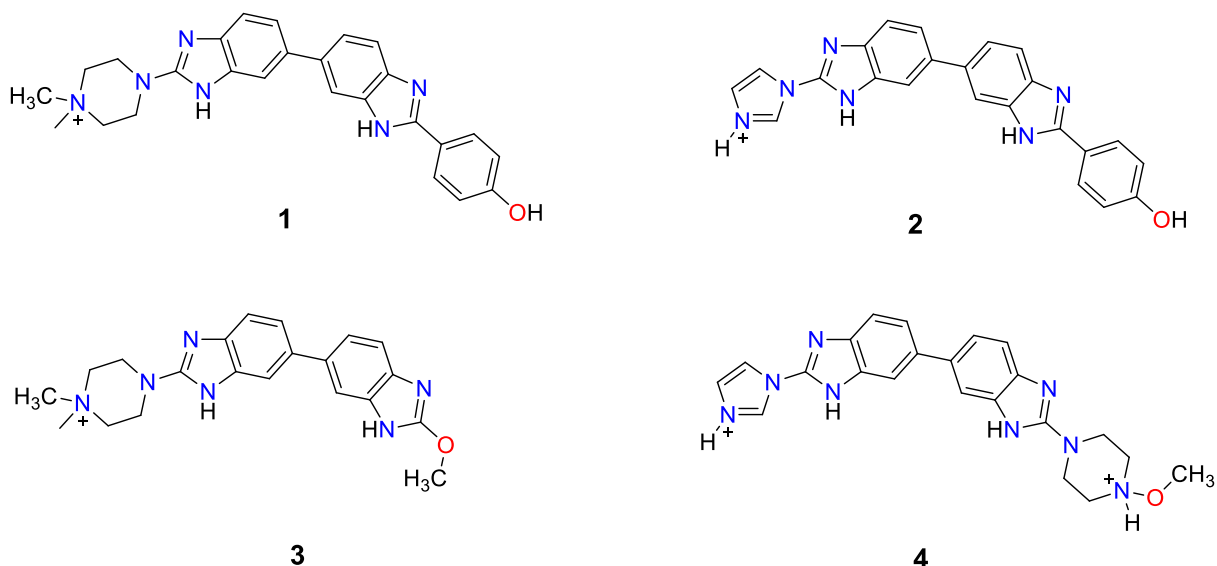
Mao ve grubu tarafından sentezlenmiş olan gümüş bileşiklerinin DNA (Şekil 1.66) bağlanma modları UV-Vis, yarışmalı floresans ve viskozite ile araştırılmaya çalışılmıştır [167]. Bileşiklerin üzerine DNA eklenmesiyle gerçekleştirilen UV-Vis titrasyon çalışmasında bileşik 1 ve 2 için % 38 ve % 68 hipokromizm gözlenmiştir. Buradan hesaplanan bağlanma sabiti değerleri ise, sırasıyla 1 ve 2 için, $6,3 \times 10^5$ ve $7,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ dir. EtBr ile yapılan yarışmalı titrasyon sonuçları ise interkalasyon yapan bileşiklerin K_q değerlerine göre 10 kat daha fazladır.



Şekil 1.67 Sentezlenen Gümüş komplekslerinin viskozite görüntüsü.

Komplekslerin DNA viskozitesine etkisi de incelenmiştir (Şekil 1.67). Komplekslerin her ikisi de DNA'nın viskozitesini interkalasyon yapan bileşikler gibi arttırmışlardır.

Sonuçlardan görüldüğü gibi 2 kompleksi DNA'ya daha kuvvetli bağlanmaktadır. Bu metalin şelatlama etkisi nedeniyle komplekslerin düzlemselliğinin değişmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca 1'de bulunan fenil halkalarının serbest hareket kabiliyeti düzlemselliği bozuyor olabilir [167].



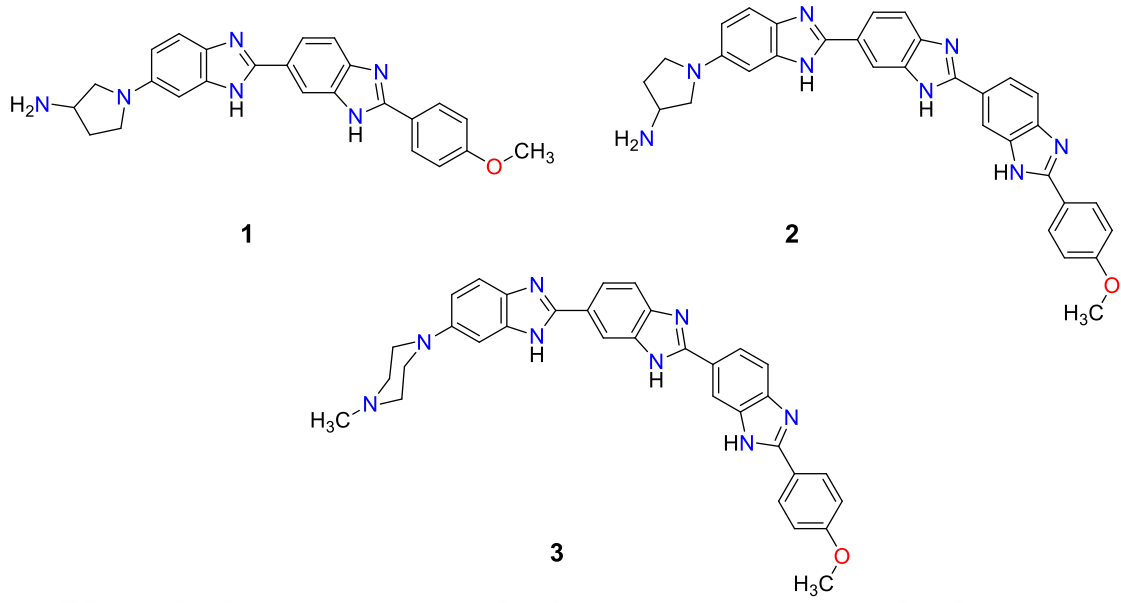
Şekil 1.68 Bostock-Smith ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevleri.

Bostock-smith ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevleri (Şekil 1.68) [168], Hoechst-33258 ile benzer yapılardır. Hoechst-33258 DNA’da AT dizilerinin zengin olduğu bölgeleri tercih ederek minör oyuktan bağlanan bir bileşiktir. Bu yüzden sentezlenen bileşikler de AT dizilerinin zengin olduğu DNA ile çalışılmıştır. AT zengin DNA dizileri ile bileşiklerin UV-Vis ve erime noktası değişimleri ölçülmüştür (Çizelge 1.5).

Çizelge 1.5 Bostock-Smith ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin ayrıntılı UV titrasyon ve erime noktası değişimi sonuçları.

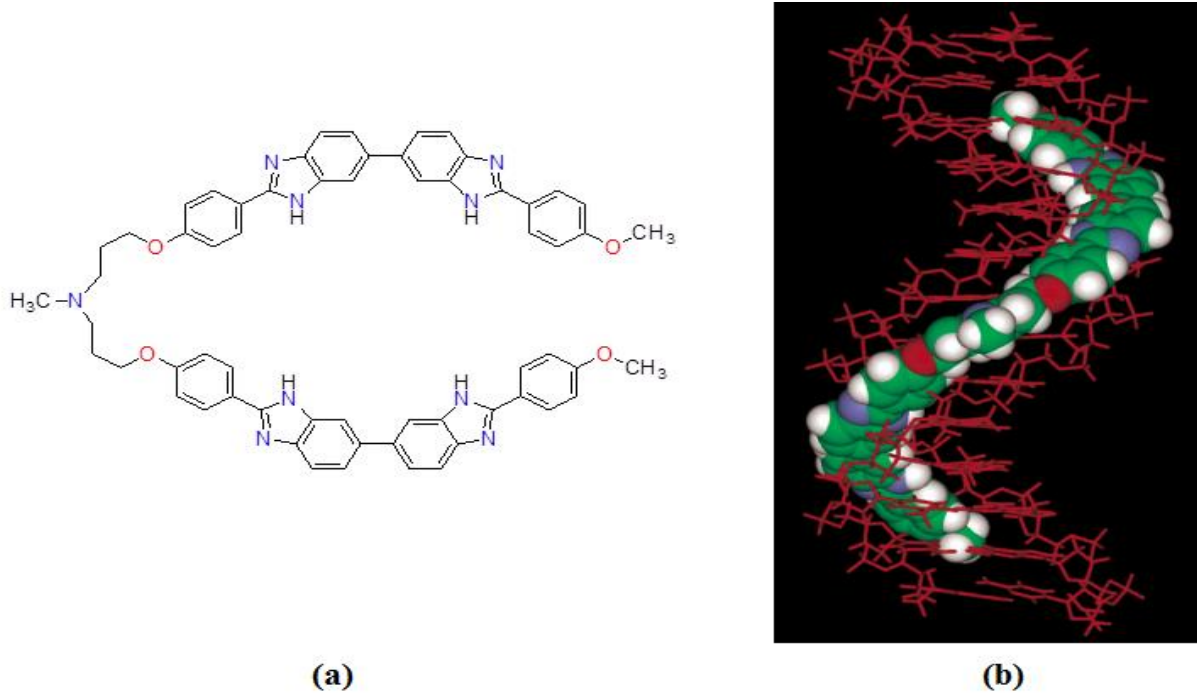
Bileşikler	$K_b \times 10^8 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$T_m \text{ (}^\circ\text{C)}$
1	3,6	15,5
2	0,5	17,6
3	4,2	15,3
4	0,06	20,1

Ayrıca çeşitli pH 5-6 değerlerinde de K_b hesaplamaları yapılmıştır. D bileşiği hariç diğer bileşiklerin pH azaldıkça K_b değerleri de azalmıştır. Ancak 4 bileşiğinin K_b değeri pH: 6 iken on kat artmıştır. Bundan sonraki pH değişimleri bileşiğin bağlanma sabitini kayda değer biçimde etkilememiştir. 4 bileşiğinin pH 6’da DNA’ya daha iyi bağlanıyor olması molekülün bu pH’da dikatyonik yapıya ulaşmasından kaynaklanıyor olabilir [168].



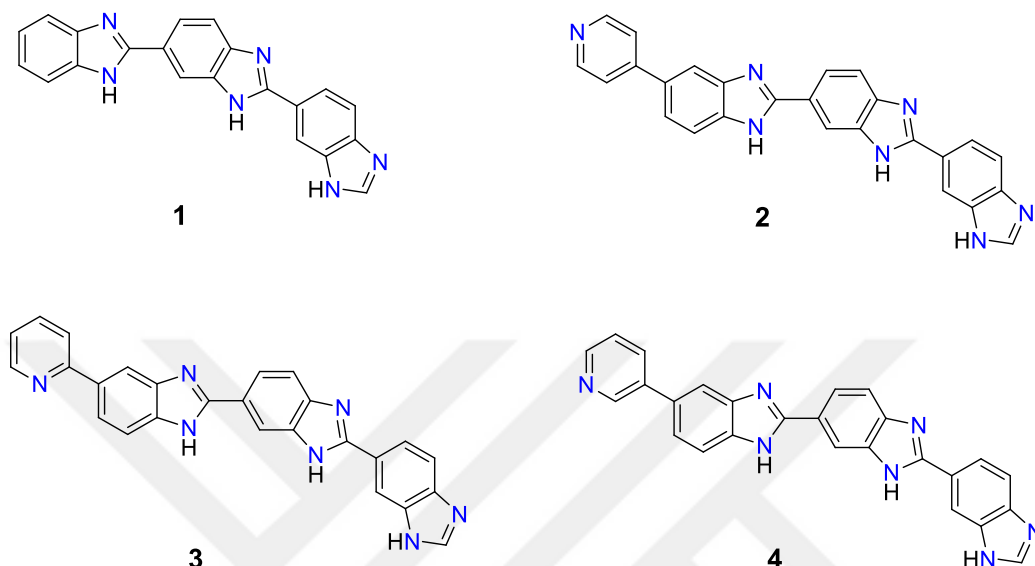
Şekil 1.69 Chessari ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevleri.

Chessari ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerden Şekil 1.69, 1 de gösterilen bileşik oyuk bağlayıcı olarak bilinen bir bileşiktir. Bu bileşik referans alınarak bileşiklerin LD spektrumları kaydedilmiştir. Burada kaydedilen spektral değişiklikler iki bileşikte oyuk bağlayıcı olarak bağlandığını göstermektedir. Ancak hangi oyuğu tercih ettiği bu yöntemle belirlenememiştir. Ancak bileşiklerin minör oyuk bağlayıcı Hoechst-33258 ile benzerlikleri göz önüne alınırsa minör oyuğu tercih etmiş olabilecekleri söylenebilir [169].



Şekil 1.70 Joubert ve grubu tarafından sentezlenen a) bis-benzimidazol türevi ve b) moleküler modelleme çalışması.

Joubert ve grubu Molekül modelleme çalışmaları ile DNA minör oyuğa yerleşebilecek dört imidazol gruplu bir yapı tasarlanabileceği düşünülmüştür (Şekil 1.70). Merkezi pozitif yüklü azot atomuna sahip ligantın hesaplanan bağlanma enerjileri en iyi minör oyuktan bağlanabileceğini ortaya koymuştur [170].



Şekil 1.71 Aki ve grubu tarafından sentezlenen ter-benzimidazol türevleri.

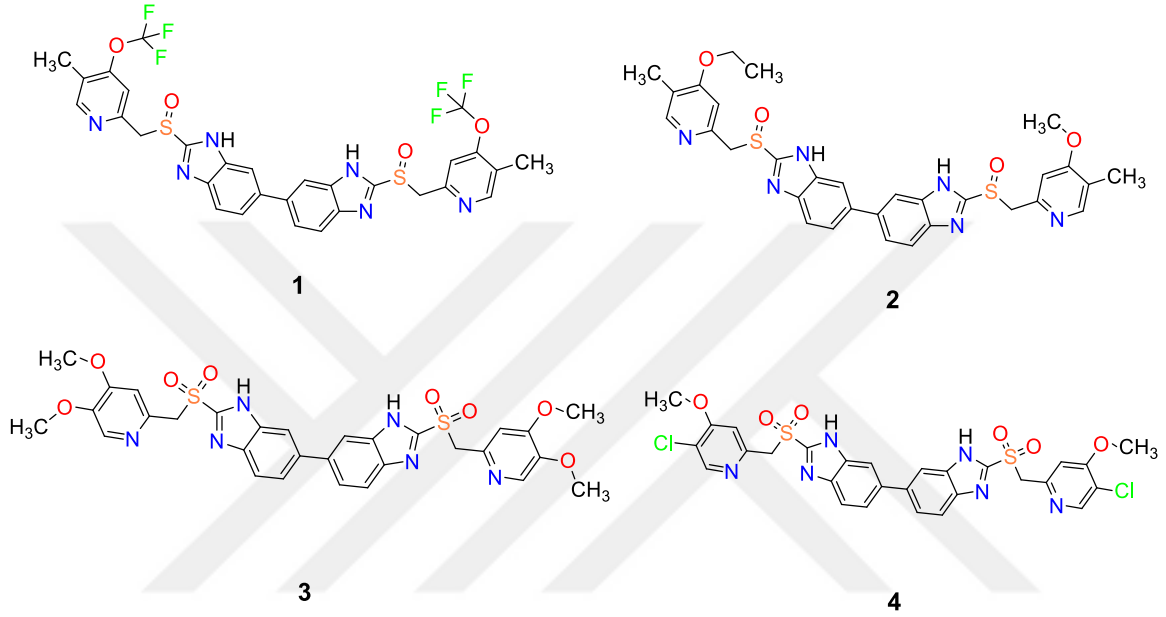
Aki ve çalışma grubu tarafından sentezlenip (Şekil 1.71) çalışılan ter-benzimidazol türevleri çeşitli kanser hücrelerine karşı ve topoizomerez I üzerine etkileri çalışılmış ve Hoechst–33342 ile karşılaştırılmıştır [171].

Çizelge 1.6 Aki ve gurubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkileri.

Bileşikler	Topoizomerez I	IC ₅₀ (μM)			
		RPMI	CPT-K5	KB-3-1	KBV-1
1	1	>25	>25	ND	ND
2	3,3	0,16	5,8	0,05	0,09
3	2	0,035	2,5	0,02	0,02
4	2	0,035	2,5	0,02	0,01
Hoechst-33342	1	0,03	0,9	0,01	1,2

Hoechst–33342 topoizomerez I'i düşük konsantrasyonlarda inhibe edebilmektedir. Ayrıca çeşitli kanser hücrelerine karşı düşük sitotoksiste göstermektedir (Çizelge 1.6). Bileşiklerde ter-benzimidazol yapısına piridin halkasının farklı pozisyonlarda bağlanmasıyla kanser hücrelerine karşı etkilerinde değişiklikler gözlenmiştir. 1 bileşiği RPMI ve CPT-K5 (Deri ve akut

lösemi) hücre hattı için diğer bileşiklere daha fazla toksik olmasına rağmen KB3–1 ve KBV–1 (akciğer ve karaciğer) hücre hattı için toksisite gözlenmemektedir. Bu hücrelere karşı Hoechst-3342’den daha iyi anti-kanser bileşiği olduğu söylenebilir. Çalışılan tüm hücrelere karşı en toksik olan bileşik **b** bileşiğidir. Diğer hücrelerde toksisite değerlerinin farklılık göstermesi piridin halkasının bağlanma konumunun farklılığının hücreler üzerine farklı şekilde etki gösterdiğini göstermektedir [171].

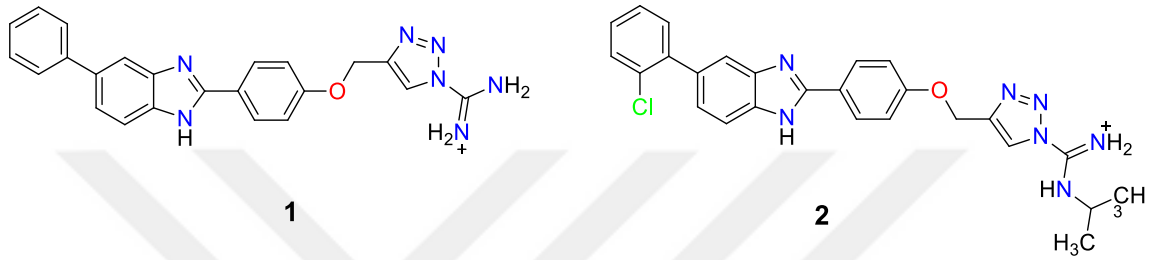


Şekil 1.72 Cheng ve grubu tarafından sentezlenen bis-imidazol türevleri.

Cheng ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin (Şekil 1.72) rahim ağzı ve mide kanser hücrelerine karşı aktiviteleri ölçülmüştür. Ölçülen değerler cis-platin ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 1.7). Cis-platin düşük konsantrasyondan itibaren kanser hücrelerinin ölümünü sağlamaktadır. Bileşiklerin yan grupları değiştikçe eklenen Flor, Klor gibi gruplar kanser hücreleri üzerine daha fazla etkili olmaktadır. Bu Flor ve Klorun DNA bazlarıyla etkileşimi artırarak daha güçlü bağlanmış olabileceği düşündürmektedir. Ancak dört bileşikte cis-platin kadar etkili değildir. Ayrıca bileşik 1 ve 2 için yapılan molekül modelleme çalışmalarında bileşiklerin oyuk bağlayıcı olarak DNA’ya A-T dizilerini tercih ederek bağlandığı görülmüştür [172].

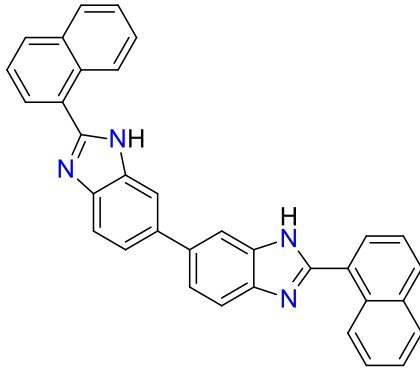
Çizelge 1.7 Cheng ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkileri.

Bileşikler	IC ₅₀ (μM)	
	HeLa	BGC-823
1	2,3	>100
2	>100	>100
3	30,9	>100
4	10,2	67,9
Cis-Platin	1,6	1,3

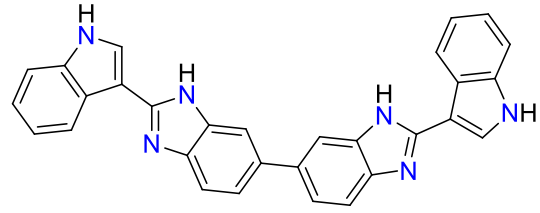


Şekil 1.73 Bistrovic ve grubu tarafından sentezlenen benzimidazol türevleri.

Bistrovic ve grubu tarafından sentezlenen bileşikler (Şekil 1.73) UV-Vis ve erime noktası değişimi gibi tekniklerle çalışılmıştır. Bileşiklerin UV-Vis titrasyon çalışmalarında karışık baz dizileri içeren DNA, A-T zengin DNA ve G-C dizileri zengin DNA ile çalışılmıştır. Bu çalışmalarda her üç farklı DNA dizisine en iyi bağlanan b bileşiğidir. Ancak her iki bileşiğinde yapılan titrasyon çalışmalarında A-T zengin DNA dizileri ile bağlanma kuvvetleri düşerken G-C zengin diziler ile yapılan çalışmalarda bağlanma kuvvetleri karışık dizi içeren DNA'ya göre artmıştır. Bileşikler DNA bağlanmalarının yanı sıra gram pozitif ve negatif bakteriler üzerine etkileri de araştırılmıştır. 1 ve 2 bileşiği gram negatif bakteriler üzerine düşük etki göstermelerine rağmen, 2 bileşiği gram pozitif bakteriler üzerine referans alınan antibiyotiklerden daha iyi etki göstermektedir. Bu 2 bileşiğinin yapısında bulunan klor atomunun DNA'ya bağlanma kuvvetini arttırmasından kaynaklanmaktadır [173].



1



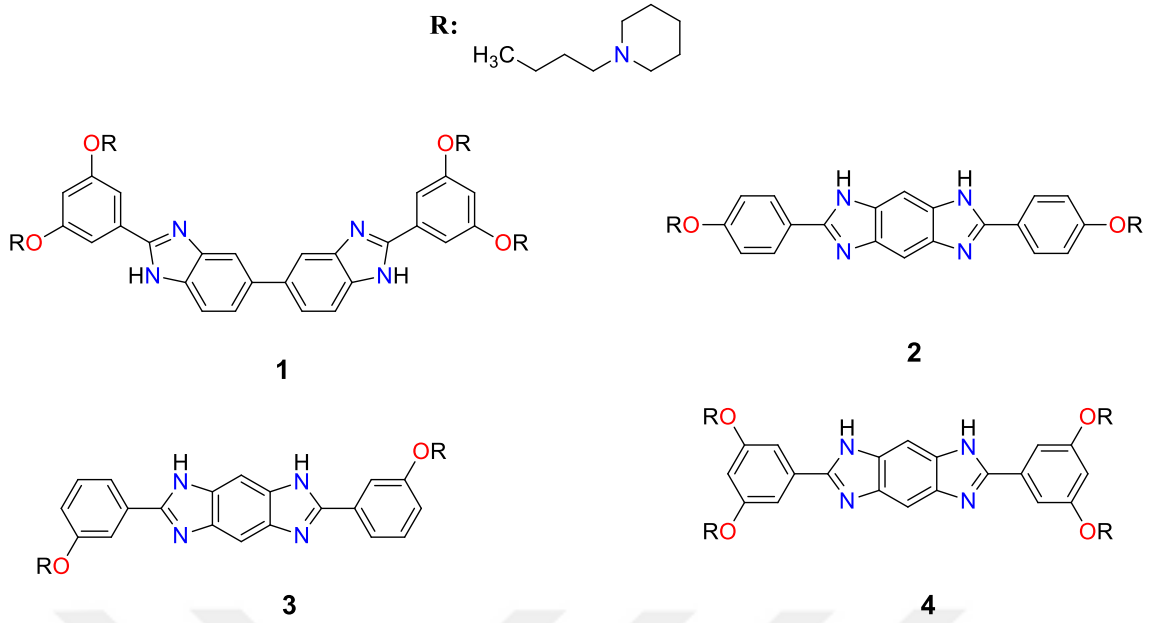
2

Şekil 1.74 Özkay ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevleri.

