

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLUKONAZOL İLACININ FLORA BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI, DNA'YA BAĞLANMASININ İN VİTRO VE İN SİLİKO METOT
İLE ANALİZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜMEYYE ZARF

MAYIS, 2019

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLUKONAZOL İLACININ FLORA BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI, DNA'YA BAĞLANMASININ İN VİTRO VE İN SİLİKO METOT
İLE ANALİZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sümeyye ZARF

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Ebrahim VALİPOUR

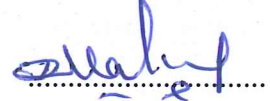
ZONGULDAK
Mayıs, 2019

KABUL:

Sümeyye ZARF tarafından hazırlanan “Flukonazol İlacının Flora Bakteriler Üzerine Etkisinin Araştırılması, DNA’ya Bağlanması ve İn Vitro ve İn Siliko Metot ile Analizi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 27/05/2019

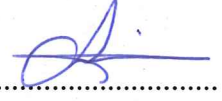
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ebrahim VALIPOUR

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



Üye : Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ

Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik 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.”


Sümeyye ZARF

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FLUKONAZOL İLACININ FLORA BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI, DNA'YA BAĞLANMASININ İN VİTRO VE İN SİLİKO METOT İLE ANALİZİ

Sümeyye ZARF

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ebrahim VALİPOUR

Mayıs 2019, 79 sayfa

Flukonazol, antifungal bir ilaç olarak dünya çapında özellikle ülkemizde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlacın toksik etkileri hakkında bazı çalışmalar olmasına rağmen, çalışmamıza göre Flu-DNA etkileşimleri ve antibakteriyel etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Flukonazol'un oksidatif ve antioksidatif etkileri, Flukonazol-DNA etkileşimi; UV-Vis spektrofotometresi, agaroz jel elektroforezi ve in siliko metodu kullanılarak incelenmiştir. Ek olarak, ilacın bazı insan flora bakterisi suşları üzerindeki etkisi disk difüzyon ve sıvı besiyerinde seyreltme yöntemleri ile incelenmiştir. İlaç, süpersarmal plazmid DNA üzerinde hidroksil radikallerinin kırma etkisine karşı bir miktar koruyucu etki gösterirken; demir, bakır, askorbik asit ve bakır artı askorbik asit varlığında DNA üzerinde herhangi bir etki göstermedi. Flukonazol-DNA etkileşiminin UV Titrasyon metodu ile analizinde, absorbanstaki artış, ilacın DNA ile bazı etkileşimlere sahip olduğunu göstermiştir. Bu yöntemde ilacın DNA ile bağlanma sabiti 179 M^{-1} olarak elde edildi.

ÖZET (devam ediyor)

In-siliko analizi, -3.09 bağlanma enerjisi ile 3 hidrojen bağı ve hidrofobik bağlar yaparak ilacın süpersarmal DNA'nın minör oluşuna tutunduğunu göstererek UV Titrasyon yönteminin sonucunu doğruladı. İlacın 24 mM konsantrasyonu, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* ve *Escherichia coli* suşlarının büyümesini sırasıyla %35, %22, %20 ve %20 olarak inhibe etti.

Anahtar Kelimeler: Flukonazol, antibakteriyel, flora, in-siliko.

Bilim Kodu: 401.02.00



ABSTRACT

M. Sc.Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FLUCONAZOLE ON FLORA BACTERIA, IN VITRO AND IN SILICO ANALYSIS OF ITS BINDING TO DNA

Sümeyye ZARF

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

Thesis Advisor: Assist. Prof. Dr. Ebrahim VALIPOUR

May 2019, 79 pages

Fluconazole is widely used as an antifungal drug worldwide, especially in our country. Although there are some studies about the toxic effects of the drug, according to our study, there is no study about the fluconazole-DNA interactions and its antibacterial effect. In this study, oxidative and anti-oxidative effects of fluconazole, fluconazole-DNA interaction were investigated using UV-Vis spectrophotometer, agarose gel electrophoresis and in-silico method. In addition, effect of the drug on some human flora bacterial strains were studied by disc diffusion and broth dilution methods. The drug showed some protective effect on supercoiled plasmid DNA against breaking effect of hydroxyl radicals, while it did not exhibited any effect on the DNA at presence of iron, copper, copper plus ascorbic acid and ascorbic acid. In the analysis of the fluconazole-DNA interaction by UV Titration method, the increase in absorbance indicated that the compound had some interactions with the DNA. In this method binding constant of the drug with DNA was obtained as 179 M^{-1} . In-silico

ABSTRACT (continued)

analysis confirmed the result of UV Titration method by showing the bonding of the drug on a minor groove of double helix DNA by the binding energy of -3.09, making 3 hydrogen bonds and hydrophobic bonds. 24 mM of the drug inhibited the growth of *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli* strains as 35%, 22%, 20% and 20% respectively.

Keywords: Fluconazole, antibacterial, flora, in silico.

Science Code: 401.02.00



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen başta Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Ender Büyükgüzel olmak üzere tüm bölüm hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans Tez çalışmam boyunca, kıymetli bilgilerini ve engin tecrübelerini zaman kavramı gözetmeksizin esirgemedi aktarmaya çalışan ve bilimsel gelişimimde mevcut tüm olanaklardan faydalanmam için en büyük gayreti gösteren çalışma azmiyle örnek aldığım çok kıymetli Danışman Hocam Dr. Öğretim Üyesi Ebrahim Valipour'a en içten dileklerle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite hayatımın ilk gününden bu yana hiç ayrılmadan pek çok güzel anılar biriktirdiğim ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda içtenlikle yardım eden, hayatımda oldukları için çok şanslı olduğumu hissettiğim çalışma arkadaşlarım Çağla Aslan ve Gülsüm Kübra Gümüş'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım ve hayatım boyunca her an yanımda olan ve beni sonsuz sevgileriyle kucaklayan başta canım babam Ersin Zarf ve canım annem Naime Zarf olmak üzere bütün aile fertlerime sabır ve anlayışlarından dolayı sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmada kullanılan *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), *Proteus mirabilis* (ATCC7002) ve *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047) suşlarını bize cömertçe hediye eden Zonguldak-TÜRKİYE ZBEU Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümüne teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1 KANDİDA YAPISI VE ÖZELLİKLERİ.....	1
1.2. ANTİFUNGAL İLAÇLARIN GELİŞİMİ	1
1.2.1. Antifungal İlaçların Sınıflandırması	2
1.3. AZOL TÜREVİ ANTİFUNGALLER.....	2
1.3.1. Azol Türevlerinin Etki Düzenegi	3
1.4. FLUKONAZOL (FLU)	3
1.5. DNA (DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT)	5
1.5.1. DNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu	6
1.5.2. DNA Üzerindeki Major ve Minör Oluklar	8
1.6 DNA-İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ	9
1.6.1. Kovalent Bağ Etkileşimi	9
1.6.2. Kovalent Olmayan Bağ Etkileşimi	10
1.7 OKSİDATİF STRES KAYNAKLI DNA HASARI	11
1.7.1. Serbest Radikaller	12
1.8. METAL VARLIĞINDA SERBEST RADİKAL OLUŞUMU	12
1.8.1. Demir	12
1.8.2. Bakır.....	13