Özkay ve grubu bir dizi bis-benzimidazol türevi sentezlemiş (Şekil 1.74), HT-29 ve MCF-7 (kolon ve meme kanseri) kanser hücrelerine etkilerini araştırmışlardır. Sentezlenen bileşikler arasında en iyi etki gösteren naftalen yan grulu bileşiktir (Çizelge 1.8). Naftalen yan grubu içeren bileşik aromatikliğin daha fazla olması sebebiyle, indol yan grubu içeren türeve göre her iki kanser türüne karşı daha fazla sitotoksosite gösterdiği görülmektedir [174].

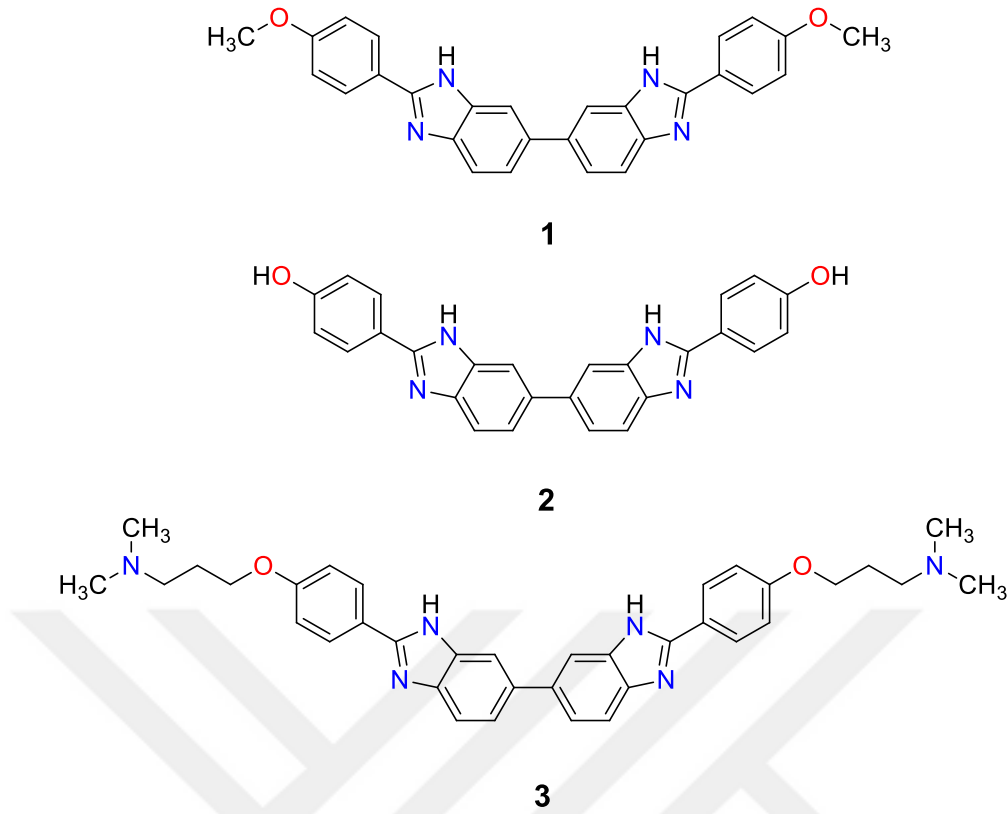
Çizelge 1.8 Özkay ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkileri.

Bileşikler	IC ₅₀ (µM)	
	HT-29	MCF-7
1	9,5	4,1
2	8,5	190,9
Cis-Platin	1,7	2,6



Şekil 1.75 Huang ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol ve benzo-bisimidazol türevleri.

Sentezlenen bis-benzimidazol ve benzo-bisbenzimidazol yapıları ds-DNA ve G-DNA ile çalışılmıştır (Şekil 1.75). G-DNA insan telomer bölgelerinin sonunda transkripsiyonu düzenleyici genlerden oluşan Guanince zengin bir yapıdır. G-DNA'ya bağlanan bileşikler telomeraz aktivitesinin bloke ederek kanser hücrelerine etki etmektedir. G-DNA'ya seçici olarak bağlanan bileşikler önemli anti-kanser bileşikler olarak değerlendirilebilir. Bis-benzimidazol türevi benzo-bisbenzimidazol türevlerine göre ds-DNA'ya G-DNA'ya göre daha kuvvetli bağlanmaktadır. Bis-benzimidazol türevleri ds-DNA üzerinde A-T zengin bölgeleri tercih ederek minör oyuktan DNA'ya bağlandıkları için, G-DNA'ya seçicilik göstermemektedir [175].

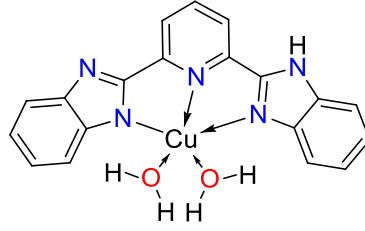


Şekil 1.76 Neidle ve grubu tarafından sentezlenen bis-benzimidazol türevleri.

Neidle ve grubu bir dizi bis-benzimidazol türevi sentezlemiş (Şekil 1.76) ve bu türevlerin yumurtalık kanser hücrelerine etkileri araştırılmıştır. Bileşiklerin yumurtalık hücrelerine etkileri hoechst-33258 ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 1.9). Hoechst-33258'in bu hücrelere karşı sitotoksitesi sentezlenen bileşiklere göre oldukça yüksektir. C bileşiği tüm kanser hücrelerine karşı yaklaşık 0,2 μM gibi bir değerde etki gösterebilmiştir. Bu yapıdaki azot atomlarının protonlanabilme kapasitesiyle ilgili olduğu söylenebilir [176].

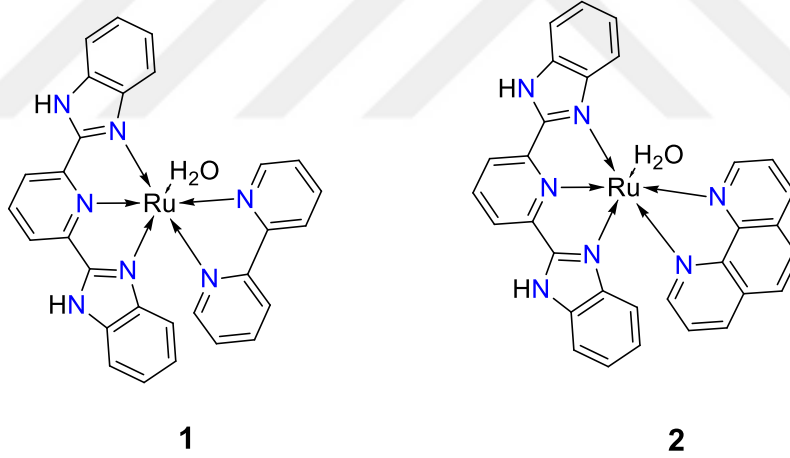
Çizelge 1.9 Neidle ve grubu tarafından sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine etkisi.

Bileşikler	IC ₅₀ (μM)			
	A2780	A2780cisR	CH1	SKOV-3
1	13,5	5,1	3,8	16,5
2	4,3	2,7	1,05	16,0
3	0,235	0,115	0,24	0,375
Hoechst-33258	12,0	9,5	26,5	>100



Şekil 1.77 Chattopadhyay ve grubu tarafından sentezlenen bakır kompleksi.

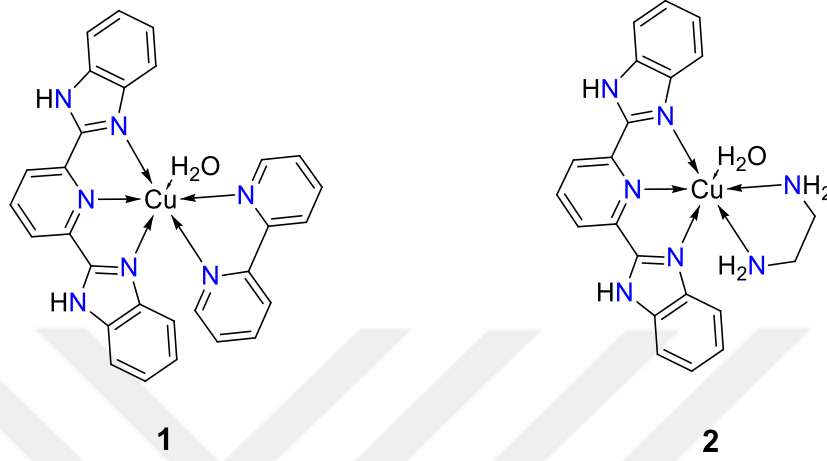
Chattopadhyay ve çalışma grubu 2,6- bis-(benzimidazo)piridin bakır kompleksi sentezleyerek (Şekil 1.77) DNA etkileşimlerini UV-Vis ve Floresans teknikleri kullanarak incelemişlerdir. Bileşik üzerine artan DNA çözeltisi eklendikçe 330 nm’de hiperkromizm gözlenmektedir. Absorbans değişiminden yararlanılarak hesaplanan bağlanma sabiti değeri $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu değer klasik interkalatörlerden ziyade oyuk bağlayıcı moleküller ile özdeşleşmektedir. Ayrıca interkalatör olarak bilinen EtBr ile yapılan yarışmalı floresans çalışmalarında da EtBr’yi yerinden çıkaramaması oyuk bağlayıcı olabileceğini desteklemektedir [177].



Şekil 1.78 Nair ve grubu tarafından sentezlenen Rutenyum kompleksleri.

Nair ve grubu bipiridin ve fenantrolin yan gruplu iki bis-benzimidazol Rutenyum kompleksi sentezlemişlerdir (Şekil 1.78). Sentezlenen bileşiklerin DNA bağlanma modları, yarışmalı floresans, viskozite ve agaroz jel ile çalışılmıştır. Floresans çalışmalarında her iki bileşik üzerine DNA eklendikçe emisyon yoğunluğunda azalma gözlenmiştir. Bu spektral değişiklikten hesaplanan bağlanma sabitleri ise (K_{sv}) $1,33 \times 10^4$ ve $6,55 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Viskozite çalışmaları ise interkalasyon yapan EtBr referans olarak yapılmıştır. Bileşiklerin DNA viskozitesine etkileri EtBr ile benzerdir. Bu da bileşiklerin EtBr gibi

interkalasyon yapmış olduğunu göstermektedir. 2 bileşiği 1'e göre DNA'ya biraz daha iyi bağlanmasının sebebi fenantrolin halkası ile DNA baz çiftleri arasında yük geçişinin daha fazla olmasıdır. Molekül modelleme çalışmaları ise bileşiklerin minör oyuk üzerinden interkalasyon (kısmi interkalasyon) yapmış olabileceğini göstermektedir [178].



Şekil 1.79 Sunita ve grubunun sentezlediği bakır kompleksleri.

Rutenyum metali içeren bis-benzimidazol türevlerinin DNA etkileşimin iyi sonuçlar vermesi ile Sunita ve grubu da bakır tabanlı türevler sentezlemişlerdir. Bileşiklerin UV-Vis absorpsiyon özellikleri, bileşikler üzerine DNA eklendikçe absorbandsa azalma ve izobestik noktalar oluşmuştur. Buradan hesaplanan bağlanma sabiti değerleri (K_b), (Şekil 1.79) 1 ve 2 için sırasıyla, $1,4 \times 10^4$ ve $1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 'dir. Floresans değişimi ise iki kompleksin de hiperkromizm yönündendir. EtBr ile yapılan yarışmalı floresans çalışmasında hesaplanan K_{sv} değerleri ise sırasıyla $2,1$ ve $2,00 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 'dir. EtBr referans olarak kullanılarak yapılan viskozite değişimlerinde ise bileşikler DNA'nın viskozitesini artırmıştır. Tüm bu sonuçlar bileşiklerin interkalasyon yoluyla DNA'ya bağlandığını göstermektedir [179].

Tüm bu literatür araştırmasından sonra benzimidazol ve imidazopridin içeren bileşiklerin DNA'ya iyi bağlanan bileşikler olduğu görülmüştür. Ayrıca Hoechst-33258'in de DNA'ya bağlanarak antikanser etki gösteren bir bileşik olmasından dolayı bu tezde benzimidazol ve imidazopridin yan grubu içeren bileşikler sentezlenerek DNA etkileşimleri araştırılmıştır.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOD

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Çözücü ve kimyasallar

Bütün kimyasallar ve çözücüler analitik derecede ve saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. Reaksiyonlarda ve etkileşimlerde kullanılacak bütün sulu çözeltilerin hazırlanmasında Milli-Q su saflaştırma ünitesi kullanılmıştır. DNA etkileşim çalışmalarında pH = 7,5 olan 10 mM KCl-Tris tampon kullanılmıştır

Bu çalışmada kullanılan, İmidazo(1,2-*a*)piridin-8-karbaldehit (%99), o-fenilendiamin (%99,5), 3,3 diaminobenzidin (%99), KCl, ve eter Aldrich firmasından, etanol, kloroform Merck firmasından temin edilmiştir.

DNA;

DNA (Aldrich firmasından alınan sığır timüsünden izole edilmiş, liyofilize sodyum tuzu, yüksek oranda polimerize-D1502) saf su içerisinde (50 mM pH = 7,5 tampon çözeltide) 24 saat bırakılıp çözülerek 3 mM stok çözeltisi her defasında taze olarak hazırlanmıştır. DNA konsantrasyonu Beer-Lambert yasası (eşitlik 2.1) kullanılarak spektrofotometre ile 260 nm’de absorpsiyon okumasıyla $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. DNA ultrasonik banyoda bırakılmıştır. Stok çözelti 1 günden fazla buzdolabında saklanmamıştır. Bütün titrasyon işlemlerinde bu stok çözelti kullanılmıştır.

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \quad (2.1)$$

Elektroforez için 10xTBE tampon çözeltisi 10 kere seyreltilerek kullanılmıştır. Agaroz jel %1’lik agarozun kaynatılarak çözünmesiyle oluşan çözeltinin yavaşça soğutulmasıyla elde

edilmiştir. Jel üzerinde yürüme mesafesinin görülebilmesi için tüm karışımlara boya çözeltisi eklenmiştir. Boya çözeltisi bromofenol mavisinin %40'lık süktroz çözeltisinde çözülmesiyle elde edilmiştir. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel EtBr ile 30 d boyanmıştır. Daha sonra su ile yıkandıktan sonra DNr MiniBIS (16mm) Pro Bio-Imaging System görüntüleme cihazı kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

2.2 KULLANILAN CİHAZLAR

2.2.1 Infrared Spektrofotometresi: Jasco FT/IR-300 E

2.2.2 ¹H-NMR Spektrofotometresi: Bruker Ultra Shield Plus, Ultra long hold time 400MHz NMR

2.2.3 UV/Vis Spektrofotometresi: Carry VinUV 100 Bio, Varian

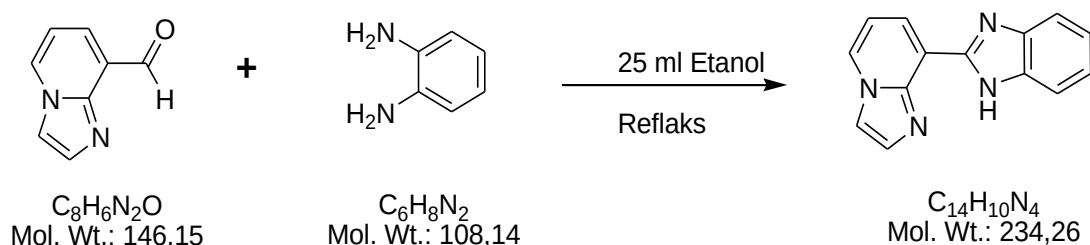
2.2.4 Floresans Spektrometresi: Perkin Elmer LS 55

2.2.5 ESI-MS: Tandem Gold

2.2.6 Jel Elektroforez: Thermo Electron Corporation EC-330 Midicell Primo

2.3 LİGANDLARIN SENTEZİ

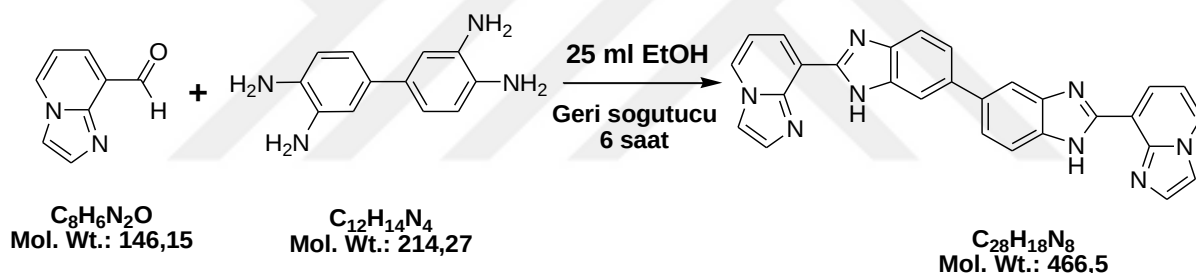
2.3.1 İmidazo(1,2-*a*)piridinil-8-benzimidazol sentezi



Şekil 2.1 İmidazo(1,2-*a*)piridinil-8-benzimidazol sentezi.

İmidazo(1,2-a)piridin-8-karbaldehit (0,5 g 3,4 mmol) ve o-fenilendiamin (0,5 g 3,4 mmol) 25 ml etanol içerisinde 18 saat boyunca geri soğutucu altında karıştırıldı (kırmızı renkli bir çözelti). Çözelti siyah renk aldıktan sonra reaksiyon sonlandırıldı ve çözeltideki etanolün fazlası uçurulduktan sonra çözeltiye su ilave edilerek çökmesi sağlandı. Çöken kısım süzülerek ayrıldı ve eter ile yıkandıktan sonra etüvde kurumaya bırakıldı (kirli sarı). 247 mg imidazo(1,2-a)piridinil-8-benzimidazol (**L1**) bileşiği %31 verimle elde edildi. E.N.= 200,1 °C. **FT-IR** (ν cm⁻¹): 3246, 3142, 3042 (N-H), 2163, 1867, 1781, 1728 (Aromatik), 1628 (C=N), 1569, 1520, 1488, 1440, 1396, 1374, 1322, 1311, 1276, 1231, 1178, 1143, 1130, 1081, 1033, 1000, 932, 908, 896, 866, 802, 772, 754, 748, 704, 675. **¹H NMR**: (400 MHz, DMSO, λ_{ppm}), 12,91 (s, 1H, H10), 8,72 (dd, 1H, H7), 8,30 (dd, 1H, H1), 8,15 (dd, 1H, H4), 7,81 (dd, 2H, H5, H6), 7,68 (dd, 1H, H9), 7,22 (t, 2H, H2, H3), 7,13 (dd, 1H, H8). **MALDI-MS**: m/z (M)= (M+H) hesaplanan 234; bulunan (M+H)= 234.

2.3.2 2,2'-bis(imidazo[1,2-a]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol Sentezi



Şekil 2.2 2,2'-bis(imidazo[1,2-a]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol sentezi.

İmidazo(1,2-a)piridin 8-karbaldehit (0,12 g 0,81 mmol) ve 3,3 diaminobenzidin (0,085 g 0,4 mmol) 25 ml etanol içerisinde 6 saat boyunca geri soğutucu altında karıştırıldı (kırmızı renkli bir çözelti). Çözelti sarı renk aldıktan sonra TLC bakılıp başlangıç maddelerinin olmadığı görülünce reaksiyon sonlandırıldı ve çözeltideki etanolün fazlası uçurulduktan sonra çözeltiye su ilave edilerek çökmesi sağlandı. Çöken kısım süzülerek ayrıldı ve eter ile yıkandıktan sonra etüvde kurumaya bırakıldı. %37 verimle 76 mg 2,2'-bis(imidazo[1,2-a]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol (**L2**) bileşiği elde edildi. E.N= 288-289 °C. **FT-IR** (ν cm⁻¹): 3070 (N-H), 1629 (C=N), 1609, 1586, 1521, 1499, 1480, 1455, 1426, 1392, 1287, 1226, 1150, 1110, 1035, 1023, 1011, 971, 911, 875, 847, 806, 779, 751, 739, 719. **¹³C NMR**: (400 MHz, DMSO, λ_{ppm}), 112,94 (C10, C25), 113,29 (C4, C21), 114,74 (C14, C27), 117,88 (C3, C20), 119,08 (C13, C26), 122,46 (C2, C19), 123,03 (C5, C22), 123,90 (C11, C12), 128,66 (C7, C17), 133,44

(C1, C18), 134,90 (C9, C24), 142,36 (C15, C28), 143,84 (C6, C23), 148,07 (C8, C16).

MALDI-MS: m/z (M)= (M+H) hesaplanan 467; bulunan (M+H)= 466.

2.4 UV TİTRASYONU

2,5 ml kompleks çözeltisi 5 mM KCI-TRIS (pH=7,5) tamponu kullanılarak UV kuvartz küvetinde hazırlandı. Absorbsiyon spektrumu kaydedildi. Üzerine 2 μ l porsiyonlar halinde aynı tamponda hazırlanan 2,5 mM DNA çözeltisi eklendi ve her seferinde pastör pipet yardımıyla karıştırılarak inkübe olması için 5 dk beklendikten sonra absorbsiyon spektrumu kaydedildi. Spektrumda değişim durana kadar titrasyona devam edildi. Elde edilen veriler grafiğe geçirilerek ligantın bağlanma sabiti hesaplandı. Ölçüm boyunca küvet ısısı 25 °C’de sabit tutuldu.

2.5 FLORESANS TİTRASYONU

2.5.1 Floresans Değişimi

2,5 ml kompleks çözeltisi 5 mM KCI-TRIS (PH=7,5) tamponu kullanılarak cam küvete hazırlandı ve uygun dalga boyunda uyarılarak emisyon spektrumu kaydedildi. Titrasyon için, 2 μ l porsiyonlar halinde aynı tamponda hazırlanan 2,5 mM DNA çözeltisi eklendi ve her seferinde pastör pipet yardımıyla karıştırılarak inkübe olması için 5 dk beklendikten sonra emisyon spektrumu kaydedildi. Spektrumda değişim durana kadar titrasyona devam edildi. Elde edilen verilerden bağlanma sabiti hesaplandı. Ölçüm boyunca küvet ısısı 25 °C’de sabit tutuldu.

2.5.2 EtBr ile Yarışmalı Floresans Çalışması

Yarışmalı floresans çalışması için, 5 mM KCI-TRIS (PH=7,5) tamponunda hazırlanan EtBr çözeltisi 2,5 ml 20 μ M olacak şekilde cam küvette hazırlandı. 543 nm dalga boyunda uyarıldı ve 550–750 nm arasında emisyon spektrumu kaydedildi (slit=2,5–2,5). Daha sonra EtBr çözeltisine aynı tamponda hazırlanan 100 μ M DNA çözeltisi ilave edildi ve etkileşim için 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 30 dk sonunda 543 nm dalga boyunda uyarılarak emisyon spektrumu kaydedildi. Üzerine aynı tamponda hazırlanan 10 μ L porsiyonlar halinde 1mM kompleks çözeltisi eklenerek inkübasyon için 5 dk beklendikten sonra spektrum kaydedildi.

Spektrumda değişim durana kadar titrasyona devam edildi. Ölçüm boyunca küvet ısısı 25 °C’de sabit tutuldu.

2.5.3 DAPI ile Yarışmalı Floresans Çalışması

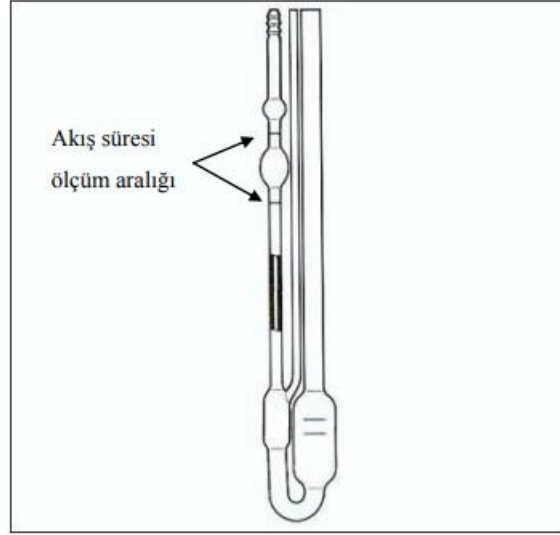
DAPI ile yarışmalı floresans çalışması için, 5 mM KCI-TRIS (PH=7,5) tamponunda hazırlanan DAPI çözeltisi 2,5 ml 1 µM olacak şekilde cam küvette hazırlandı. 350 nm dalga boyunda uyarıldı ve 380–620 nm arasında emisyon spektrumu kaydedildi (slit=4–4). Daha sonra DAPI çözeltisine aynı tamponda hazırlanan 6 µM DNA çözeltisi ilave edildi ve etkileşim için 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve emisyon spektrumu kaydedildi. Üzerine 10 µL porsiyonlar halinde 1mM kompleks çözeltisi eklenerek inkübasyon için 5 dk beklendikten sonra spektrum kaydedildi. Spektrumda değişim durana kadar titrasyona devam edildi. Ölçüm boyunca küvet ısısı 25 °C’de sabit tutuldu.

2.5.4 Hoechst 33258 ile Yarışmalı Floresans Çalışması

Hoechst ile yarışmalı floresans çalışması için, 5 mM KCI-TRIS (PH=7,5) tamponunda hazırlanan Hoechst çözeltisi 2,5 ml 1,25 µM olacak şekilde cam küvette hazırlandı. 365 nm dalga boyunda uyarıldı ve 370–640 nm arasında emisyon spektrumu kaydedildi (slit=2,5–2,5). Daha sonra Hoechst çözeltisine aynı tamponda hazırlanan 12,5 µM DNA çözeltisi ilave edildi ve etkileşim için 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve emisyon spektrumu kaydedildi. Üzerine 10 µL porsiyonlar halinde 1mM kompleks çözeltisi eklenerek inkübasyon için 5 dk beklendikten sonra spektrum kaydedildi. Spektrumda değişim durana kadar titrasyona devam edildi. Ölçüm boyunca küvet ısısı 25 °C’de sabit tutuldu.

2.6 VİSKOZİTE ÇALIŞMASI

Vizkozimetri çalışmasında Ubbelohde vizkozimetresi kullanıldı (Şekil 2.3). Digital su banyosu sıcaklığı 30 °C ayarlandı.



Şekil 2.3 Ubbelohde vizkozimetresi.

Ölçümünde kullanmak için KCI-TRIS tamponu içerisinde 12 ml 100 μ M DNA ve 2 mM kompleks çözeltisi hazırlandı. İlk olarak DNA çözeltisi kolona eklendi ve dijital bir kronometre kullanılarak akış hızı süresi ölçüldü. Daha sonra kompleks çözeltisinden 50 μ l'lik porsiyonlar halinde DNA çözeltisine eklendi, her eklemenin ardından karışım çalkalanarak 5dk etkileşimin tamamlanması için beklendi ve dijital kronometre yardımıyla akış hızı süresi 3 defa ölçüldü. Değişim durana kadar ölçüme devam edildi. Kaydedilen verilerin ortalaması alınarak bağıl viskozite değeri hesaplandı ve DNA derişimine karşı grafiğe geçirildi.

2.7 ERİME NOKTASI DEĞİŞİMİ

2,5 ml 60 μ M DNA çözeltisi 5 mM KCI-TRIS (pH=7,5) hazırlandı ve 35 den 100 °C'ye kadar sıcaklık arttırılarak absorbandaki değişim kaydedildi. Aynı tamponda 2,5 ml 60 μ M DNA ve 20 μ M ligant çözeltisi hazırlanarak absorbands değişimi kaydedildi. Elde edilen verilerden ligantın DNA'nın kararlılığını ne kadar etkilediği belirlendi.

2.8 AGOROZ JEL ELEKTROFOREZ ÇALIŞMASI

Agoroz jel; 1,5 gr agaroz 15 ml TBE ve 135 ml saf su içinde kaynatılıp iyice çözündükten sonra oda sıcaklığında ilk sıcaklığı geçene kadar bekletildi ve kalıp kabına döküldü. Kullanılan DNA(20 ng/ μ L plazmid DNA çözeltisi), bileşikler KCI-TRIS tamponu içinde hazırlandı.

Jele yüklenecek çözeltiler karanlık ortam ve DNA nötralizasyon deneyleri için: 10 µl plazmid DNA + 10 µl bileşik,

Hidrojen peroksit deneyleri için, 10 µl plazmid DNA + 8 µl bileşik ve 2 µl H₂O₂.

Hazırlanan çözeltiler 1 saat karanlıkta 38 °C’de inkübe edildi. İnkübe işlemi bittikten sonra her çözeltiye 5 µl bromo fenol mavisi boya eklenip iyice karıştırıldıktan sonra çözeltilerden 10 µl alınarak teker teker jele ekildi. 35 Voltta 180 dakika yürütüldükten sonra jel EtBr içinde (5 mg/ml etidyum bromürün 30 µl’si 500 ml suya eklenerek hazırlanmıştır.) 30 dk boyandı ve 30 dk EtBr’nin fazlası alınması için saf su içinde bekletildikten sonra fotoğrafı çekildi.



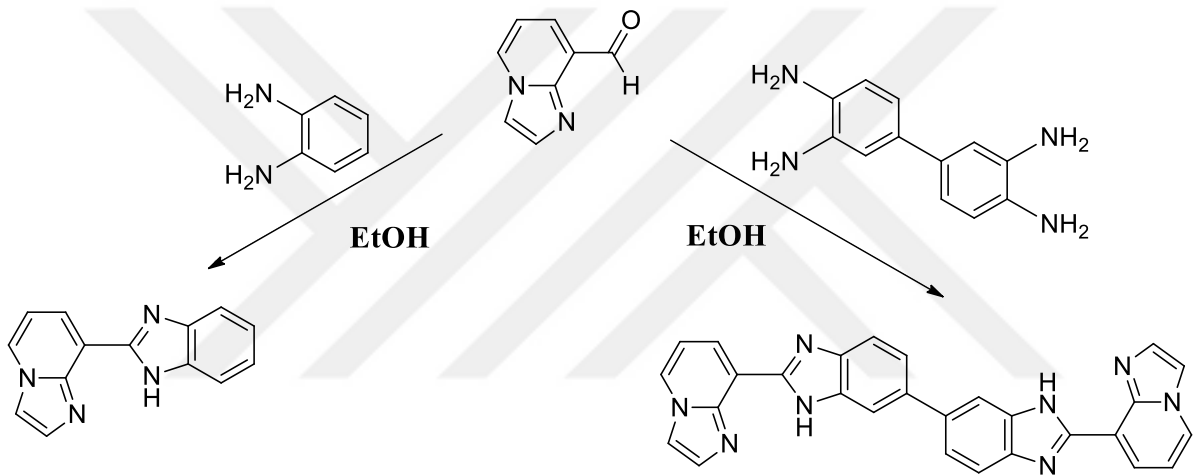


BÖLÜM 3

SONUÇLAR

3.1 SENTEZ

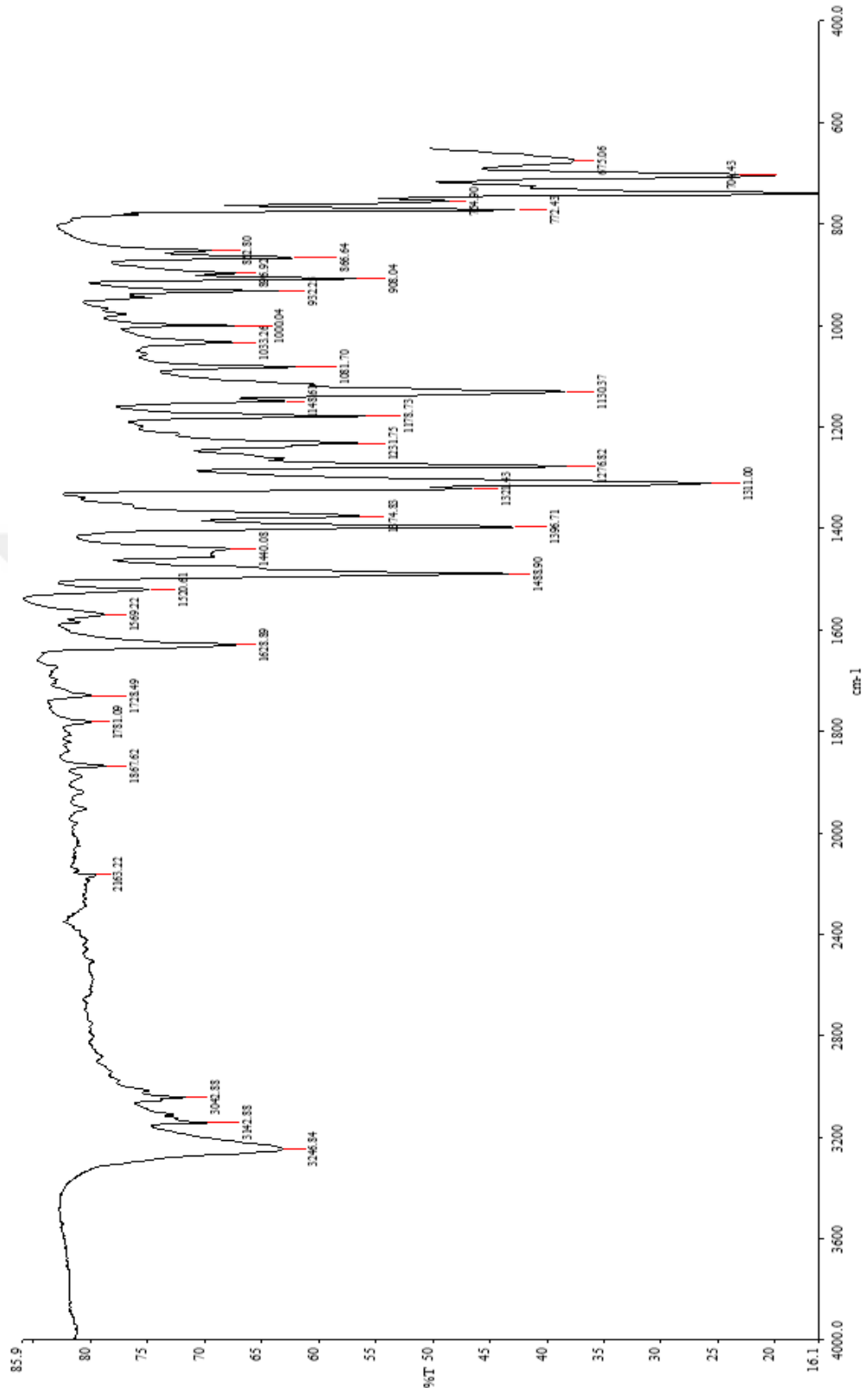
İmidazo(1,2-*a*)piridin türevleri (**L1** ve **L2**) aşağıdaki şemaya uygun olarak sentezlenmiştir.



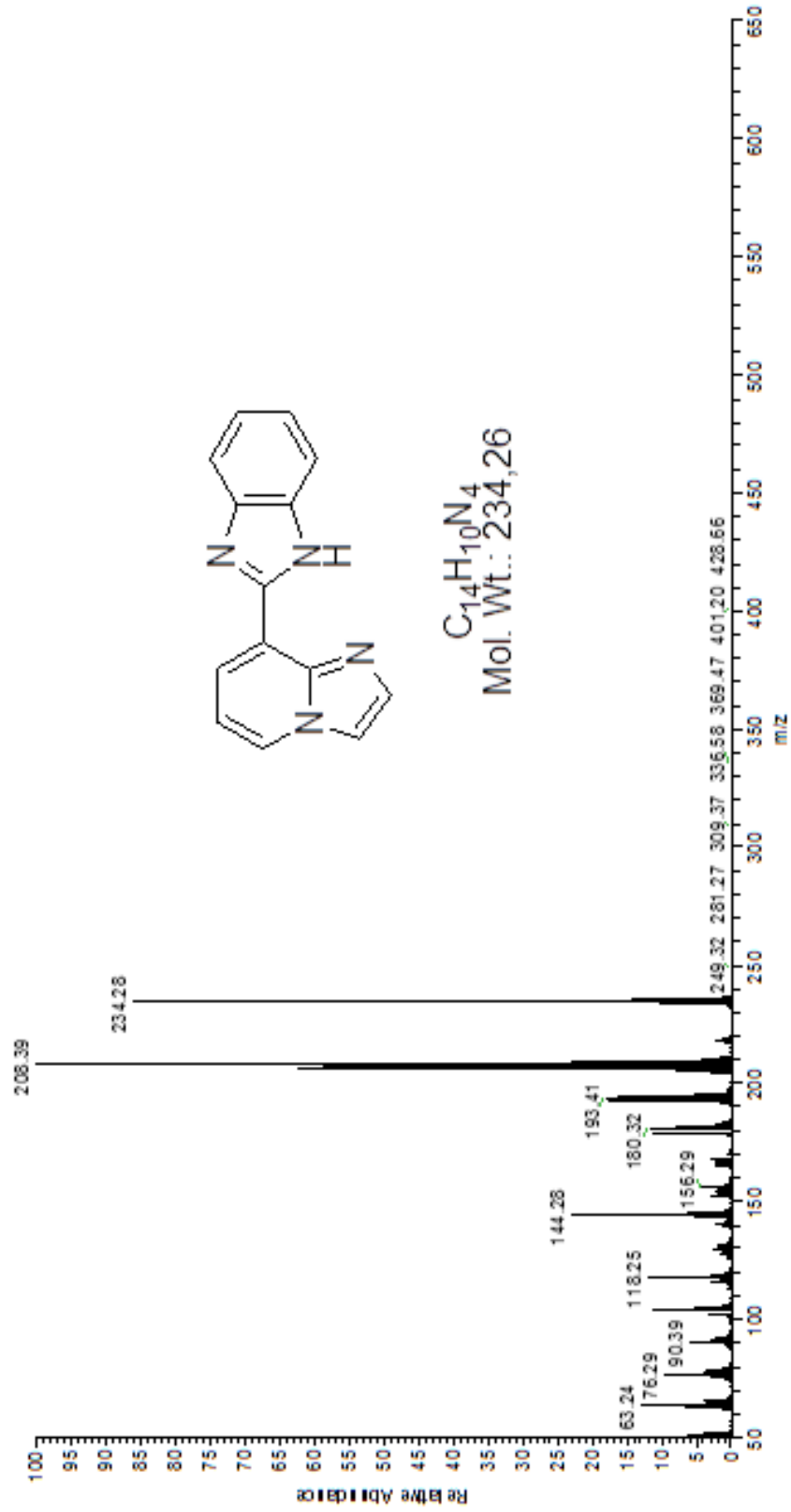
Şekil 3.1 L1 ve L2 bileşiklerinin sentez şeması.

3.1.1 İmidazo(1,2-*a*)piridinil-8-benzimidazol sentezi

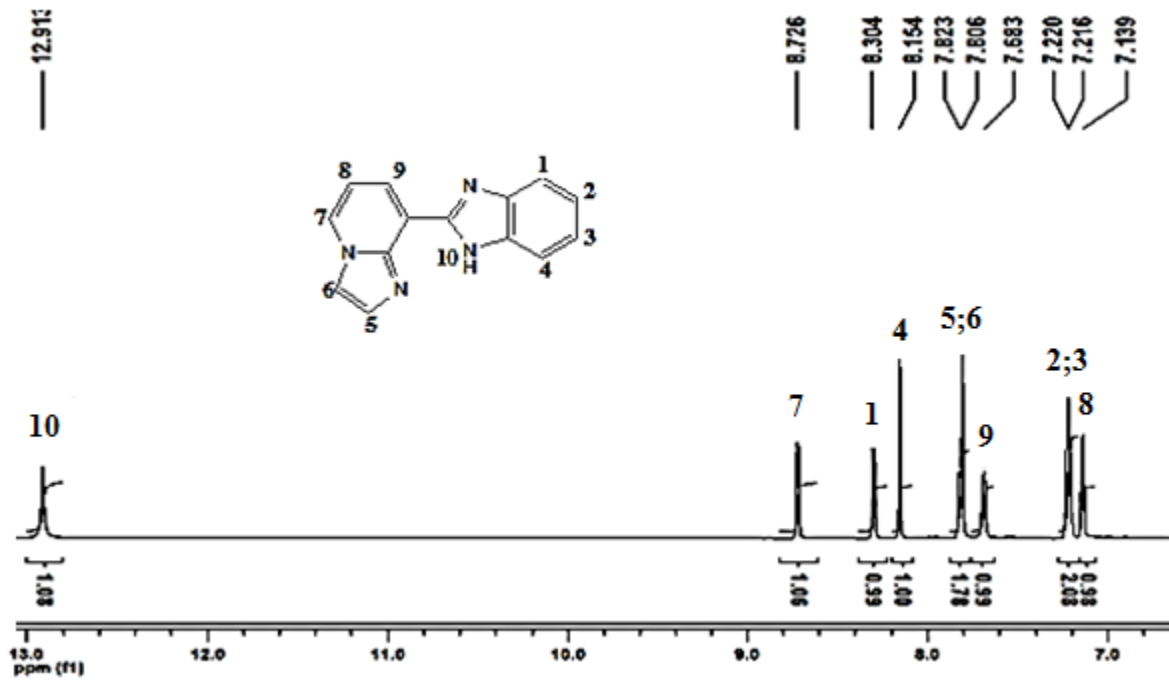
İmidazo(1,2-*a*)piridinil-8-benzimidazol (**L1**) bileşiği etanol içerisinde imidazo(1,2-*a*)piridin-8-karbaldehit ve o-fenilendiaminin 18 saat boyunca geri soğutucu altında karıştırılmasıyla % 31 verimle elde edildi. FT-IR spektrumunda (Şekil 3.3) başlangıç maddesine ait olan $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ C=O, $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ aldehit C-H bandının burada görülmemiş olması, $3246, 3142, 3042\text{ cm}^{-1}$ N-H, ve 1628 cm^{-1} C=N bandı ve ESI-MS spektrumunda (Şekil 3.4) $m/z = 234$ 'te görülen M+H piki tasarlanan yapının sentezlendiğini göstermektedir. **L1**'e ait ^1H -NMR spektrumu (Şekil 3.4) molekülün yapısı ile uyumludur. Ligandın ^1H -NMR spektrumundaki aromatik pikler beklendikleri yerlerde gelmişlerdir. İmidazol halkasında bulunan –NH protonu halkadaki rezonanstan dolayı yüksek alana kaymıştır. ^{13}C -NMR spektrumunda, (Şekil 3.5) molekülde aynı çevreye sahip 5 eş ve 4 (7,13 ve 11,12) yakın çevreye sahip karbon bulunmaktadır.



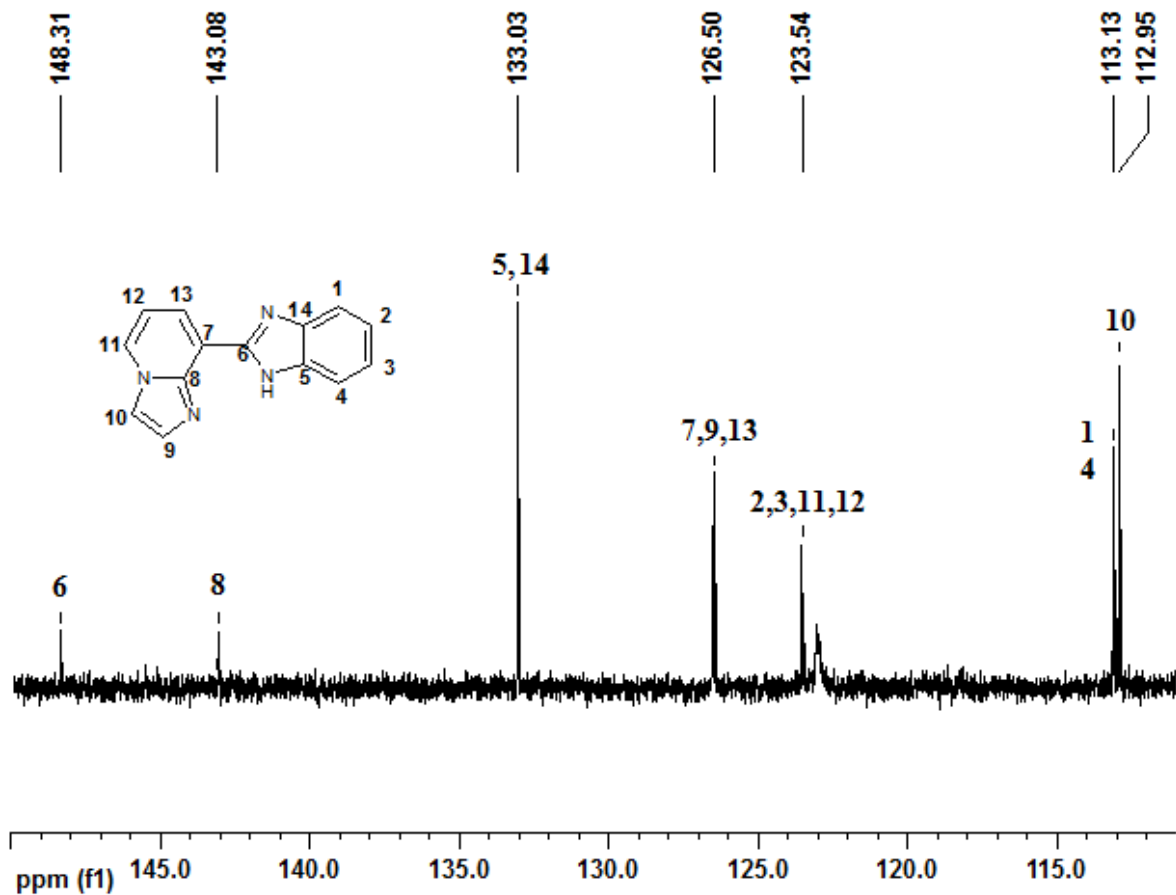
Şekil 3.2 L1 ligandının IR spektrumu



Şekil 3.3 L1 ligandının kütle spektrumu.



Şekil 3.4 L1 ligandının ¹H NMR spektrumu.