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
1.9. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS).....	14
1.9.1. Süperoksit radikalleri (O ₂ ⁻)	14
1.9.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	14
1.9.3. Hidroksil radikalleri (OH•)	15
1.10. ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI	16
1.10.1. Askorbik Asit (C Vitamini)	17
1.11. MİKROBİYOM VE MİKROBİYATA.....	19
1.11.1. Bağırsak Mikrobiyotası.....	19
1.11.2. Simbiyoz ve Disbiyozis	21
1.12. BAĞIRSAK FLORA BAKTERİLERİ	22
1.12.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesi	23
1.12.1.1. <i>Escherichia coli</i>	23
1.12.1.2. <i>Proteus mirabilis</i>	24
1.12.1.3. <i>Enterobacter cloacae</i>	25
1.12.2. <i>Enterococcus</i> Ailesi.....	26
1.12.2.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	26
BÖLÜM 2 MATERYAL VE METOT	27
2.1. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER	27
2.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	27
2.2.1. Elektroforez İçin Kullanılan Kimyasallar	27
2.2.2. Besiyeri Hazırlamak İçin Kullanılan Kimyasallar	28
2.2.3. Fosfat Tamponu Hazırlamak İçin Kullanılan Kimyasallar	28
2.2.4. 50X TAE Buffer Hazırlamak İçin Kullanılan Kimyasallar	28
2.2.5. UV – Vis Spektrofotometre Analizinde Kullanılan Kimyasallar	29
2.3. FLUKONAZOL’UN HAZIRLANMASI.....	29
2.4. DNA’NİN HAZIRLANMASI.....	29
2.4.1. Kompetent Hücre Hazırlama	29
2.4.2. Transformasyon	30
2.4.3. pUC19 Plazmid DNA Pürfikasyonu.....	31

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.5. FLUKONAZOL'UN DNA ÜZERİNE OLAN KIRMA AKTİVİTESİ.....	32
2.5.1. Flukonazol Konsantrasyonlarının DNA Üzerine Etkisi	32
2.5.2. Flukonazol'un Askorbik Asit (Asc) Varlığında DNA Üzerine Etkisi	32
2.5.3. Flukonazol'un H ₂ O ₂ Varlığında DNA Üzerine Etkisi	33
2.6. DNA ÜZERİNDE DEMİR KAYNAKLI HASARA FLUKONAZOL'UN ETKİSİ ...	34
2.6.1. Flukonazol'un Demir (FeSO ₄) Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	34
2.6.2. Flukonazol'un Demir ve H ₂ O ₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	34
2.6.3. Flukonazol'un Farklı Konsantrasyonlardaki Demir ve H ₂ O ₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi	34
2.7. DNA ÜZERİNDE BAKIR KAYNAKLI HASARA FLUKONAZOL'UN ETKİSİ	35
2.7.1. Flukonazol'un Bakır (CuCl ₂) Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	35
2.7.2. Flukonazol'un Farklı Konsantrasyonlardaki Bakır Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi	35
2.8. FLUKONAZOL'UN GRAM NEGATİF (<i>ESCHERİCHİA COLİ</i> , <i>ENTEROBACTER CLOACAE</i> VE <i>PROTEUS MİRABİLİS</i>) VE GRAM POZİTİF (<i>ENTEROCOCCUS FAECALİS</i>) FLORA BAKTERİLERİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	35
2.8.1. Flukonazol'un <i>Enterobacter cloacae</i> suşu üzerine etkisi	36
2.8.2. Flukonazol'un <i>Escherichia coli</i> suşu üzerine etkisi.....	36
2.8.3. Flukonazol'un <i>Enterococcus faecalis</i> suşu üzerine etkisi	37
2.8.4. Flukonazol'un <i>Proteus Mirabilis</i> Suşu Üzerine Etkisi	37
2.9. FLUKONAZOL'UN DNA VE PROTEİNE BAĞLANMA OLASILIĞININ ANALİZİ	38
2.9.1. UV Titrasyon Metodu ile Flukonazol'un DNA'ya Bağlanma Aktivitesinin Ölçülmesi	38
2.9.2. UV Titrasyon Metodu ile Flukonazol'un Proteine (BSA) Bağlanma Aktivitesinin Ölçülmesi	38
2.10. In Siliko Analizi.....	39
BÖLÜM 3 BULGULAR.....	41

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.1. FLUKONAZOL'UN DNA ÜZERİNE OLAN KIRMA AKTİVİTESİ.....	41
3.1.1. Flukonazol Konsantrasyonlarının DNA Üzerine Etkisi	41
3.1.2. Flukonazol'un Askorbik Asit (Asc) Varlığında DNA Üzerine Etkisi	41
3.1.3. Flukonazol'un H ₂ O ₂ Varlığında DNA Üzerine Etkisi	42
3.2. DNA ÜZERİNDE DEMİR KAYNAKLI HASARA FLUKONAZOL'UN ETKİSİ ...	43
3.2.1. Flukonazol'un Demir Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	43
3.2.2. Flukonazol'un Demir ve H ₂ O ₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	43
3.2.3. Flukonazol'un Farklı Konsantrasyonlardaki Demir ve H ₂ O ₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi	44
3.3. DNA ÜZERİNDE BAKIR KAYNAKLI HASARA FLUKONAZOL'UN ETKİSİ	44
3.3.1. Flukonazol'un Bakır Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi	44
3.3.2. Flukonazol'un Farklı Konsantrasyonlardaki CuCl ₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi	45
3.4. FLUKONAZOL'UN GRAM NEGATİF (<i>ESCHERİCHİA COLİ</i> , <i>ENTEROBACTER CLOACAE</i> VE <i>PROTEUS MİRABİLİS</i>) VE GRAM POZİTİF (<i>ENTEROCOCCUS FAECALİS</i>) FLORA BAKTERİLERİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	46
3.4.1. Flukonazol'un <i>Enterobacter cloacae</i> Suşu Üzerine Etkisi.....	46
3.4.2. Flukonazol'un <i>Escherichia coli</i> suşu üzerine etkisi.....	48
3.4.3. Flukonazol'un <i>Enterococcus faecalis</i> suşu üzerine etkisi	50
3.4.4. Flukonazol'un <i>Proteus mirabilis</i> Suşu Üzerine Etkisi.....	52
3.5. FLUKONAZOL'UN DNA VE PROTEİNE BAĞLANMA OLASILIĞININ ANALİZİ	54
3.5.1. UV Titrasyon Metodu ile Flukonazol'un DNA' ya Bağlanma Aktivitesinin Ölçülmesi.....	54
3.5.2. UV Titrasyon Metodu ile Flukonazol'un Proteine (BSA) Bağlanma Aktivitesinin Ölçülmesi	55
3.6. FLUKONAZOL'UN DNA'YA BAĞLANMASININ İN SİLİKO ANALİZ İLE İNCELENMESİ.....	56

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

BÖLÜM 4 TARTIŞMA	59
BÖLÜM 5 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ	79





ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Antifungal ilaçların yıllara göre gelişimi	2
Şekil 1.2. Azollerin etki mekanizması	3
Şekil 1.3. Flukonazol'un kimyasal yapısı	4
Şekil 1.4. DNA'nın çift heliks yapısı	7
Şekil 1.5. DNA'nın soldan sağa doğru A, B ve Z formu	7
Şekil 1.6. DNA yapısındaki minör ve major oluklar.....	9
Şekil 1.7. DNA ile kovalent olmayan etkileşim türleri	10
Şekil 1.8. Serbest radikallerin hücrenel fonksiyonlara olan etkisi.....	16
Şekil 1.9. Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırılması	17
Şekil 1.10. Askorbik Asit Oksidasyonu	18
Şekil 1.11. Askorbik asitin bakır ile tepkimesi	18
Şekil 1.12. Mikrobiyotaya etki eden iç ve dış faktörler	21
Şekil 1.13. Bağırsak mikrobiyotasının epitelden lümeneye değişimi.....	22
Şekil 1.14. <i>Escherichia coli</i> SEM görüntüsü	23
Şekil 1.15. <i>Proteus mirabilis</i>	24
Şekil 1.16. <i>Enterobacter cloacae</i>	25
Şekil 1.17. <i>Enterococcus faecalis</i> SEM görüntüsü	26
Şekil 2.1. Flukonazol'un kimyasal yapısı	29
Şekil 2.2. Kanlı Agar ve Muller Hinton katı besiyerlerindeki <i>E.coli</i> bakteri kolonileri üzerine H ₂ O ₂ damlatılması	33
Şekil 3.1. pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bazları) Flu ile muamelesi ve agaroz jel (% 1) elektroforezinde analizi. a,b,c,d ve e sırasıyla Flukonazol'un (FLU) 8800-880-88-44 ve 22 µM konsantrasyonlarını temsil eder. Tüm testler fosfat tamponunda yapıldı.	42
Şekil 3.2. pUC19 plazmid DNA'nın (0,247 µM bazları) asc varlığında Flu ile muamelesi ve agaroz jel (% 1) elektroforezinde analizi. a,b,c,d ve e sırasıyla Flukonazol'un (FLU) 8800-880-88-44 ve 22 µM konsantrasyonlarını temsil eder. Asc sabit konsantrasyonu 0,0185 mM'dir.	43
Şekil 3.3. pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bazları) H ₂ O ₂ varlığında Flu ile muamelesi ve agaroz jel (% 1) elektroforezinde analizi. a,b,c,d ve e sırasıyla Flukonazol'un (FLU) 8800-880-88-44 ve 22 µM konsantrasyonlarını temsil eder. H ₂ O ₂ 'nin sabit konsantrasyonu 6 mM idi.	43

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 3.4. Flu'un demir varlığında DNA ile etkileşimi üzerine etkisi. DNA, pUC19 plazmid DNA (0,247 µM bazları) idi. Flu'un konsantrasyonları sırasıyla 8800-880-88-44 ve 22 µM'yı temsil eden a, b, c, d ve e olarak gösterilmiştir. FeS04'un konsantrasyonu 1,5 mM idi. 44	44
Şekil 3.5. Flu'un demir ve H ₂ O ₂ varlığında DNA ile etkileşimi üzerine etkisi. Flu'un konsantrasyonları sırasıyla 8800-880-88-44 ve 22 µM'yı temsil eden a, b, c, d ve e olarak gösterilmiştir. FeS04 ve H ₂ O ₂ 'nin konsantrasyonu sırasıyla 1,5 mM ve 6 mM idi..... 44	44
Şekil 3.6. Flu'un farklı konsantrasyonlardaki demir ve H ₂ O ₂ varlığında DNA ile etkileşimi üzerine etkisi. Flu'un 88 µM konsantrasyonu c olarak gösterilmiştir. FeS04 konsantrasyonları ise sırasıyla 30, 0,3 ve 0,03 mM'yi temsil eden a, b ve c olarak gösterilmiştir. H ₂ O ₂ konsantrasyonu 6mM idi..... 45	45
Şekil 3.7. pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bazları) CuCl ₂ varlığında Flu ile muamele edilmesi ve agaroz jeli (% 1) elektroforezinde analizi. Flu konsantrasyonları sırasıyla 8800-880-88-44 ve 22 µM'yı temsil eden a, b, c, d ve e olarak gösterilmiştir. 46	46
Şekil 3.8. pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bazları) farklı konsantrasyonlardaki CuCl ₂ varlığında Flu ile muamele edilmesi ve agaroz jeli (% 1) elektroforezinde analizi. Flu'un 88 µM konsantrasyonu c olarak gösterilmiştir. CuCl ₂ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 60, 40, 20 ve 2 µM temsil eden a, b, c ve d olarak gösterilmiştir..... 46	46
Şekil.3.9. A) <i>Enterobacter cloacae</i> 'nin Flu'nun farklı konsantrasyonlarını içeren Mueller Hinton sıvı besiyerinde göreceli üremesi. B) Her konsantrasyon (24 mM, 12 mM,6 mM,3 mM ve kontrol) üç tekrarlı şekilde yapılmıştır. 47	47
Şekil 3.10. <i>Enterobacter cloacae</i> 'nin Flu'nun farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde göreceli üremesi. Grafikde %100 olarak gösterilen üreme 2,72E-21 hücre sayısını göstermektedir. 47	47
Şekil 3.11. <i>Enterobacter cloacae</i> 'nin standart üreme grafiği 48	48
Şekil 3.12. Steril diskler kullanılarak <i>Enterobacter cloacae</i> 'nin Mueller Hinton agarlı katı besiyeri üzerinde üremesi. 0, 1, 2, 3 ve 4 şeklinde etiketlenmiş olan petripler içerisindeki disklerin Flu konsantrasyonları sırasıyla kontrol, 24 mM, 12 mM,6 mM ve 3 mM idi. 48	48
Şekil 3.13. A) <i>Escherichia coli</i> 'nin Flu'un farklı konsantrasyonlarını içeren Mueller Hinton sıvı besiyerinde göreceli üremesi. B) Her konsantrasyon (24 mM, 12 mM,6 mM,3 mM ve kontrol) üç tekrarlı şekilde yapılmıştır. 49	49
Şekil 3.14. <i>Escherichia coli</i> 'nin Flu'un farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde göreceli üremesi. Grafikde %100 olarak gösterilen üreme 0,7645E+15 hücre sayısını göstermektedir..... 49	49
Şekil 3.15. <i>Escherichia coli</i> 'nin standart üreme grafiği 50	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.16. Steril diskler kullanılarak <i>Escherichia coli</i> 'nin Mueller Hinton agarlı katı besiyeri üzerinde üremesi. 0, 1, 2, 3 ve 4 şeklinde etiketlenmiş olan petripler içerisindeki disklerin Flu konsantrasyonları sırasıyla kontrol, 24 mM,12 mM, 6 mM ve 3 mM idi.....	50
Şekil 3.17. A) <i>Enterococcus faecalis</i> 'in Flu'nun farklı konsantrasyonlarını içeren Mueller Hinton sıvı besiyerinde göreceli üremesi. B) Her konsantrasyon (24 mM,12 mM,6 mM,3 mM ve kontrol) üç tekrarlı şekilde yapılmıştır.	51
Şekil 3.18. <i>Enterococcus faecalis</i> 'nin Flu'un farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde göreceli üremesi. Grafikde %100 olarak gösterilen üreme 0,5E+22 hücre sayısını göstermektedir.	51
Şekil 3.19. <i>Enterococcus faecalis</i> 'in standart üreme grafiği	52
Şekil 3.20. Steril diskler kullanılarak <i>Enterococcus faecalis</i> 'in Mueller Hinton agarlı katı besiyeri üzerinde üremesi. 0, 1, 2, 3 ve 4 şeklinde etiketlenmiş olan petripler içerisindeki disklerin flukonazol konsantrasyonları sırasıyla kontrol, 24 mM, 12 mM,6 mM ve 3 mM idi.	52
Şekil 3.21. A) <i>Proteus mirabilis</i> 'in Flu'un farklı konsantrasyonlarını içeren Mueller Hinton sıvı besiyerinde göreceli üremesi. B) Her konsantrasyon (24 mM, 12 mM,6 mM,3 mM ve kontrol) üç tekrarlı şekilde yapılmıştır.	53
Şekil 3.22. <i>Proteus mirabilis</i> 'in Flu'un farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde göreceli üremesi. Grafikde %100 olarak gösterilen üreme 2,037E+22 hücre sayısını göstermektedir.....	53
Şekil 3.23. <i>Proteus mirabilis</i> 'in standart üreme grafiği	54
Şekil 3.24. Steril diskler kullanılarak <i>Proteus mirabilis</i> 'in Mueller Hinton agarlı katı besiyeri üzerinde üremesi. 0, 1, 2, 3 ve 4 şeklinde etiketlenmiş olan petripler içerisindeki disklerin Flu konsantrasyonları sırasıyla kontrol, 24 mM,12 mM, 6 mM ve 3 mM idi.....	54
Şekil 3.25. DNA üzerine Flu'un titre edilmesi sonucu elde edilen Absorbans-Dalga boyu grafiği.....	55
Şekil 3.26. DNA üzerine Flu'un titre edilmesi sonucu elde edilen Absorbans-Flukonazol grafiği.....	56
Şekil 3.27. BSA üzerine Flu'un titre edilmesi sonucu elde edilen Absorbans-Dalga boyu grafiği.....	56
Şekil 3.28. BSA üzerine Flu'un titre edilmesi sonucu elde edilen Absorbans-Flukonazol grafiği.....	57
Şekil 3.29. Flukonazol'un DNA'ya bağlanmasının in siliko analiz ile incelenmesi.....	58
Şekil 3.30. Flukonazol ve DNA arasında kurulan hidrojen bağlarının in siliko analiz programında gösterimi	58
Şekil 3.31. Flukonazol ve DNA arasındaki hidrofobik etkileşimlerin in siliko modellenmesi .	59