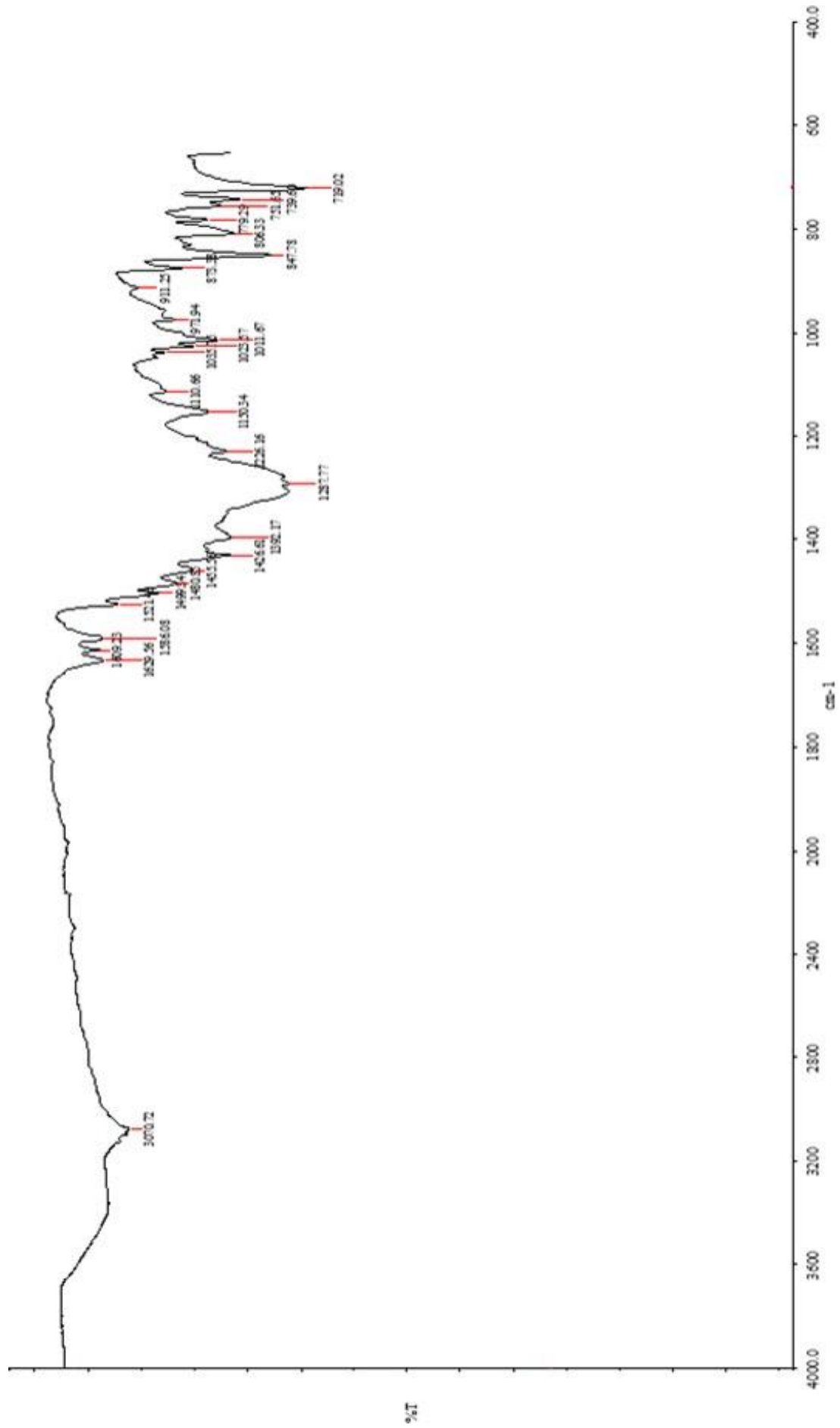
Şekil 3.5 L1 ligandının ¹³C NMR spektrumu.

3.1.2 2,2'-bis(imidazo[1,2-*a*]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol (L2) Sentezi

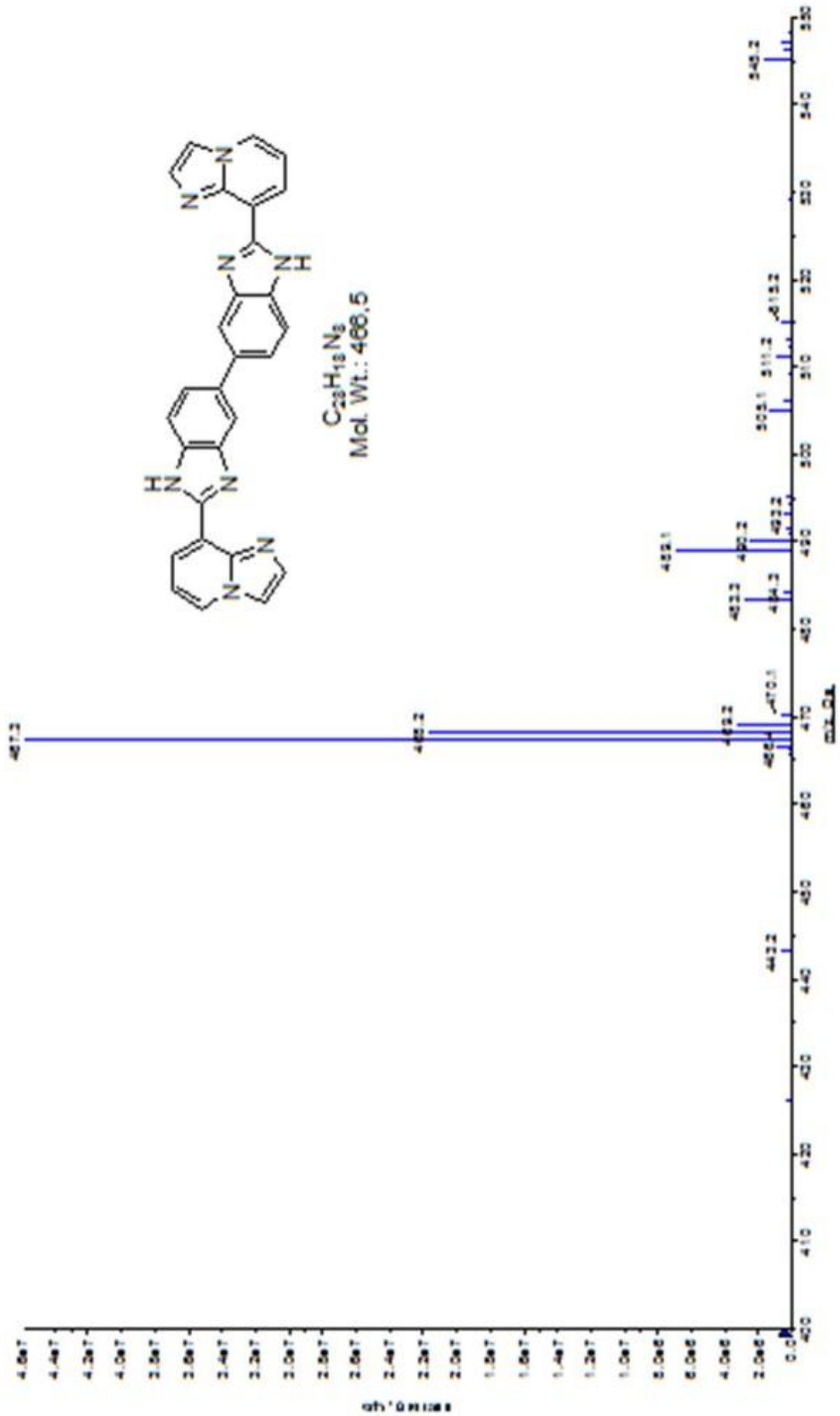
2,2'-bis(imidazo[1,2-*a*]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol (L2) sentezi, imidazo(1,2-*a*)piridin-8-karbaldehit ve 3,3-diaminobenzidinin etanol içerisinde 6 saat boyunca geri soğutucu altında karıştırılmasıyla 76 mg (% 37) verimle 8,8'-[6,6'-bi-1H-benzimidazol]-2,2'-di-il-bis-imidazo(1,2-*a*)piridin bileşiği elde edildi. FT-IR spektrumunda (Şekil 3.6) ~2800 cm⁻¹ aldehit C-H bandının burada görünmemiş olması aldehitin reaksiyona girdiğini ve ~3075 cm⁻¹ civarı oluşan –NH piki yeni bileşiğin oluştuğunu desteklemektedir ve ESI-MS spektrumunda (Şekil 3.7) m/z= 467'de görülen M+H piki tasarlanan yapının molekülün sentezlendiğini göstermektedir.

L2'ye ait ¹H-NMR spekturumunda, (Şekil 3.8) molekülde aynı çevreye sahip 18 eş proton bulunmaktadır. Aromatik halkaya ait protonlar beklendiği gibi 7-9 ppm arası gelmiştir. İmidazol halkasında bulunan -NH protonu aktif protondur ve çözücüyle yer değiştirmiştir. Bu yüzden spektrumda görülmemiştir.

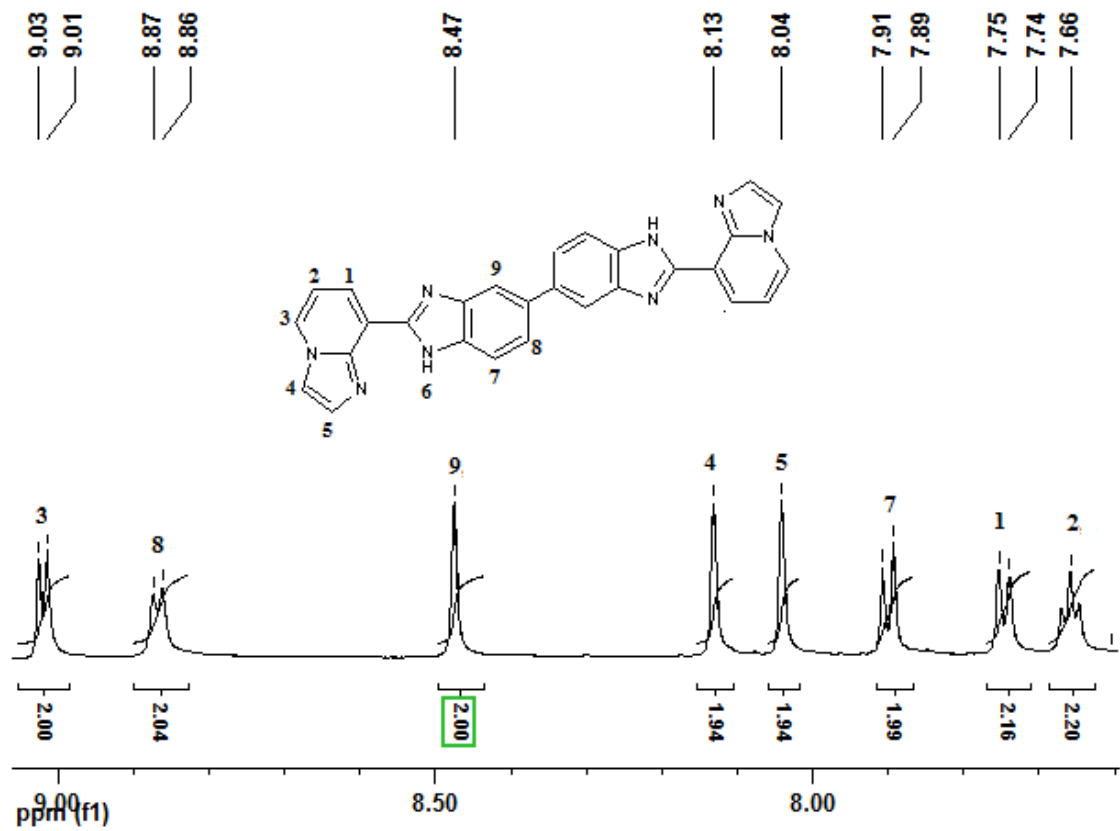
L2'ye ait ¹³C-NMR spekturumunda, (Şekil 3.9) molekülde aynı çevreye sahip 14 eş karbon bulunmaktadır. Spektrumda görünen 14 pik karbon sayısının tuttuğunu göstermektedir. 112-149 ppm arası aromatik karbonlar gözlenmektedir. Azota yakın karbonlar daha yüksek alana kaymıştır.



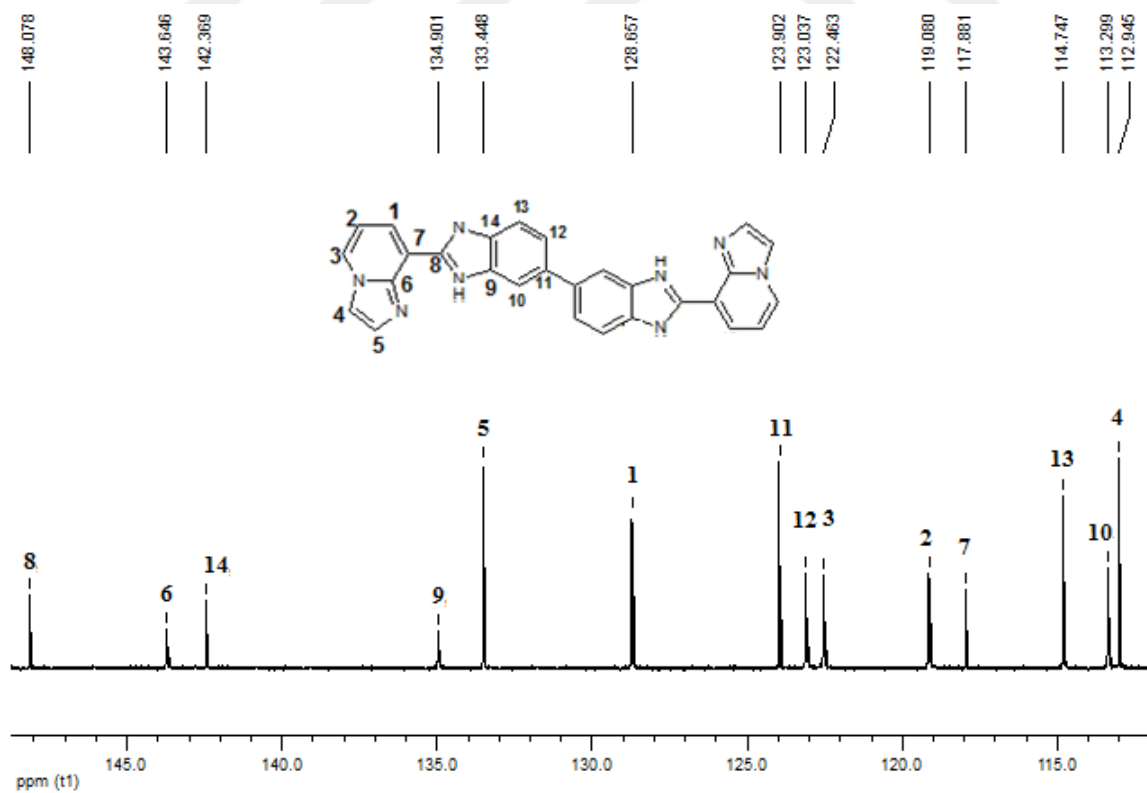
Şekil 3.6 L2 ligandının IR spektrumu



Şekil 3.7 L2 ligandının kütle spektrumu



Şekil 3.8 L2 ligandının ¹H NMR spektrumu.



Şekil 3.9 L2 ligandının ¹³C NMR spektrumu.

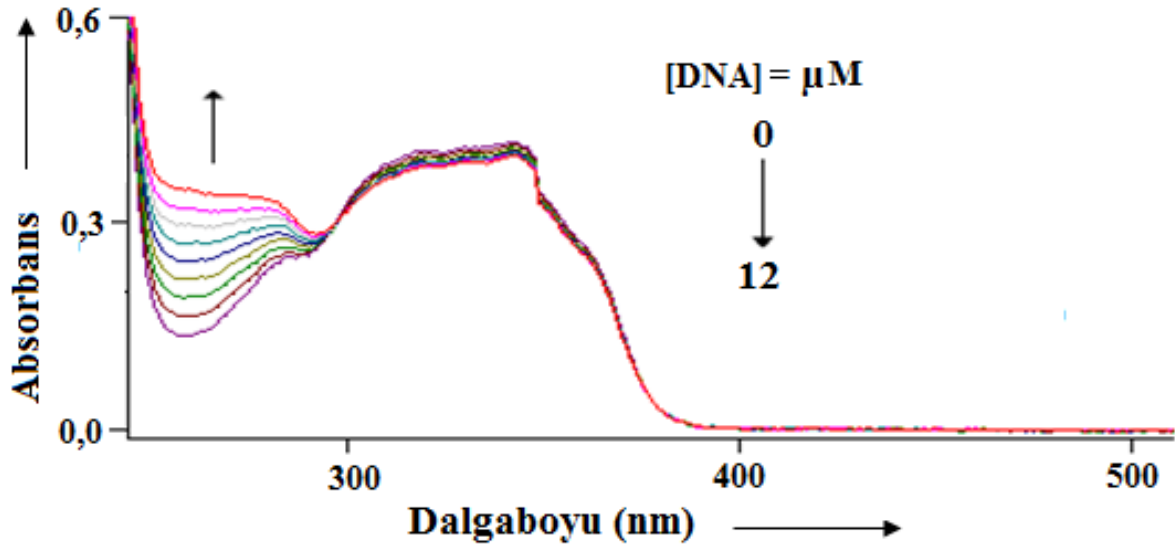
Çizelge 3.1 Sentezlenen bileşiklerin fiziksel özellikleri

Bileşikler	Erime Noktası (°C)	Renk	Çözücü	Kütle (g/mol)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Λ_{em} (nm)
L1	200	Sarı	DMSO, DMF, Etanol	234,26	342	426
L2	288	Yeşil	DMSO, DMF, Etanol	466,5	361	451-484

3.2 LİGANTLARIN DNA İLE ETKİLEŞİMLERİ

3.2.1 UV Titrasyon Sonuçları

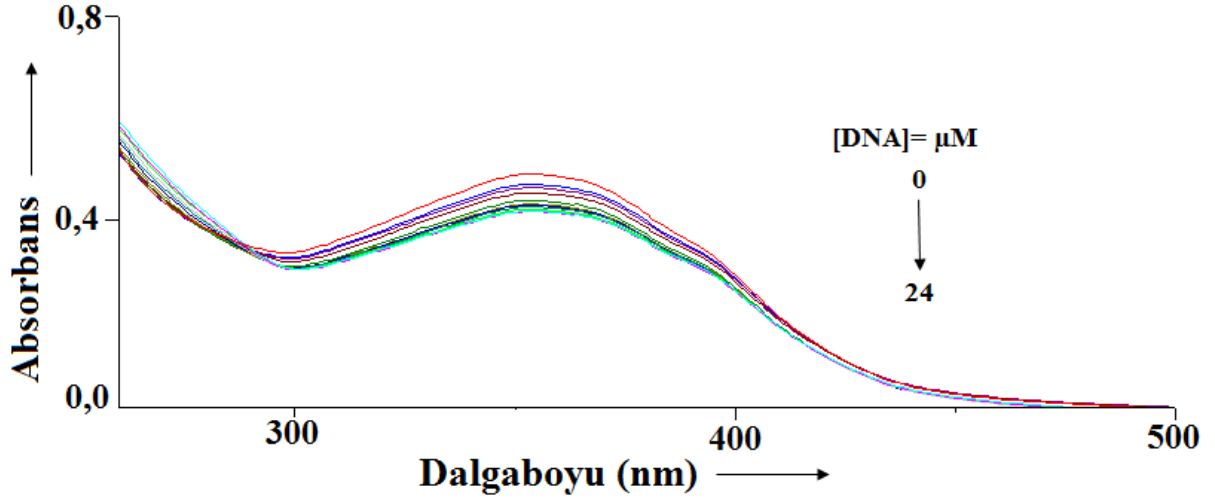
UV-Vis titrasyon spektrumlarında 5 mM KCl-Tris tamponu içinde hazırlanan **L1** ve **L2** çözeltilerinin absorpsiyonu kaydedilmiştir. Çözelti üzerine artan miktarda aynı tampon içerisinde hazırlanan DNA eklenmesiyle bileşiklerin absorbasında oluşan değişim gözlemlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.10 L1 (20 µM) çözeltisinin DNA çözeltisi (0-12 µM) ile titrasyonu sonucu UV-Vis spektrumunda oluşan değişim.

KCl-Tris tamponu (pH= 7,5) içerisinde hazırlanan **L1** çözeltisinin 200-500 nm arasında absorpsiyon değeri ölçülmüştür (Şekil 3.10). 300-370 nm arası **L1** çözeltisine ait geniş bir absorpsiyon spektrumu ve 345 nm’de maksimum absorpsiyon piki mevcuttur. DNA çözeltisi

eklenmesiyle, çözeltide DNA konsantrasyonunun artmasından kaynaklı 260 nm’de hiperkromizm, 300-370 nm arası **L1-DNA** etkileşimine bağlı olarak %10 hipokromizm ve 2 nm batokromizm gözlenmektedir. Çözelti içerisinde DNA konsantrasyonu 6 μM olana kadar titrasyona devam edilmiştir. Bu noktada çözelti doygunluğa ulaşmış ve absorbansda gözlemlenen değişim durmuştur. Ayrıca 272 nm’de görülen izobestik nokta ortamda **L1** ve DNA harici bir kompleksin oluştuğunu gösteriyor olabilir.



Şekil 3.11 L2 (30 μM) çözeltisinin DNA çözeltisi (0-24 μM) ile titrasyonu sonucu UV-Vis spektrumunda oluşan değişim.

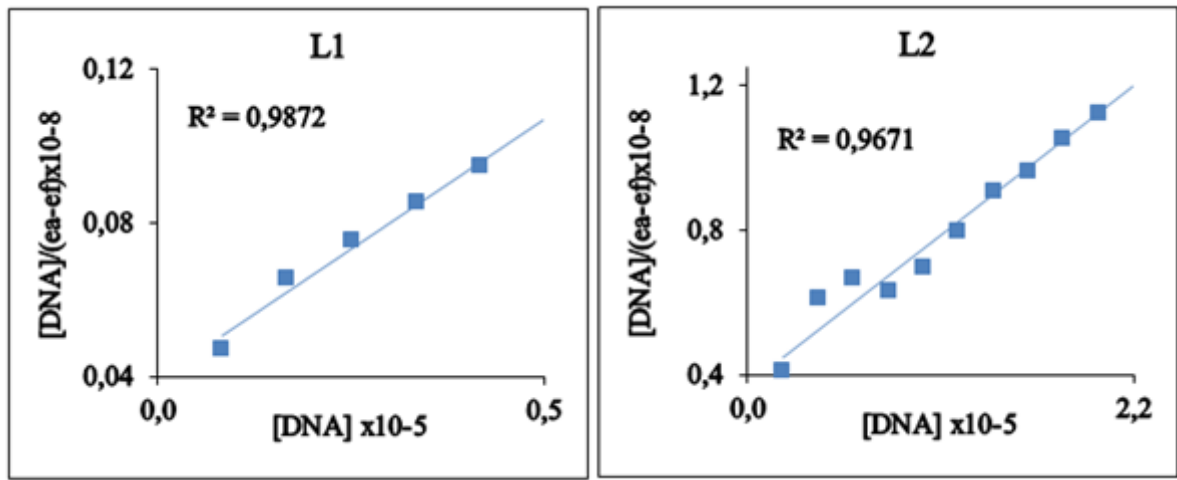
L2 ligandının 5 mM KCl-Tris (pH= 7,5) tamponunda hazırlanan çözeltisinin absorbsiyon spektrumunda (Şekil 3.11), 361 nm’de **L2** ligandına ait maksimum absorbsiyon piki görülmektedir. DNA çözeltisi eklendikçe, **L2**’nin absorbansında %17’lik hipokromizm gerçekleşmiştir. Absorbansta değişim durana kadar titrasyona devam edilmiştir. Değişim DNA konsantrasyonu 24 μM olduğunda durmuştur. **L1** ligandında görülen izobestik nokta **L2** ligandında 290 nm’de gözlemlenmektedir.

Bileşiklerin DNA ile etkileşim gücünü birbiriyle karşılaştırabilmek için eşitlik 1.1 kullanarak bağlanma sabiti (K_b) hesaplanmıştır. **L1** için 342 nm’deki absorbans değerleri, **L2** için ise 361 nm’deki absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan K_b değerleri sırasıyla; $3,5 \times 10^4$ ve $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ dir.

Bileşiklerin UV titrasyon sonuçları Çizelge 3.2’de ayrıntılı bir şekilde ele alınmıştır.

Çizelge 3.2 Bileşiklerin UV titrasyonu sonuçları.