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Flukonazol'un Çözücüleri	4
Çizelge 1.2. Flukonazol'un kan, serum ve plazma konsantrasyonları	5





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

mg	: Miligram
ml	: Mililitre
l	: Litre
μg	: Mikrogram
H	: Hidrojen
Cu	: Bakır
Fe	: Demir
Fe^{+3}	: Ferrik
Fe^{+2}	: Ferröz
Cu^{+2}	: Cupric
mg	: Miligram
Mn	: Mangan
Mo	: Molibden
O_2^-	: Süperoksit radikali
$\text{OH}\cdot$: Hidroksil radikali
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
$^\circ\text{C}$: Santigrat Derece
mm	: Milimetre
%	: Yüzde
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar
g	: Gram
CuCl_2	: Bakır Klorür
FeSO_4	: Demir Sülfat
CaCl_2	: Kalsiyum klorür

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

M	: Molar
rpm	: Revolutions per Minute
μ l	: Mikrolitre
bp	: Basepair
g	: Santrifüj dönme hızı
nm	: Nanometre
ϵ	: Absorpsiyon Katsayısı

KISALTMALAR

A,T,G,C	: Adenin, Guanin, Sitozin, Timin
Amp⁺	: Amfisilinli
Asc	: Askorbik Asit
BSA	: Sığır Serum Albumin
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
C-H bağları	: Karbon-Hidrojen Bağları
dk	: Dakika
<i>E. cloacae</i>	: <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
Flu	: Flukonazol
GİS	: Gastrointestinal Sistem
IBD	: İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
İMP	: İnsan Mikrobiyom Projesi
İYE	: İdrar Yolu Enfeksiyonları
K_b	: Bağlanma Sabiti
LB	: Luria Broth Besiyeri
NEB5α	: Kompetent Hücre
OD	: Optik Yoğunluk (optical density)
<i>P.mirabilis</i>	: <i>Proteus mirabilis</i>
pUC19	: Vektör

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

RNA	: Ribonükleik asit
ROS/ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
ss-DNA	: Tek Sarmallı DNA





BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 KANDİDA YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Mantar enfeksiyonlarının en çok karşılaşılan sebebi olan Kandida türleri, maya şeklindeki mantarlardır. Kandida'lar doğumdan itibaren insanın cilt ve mukozalarında kolonize olabilen önemli insan patojenleridir (Kavuşak 2019). Vücudun bağışıklık sistemi ve patojen olmayan bağırsak flora bakterileri, Kandida'yı kontrol altında tutarken, Kandida ise sindirim sistemindeki varlığıyla diğer patojen bakterilerin artmasını önler (Acarkan vd. 2014). Kolonizasyon durumu vücut direncinin ve fizyolojik dengelerin bozulmasıyla kolaylıkla enfeksiyonlara dönüşebilmektedir (Kavuşak 2019). Kandida'ların 200'den fazla çeşidi bulunur. Bunların içinde invazif olmayan deri ve mukoza kandidozuna en sık sebebiyet veren çeşit *Candida albicans*'tır (Seyedmousavı vd. 2015).

Kandida türleri 3–6 µm çapında, tek hücreli, hücre duvarlarında kitin veya sellüloz içeren, ökaryotik mikroorganizmalardır (Dağ 2007). Hücre zarı çift katlı olup fosfolipid, sfingolipid, glikoprotein ve sterol içerir. Sterol; ergosterol ve zimosterol yapısındadır. Sterolün %95'ini kapsayan ergosterol antifungal ilaçlar için önemli bir hedeftir (Gülat 2013).

1.2 ANTİFUNGAL İLAÇLARIN GELİŞİMİ

Antifungal ilaç kullanımındaki sıkıntı, ökaryot yapıdaki mantar hücresine etkili fakat insan hücresine etki etmeyen kimyasal maddelerin bulunmasıdır. Bu sebeple, insan hücre zarında temel sterol yapı kolesterol iken, mantar hücresinde ergosterol olduğundan günümüzde kullanılan antifungal ilaçların büyük bir kısmının hedefi bu sterol yapıdır (Dağ 2007). Yakın zamanlara kadar mantarların neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek etkin antifungaller bulunmamaktaydı (Bilgin 2005). 1950'lerin sonlarında kullanılan ilk

poliyen Amfoterisin B bulunması sistemik antifungal tedavide dönüm noktası olmuştur (Durmaz 1991).

-
- 1950'ler Amfoterisin B, Nistatin
 - 1960'lar Griseofulvin
 - 1970'ler Flusitozin, Klotrimazol, Mikonazol
 - 1980'ler Ketokonazol, Flukonazol, İtrakonazol
 - 1990'lar Lipid Amfoterisin B, Terbinafin
 - 2000'ler Ekinokandinlerden; Mikafungin (FK 463), Kaspofungin Azollerden; Vorikonazol, Posakonazol, Ravukonazol Polienlerden; Lipozomal Nistatin, Nanosferik Amfoterisin B ve Sordarinler, Nikomisinler, Pradimisinler
-

Şekil 1.1 Antifungal ilaçların yıllara göre gelişimi (Bilgin 2005).

1.2.1 Antifungal İlaçların Sınıflandırması

Mantarların neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan farklı kimyasal formdaki antifungal ilaçlar; polyenler, azol türevleri, antimetabolitler, allilaminler, hücre duvar inhibitörleri ve yeni antifungaller olarak sayılabilir (Gülat 2013). Antifungal ilaçların başlıca hedefi hücre duvarı ve hücre membranıdır (Kavuşak 2019).