Bileşikler (X)	[X], μM	[DNA], μM	λ_{max} (nm)	Absorbans değişimi	$\Delta A\%$	$K_b \times 10^5 (\text{M}^{-1})$
L1	10	5	342	Hipokromizm	10	0,35
L2	30	24	361	Hipokromizm	17	1,5



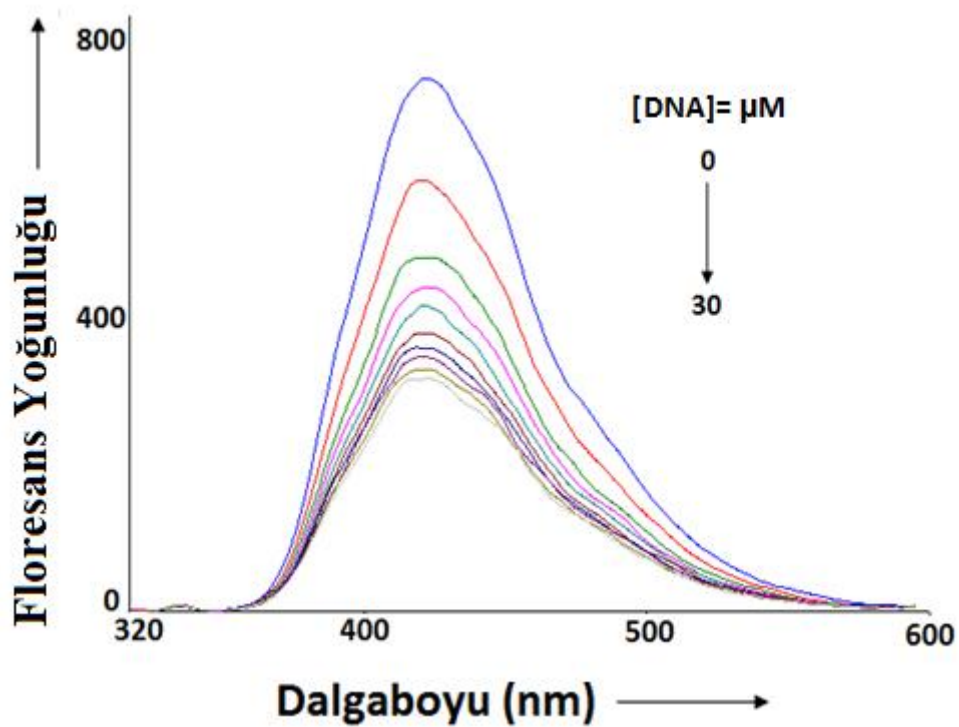
Şekil 3.12 Bileşiklere ait [DNA] değerlerine karşı $[\text{DNA}]/(\epsilon A - \epsilon f)$ grafiği.

Absorbansda gözlenen sırasıyla %10 ve %30’luk hipokromizm bileşiklerin DNA baz çiftleri arasına girerek interkalasyon yapması olarak nitelendirilse de, bileşiklerde batokromizm gözlenmemesi ve oluşan hipokromizmin %30’dan az olması bileşiklerin interkalasyondan ziyade oyuk bağlayıcı ya da elektrostatik olarak bağlanmış olabileceğini düşündürmektedir.

3.2.2 Floresans Titrasyon Sonuçları

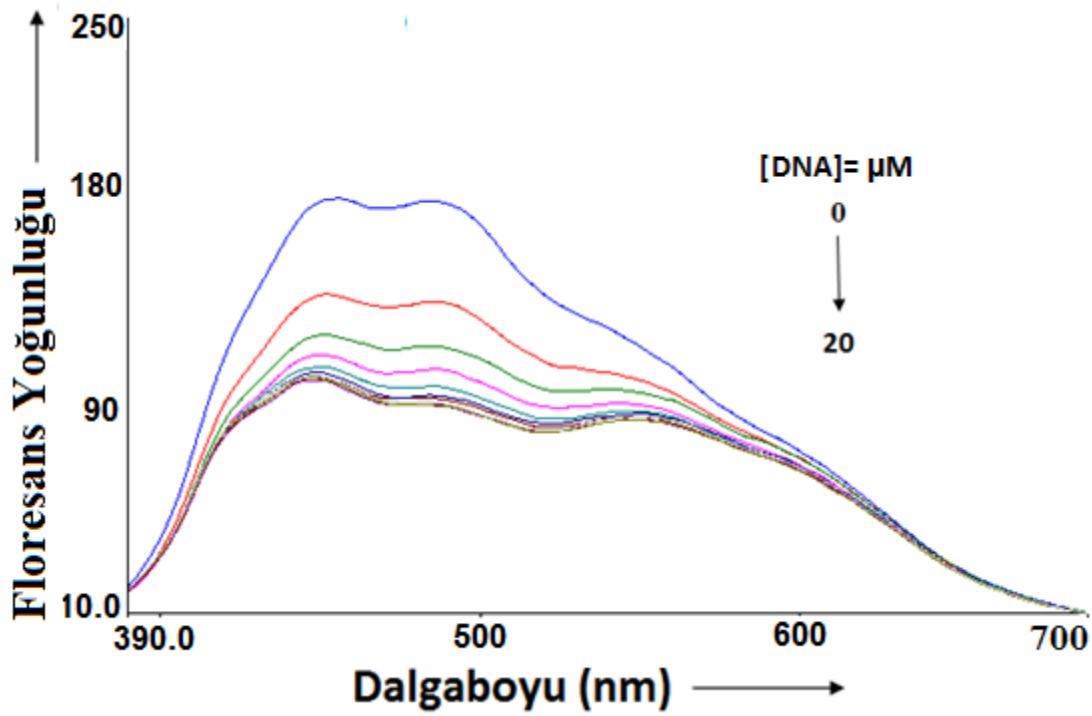
3.2.2.1 Floresans Değişimi

Floresans titrasyon spektrumlarında 5 mM KCl-Tris tamponu içinde hazırlanan **L1** ve **L2** çözeltileri uygun dalga boyunda uyarılarak emisyon spektrumları kaydedilmiştir. Çözeltiler üzerine artan miktarda aynı tampon içerisinde hazırlanan DNA eklenmesiyle bileşiklerin emisyonunda oluşan değişim gözlemlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.13 L1 (0,5 μM) çözeltisinin DNA çözeltisi (0-30 μM) ile titrasyonu sonucu floresans spektrumunda oluşan değişim.

L1 bileşiği aynı tampon içerisinde hazırlanmış çözeltisi UV-Vis spektrumunda izobestik noktaya yakın olan 290 nm dalga boyunda uyarılarak, 426 nm dalga boyunda oluşan emisyon spektrumu (slit= 2,5–2,5) kaydedilmiştir (Şekil 3.15). **L1** çok floresans bir madde olduğu için ancak 0,5 μM olarak hazırlanan çözeltisinin 2,5-2,5 slit aralığı kullanılarak titrasyonu yapılabilmiştir. **L1** çözeltisine DNA eklendikçe floresans yoğunluğunda % 57’lik hipokromizm meydana gelmiştir. **L1** çözeltisi içerisinde DNA 30 μM olduğunda sistem doygunluğa ulaşmıştır ve değişim durmuştur.



Şekil 3.14 L2 (40 μM) çözeltisinin DNA çözeltisi (0-20 μM) ile titrasyonu sonucu floresans spektrumunda oluşan değişim.

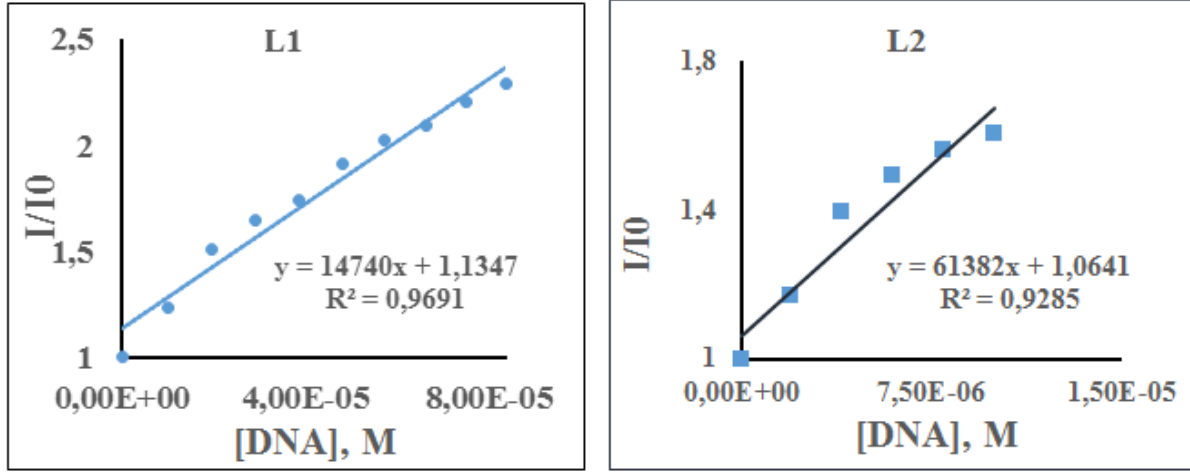
L2 bileşiği aynı tamponda hazırlanan çözeltisi 360 nm’de uyarılarak emisyon spektrumu kaydedilmiştir (Şekil 3.14). L2 390-700 nm arası 451 ve 484 nm’de iki tepe noktası olan geniş emisyon bandına sahiptir (slit= 10–10). 40 μM olarak hazırlanan L2 çözeltisine DNA eklenmesiyle oluşan L2-DNA kompleksi L2’ye göre düşük floresans özelliğe sahiptir. L2 ligandı için gözlemlenen hipokromizmin %15’i ilk DNA eklenmesiyle olmuştur. Bu, hipkromizm oranı fazla olamamasına rağmen bağlanma sabitinin (K_{sv}) yüksek çıkma nedenini açıklamaktadır. Eklenen DNA konsantrasyonu 20 μM olduğunda değişim durmuştur.

Oyuk bağlayıcı veya elektrostatik yolla bağlanan maddeler ile DNA fosfat omurgası arasında oluşan hidrojen bağları, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler ve molekülün bağlanma bölgesinde rotasyon yeteneği sayesinde emisyonunda azalma gözlemlenmektedir [110].

Elde edilen sonuçlar klasik Stern-Volmer eşitliği (Eşitlik 1.2) ile incelenerek kompleksin bağlanma derecesi belirlenmiştir.

Şekil 3.25’te elde edilen veriler kullanılarak hazırlanmış Stern-Volmer eşitliğinden elde edilen lineer grafik görülmektedir. Kompleks derişimine karşı floresans yoğunluğu oranı değerleri

grafiğe geçirildiğinde eğim değeri doğrudan K_{sv} değerine eşit olmaktadır. Yapılan hesaplamalar sonucu K_{sv} değerleri **L1**, ve **L2** için sırasıyla $1,4 \times 10^4$ ve $6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.15 Bileşiklere ait Stern-Volmer grafikleri.

Bileşiklerin floresans titrasyon sonuçları Çizelge 3.3’de ayrıntılı bir şekilde ele alınmıştır.

Çizelge 3.3 Bileşiklerin floresans titrasyonu sonuçları.

Bileşikler (X)	[X], M	[DNA], M	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Floresans değişimi	$\Delta E\%$	$K_{sv} \times 10^4 (\text{M}^{-1})$
L1	0,5	30	290	426	Hipokromizm	57	1,47
L2	15	20	360	451-484	Hipokromizm	41	6,13

Çizelge 3.3 de görüldüğü gibi en yüksek K_{sv} değeri **L2**’ye aittir. Bu **L2** çözeltisine ilk DNA eklendiğinde oluşan hipokromizmin büyüklüğüyle alakalıdır. **L2**’nin floresans yoğunluğunda oluşan %44 oranında hipokromizmin %15’i ilk DNA eklenmesine aittir.

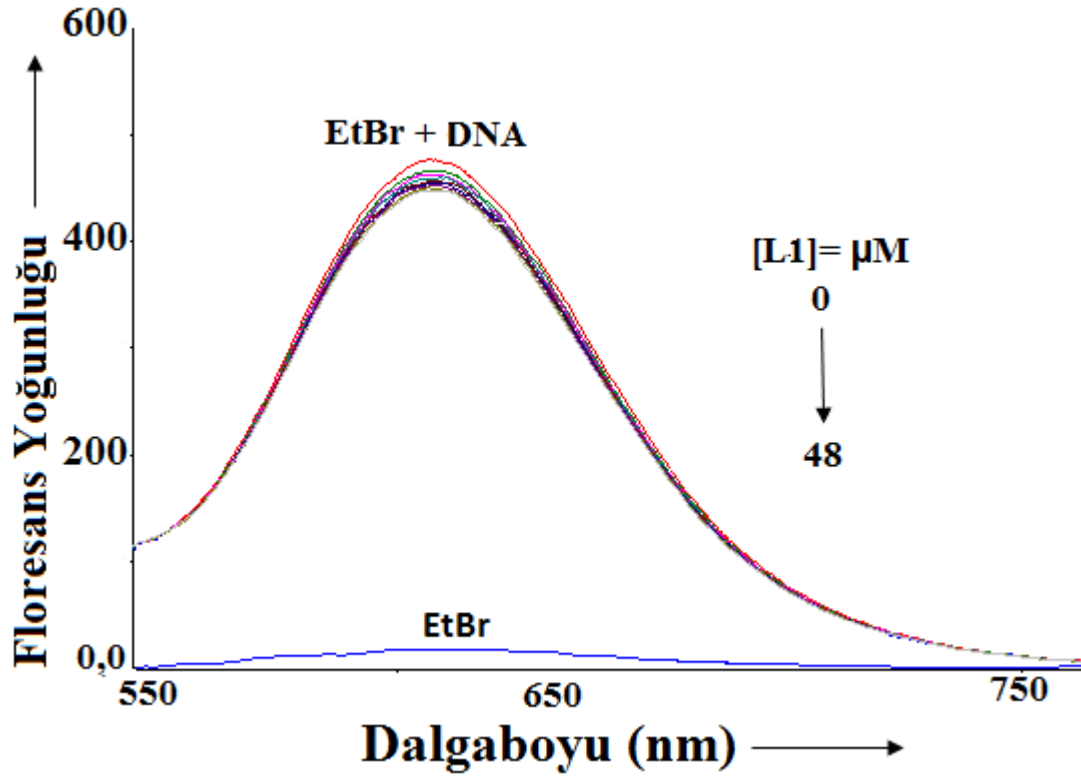
3.2.3 Yarışmalı floresans spektroskopisi sonuçları

Floresans boyalar kullanılarak gerçekleştirilen yarışmalı yer değiştirme analizlerinde, önceden DNA’ya bağlanmış olan boyayı yerinden alabilen herhangi bir küçük molekül, yer değiştirmiş boya ile aynı modda DNA’ya bağlanıyor demektir. Yaygın olarak kullanılan boyalar EtBr, Hoechst-32258 ve DAPI dir. EtBr, Hoechst-32258 ve DAPI sulu çözeltilerinde düşük floresans

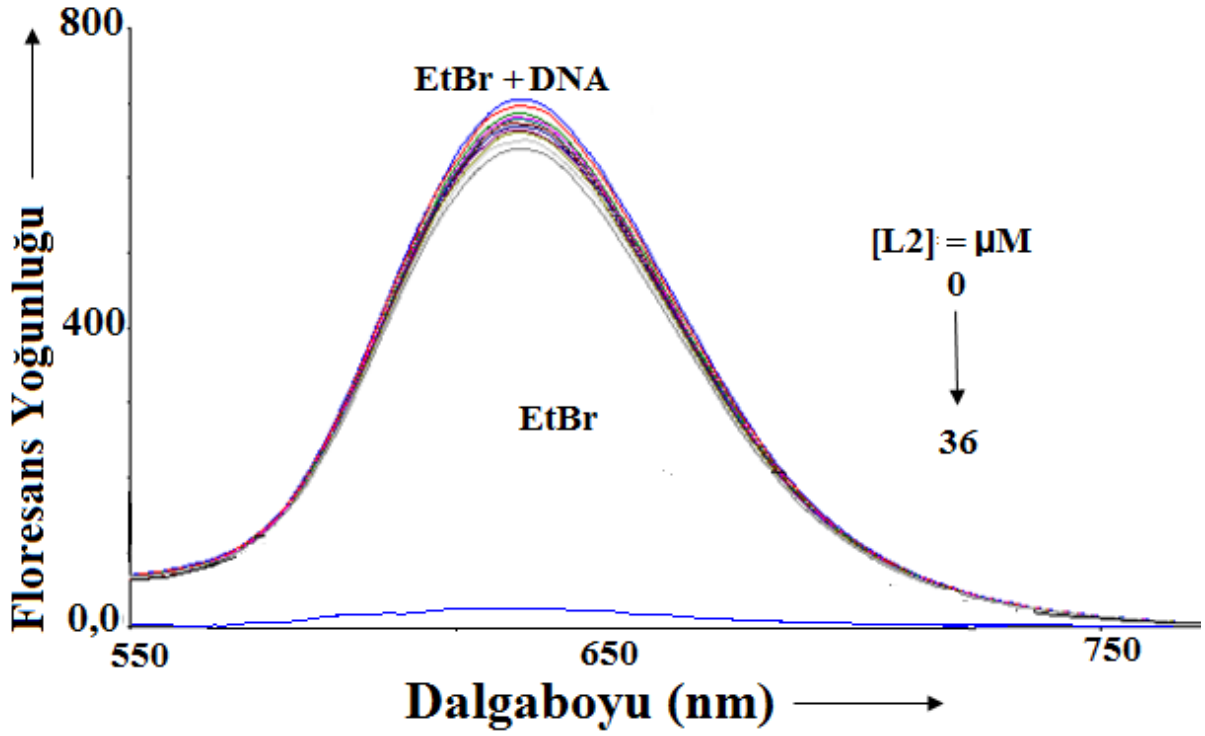
özellik gösteren boyalardır. Ancak DNA ile bağlandıkları zaman floresans özellikleri artmaktadır. Eklenen ilaç boyayı yerinden çıkarttıkça floresans özellikleri düşmeye başlayacaktır.

3.2.3.2 EtBr ile Yarışmalı Floresans

Bileşiklerin DNA ile etkileşimini anlayabilmek için DNA ile etkileşim modları bilinen çeşitli bileşikler ile çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri de DNA'ya interkalasyon ile bağlanan EtBr ile yapılan çalışmadır. Şekil 3.16 ve şekil 3.17 da 20 μM EtBr ile 100 μM sığır DNA'sı içeren çözeltinin artan derişimlerde **L1** ve **L2** bileşiklerinin ilavesi ile floresans spektrumunda oluşan değişim gösterilmiştir.



Şekil 3.16 EtBr-DNA kompleksinin (20 μM EtBr ve 100 μM DNA) L1 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.



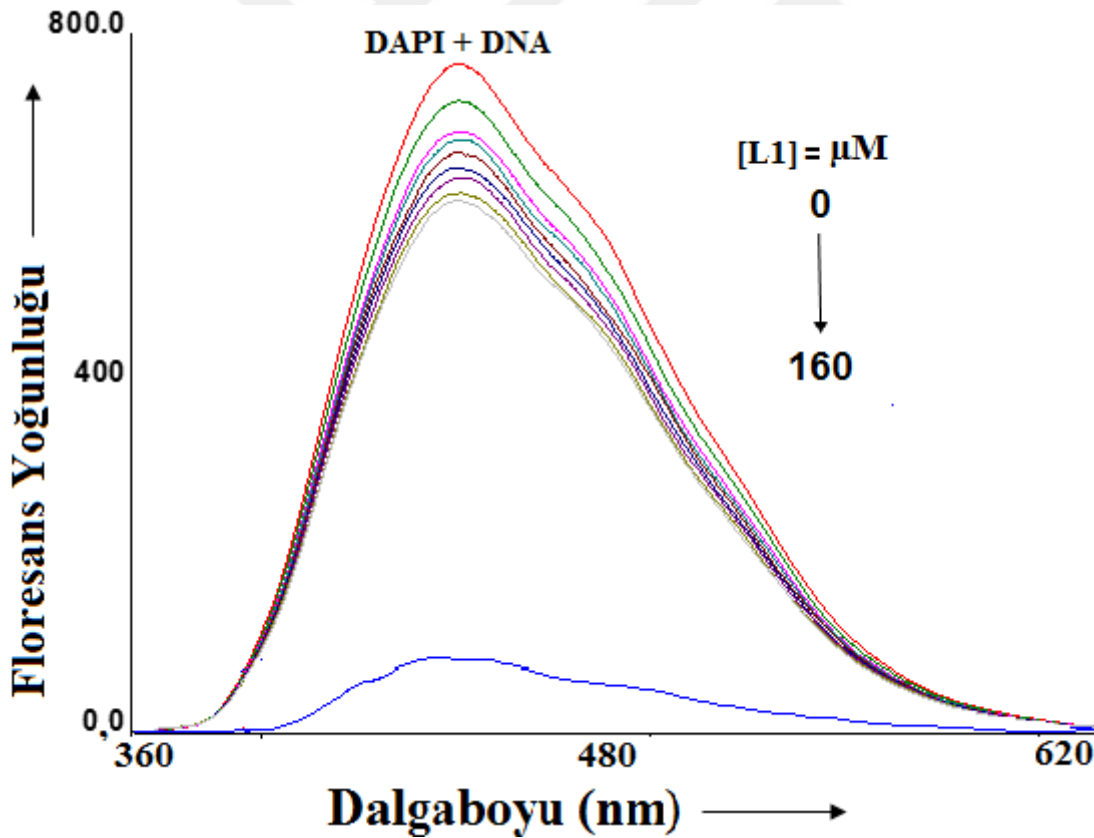
Şekil 3.17 EtBr-DNA kompleksinin (20 μ M EtBr ve 100 μ M DNA) L2 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.

Tris-KCl tamponu (pH= 7,5) içerisinde 20 μ M EtBr hazırlanıp 543 nm dalga boyunda uyarılmıştır. EtBr'nin 628 nm'de oluşan emisyon yoğunluğu çok düşüktür. Ancak EtBr çözeltisine 100 μ M DNA eklendiği zaman EtBr DNA baz çiftleri arasına girer ve emisyon yoğunluğunda kuvvetli bir artış görülmektedir. Bu EtBr-DNA sistemine aynı tamponda hazırlanan 1 mM'lık **L1** ve **L2** çözeltileri eklenip spektrum kaydedilmiştir (Şekil 3.16 ve Şekil 3.17). **L1**, ve **L2** bileşikleri DNA-EtBr sistemine çok az etki göstermişlerdir. Bu durum bileşiklerin DNA'ya interkalasyonla bağlanmadıklarını gösterir.

3.2.3.3 DAPI ve Hoechst-33258 ile Yarışmalı Floresans

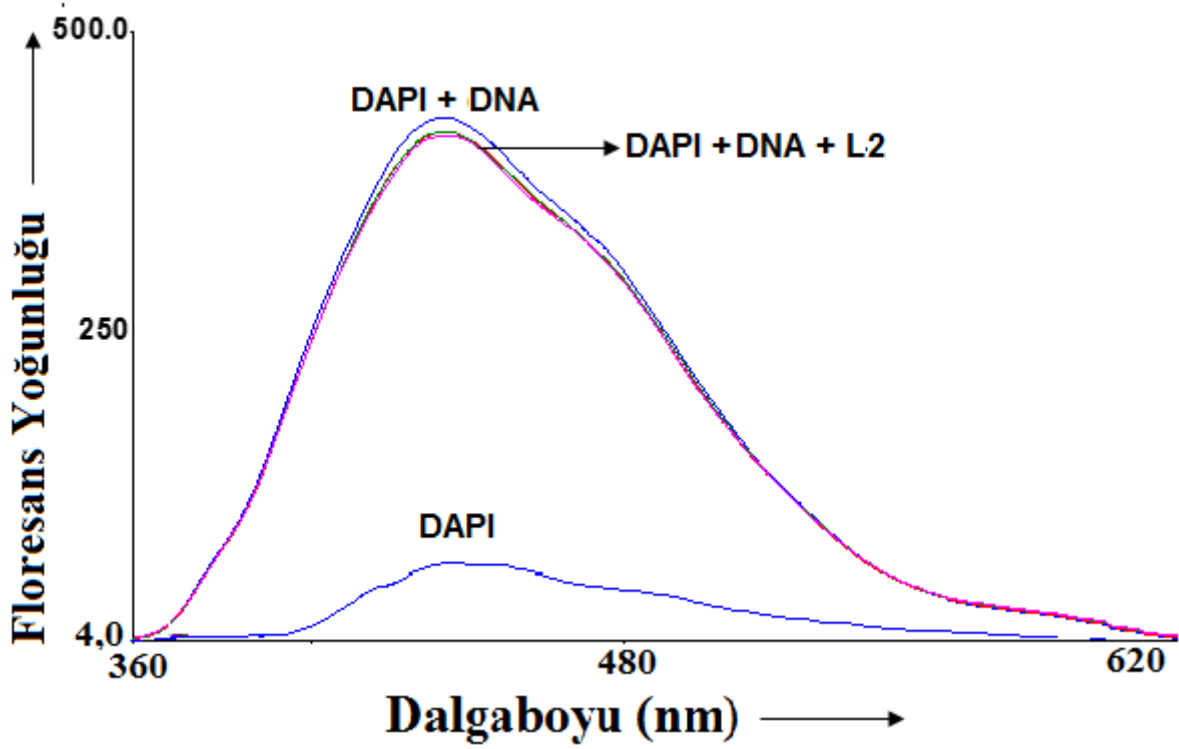
DAPI ve Hoechst-33258 küçük oyuk üzerinden DNA'ya bağlandığı bilinen maddelerdir. Genelde DNA üzerinde A-T dizilerinin yoğun bölgeleri tercih ederler. DAPI ve Hoechst-33258 EtBr gibi sulu çözeltilerinde düşük floresans özellik gösteren boyalardır. Ancak DNA eklendiği zaman yüksek floresans özelliğe sahip DNA ile etkileşerek DAPI-DNA ve Hoechst-33258-DNA kompleksleri oluşur. Bu komplekslere DAPI ve Hoechst-33258 gibi oyuk üzerinden bağlanan bir madde eklendiği zaman, eklenen madde DAPI ve Hoechst-33258'i yerinden çıkararak DNA'ya kendisi bağlanır. Bunun sonucunda da floresans yoğunluğunda düşüş meydana gelir.

Şekil 3.18 ve Şekil 3.19'de 1 μM DAPI ile 6 μM DNA içeren çözeltinin artan derişimlerde **L1**, ve **L2** bileşiklerinin ilavesi ile floresans spektrumunda oluşan değişim gösterilmiştir.



Şekil 3.18 DAPI-DNA kompleksinin (1 μM DAPI ve 6 μM DNA) L1 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.

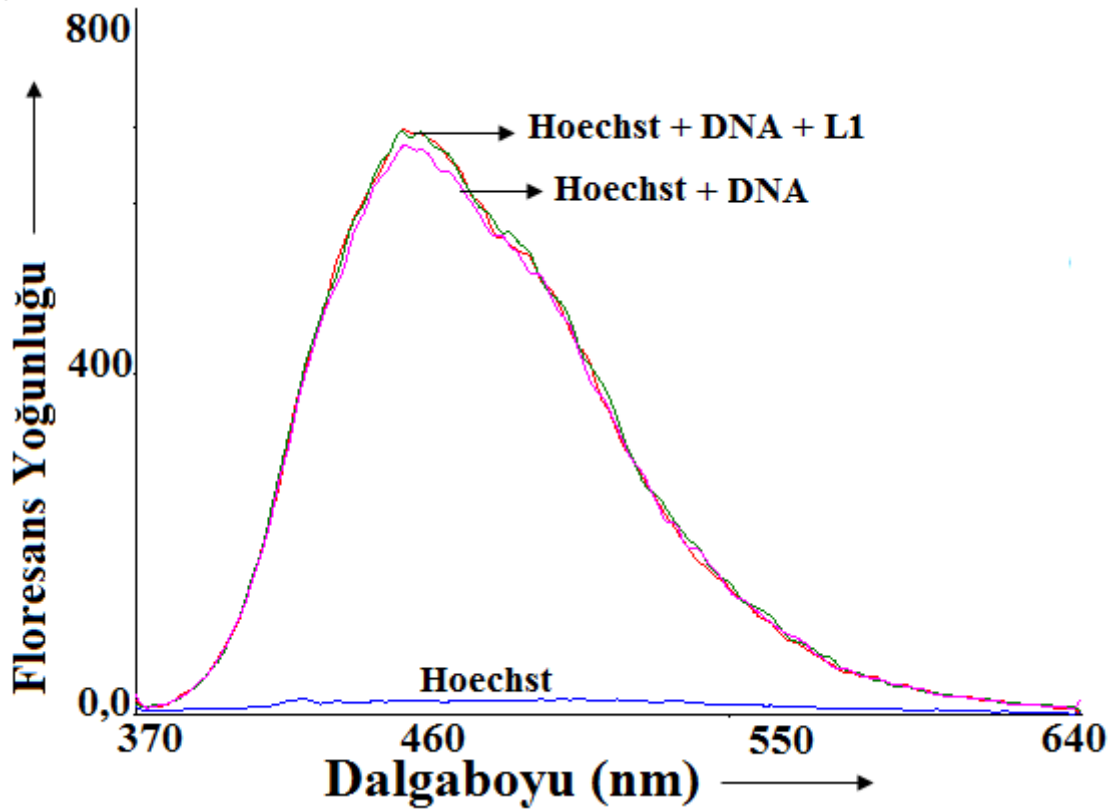
Tris-KCl tamponu (pH= 7,5) içerisinde hazırlanan 1 μ M DAPI çözeltisi 350 nm dalga boyunda uyarılarak (slit= 4-4) 435nm’de oluşan emisyon spektrumu gösterilmektedir (Şekil 3.18). DAPI çözeltisine 6 μ M DNA eklenmesiyle floresans yoğunluğu artmıştır. Bu çözeltiye aynı tamponda hazırlanan **L1** çözeltisi ilave edildikçe floresans yoğunluğu düşmeye başlamıştır. Çözeltideki **L1** konsantrasyonu 160 μ M olmasına rağmen DAPI’yi yerinden çıkaramamıştır.



Şekil 3.19 DAPI-DNA kompleksinin (1 μ M DAPI ve 6 μ M DNA) L2 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.

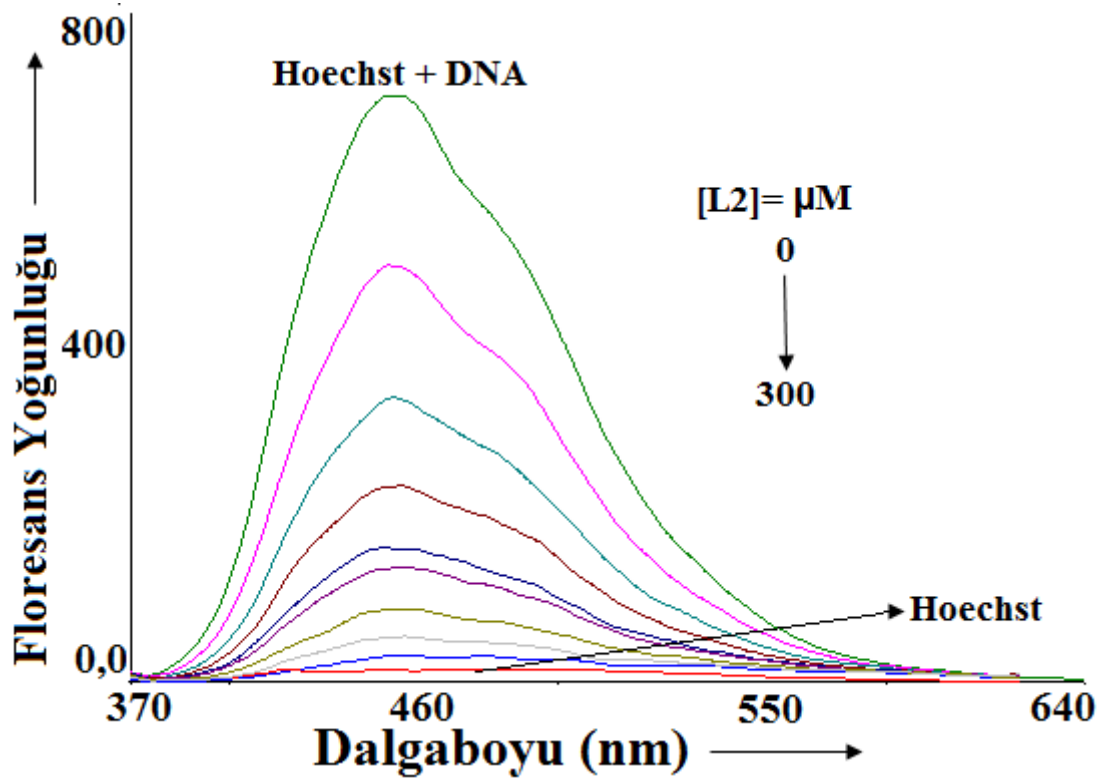
Aynı şekilde hazırlanan DAPI-DNA sistemine **L2** ilavesi sisteme hiçbir etki gösterememiştir.

DAPI ile yapılan çalışmalarda bileşikler DAPI-DNA sistemine etki gösterememişlerdir. Yine küçük oyuktan bağlanan Hoechst-33258 bileşiği ile çalışmalar tekrarlanmıştır. Şekil 3.20 ve Şekil 3.21 1,25 μ M Hoechst-33258 ve 12,5 μ M DNA içeren çözeltinin artan derişimlerde bileşiklerin ilavesi ile floresans spektrumunda oluşan değişim gösterilmiştir.



Şekil 3.20 Hoechst-33258-DNA kompleksinin (1,25 μ M Hoechst-33258 ve 12,5 μ M DNA) L1 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.

1,25 μ M Hoechst çözeltisi 365 nm dalga boyunda uyarılmıştır. Bu çözeltiye 12,5 μ M DNA eklendiğinde DAPI gibi Hoechst-33258-DNA'nın küçük oyuğuna bağlanarak floresans yoğunluğunu arttırmaktadır ve 450 nm'de emisyon vermektedir (Şekil 3.20). Oluşan Hoechst-33258-DNA kompleksine **L1** çözeltisi eklendikçe emisyon yoğunluğu artmıştır. Bu artış L1 ve Hoechst-33258 bileşiğinin emisyon verdiği bölgeler aynı olmasına bağlanabilir.



Şekil 3.21 Hoechst-33258-DNA kompleksinin (1,25 μM Hoechst-33258 ve 12,5 μM DNA) L2 ile titrasyonu sonucu elde edilen floresans değişimi.

Hoechst-33258-DNA kompleksine yüksek konsantrasyonlarda **L2** eklenmesiyle kompleksin floresans yoğunluğu azalmıştır (Şekil 3.21). Ancak bu azalış bileşiğin yüksek konsantrasyonda eklenmesiyle gerçekleşmiştir. Bu yüzden **L2**'nin Hoechst-33258'i yerinden atıp kendi bağlandığı değil, ortamda düşük floresans özelliğe sahip **L2-Hoechst-33258-DNA** kompleksi oluştuğu için floresans yoğunluğunun düştüğü düşünülebilir.

Çizelge 3.4 Bileşiklere ait bağlanma sabiti değerleri.

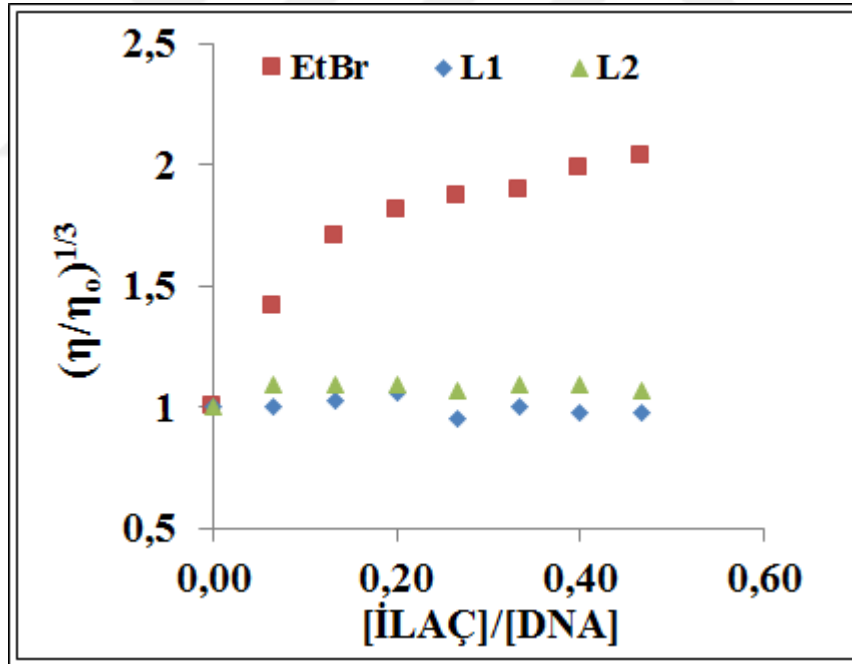
Bileşikler	$K_{sv} \times 10^6 (\text{M}^{-1})$
L1	-
L2	0,2
Hoechst-33258	26,3 ^[180]

DNA-Hoechst-33258 kompleksi üzerine test edilen bileşik çözeltileri eklenmesiyle, Hoechst-33258 serbest kalmaya başladığından floresans yoğunluğu düşmeye başlamıştır. Hoechst-33258'in floresans yoğunluğundaki azalma; komplekslerin küçük oyuk üzerinden DNA baz çiftleri arasına interkalasyon yapmış olabileceğini gösterir. Çizelge 3.4'de görüldüğü gibi DNA'ya küçük oyuktan en iyi bağlanan **L2** ligantıdır. **L2** ligantının yapısı Hoechst-33258 ile

çok benzer olduğu için DNA'ya en iyi bağlanan bileşik olması muhtemel bir sonuçtur. **L1** ligantı ise Hoechst-33258 ile aynı bölgede emisyon verdiği için bu bileşik ile çalışılamamıştır ancak aynı bağlanma bölgesinden bağlanan DAPI ile yapılan çalışmada da DAPI'ye etki gösterememesi küçük oyuktan bağlanamadığını göstermiştir. Bunun nedeni de **L1** bileşiğinin küçük yapıli bir bileşik olmasından kaynaklanmış olabilir.

3.2.4 Viskozite Sonuçları

Viskozite çalışmasında, dört bileşikte interkalasyon yapan EtBr molekülü ile karşılaştırılmıştır. EtBr molekülü DNA baz çiftleri arasına girerek DNA'nın boyunu yaklaşık 2 Å kadar uzatır. Buda vizkozitede bir artış meydana getirir. Oyuk bağlayıcı mddelerde ise DNA'nın yüzeyinde oyuklardan bağlanma olduğu için DNA'nın boyunda bir değişim olmaz ya da oyuklar bağlanmadan dolayı birbirine yaklaştığı için DNA'nın boyu biraz daha kısılır. Bu nedenle vizkozitede değişim olmaz ya da azalma olur.



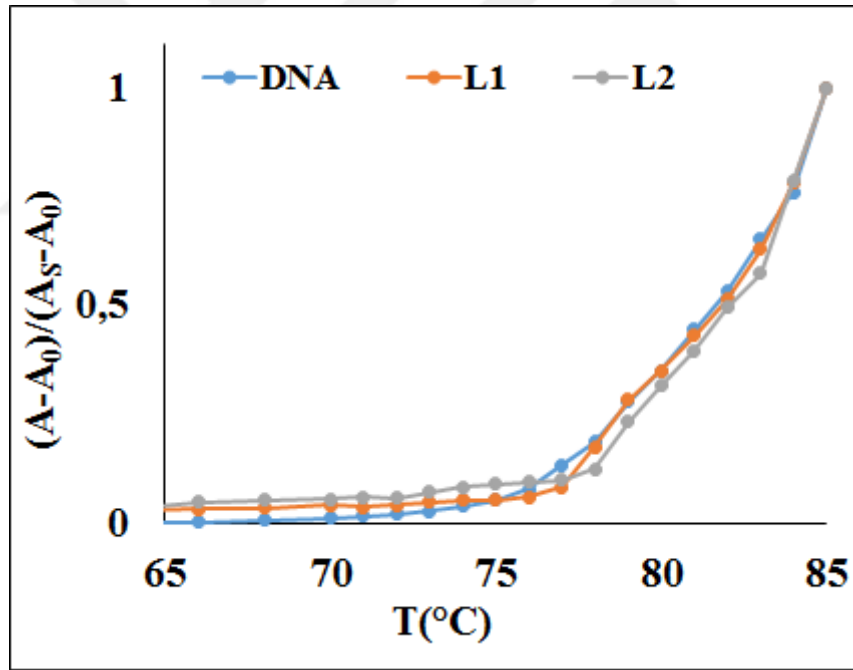
Şekil 3.22 L1 ve L2 bileşiklerinin 100 µM DNA viskozitesine etkileri.

Viskozite çalışmalarında ilk olarak DNA'nın KCl-Tris (pH= 7,5) tamponunda hazırlanan çözeltisinin 35 °C'de viskozitesi ölçülmüştür. Daha sonra üzerine aynı tamponda hazırlanan **L1** ve **L2** çözeltileri ayrı ayrı eklenerek bu bileşiklerin DNA viskozitesi üzerine nasıl etki gösterdiklerini göstermektedir (Şekil 3.22). Karşılaştırma yapabilmek için EtBr bileşiğinin de

DNA viskozitesi üzerine etkisi ölçülmüştür. Grafikten görüldüğü gibi EtBr DNA baz çiftleri arasına girerek viskoziteyi arttırmıştır. Ancak bileşiklerin DNA viskozitesi üzerine belirgin bir etkisi olmamıştır.

3.2.5 Erime Noktası Değişimi

Şekil 3.38 DNA'nın KCl-Tris (pH= 7,5) tamponunda hazırlanan çözeltisinin artan sıcaklığa karşı 260 nm dalga boyundaki absorbans değişimini göstermektedir. DNA'ya bağlanan bileşikler DNA'nın kararlılığında değişiklikler meydana getirir. İnterkalasyon yapan bileşikler baz çiftleri arasına girdiği için DNA'yı daha sağlam yapar. Bu da erime noktasının artmasına neden olur. Oyuk bağlayıcı bileşikler ise dış bir bağlanma gerçekleştirdikleri için erime noktası üzerine belirgin bir fark yaratmazlar. Erime noktası değişiminde; interkalasyon yapan bileşikler ctDNA'nın erime noktasını 4-8 °C artırırken, oyuk bağlayıcı moleküller 1-3 °C artırır.



Şekil 3.23 L1 ve L2 (15 µM) bileşiklerinin DNA'nın (60 µM) erime noktası üzerine etkisi. DNA'nın L1/L2 varlığında ve yokluğunda erime noktası değişim grafiği.

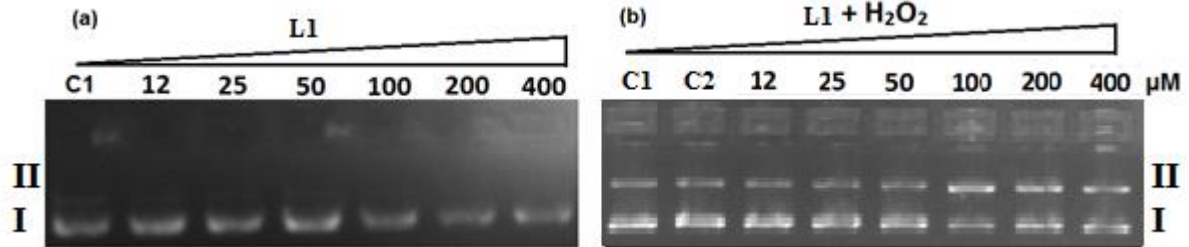
DNA'nın erime noktası 81 °C'dir. Aynı tampon içerisinde hazırlanan L1 ve L2 bileşikleri eklendiğinde ise sırasıyla; 0,02 ve 0,5 °C artmıştır. Şekil 3.23 de görüldüğü gibi bileşikler DNA'nın erime noktasını bir miktar artırmışlardır. Bu değişimler çok az olsa da DNA'nın kararlılığını bir miktar arttırdığı söylenebilir. EtBr gibi interkalasyon yoluyla DNA'ya bağlanan bileşikler DNA'nın erime noktasını ~13 °C artırır [181]. Bileşiklerin DNA'nın erime

noktasını en fazla 0,5 °C arttırmış olması 2 bileşiğin de oyuk bağlayıcı yolla bağlandıklarını doğrulamaktadır.

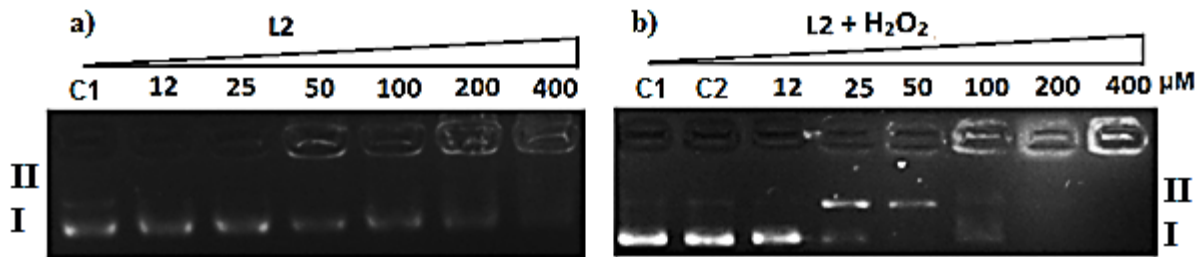
3.2.6 Elektroforez Sonuçları

Agaroz jel elektroforezi sentezlenen bileşiklerin DNA hasarı gerçekleştirdiği en küçük derişimi bulabilmek için yapılmıştır. Şekil 3.39 ve Şekil 3.40 artan konstrasyonda hazırlanan bileşiklerin hem karanlıkta hem H₂O₂ ile 1 saat muamele edilerek yapılan elektroforez görüntüsü göstermektedir. Hidrojen peroksit (H₂O₂), tek başına zararlı bir yapı olmadığı halde geçiş metallerinin (Fenton reaksiyonu) ve süperoksit radikalının ($\bullet\text{O}_2^-$) varlığında en güçlü radikal olan hidroksil radikalini ($\bullet\text{OH}$) oluşturur. Oluşan hidroksil radikali DNA bazları ile reaksiyona girerek DNA hasarı gerçekleştirir.

Plazmit DNA 1 numaralı hat (C1) kontrol olarak, diğer hatlar artan miktarda bileşik ve DNA içermektedir. H₂O₂ ile yapılan çalışmada ise, C1 hattı kontrol olarak plazmid DNA, C2 hattında yine kontrol olarak plazmid DNA+H₂O₂, geri kalan hatlarda ise H₂O₂ ve artan konstrasyonlarda bileşik karışımlarının plazmid DNA'ya etkisi gösterilmektedir.



Şekil 3.24 a)Aktivatör yokluğunda ve b) Aktivatör varlığında pBR322 ve artan L1 karışımına ait elektroforez görüntüsü.



Şekil 3.25 a)Aktivatör yokluğunda ve b) Aktivatör varlığında pBR322 ve artan L2 karışımına ait elektroforez görüntüsü.

L1 ve L2 bileşiklerinin artan konsantrasyonlarda plazmid DNA üzerine etkisini öğrenebilmek için plazmid DNA içeren çözelti üzerine artan miktarda eklenen L1 ve L2 çözeltisi içeren karışımlar aktivatör yokken ve H₂O₂ aktivatörü ile karanlık ve 38°C’ta 1 saat bekletildi.