1.3 AZOL TÜREVİ ANTİFUNGALLER

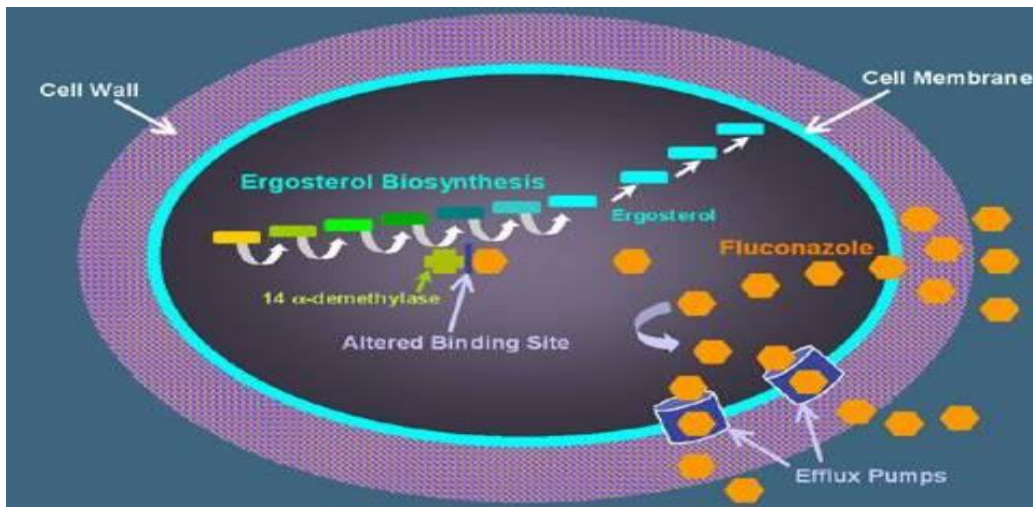
Azol türevleri, imidazoller ve triazoller olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Gülat 2013). İmidazol grubu ilaçlar azol halkasında iki nitrojen atomu içerirken triazol sınıfı ilaçlar, azol halkasında üçüncü bir nitrojen atomu içerirler (Durmaz 1991). İmidazoller; Ketokonazol, Mikonazol ve Klotrimazol şeklinde alt başlıklara ayrılırken, triazoller ise Flukonazol ve İtrakonazol olarak alt başlıklara ayrılır (Gülat 2013).

Triazollerin imidazollerden üç noktada üstünlükleri vardır:

1. Daha yavaş metabolize edilirler ve daha uzun süre etkilidirler
2. İnsan hücresindeki sterollere daha az etkilidirler ve direkt toksik etkileri zayıftır
3. Endokrin yan etkileri yoktur (İnmez 2007).

1.3.1 Azol Türevlerinin Etki Düzenegi

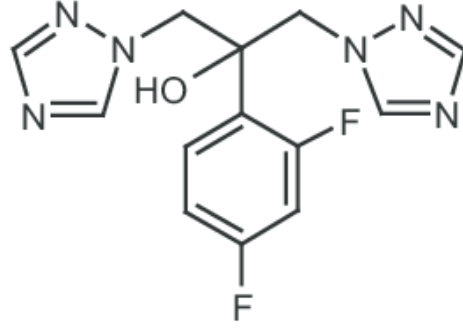
Tüm azol türevleri, lanosterol-ergosterol sentezinde rol alan bir enzim olan sitokrom P-450 bağımlı C14 α -demetilazı inhibe ederek antifungal etki gösterir. Bu antifungal etki sonucunda sitoplazmik membranın bütünlüğü ve fonksiyonları, besin geçişi ve kitin sentezi kaybolur dolayısıyla mantarın büyümesi inhibe olur (Irmak 2010). Flukonazol'un hedefi olan P-450 enzimi, insan ve diğer memelilerde de vardır ve lanosterolden kolesterol yapımı için gereklidir (Öncel ve Keçeli 2018).



Şekil 1.2 Azollerin etki mekanizması (Kutlu 2017).

1.4 FLUKONAZOL (FLU)

Flukonazol, ilk defa 1981'de imidazol çekirdeğinin değiştirilmesiyle (İnmez 2007) sentezlenen geniş spektrumlu bir bis-triazol türevidir. Flu, antifungal ilaç olarak dünya genelinde özellikle ülkemizde yaygın olarak kullanılmaktadır (Yurtdaş 2010). Kandida türlerinin son on yıldaki artan insidansının, fazla flukonazol kullanımı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Dağ 2007). Flukonazol molekülü tasarlanırken imidazol grubunun yerine bir triazol grubunun kullanılması, metabolik degradasyon bölgelerinden birini ortadan kaldırmış ve ilacın mantarlardaki demetilaz enzimine karşı olan spesifitesini arttırmıştır. İkinci bir triazol grubunun eklenmesi ise antifungal aktivitenin daha da artmasını sağlamıştır (Bilgin 2005). Flukonazol *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* ve *C. tropicalis*'e etkilidir. *C. krusei* flukonazole doğal dirençli olup *C. glabrata*'nın birçok suşu da dirençli veya az duyarlıdır (Öncel ve Keçeli 2018).



Şekil 1.3 Flukonazol'un kimyasal yapısı.

İlacın kimyasal formülü $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ şeklindedir. Flukonazol'un kimyasal adı “ α -(2,4-Diflorofenil)- α -(1H1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol”dür (Öncel ve Keçeli 2018). Molekül ağırlığı 306.27 olan flukonazol, kristal yapıda ve erime derecesi 138-140°C aralığındadır. Beyaz veya beyazımsı tozudur. Suda yavaşça, asetonda ve metanolde serbestçe çözünür (Yurtdaş 2010). Oral yolla ya da intravenöz infüzyon yoluyla uygulanan Flu ilacı, bağışıklık yetmezliği olan hastaların neredeyse tümünde bütün kandida enfeksiyonları için birincil tedavi seçeneğidir (Yurtdaş 2010). Oral dozu 50, 100, 150 ve 200 mg'lık tabletler halindedir. Günlük doz alımı 50-400 mg'dır. Kandidemi tedavisinde duyarlı Kandida türleri için günlük max. doz 400 mg'dır fakat *Candida glabrata* için günlük 800 mg doza ihtiyaç duyulabilir. Artan dozlar hastalar tarafından tolere edilebilmiş fakat doz arttıkça hepatik ve diğer yan etkilerde artış görülmüştür (Köksal ve Aksoy 2008).

Çizelge 1.1 Flukonazol'un Çözücüleri.

Çözücü	Çözünürlük(mg/ml)	Kaynak
Water	8-10 mg/ml	(Yamreudeewong vd. 1993)
Water	5.5 mg/ml	(Salerno vd. 2010)
Water(37°C)	7.5 mg/ml	(Charoo vd. 2014)
Water(37°C)	8.0 mg/ml	(Charoo vd. 2014)
Water(23°C)	5.0 mg/ml	(Charoo vd. 2014)
Fosfat tamponu (ph 6.8)	% 100 (60 dk)	(Auti vd. 2015)
Fosfat tamponu (ph 7.4/ 37°C)	6.9 mg/ml	(Charoo vd. 2014)
Fosfat tamponu (ph 6.8)	7.82 ± 0.04	(Charoo vd. 2014)
0.1 M HCL	900 ml /150 mg kapsül	(Corrêa vd. 2012)
0.1N HCL (ph 1.2)	% 100 (45 dk)	(Auti vd. 2015)
0.1 M HCL (23°C)	14.0 mg/ml	(Charoo vd. 2014)
Asetat buffer (ph 4.5)	% 100 (45 dk)	(Auti vd. 2015)
Asetat buffer (ph 4.5)	6.91 ± 0.03	(Charoo vd. 2014)
Fosfat tamponu (ph 6.8)	% 100 (60 dk)	(Auti vd. 2015)
Metanol	10 mg /30 ml	(Reddy 2012)
0.1 M NAOH (23°C)	5.0 mg/ml	(Charoo vd. 2014)

Günde 200 veya 400 mg Flu alan hastalarda maksimum serum seviyeleri sırasıyla 7.9 ve 15.6 mg / l ve minimum seviyeler sırasıyla 5.0 ve 10.3 mg / l olmaktadır. Oral ve intravenöz uygulama sonrası serum Flu düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (Kami vd. 2001).

Çizelge 1.2 Flukonazol'un kan, serum ve plazma konsantrasyonları.

Dozu	Uygulama yolu	Plazma dozu	Serum/ Plazma /Kan	Kaynak
200mg	Oral	4.0 mg/l	Serum	(Kami vd. 2001)
200 mg	İntravenöz	13.3 mg/l	Serum	(Kami vd. 2001)
400 mg	Oral	8.7 mg/l	Serum	(Kami vd. 2001)
400 mg	İntravenöz	26.9 mg/l	Serum	(Kami vd. 2001)
100 mg	oral/inravenöz	4-8 µg.mL-1	Plazma	(Yurtdaş 2010)
100 mg	Oral	2 mg/l	Plazma	(Debruyne 1997)
200 mg	Oral	6-7 µg /ml	Plazma	(Al Dgither vd. 2009)

Oral uygulama sonrası maksimum konsantrasyona bir veya iki saatte erişilir. Plazma proteinlerine bağlanma oranı düşük olup, yaklaşık % 11-12'dir (Öncel ve Keçeli 2018). Alınan Flu dozunun yaklaşık % 80'i idrarla değişmeden, yaklaşık % 11' i ise 1,2,3-triazol ve 2-N-dealkile edilmiş bileşik olan metabolitleri şeklinde renal yolla atılır. Otuz saat olan eliminasyon yarı ömrü, renal fonksiyon bozukluğu olan hastalarda daha uzundur ve doz ayarlaması gerektirir (Yurtdaş 2010). Flu kullanımı ile bildirilen yan etkiler genellikle gastrointestinal sistemle etkileşimi ile ilişkilidir. Abdominal ağrı, diyare, flatülans, mide bulantısı, kusma, lökopeni, trombositopeni, hiperlipidemi, karaciğer enzim değerlerindeki artış gibi ciddi yan etkiler bildirilmiştir (Yurtdaş 2010). Somchit ve arkadaşlarının 2002'de yayınladığı "Sıçan hepatositlerinde itrakonazol ve Flu kaynaklı toksisite: karşılaştırmalı in vitro" çalışmasında Flukonazol'un güçlü bir P-450 inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, Flu ilacının intrinsik doza bağlı toksisiteyi indükleyebildiğini göstermiştir. Aynı araştırmacı ilacın hepatosit hücrelerinin üzerinde doza ve zamana bağlı toksik etkisini göstermiştir (Somchit vd. 2002).

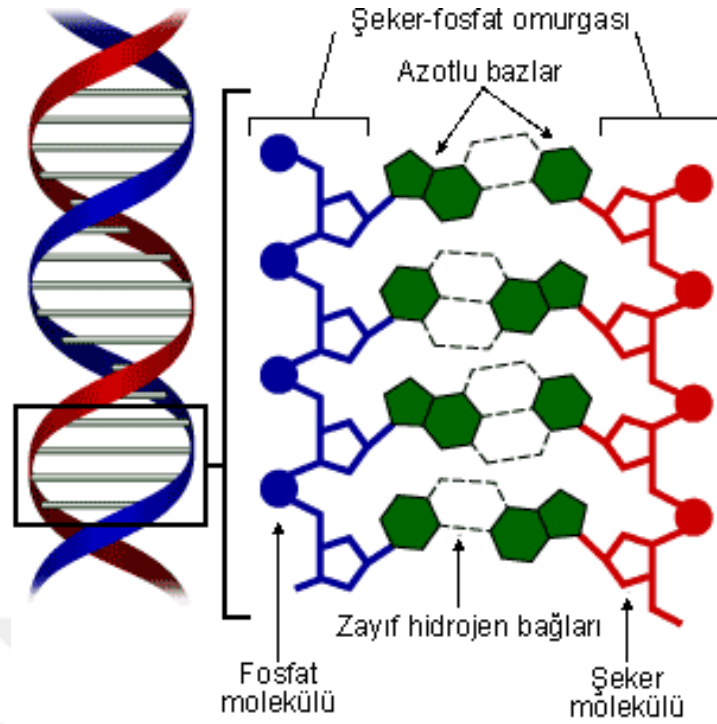
1.5 DNA (DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT)

DNA, ökaryot canlılarda (bitki, hayvan ve mantar gibi) hücre çekirdeği içinde bulunurken, prokaryot canlılarda (bakteri gibi) hücre sitoplazmasında yer alır (Kapçak 2017). Canlı

organizmaların evrensel özelliği, fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli olan tüm genetik bilgiyi depolamak, kullanmak ve bir sonraki kuşaklara aktarmaktır. Bazı RNA virüsleri haricinde bunları gerçekleştiren daima DNA molekülleridir (Kaya vd. 2019). Organizmanın vücut şekli, organların iş bölümü ve işleyiş sırası gibi canlılığın sürdürülebilmesi için gereken işlevleri, hücrede üretilen proteinlerin genetik kodları, proteinlerin miktarı gibi tüm bu olaylar DNA’da planlanır ve kodlanır (Dursun 2009).

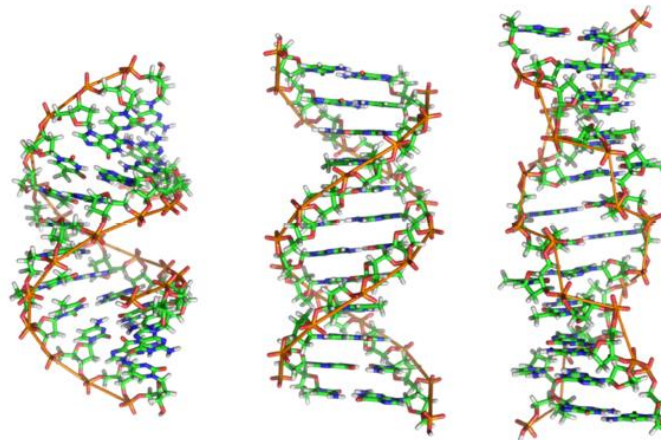
1.5.1 DNA’nın Yapısı ve Fonksiyonu

Organizmanın genetik bilgisini içeren ve kalıtımda rol oynayan DNA molekülünün yapısı, 1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından açıklanmıştır. DNA molekülleri 5’ ucundan 3’ ucuna doğru şeker fosfat omurgasından oluşan iki zincirin birbiri eksenini etrafında birbirlerine antiparalel olarak sarılması ile meydana gelen çift sarmal yapıdadır (Kaya vd. 2019). Bu yapıya “double helix” yapısı denir. Bu iki zincirin baz eşleşmesi modelinin genetik açıdan önemli bir özelliğidir (Kapçak 2017). Her bir nükleotitte 2-Deoksiriboz şekeri, bir azotlu baz ve bir fosfat grubu bulunmaktadır (Toptancı vd.). Azotlu bazlar, pürin ve pirimidinler olarak gruplandırılır ve pürin grubunda Adenin (A) ve Guanin (G) bazları yer alırken, pirimidin grubunda Sitozin (C) ve Timin (T) bazları yer almaktadır. Pürin ve pirimidinler birbirine hidrojen bağları ile bağlanmaktadır. A ile T arasında ikili, G ile C arasında üçlü zayıf hidrojen bağları vardır (İnci 2018). Şeker ve fosfat birimleri fosfodiester bağı ile birbirine bağlanarak molekülün ana omurgasını oluştururken, azotlu bazlar ise iki omurgayı bir arada tutmaktadır. Kısacası nükleik asitler birçok yapısal ünitenin bir düzen içinde bir araya gelmesi ile ortaya çıkmıştır (Bostancı 2016).