L1 karanlıkta hiçbir aktivatör (Şekil 24a) yokken DNA hasarı gerçekleştirememektedir. Ancak aktivatör H₂O₂ varlığında (Şekil 24b) 100 µM’den itibaren DNA hasarı gerçekleştirebilmektedir.

Karanlık ortamda aktivatör yokken L2 ligandı DNA’yı nötralize ederek elektroforezde yürüyememesini sağlamaktadır (Şekil 25a). Aktivatör varlığında 25 µM’den itibaren DNA’hasar vermeye başlamıştır ve 100 µM’den itibaren ise DNA’yı nötralize ederek jelde çökmesini sağlamaktadır (Şekil 25b).

Ligantların sahip olduğu benzimidazol halkasında bulunan azotlar amfoterik yapıda olduğu için sulu çözeltide artı yüklü yapıda bulunmaktadır [162]. Artı yük ligantların DNA’ya yaklaşmasını kolaylaştırmaktadır ve eksi yüklü DNA-fosfat omurgasına bağlanarak DNA’yı nötralize etmiş olabilecekleri söylenebilir.

3.3 SONUÇ

Sonuç olarak İmidazo(1,2-*a*)piridinil-8-benzimidazol (L1) ve 2,2'-bis(imidazo[1,2-*a*]piridin-8-yl)-3H,3'H-5,5'-bibenzo[d]imidazol (L2) bileşikleri literatür doğrultusunda sentezlenip IR, ¹H-NMR ve ESI-MS yöntemleriyle karakterize edildi. Sentezlenen bileşiklerin DNA etkileşimleri UV-Vis titrasyon, floresans titrasyon, vizkozite, UV erime noktası değişimi ve agaroz jel elektroforez yöntemleriyle belirlendi.

UV-Vis titrasyon sonucunda bileşiklerin DNA’ya bağlandıkları ve bağlanma sabitleri sırasıyla 0,35×10⁵ M⁻¹ ve 1,5×10⁵ M⁻¹ olarak hesaplandı. Floresans sonuçlarında da benzer sonuçlar alındı. Yarışmalı floresans çalışmalarında L1 bileşiğinin DAPI’nin DNA’ya bağlandığı bölgeden DNA’ya yanaşabildiği söylenebilir. L1 bileşiğinin DNA’nın erime noktasını 0,02 °C değiştirmesi DNA’ya bir bağlanma gerçekleşmediği sonucu desteklemektedir. Hoechst-33258’e benzer yapıda olan L2 bileşiği ise Hoechst-33258’i taklit ederek Hoechst-33258’in DNA’ya bağlandığı küçük oyuktan DNA’ya bağlandığı düşünülmektedir. Erime noktası değişimi ve viskozite çalışmaları da bu sonucu desteklemektedir. Ancak DNA’ya bağlanma

sabiti Hoechst 33258 ile karşılaştırıldığında 100 kat daha zayıftır. Bu da Hoechst-33258 ve L2 bileşiğinin aynı anda DNA oyuklarında var olduğunu göstermektedir.

Elektroforez çalışmalarında her iki bileşik de ortamda hiçbir aktivatör yokken DNA üzerinde herhangi bir kırılma gerçekleştirememiştir. Ancak L2 bileşiği yüksek konsantrasyonda DNA'nın eksi yükünü nötralize ederek jel üzerinde DNA'nın çökmesine neden olmuştur. Peroksit varlığında ise L1 100 μ M ve L2 de 25 μ M ve daha yüksek konsantrasyonlarda DNA hasarı meydana getirmişlerdir.