Şekil 1.4 DNA'nın çift heliks yapısı (Bostancı 2016).

DNA ısıtıldığında, bazlar arasındaki hidrojen bağları zayıf olduğundan, sarmal yapının bozularak ikiye ayrılması olayına denatürasyon adı verilir. Yüksek konsantrasyonda G ve C içeren DNA, A ve T bulunduran DNA yapısına göre daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. Denatürasyondaki durumların tersi yönde gerçekleşmesi ve çift sarmal DNA'nın tekrar oluşmasına renatürasyon denir (Topal 2011). Çift sarmal yapıdaki DNA'nın A, B ve Z olmak üzere 3 değişik şekli bulunmaktadır ve kromozomal DNA'nın sağa yönelik B formunda olduğu düşünülmektedir (Çakmak 2013).



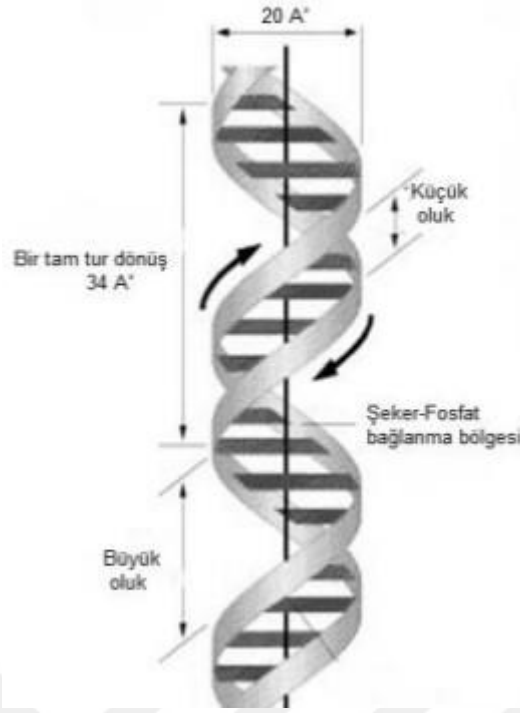
Şekil 1.5 DNA'nın soldan sağa doğru A, B ve Z formu (Çakmak 2013).

Hücrenin çekirdeğinde proteinlere sarılı DNA zincirleri taşıyan yapılara kromozom adı verilir (Şenel 2011). DNA hücrede kromozomlar içinde bulunur. Prokaryotlar da dairesel kromozomlar içinde iken ökaryotlarda doğrusal kromozomlar içinde yer alır. Kromozomlardaki genler DNA yapısındadır. Bir hücrede bulunan kromozomlar topluluğuna genom denilmektedir. İnsan genomunda yaklaşık 46 kromozom ve bunlar içinde bulunan yaklaşık 3 milyar baz çifti bulunmaktadır (Yıldırım 2015). DNA omurgasındaki A,T,G,C bazlarının her biri bir şifre sembolüdür ve oluşturdukları dizi ile genetik bilgiyi kodlarlar. Bu genetik bilgi protein sentezi sırasında genetik kod aracılığı ile okunarak proteinlerin aminoasit dizilimi belirlenir (Kapçak 2017).

DNA'nın iki temel görevi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi DNA'nın kendisinin bir kopyasını yapmasıdır ve bu işleme duplikasyon adı verilir. Duplikasyonda hidrojen bağları açılır ve açıkta kalan nükleotitler önceden sentezlenmiş nükleotitlerle tamamlanır. Böylece birbirinin aynısı iki DNA oluşur (Bostancı 2016). İkinci görevi ise transkripsiyon olarak adlandırılan kendinde toplanan bilgileri RNA'ya aktarmaktır. Transkripsiyon RNA'nın DNA kalıbı üzerine senteziyle DNA'daki bilgiler RNA molekülüne aktarılır. RNA da toplanan bilgiler ribozomlarda okunur ve protein, enzim sentezinde kullanılır. Bu sürece ise translasyon denilmektedir (Dursun 2009). Genetik bilginin akışı DNA-RNA-Protein şeklinde olup, bu akış santral doğma olarak adlandırılır (Yılmaz , Kaya vd. 2019).

1.5.2. DNA Üzerindeki Major ve Minör Oluklar

DNA üzerindeki büyük (majör) ve küçük (minör) oluklar baz çiftlerinin dizilişine bağlı olarak oluşmaktadır. DNA sarmallarının birbirine en yakın olduğu noktaya küçük oluk ve birbirlerinden en uzak oldukları noktaya da büyük oluk adı verilir (Kapçak 2017). DNA'daki major ve minor oluklar; van der Waals, hidrofobik ve hidrojen bağı etkileşimleri ile ilaç gibi etken maddelere ya da proteinlere uygun bağlanma yerleri sağlarlar (İnci 2018). Büyük oluk 11,6 Å genişlik ve 8,5 Å derinlik gibi daha geniş etkileşim alanı içerdiğinden ilaçlar ve hacimli moleküllerin kolayca bağ oluşturmasını sağlar. Küçük oluklar derinlikleri 8,2 Å kadardır ve daha küçük etkileşim alanına sahiptir. Antibiyotikler ve antikanser ilaçları küçük moleküller olduğu için bu küçük oluktan bağlantı kurarlar (Toptancı vd.). Bu bağlanma sonucu DNA'nın fonksiyonlarını bozarlar (Kapçak 2017).



Şekil 1.6 DNA yapısındaki minör ve major oluklar (Kapçak 2017).

1.6 DNA-İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ

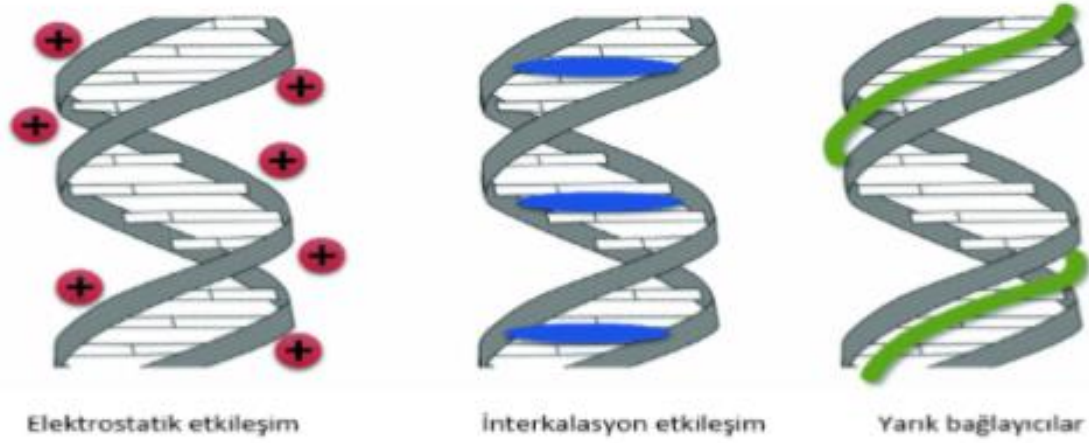
İlaçların DNA ile etkileşim yolları iki şekilde gerçekleşir. Birincisi, DNA ile kovalent bağ etkileşimi; ikincisi ise, kovalent olmayan bağ etkileşimidir (Sirajuddin vd. 2013).