Sonuç olarak tüm veriler incelendiğinde bileşiklerin DNA'ya minör oyuk üzerinden bağlandığı düşünülmüştür. Bunun yanı sıra L2 bileşiği plazmid DNA'ya L1'e göre daha düşük derişimlerde etki ederek DNA'da kırılma meydana getirmektedir. L2 ayrıca DNA'nın fosfat omurgasına bağlanarak DNA'yı nötralize ederek çökmesine neden olmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] **Rehman S U, Sarwar T, Husain M A, Ishqi H M and Tabish M** (2015) Studying Non-Covalent Drug–DNA Interactions, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 576: 49-60.
- [2] **Barbuceanu S-F, Almajan G L, Saramet I, Draghici C, Tarcomnicu A I and Bancescu G** (2009) Synthesis, Characterization and Evaluation of Antibacterial Activity of Some Thiazolo [3, 2-B][1, 2, 4] Triazole Incorporating Diphenylsulfone Moieties, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(11): 4752-4757.
- [3] **Boiani M and González M** (2005) Imidazole and Benzimidazole Derivatives as Chemotherapeutic Agents, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(4): 409-424.
- [4] **Pjura P E, Grzeskowiak K and Dickerson R E** (1987) Binding of Hoechst 33258 to The Minor Groove of B-DNA, *Journal of Molecular Biology*, 197(2): 257-271.
- [5] **Hobrecke F** (1872) Reduction-Products of Nitracetamide Compounds, *Deut Chem Ges Ber*, 5: 920-924.
- [6] **Liang M, Liu X, Liu G, Dou S, Cheng D, Liu Y, Ruszkowski M, and Hnatowich D J** (2010) Reducing the Background Fluorescence in Mice Receiving Fluorophore/Inhibitor DNA Duplexes, *Molecular Pharmaceutics*, 8(1): 126-132.
- [7] **Froehlich E, Mandeville J S, Weinert C M, Kreplak L and Tajmir-Riahi H A** (2011) Bundling and Aggregation of DNA by Cationic Dendrimers, *Biomacromolecules*, 12(2): 511-517.
- [8] **Dahm R** (2005) Friedrich Miescher and the Discovery of DNA, *Developmental Biology*, 278(2): 274-288.
- [9] **Avery O T, MacLeod C M, Lederberg J, Dubos R and McCarty M** (1944) Symposium February 2, 1979, *The Journal of Experimental Medicine*, 79(2): 137-158.
- [10] **Watson J D and Crick F H** (1953) A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 171(4356): 737-738.
- [11] **Chargaff E, Vischer E, Doniger R, Green C and Misani F** (1949) The Composition of The Desoxypentose Nucleic Acids of Thymus And Spleen, *Journal of Biological Chemistry*, 177(1): 405-416.
- [12] **Passarge E** (1995) *Color Atlas of Genetics*, 8st Edition, ISBN: 3131003618, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 411 pp.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [13] **Silverman R B and Holladay M W**, 2014, in *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action* (Third Edition), *Chapter 6 - DNA-Interactive Agents*, R.B. Silverman and M.W. Holladay, Editors. 978-0-12-382030-3, Academic Press: Boston. p. 275-331.
- [14] **Strayer L** (1981) *Biochemistry*, 1st Edition, ISBN: 9786053552024, Palme Yayınevi, Ankara, 1186 pp.
- [15] **Watson J.D. e a** (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 7th Edition, ISBN: 978-0-321-76243-6, Gold Spring Harbor, New York, 845 pp.
- [16] **Neidle S** (1999) *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, 1st Edition, ISBN: 0198500386, Oxford University Press on Demand, 680 pp.
- [17] **Brett A M O, Macedo T R A, Raimundo D, Marques M H and Serrano S H P** (1998) Voltammetric Behaviour of Mitoxantrone at a DNA-Biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 13(7): 861-867.
- [18] **Franklin R E and Gosling R G** (1953) The Structure of Sodium Thymonucleate Fibres. I. The Influence of Water Content, *Acta Crystallographica*, 6(8-9): 673-677.
- [19] **Hanlon S** (1966) The Importance of London Dispersion Forces in The Maintenance of The Deoxyribonucleic Acid Helix, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 23(6): 861-867.
- [20] **Beak P** (1977) Energies and Alkylations of Tautomeric Heterocyclic Compounds: Old Problems-New Answers, *Accounts of Chemical Research*, 10(5): 186-192.
- [21] **Lown J W** (1988) Lexitropsins: Rational Design of DNA Sequence Reading Agents as Novel Anti-Cancer Agents and Potential Cellular Probes, *Anti-Cancer Drug Design*, 3(1): 25-40.
- [22] **Takeda Y, Ohlendorf D, Anderson W and Matthews B** (1983) DNA-Binding Proteins, *Science*, 221(4615): 1020-1026.
- [23] **Pabo C O and Sauer R T** (1984) Protein-DNA Recognition, *Annual Review of Biochemistry*, 53(1): 293-321.
- [24] **Kielkopf C L, White S, Szewczyk J W, Turner J M, Baird E E, Dervan P B, and Rees D C** Recognition of AT and TA Base Pairs in the Minor Groove of:
- [25] **Zhu K, Hu X, Ge Q and Sun Q** (2014) Fluorescent Recognition of Deoxyribonucleic Acids by A Quantum Dot/Meso-Tetrakis (N-Methylpyridinium-4-Yl) Porphyrin Complex Based on a Photo Induced Electron-Transfer Mechanism, *Analytica Chimica Acta*, 812: 199-205.
- [26] **Gao X, Mirau P and Patel D J** (1992) Structure Refinement of The Chromomycin Dimer-DNA Oligomer Complex in Solution, *Journal of Molecular Biology*, 223(1): 259-279.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [27] **Hernández-Pérez S, Cabrera E, Amoedo H, Rodríguez-Acebes S, Koundrioukoff S, Debatisse M, Méndez J, and Freire R** (2016) USP37 Deubiquitinates Cdt1 and Contributes to Regulate DNA Replication, *Molecular Oncology*, 10(8): 1196-1206.
- [28] **Kuetch V K** (2016) Ab Initio Bubble-Driven Denaturation of Double-Stranded DNA: Self-Mechanical Theory, *Journal of Theoretical Biology*, 401: 15-29.
- [29] **Frank-Kamenetskii M D and Prakash S** (2014) Fluctuations in the DNA Double Helix: a Critical Review, *Physics of Life Reviews*, 11(2): 153-170.
- [30] **P. Kara, K.Dağdeviren, M. Ozsöz**, Electrochemical DNA Biosensors for the Detection of DNA Damage by Radioactive Iodine and Terchnetium, *T. Journal of Chemistry*, 31 (3), 1-6
- [31] **Gnarra J, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei M, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, and Duh F-M** (1994) Mutations of the VHL Tumour Suppressor Gene in Renal Carcinoma, *Nature genetics*, 7(1): 85.
- [32] **Harman D** (1962) Role of Free Radicals in Mutation, Cancer, Aging, and the Maintenance of Life, *Radiation Research*, 16(5): 753-763.
- [33] **Kwakye-Berko F and Meshnick S R** (1989) Binding of Chloroquine to DNA, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 35(1): 51-55.
- [34] **Marty R, Ouameur A A, Neault J-F, Nafisi S and Tajmir-Riahi H-A** (2004) AZT–DNA Interaction, *DNA and Cell Biology*, 23(3): 135-140.
- [35] **Lisgarten J N, Coll M, Portugal J, Wright C W and Aymami J** (2002) The Antimalarial and Cytotoxic Drug Cryptolepine Intercalates into DNA at Cytosine-Cytosine Sites, *Nature Structural and Molecular Biology*, 9(1): 57.
- [36] **Sparks J and Scholz C** (2009) Evaluation of a Cationic Poly(β -hydroxyalkanoate) as a Plasmid DNA Delivery System, *Biomacromolecules*, 10(7): 1715-1719.
- [37] **Singh M P, Joseph T, Kumar S, Bathini Y and Lown J W** (1992) Synthesis and Sequence-Specific DNA Binding of a Topoisomerase Inhibitory Analog of Hoechst 33258 Designed for Altered Base and Sequence Recognition, *Chemical Research In Toxicology*, 5(5): 597-607.
- [38] **Pham W, Choi Y, Weissleder R and Tung C-H** (2004) Developing a Peptide-Based Near-Infrared Molecular Probe for Protease Sensing, *Bioconjugate Chemistry*, 15(6): 1403-1407.
- [39] **Wang F, Tan W B, Zhang Y, Fan X and Wang M** (2005) Luminescent Nanomaterials for Biological Labelling, *Nanotechnology*, 17(1): R1.
- [40] **Ocak I and Kara H E S** (2018) Phosphorescent Detection of DNA- Drug Interaction Based on Emission Quenching of Zns Quantum Dots via Photoinduced Electron Transfer, *Journal of Luminescence*, 197: 112-118.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [41] **Kayaalp S** (ed) (1998) *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 13st Edition, 2, ISBN: 9786055270100, Hacettepe-Taş Yayinlari, Ankara, 1007-1072 s.
- [42] **Bellamy C O** (1997) p53 and Apoptosis, *British medical bulletin*, 53(3): 522-538.
- [43] **Hanahan D and Weinberg R A** (2011) Hallmarks of Cancer: the Next Generation, *Cell*, 144(5): 646-674.
- [44] **Hanahan D and Weinberg R A** (2000) The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100(1): 57-70.
- [45] **Gerschenson L and Rotello R** (1992) Apoptosis: a Different Type of Cell Death, *The FASEB Journal*, 6(7): 2450-2455.
- [46] **Tilly J L, Kowalski K I, Johnson A L and Hsueh A J W** (1991) Involvement of Apoptosis in Ovarian Follicular Atresia and Postovulatory Regression, *Endocrinology*, 129(5): 2799-2801.
- [47] **Erdoğan B B and Uzaslan E K** (2003) Apoptozis Mekanizmaları: Tümör Gelişiminde Fas-Fasl Bağimli Apoptozis, *Türkiye Klinikleri Archives of Lung*, 4(3): 165-174.
- [48] **Flici H, Cattenoz P B, Komonyi O, Laneve P, Erkosar B, Karatas O F, Reichert H, Berzsenyi S, and Giangrande A** (2014) Interlocked Loops Trigger Lineage Specification and Stable Fates in the Drosophila Nervous System, *Nature Communications*, 5: 4484.
- [49] **Karatas O F, Guzel E, Suer I, Ekici I D, Caskurlu T, Creighton C J, Ittmann M, and Ozen M** (2014) miR-1 and miR-133b are Differentially Expressed in Patients with Recurrent Prostate Cancer, *PloS one*, 9(6): e98675.
- [50] **Shamberger R** (1986) Evaluation of Water Soluble and Lipid Soluble Sialic Acid Levels as Tumor Markers, *Anticancer Research*, 6(4): 717-720.
- [51] **Chatterjea and Shinde R** (2012) *Medical Biochemistry*, 1st Edition, ISBN: 8180613658, Jaypee Brothers Medical Publishers, Mumbai, 800 pp/s.
- [52] **VF R, TL L and Williams DA e a** (2007) *Principles of Medicinal Chemistry*, 7st Edition, ISBN: 978-1-60913-345-0, Lippincott Williams & Wilkins, New York, 1147 pp/s.
- [53] **Calabresi P and Welch A** (1962) Chemotherapy of Neoplastic Diseases, *Annual Review of Medicine*, 13(1): 147-202.
- [54] **Hitchings G H** (1983) Rational Design of Anticancer Drugs: Here, Imminent or Illusive. In Development of Target-Oriented Anticancer Drugs”, *Progress in Cancer Research and Therapy*, 28, Raven Press, New York, 227-238.
- [55] **Sirajuddin M, Ali S and Badshah A** (2013) Drug–DNA Interactions and Their Study by UV–Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124: 1-19.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [56] **Randolph V L, Vallejo A, Spiro R H, Shah J, Strong E W, Huvos A G, and Wittes R E** (1978) Combination Therapy of Advanced Head and Neck Cancer. Induction of Remissions with Diamminedichloroplatinum (II), Bleomycin and Radiation Therapy, *Cancer*, 41(2): 460-467.
- [57] **Strekowski L and Wilson B** (2007) Noncovalent Interactions with DNA: an Overview, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623(1): 3-13.
- [58] **Park H-J and Hurley L H** (1997) Covalent Modification of N3 of Guanine by (+)-CC-1065 Results in Protonation of the Cross-Strand Cytosine, *Journal of the American Chemical Society*, 119(3): 629-630.
- [59] **Liu H-K and Sadler P J** (2011) Metal Complexes as DNA Intercalators, *Accounts of Chemical Research*, 44(5): 349-359.
- [60] **Huang H, Zhu L, Reid B R, Drobny G P and Hopkins P B** (1995) Solution Structure of a Cisplatin-Induced DNA Interstrand Cross-Link, *Science*, 270(5243): 1842.
- [61] **Krumbhaar E B and Krumbhaar H D** (1919) The Blood and Bone Marrow in Yellow Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning: Changes Produced in The Bone Marrow of Fatal Cases, *The Journal of Medical Research*, 40(3): 497.
- [62] **Lerman L S** (1961) Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines, *Journal of Molecular Biology*, 3(1): 18-14.
- [63] **Baginski M, Fogolari F and Briggs J M** (1997) Electrostatic and Non-Electrostatic Contributions to the Binding Free Energies of Anthracycline Antibiotics to DNA1, *Journal of Molecular Biology*, 274(2): 253-267.
- [64] **Martinez R and Chacon-Garcia L** (2005) The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What It Worked and What Did Not Work, *Current Medicinal Chemistry*, 12(2): 127-151.
- [65] **Shui X, Peek M E, Lipscomb L A, Gao Q, Ogata C, Roques B P, Garbay-Jaureguiberry C, Wilkinson A P, and Williams L D** (2000) Effects of Cationic Charge on Three-Dimensional Structures of Intercalative Complexes Structure of a Bis-Intercalated DNA Complex Solved by MAD Phasing, *Current Medicinal Chemistry*, 7(1): 59-71.
- [66] **Bauer W and Vinograd J** (1970) The Interaction of Closed Circular DNA With Intercalative Dyes: III. Dependence of The Buoyant Density upon Superhelix Density and Base Composition, *Journal of Molecular Biology*, 54(2): 281-298.
- [67] **Thurston D E** (2006) *Chemistry and pharmacology of anticancer drugs*, 1st Edition, ISBN: 1420008900, CRC press, Florida, 312 pp.
- [69] **Casciato D A, Lowitz B B and Manavoğlu O** (2004) *Klinik onkoloji el kitabı*, 1st Edition, ISBN: 9758624873, Palme Yayıncılık, Ankara, 750 s.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [70] **Gewirtz D** (1999) A Critical Evaluation of The Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin, *Biochemical Pharmacology*, 57(7): 727-741.
- [71] **Thorn C F, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein T E, and Altman R B** (2011) Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects, *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7): 440.
- [72] **Quigley G J, Wang A-H, Ughetto G, Van Der Marel G, Van Boom J H and Rich A** (1980) Molecular Structure of an Anticancer Drug-DNA Complex: Daunomycin Plus D (Cpgptpapcp), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12): 7204-7208.
- [73] **Weiss R B**. The Anthracyclines: Will We Ever Find a Better Doxorubicin?, *Seminars in Oncology*. 1992. Elsevier. 19(6): 670–86
- [74] **Roth A D, Maibach R, Fazio N, Sessa C, Stupp R, Morant R, Herrmann R, Borner M, Goldhirsch A, and de Braud F** (2004) 5-Fluorouracil as Protracted Continuous Intravenous Infusion Can Be Added to Full-Dose Docetaxel (Taxotere®)–Cisplatin in Advanced Gastric Carcinoma: A Phase I–II Trial, *Annals of oncology*, 15(5): 759-764.
- [75] **Hurwitz J, Furth J, Malamy M and Alexander M** (1962) The Role of Deoxyribonucleic Acid in Ribonucleic Acid Synthesis, III. The Inhibition of The Enzymatic Synthesis of Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid by Actinomycin D and Proflavin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 48(7): 1222-1230.
- [76] **Kelly J M, Tossi A B, McConnell D J and OhUigin C** (1985) A Study of the Interactions of Some Polypyridylruthenium(II) Complexes with DNA Using Fluorescence Spectroscopy, Topoisomerisation and Thermal Denaturation, *Nucleic Acids Research*, 13(17): 6017-6034.
- [77] **Türker F and SO K** (2005) *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 1st Edition, ISBN: 8975935415, Feryal Matbaacılık, Ankara, 317-343.
- [78] **Süzer Ö** (2008) Farmakoloji Ders Kitabı, *İstanbul: İstanbul Üniversitesi CTF Yayınları*: 567-9.
- [79] **Pullarkat S, Stoecklacher J, Ghaderi V, Xiong Y, Ingles S, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, and Lenz H** (2001) Thymidylate Synthase Gene Polymorphism Determines Response and Toxicity of 5-FU Chemotherapy, *The Pharmacogenomics Journal*, 1(1): 65.
- [80] **Heidelberger C, Chaudhuri N, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, DUSCHINSKY R, Schnitzer R, Plevin E, and Scheiner J** (1957) Fluorinated Pyrimidines, a New Class of Tumour-Inhibitory Compounds, *Nature*, 179(4561): 663.
- [81] **Grem J** (1996) 5-Fluoropyrimidine, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, 149-211.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [82] **Cho K, Chung J Y, Cho S K, Shin H-W, Jang I-J, Park J-W, Yu K-S, and Cho J-Y** (2015) Antihyperglycemic Mechanism of Metformin Occurs via the AMPK/LXR α /POMC Pathway, *Scientific Reports*, 5: 8145.
- [83] **Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I and Mazzei T** (2006) Cellular Pharmacology of Gemcitabine, *Annals of Oncology*, 17(suppl_5): v7-v12.
- [84] **Randall M E and Constable W C** (1985) Guidelines for Handling Parenteral Antineoplastics, *JAMA*, 254(8): 1033-1033.
- [85] **Iliopoulos D, Hirsch H A and Struhl K** (2011) Metformin Decreases The Dose of Chemotherapy for Prolonging Tumor Remission in Mouse Xenografts Involving Multiple Cancer Cell Types, *Cancer Research*, 71(9): 3196-3201.
- [86] **Jones R B, Frank R and Mass T** (1983) Safe Handling of Chemotherapeutic Agents: A Report from the Mount Sinai Medical Center, CA: *A Cancer Journal for Clinicians*, 33(5): 258-263.
- [87] **LA. S** (1994) Programmed Cell Death and Response to Anti-Cancer Drugs, *Anticancer Drugs*, 5: 3-9.
- [88] **Eisenhauer E A and Vermorken J B** (1998) The Taxoids, *Drugs*, 55(1): 5-30.
- [89] **Rose W C** (1992) Taxol: A Review of Its Preclinical in Vivo Antitumor Activity, *Anti-Cancer Drugs*, 3(4): 311-321.
- [90] **Suffness M** (1995) *Taxol: Science and Applications*, ISBN: 084938382X, 22st Edition, CRC press, Florida, 448 s.
- [91] **Conti J A, Kemeny N E, Saltz L B, Huang Y, Tong W P, Chou T-C, Sun M, Pulliam S, and Gonzalez C** (1996) Irinotecan is an Active Agent in Untreated Patients with Metastatic Colorectal Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 14(3): 709-715.
- [92] **Özşahin M, Özşahin H and Schwartz L H** Kanser Kemoprevansiyonunda Retinoik Asitlerin Yeri, *Türk Onkoloji Dergisi*, 7st, 1-4.
- [93] **Ölgen S, Biçak I and Nebioğlu D** (2002) Angiogenesis ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar, *J. Fac. Pharm*, 31(3): 193-214.
- [94] **González-Ruiz V, Olives A I, Martín M A, Ribelles P, Ramos M T and Menéndez J C**, 2011, In Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies, *an Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug-DNA Interactions. Applications to The Design of Genosensors*. ISBN 978-953-307-514-3, Intech, 644 pp/s.
- [95] **Akdi K, Vilaplana R A, Kamah S and González-Vílchez F** (2005) Effects of Tris and Hepes Buffers on The Interaction of Palladium–Diaminopropane Complexes With DNA, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(6): 1360-1368.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [96] Arjmand F, Parveen S, Afzal M, Toupet L and Hadda T B (2012) Molecular Drug Design, Synthesis and Crystal Structure Determination of Cu II–Sn IV Heterobimetallic Core: DNA Binding and Cleavage Studies, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 49: 141-150.
- [97] Song Y, Zhong D, Luo J, Tan H, Chen S, Li P, Wang L, and Wang T (2014) Binding Characteristics and Interactive Region of 2-Phenylpyrazolo [1, 5-C] Quinazoline With DNA, *Luminescence*, 29(8): 1141-1147.
- [98] Pratviel G, Bernadou J and Meunier B, 1998, In Advances in Inorganic Chemistry, *DNA and RNA Cleavage by Metal Complexes*. Vol. 45, 0898-8838, Elsevier. P. 251-312.
- [99] Shahabadi N, Kashanian S, Khosravi M and Mahdavi M (2010) Multispectroscopic DNA Interaction Studies of a Water-Soluble Nickel (II) Complex Containing Different Dinitrogen Aromatic Ligands, *Transition Metal Chemistry*, 35(6): 699-705.
- [100] Arjmand F and Jamsheera A (2011) DNA Binding Studies of New Valine Derived Chiral Complexes of Tin (IV) and Zirconium (IV), *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(1): 45-51.
- [101] Long E C and Barton J K (1990) On Demonstrating DNA Intercalation, *Accounts of Chemical Research*, 23(9): 271-273.
- [102] Pyle A, Rehmann J, Meshoyrer R, Kumar C, Turro N and Barton J K (1989) Mixed-Ligand Complexes Of Ruthenium (II): Factors Governing Binding to DNA, *Journal of The American Chemical Society*, 111(8): 3051-3058.
- [103] Wang L, Wu Y, Chen T and Wei C (2013) The Interactions of Phenanthroline Compounds with Dnas: Preferential Binding to Telomeric Quadruplex over Duplex, *International Journal of Biological Macromolecules*, 52: 1-8.
- [104] Wolfe A, Shimer Jr G H and Meehan T (1987) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA, *Biochemistry*, 26(20): 6392-6396.
- [105] Kalanur S S, Katrahalli U and Seetharamappa J (2009) Electrochemical Studies and Spectroscopic Investigations on The Interaction of an Anticancer Drug with DNA and Their Analytical Applications, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 636(1): 93-100.
- [106] Tao M, Zhang G, Pan J and Xiong C (2016) Deciphering The Groove Binding Modes of Tau-Fluvalinate and Flumethrin With Calf Thymus DNA, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 155: 28-37.
- [107] Singla P, Luxami V, Singh R, Tandon V and Paul K (2017) Novel Pyrazolo[3,4-D]Pyrimidine with 4-(1H-Benzimidazol-2-Yl)-Phenylamine as Broad Spectrum Anticancer Agents: Synthesis, Cell Based Assay, Topoisomerase Inhibition, DNA Intercalation and Bovine Serum Albumin Studies, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 126: 24-35.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [108] **Jaumot J and Gargallo R** (2012) Experimental Methods for Studying The Interactions Between G-Quadruplex Structures and Ligands, *Current Pharmaceutical Design*, 18(14): 1900-1916.
- [109] **Lakowicz J R** (2006) Plasmonics in Biology and Plasmon-Controlled Fluorescence, *Plasmonics*, 1(1): 5-33.
- [110] **Li W-Y, Xu J-G, Guo X-Q, Zhu Q-Z and Zhao Y-B** (1997) Study on The Interaction Between Rivanol and DNA And Its Application to DNA Assay, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 53(5): 781-787.
- [111] **Barone G, Terenzi A, Lauria A, Almerico A M, Leal J M, Busto N, and Garcia B** (2013) DNA-Binding of Nickel(II), Copper(II) And Zinc(II) Complexes: Structure–Affinity Relationships, *Coordination Chemistry Reviews*, 257(19): 2848-2862.
- [112] **Satyanarayana S, Dabrowiak J C and Chaires J B** (1992) Neither. DELTA.-Nor. LAMBDA.-Tris (Phenanthroline) Ruthenium (II) Binds to DNA by Classical Intercalation, *Biochemistry*, 31(39): 9319-9324.
- [113] **Tiselius A** (1937) A New Apparatus for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures, *Transactions of The Faraday Society*, 33: 524-531.
- [114] **Tabassum S, Asim A, Arjmand F, Afzal M and Bagchi V** (2012) Synthesis and Characterization of Copper(II) and Zinc(II)-Based Potential Chemotherapeutic Compounds: Their Biological Evaluation Viz. DNA Binding Profile, Cleavage and Antimicrobial Activity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 58: 308-316.
- [115] **Tabassum S, Ahmad M, Afzal M, Zaki M and Bharadwaj P K** (2014) Synthesis and Structure Elucidation of A Copper(II) Schiff-Base Complex: In Vitro DNA Binding, Pbr322 Plasmid Cleavage and HSA Binding Studies, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140: 321-331.
- [116] **Bağda E, Yabaş E and Bağda E** (2017) Analytical Approaches for Clarification of DNA-Double Decker Phthalocyanine Binding Mechanism: as an Alternative Anticancer Chemotherapeutic, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 172: 199-204.
- [117] **Kumar H, Devaraji V, Prasath R, Jadhao M, Joshi R, Bhavana P, and Ghosh S K** (2015) Groove Binding Mediated Structural Modulation and DNA Cleavage by Quinoline Appended Chalcone Derivative, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 151: 605-615.
- [118] **Du K-J, Wang J-Q, Kou J-F, Li G-Y, Wang L-L, Chao H, and Ji L-N** (2011) Synthesis, DNA-Binding and Topoisomerase Inhibitory Activity of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(4): 1056-1065.
- [119] **Higashio Y and Shoji T** (2004) Heterocyclic Compounds Such as Pyrrole, Pyridines, Pyrrolidine, Piperidine, Indole, Imidazol and Pyrazines, *Applied Catalysis A: General*, 260(2): 251-259.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [120] Losasso C, Angrisani M, Coluccino A, Lucarelli C, Falzarano C, Palumbo A, Abignente E, De P C, and Luraschi E (1990) Research on Heterocyclic Compounds. Phenyl Derivatives of Fused Imidazole Systems: Antiinflammatory Activity, *Pharmacological Research*, 22: 78-79.
- [121] Ning W-H, Guo P-C and Ren X-M (2014) One-Dimensional Molecular Solid [I-Bzpy-D 5][Pt (Mnt) 2](I-Bzpy-D 5+= 1-N-(4-Iodobenzyl) Pyridinium-D 5, Mnt 2= Maleonitriledithiolate): Synthesis, Crystal Structure, Magnetic Property and Variable-Temperature Infrared Spectra, *Synthetic Metals*, 191: 161-167.
- [122] Dehand J and Jordanov J (1976) Complexes of Pt (II), Pd (II), Rh (I) and Rh (III) with Nitrogen and Sulfur-Containing Heterocyclic Ligands of Biological Interest. Synthesis, Characterization and Influence of Ph, *Inorganica Chimica Acta*, 17: 37-44.
- [123] Guo X-Z, Shi L, Wang R, Liu X-X, Li B-G and Lu X-X (2008) Synthesis and Biological Activities of Novel Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonists Based on Benzimidazole Derivatives Bearing a Heterocyclic Ring, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(24): 10301-10310.
- [124] Bagdi A K, Santra S, Monir K and Hajra A (2015) Synthesis of Imidazo [1, 2-A] Pyridines: A Decade Update, *Chemical Communications*, 51(9): 1555-1575.
- [125] Chichibabin A E (1925) Tautomerism of A-Aminopyridine. IV. a Method of Preparation of Pyrimidazole and Its Homologs, *Ber.*, (58B): 1704-1706.
- [126] MARIE E, (2012) *PhD Thesis*, François University, Life and health sciences, Therapeutic chemistry, Tours, 302.
- [127] Gudmundsson K S and Johns B A (2003) Synthesis of Novel Imidazo [1, 2-A] Pyridines with Potent Activity Against Herpesviruses, *Organic Letters*, 5(8): 1369-1372.
- [128] Puerstinger G, Paeshuyse J, De Clercq E and Neyts J (2007) Antiviral 2, 5-Disubstituted Imidazo [4, 5-C] Pyridines: From Anti-Pestivirus to Anti-Hepatitis C Virus Activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(2): 390-393.
- [129] Abe Y, Kayakiri H, Satoh S, Inoue T, Sawada Y, Inamura N, Asano M, Hatori C, Sawai H, and Oku T (1998) A Novel Class of Orally Active Non-Peptide Bradykinin B2 Receptor Antagonists. 2. Overcoming The Species Difference Between Guinea Pig and Man, *Journal Of Medicinal Chemistry*, 41(21): 4053-4061.
- [130] Ismail M A, Brun R, Wenzler T, Tanious F A, Wilson W D and Boykin D W (2004) Novel Dicationic Imidazo [1, 2-A] Pyridines And 5, 6, 7, 8-Tetrahydro-Imidazo [1, 2-A] Pyridines As Antiprotozoal Agents, *Journal Of Medicinal Chemistry*, 47(14): 3658-3664.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [131] Bode M L, Gravestock D, Moleele S S, Van Der Westhuyzen C W, Pelly S C, Steenkamp P A, Hoppe H C, Khan T, And Nkabinde L A (2011) Imidazo[1,2-A]Pyridin-3-Amines as Potential HIV-1 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(14): 4227-4237.
- [132] Lima P C, Avery M A, Tekwani B L, De M Alves H, Barreiro E J And Fraga C A (2002) Synthesis And Biological Evaluation of New Imidazo [1, 2-A] Pyridine Derivatives Designed as Mefloquine Analogues, *Il Farmaco*, 57(10): 825-832.
- [133] Trapani G, Franco M, Latrofa A, Ricciardi L, Carotti A, Serra M, Sanna E, Biggio G, and Liso G (1999) Novel 2-Phenylimidazo [1, 2-A] Pyridine Derivatives as Potent and Selective Ligands for Peripheral Benzodiazepine Receptors: Synthesis, Binding Affinity, and in Vivo Studies, *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(19): 3934-3941.
- [134] Lacerda R B, De Lima C K, Da Silva L L, Romeiro N C, Miranda A L P, Barreiro E J, and Fraga C A (2009) Discovery of Novel Analgesic and Anti-Inflammatory 3-Arylamine-Imidazo [1, 2-A] Pyridine Symbiotic Prototypes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(1): 74-84.
- [135] Moraski G C, Markley L D, Cramer J, Hipskind P A, Boshoff H, Bailey M A, Alling T, Ollinger J, Parish T, and Miller M J (2013) Advancement of Imidazo [1, 2-A] Pyridines with Improved Pharmacokinetics and Nm Activity Vs. Mycobacterium Tuberculosis, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(7): 675-679.
- [136] Starrett Jr J E, Montzka T A, Crosswell A R and Cavanagh R L (1989) Synthesis And Biological Activity of 3-Substituted Imidazo [1, 2-A] Pyridines as Antiulcer Agents, *Journal of Medicinal Chemistry*, 32(9): 2204-2210.
- [137] Geronikaki A, Babaev E, Dearden J, Dehaen W, Filimonov D, Galaeva I, Krajneva V, Lagunin A, Macaev F, and Molodavkin G (2004) Design, Synthesis, Computational and Biological Evaluation of New Anxiolytics, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(24): 6559-6568.
- [138] Dumont F, Waterhouse R N, Montoya J A, Mattner F, Katsifis A, Kegeles L S, and Laruelle M (2003) Synthesis And In Vivo Evaluation Of [11C] Zolpidem, an Imidazopyridine with Agonist Properties at Central Benzodiazepine Receptors, *Nuclear Medicine and Biology*, 30(4): 435-439.
- [139] Denora N, Laquintana V, Pisu M G, Dore R, Murru L, Latrofa A, Trapani G, and Sanna E (2008) 2-Phenyl-Imidazo [1, 2-A] Pyridine Compounds Containing Hydrophilic Groups as Potent and Selective Ligands for Peripheral Benzodiazepine Receptors: Synthesis, Binding Affinity and Electrophysiological Studies, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(21): 6876-6888.
- [140] Wu Z, Fraley M E, Bilodeau M T, Kaufman M L, Tasber E S, Balitza A E, Hartman G D, Coll K E, Rickert K, and Shipman J (2004) Design and Synthesis of 3, 7-Diarylimidazopyridines as Inhibitors of the VEGF-Receptor KDR, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(4): 909-912.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [141] **Dar A M, Rah B, Mir S, Nabi R, Shamsuzzaman, Gatoo M A, Mashrai A, and Khan Y** (2018) DNA Binding, Artificial Nuclease Activity and Cytotoxic Studies of Newly Synthesized Steroidal Pyrimidines, *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 52-61.
- [142] **Harrison T S and Keating G M** (2005) Zolpidem, *CNS Drugs*, 19(1): 65-89.
- [143] **Dar A M and Gatoo M A** (2015) Synthesis of New Steroidal Imidazo [1, 2-A] Pyridines: DNA Binding Studies, Cleavage Activity and in Vitro Cytotoxicity, *Steroids*, 104: 163-175.
- [144] **Chowdhury M A, Huq F, Abdullah A, Beale P and Fisher K** (2005) Synthesis, Characterization and Binding with DNA Of Four Planaramineplatinum (II) Complexes of the Forms: Trans-PtL₂Cl₂ and [PtL₃Cl] Cl, Where L= 3-Hydroxypyridine, 4-Hydroxypyridine and Imidazo (1, 2-A) Pyridine, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(5): 1098-1112.
- [145] **Huq F, Yu J Q, Daghriri H and Beale P** (2004) Studies on Activities, Cell Uptake and DNA Binding of Four Trans-Planaramineplatinum (II) Complexes of The Form: Trans-PtL (NH₃) Cl₂, Where L= 2-Hydroxypyridine, Imidazole, 3-Hydroxypyridine and Imidazo (1, 2-A) Pyridine, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(8): 1261-1270.
- [146] **Seferoğlu Z, Mahmoud M M A and Ihmels H** (2016) Studies of the Binding Interactions of Dicationic Styrylimidazo[1,2-A]Pyridinium Dyes with Duplex and Quadruplex DNA, *Dyes and Pigments*, 125: 241-248.
- [147] **Dahan-Farkas N, Langley C, Rousseau A L, Yadav D B, Davids H and De Koning C B** (2011) 6-Substituted Imidazo[1,2-A]Pyridines: Synthesis and Biological Activity Against Colon Cancer Cell Lines HT-29 and Caco-2, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(9): 4573-4583.
- [148] **Dam J, Ismail Z, Kurebwa T, Gangat N, Harmse L, Marques H, Lemmerer A, Bode M, and Koning C** (2017) Synthesis of Copper and Zinc 2-(Pyridin-2-Yl)Imidazo[1,2-A]Pyridine Complexes and Their Potential Anticancer Activity, *Elsevier*, 126: 353-368,
- [149] **Bosch P, García V, Bilen B S, Sucunza D, Domingo A, Mendicuti F, and Vaquero J J** (2017) Imidazopyridinium Cations: A New Family of Azonia Aromatic Heterocycles with Applications as DNA Intercalators, *Dyes and Pigments*, 138: 135-146.
- [150] **Mukherjee A, Dhar S, Nethaji M and Chakravarty A R** (2005) Ternary Iron (II) Complex with an Emissive Imidazopyridine Arm from Schiff Base Cyclizations and Its Oxidative DNA Cleavage Activity, *Dalton Transactions*, (2): 349-353.
- [151] **Desimone R, Currie K, Mitchell S, Darrow J and Pippin D** (2004) Privileged Structures: Applications in Drug Discovery, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 7(5): 473-493.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [152] **Gaba M and Mohan C** (2016) Development of Drugs Based on Imidazole and Benzimidazole Bioactive Heterocycles: Recent Advances and Future Directions, *Medicinal Chemistry Research*, 25(2): 173-210.
- [153] **Barker H, Smyth R, Weissbach H, Toohey J, Ladd J and Volcani B** (1960) Isolation and Properties of Crystalline Cobamide Coenzymes Containing Benzimidazole Or 5, 6-Dimethylbenzimidazole, *Journal of Biological Chemistry*, 235(2): 480-488.
- [154] **Mckellar Q And Scott E** (1990) The Benzimidazole Anthelmintic Agents-A Review, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13(3): 223-247.
- [155] **Spasov A, Yozhitsa I, Bugaeva L and Anisimova V** (1999) Benzimidazole Derivatives: Spectrum of Pharmacological Activity and Toxicological Properties (A Review), *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 33(5): 232-243.
- [156] **Rossignol J and Maisonneuve H** (1984) Benzimidazoles in the Treatment of Trichuriasis: A Review, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 78(2): 135-144.
- [157] **Patil A, Ganguly S and Surana S** (2008) A Systematic Review of Benzimidazole Derivatives as an Antiulcer Agent, *Rasayan J Chem*, 1(3): 447-460.
- [158] **Dubey A and Sanyal P** (2010) Benzimidazoles In A Wormy World, *Online Vet J*, 5: 63.
- [159] **Narasimhan B, Sharma D and Kumar P** (2012) Benzimidazole: A Medicinally Important Heterocyclic Moiety, *Medicinal Chemistry Research*, 21(3): 269-283.
- [160] **Hegde M, Kumar K S S, Thomas E, Ananda H, Raghavan S C and Rangappa K S** (2015) A Novel Benzimidazole Derivative Binds to the DNA Minor Groove and Induces Apoptosis in Leukemic Cells, *RSC Advances*, 5(113): 93194-93208.
- [161] **Wang X-J, Yang M-L, Zhang L-P, Yao T, Chen C, Mao L-G, Wang Y, and Wu J** (2014) Design of Novel Bis-Benzimidazole Derivatives as DNA Minor Groove Binding Agents, *Chinese Chemical Letters*, 25(4): 589-592.
- [162] **Singla P, Luxami V and Paul K** (2015) Triazine-Benzimidazole Hybrids: Anticancer Activity, DNA Interaction and Dihydrofolate Reductase Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(8): 1691-1700.
- [163] **Rodríguez-Cordero M, Cigüela N, Llovera L, González T, Briceño A, Landaeta V R, and Pastrán J** (2018) Synthesis, Structural Elucidation and DNA Binding Profile Of Zn (II) Bis-Benzimidazole Complexes, *Inorganic Chemistry Communications*, 91: 124-128.
- [164] **Mishra K, Bhardwaj R and Chaudhury N** (2009) Netropsin, A Minor Groove Binding Ligand: A Potential Radioprotective Agent, *Radiation Research*, 172(6): 698-705.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [165] Farahat A A, Ismail M A, Kumar A, Wenzler T, Brun R, Paul A, Wilson W D, and Boykin D W (2018) Indole and Benzimidazole Bichalcophenes: Synthesis, DNA Binding and Antiparasitic Activity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143: 1590-1596.
- [166] Mahmood K, Hashmi W, Ismail H, Mirza B, Twamley B, Akhter Z, Rozas I, and Baker R J (2019) Synthesis, DNA Binding And Antibacterial Activity Of Metal (II) Complexes Of A Benzimidazole Schiff Base, *Polyhedron*, 157: 326-334.
- [167] Mao S, Shen K, Shi X, Xu Y and Wu H (2017) Two Silver (I) Complexes with Bis (Benzimidazole)-2-Oxopropane Ligands: Syntheses, Crystal Structures and DNA Binding Studies, *Applied Organometallic Chemistry*, 31(11): E3747.
- [168] Bostock-Smith C E and Searle M S (1999) DNA Minor Groove Recognition by Bis-Benzimidazole Analogues of Hoechst 33258: Insights into Structure—DNA Affinity Relationships Assessed by Fluorescence Titration Measurements, *Nucleic Acids Research*, 27(7): 1619-1624.
- [169] Ji Y-H, Bur D, Häsler W, Schmitt V R, Dorn A, Bailly C, Waring M J, Hochstrasser R, and Leupin W (2001) Tris-Benzimidazole Derivatives: Design, Synthesis and DNA Sequence Recognition, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9(11): 2905-2919.
- [170] Joubert A, Sun X-W, Johansson E, Bailly C, Mann J and Neidle S (2003) Sequence-Selective Targeting of Long Stretches of The DNA Minor Groove by A Novel Dimeric Bis-Benzimidazole, *Biochemistry*, 42(20): 5984-5992.
- [171] Alper S, Arpacı O T, Aki E Ş And Yalçın I (2003) Some New Bi-And Ter-Benzimidazole Derivatives as Topoisomerase I Inhibitors, *Il Farmaco*, 58(7): 497-507.
- [172] Yang Y-H, Wang Q-H, Nie H, Chen H and Cheng M-S (2008) Synthesis, Biological Evaluation, and Modeling of Dimeric PPI Analogues as Novel DNA Minor Groove Binders, *Molecules*, 13(5): 1179-1188.
- [173] Bistrović A, Krstulović L, Stolić I, Drenjančević D, Talapko J, Taylor M C, Kelly J M, Bajić M, and Raić-Malić S (2018) Synthesis, Anti-Bacterial and Anti-Protozoal Activities of Amidinobenzimidazole Derivatives and Their Interactions with DNA and RNA, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1): 1323-1334.
- [174] Işıkdag İ, Özkay Y, İncesu Z and Akalın G (2011) Anticancer Activity of Some Bisbenzimidazoles, *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 66(9-10): 465-470.
- [175] Huang J, Li G, Wu Z, Song Z, Zhou Y, Shuai L, Weng X, Zhou X, and Yang G (2009) Bisbenzimidazole to Benzobisimidazole: From Binding B-Form Duplex DNA to Recognizing Different Modes of Telomere G-Quadruplex, *Chemical Communications*, (8): 902-904.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [176] **Mann J, Taylor P W, Dorgan C R, Johnson P D, Wilson F X, Vickers R, Dale A G, and Neidle S** (2015) The Discovery of A Novel Antibiotic for The Treatment of Clostridium Difficile Infections: A Story of an Effective Academic–Industrial Partnership, *Medchemcomm*, 6(8): 1420-1426.
- [177] **Dey S, Sarkar S, Paul H, Zangrando E and Chattopadhyay P** (2010) Copper (II) Complex with Tridentate N Donor Ligand: Synthesis, Crystal Structure, Reactivity and DNA Binding Study, *Polyhedron*, 29(6): 1583-1587.
- [178] **Vaidyanathan V and Nair B U** (2005) Synthesis, Characterization and Electrochemical Studies of Mixed Ligand Complexes of Ruthenium (II) with DNA, *Dalton Transactions*, (17): 2842-2848.
- [179] **Sunita M, Anupama B, Ushaiah B and Kumari C G** (2017) Synthesis, Characterization, DNA Binding and Cleavage Studies of Mixed-Ligand Copper (II) Complexes, *Arabian Journal of Chemistry*, 10: S3367-S3374.
- [180] **Loontjens F G, Regenfuss P, Zechel A, Dumortier L and Clegg R M** (1990) Binding Characteristics Of Hoechst 33258 with Calf Thymus DNA, Poly [D (AT)] and D (CCGGAATTCCGG): Multiple Stoichiometries and Determination of Tight Binding with A Wide Spectrum of Site Affinities, *Biochemistry*, 29(38): 9029-9039.
- [181] **Goswami T K, Chakravarthi B V, Roy M, Karande A A and Chakravarty A R** (2011) Ferrocene-Conjugated L-Tryptophan Copper (II) Complexes of Phenanthroline Bases Showing DNA Photocleavage Activity and Cytotoxicity, *Inorganic Chemistry*, 50(17): 8452-8464.



ÖZGEÇMİŞ

Bahar CAYMAZ 1992 yılında Zonguldak'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Zonguldak'ta tamamladı. 2010 yılında Gazi Üniversitesi Kimya Bölümü'ne yerleşti. 2014 yılında mezun olduktan sonra bir süre çalıştı ve 2016 yılında Bülent Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimine başladı.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres: Ayiçi merkez Mah. Şehit Hasan Şahin Sok. No: 2/C

Gelik/ZONGULDAK

Tel: 0546 458 55 11

E-posta: baharcaymaz6167@gmail.com