1.6.1 Kovalent Bağ Etkileşimi

DNA ile kovalent etkileşimler tersinmezdir. Yani DNA proseslerinin tamamen inhibe olmasına, ardından da hücre ölümüne neden olur (Barut 2016). Cis-platin bu grubun temsilcilerindedir ve yapısındaki klorür gruplarının DNA bazlarındaki azot grupları ile etkileşimi sonucu etkisini gösterir. Kovalent bağlanan moleküller, kanser tedavisinde DNA yapısına alkil grupları bağlayarak görev aldıkları için alkilleyici ajanlar olarak da adlandırılmaktadır. Bunun sonucunda da yanlış eşleşmiş bazlar, yer değiştirmeler ya da yapıdan ayrılan gruplar nedeniyle DNA sentezi durur ya da apoptozis gerçekleşir. Alkilasyon ajanları, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (Kapçak 2017).

1.6.2 Kovalent Olmayan Bağ Etkileşimi

Kovalent olmayan bağ etkileşimleri kendi içinde 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; elektrostatik etkileşimler, interkalasyon etkileşimler ve oluk bağlayıcılar (groove binders)'dir.



Şekil 1.7 DNA ile kovalent olmayan etkileşim türleri (Valipour 2019).

a) Elektrostatik etkileşimler

DNA'nın dış yüzeyinde bulunan guruplarla yapılan etkileşimlerin neredeyse tamamı bu etkileşim tipine dahil olmaktadır. Diğer etkileşimlerden zayıf olmasına rağmen ilaçların biyolojik aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır (Valipour vd. baskı). Örneğin; Pt(II) kompleksi.

b) İnterkalasyon etkileşimler

DNA baz çiftleri arasına bazı maddelerin yerleşerek güçlü bir şekilde bağlanması olayına interkalasyon denir. İnterkalasyon, DNA'da zincir kırılmasına sebep olur (Bostancı 2016). İnterkalasyona neden olan moleküller, Topoizomeraz (II) enzimini inhibe ederler. Bu etkileşim dönüşümlü ya da dönüşümsüz şekilde gerçekleşmektedir. İnterkalatörler antikanser ajanlar olarak ve DNA boyar madde olarak kullanılabilir. DNA boyar madde olarak kullanılan etidyum bromür ve kanser önleyici madde olarak kullanılan doksorubisin örnek olarak verilebilir (İnci 2018).

c) Oluk bağlayıcılar (Groove Binders)

İlaçlar, son yıllarda saptanan ve güçlü bir etkileşim olan oluk bağlama yoluyla da DNA ile kovalent olmayan bağlar yaparlar. DNA boşluklarına bağlanan, ilaçlar gibi küçük moleküller genelde minör oluk üzerinden etkileşime girerken protein ve oligonükleotit gibi daha uzun moleküllerin major oluk yoluyla DNA'ya bağlandıkları görülmüştür (Valipour vd. baskı). Minor oluk bağlayıcı molekülüne bir örnek, floresan DNA boyar madde olan Hoechst 33258'dir (İnci 2018).

DNA, genetik bilginin nesilden nesile aktarılmasını sağlayan ve kolay zarar görebilen bir moleküldür (Fidan 2005). Kimyasal madde ve ilacın DNA ile etkileşmesi sonucu DNA'ya saldırıp zarar vermesi genellikle kanserle ilişkilendirilir (Davis ve Lin 2011). DNA'ya hasar veren ilaçlar tümörün büyümesini hızlandırır. Genotoksik ilaçları kullanan birçok kadında meme kanseri riskinin iki katından fazla olacak şekilde arttığı görülmüştür (Sharpe vd. 2002). Şu ana kadar yapılan birçok çalışmaya bakıldığında prokarbazin, AZT, L-Dopa, kloramfenikol, N-asetilsistein ve gentamisin gibi bazı kimyasal bileşikler içeren ilaçlar DNA hasarını indükleyebilmiştir (Roriz ve Moya 2017). Bu gibi ilaçlar genotoksik etki gösterirler ve buna bağlı olarak karsinogenez, DNA hasarına ve sonuç olarak hücre hasarına neden olurlar (de Oliveira vd. 2017). DNA molekülünde meydana gelen hasar kanser gibi birçok hastalığa neden olduğu gibi bu olumsuz değişiklikler kendisinden sonra gelen nesillere aktarılan genetik bilgiyi de değiştirebilmektedir (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010). Canlılarda meydana gelen DNA hasarları DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilmektedir. Hasar ve tamir belirli bir denge halindeyse de bu dengenin bozulması durumunda tamir mekanizmaları yetersiz olacaktır ve bu durumda DNA da hücre ölümü, kanser, mutasyon gibi kalıcı zararlar meydana gelecektir (Yıldırım 2015).

1.7 OKSİDATİF STRES KAYNAKLI DNA HASARI

Stabil bir molekül olan DNA, yaşam boyunca spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir (Burçak ve Andican 2004). İnsan vücudunun her hücresindeki DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmektedir. Biyolojik sistemde reaktif oksijen veya oksijen radikallerinin düzeyi, oksidatif stres olarak tanımlanır (Altuntaş 2007). Reaktif oksijen türleri, reaktif azot türleri ve reaktif karbonil türlerinin DNA'ya zarar veren radikaller oluşturduğu bilinmektedir (Tunç 2017). Radikaller farklı mekanizmalar ile DNA

üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-Protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlar ile yaşlanma, mutagenesis ve karsinogenesis patogenezinin sebepleri olmaktadır (Yokuş ve Çakır 2002) ve bu durum oksidatif DNA hasarı olarak adlandırılmaktadır (Tunç 2017).

1.7.1 Serbest Radikaller

Serbest radikal terimi bağımsız olarak bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronu bulunan atom veya moleküller için kullanılmaktadır. Geçiş metalleri bakır (Cu), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo) ortaklanmamış elektronlara sahip olmalarına rağmen serbest radikal sayılmazlar. Ancak reaksiyonları katalizledikleri için serbest radikal oluşumuna yardımcı olurlar (Kaya vd. 2019). Serbest radikaller 2 sınıfa ayrılır. Bunlar; birincisi O₂ kaynaklı ROS/ROT'lar, ikincisi ise karbon ve kükürt kaynaklı RNT/RNS serbest radikalleridir (Kaya vd. 2019).

1.8 METAL VARLIĞINDA SERBEST RADİKAL OLUŞUMU

1.8.1 Demir

Kimyasal olarak Fe simgesiyle gösterilen demir yeryüzünde çok bulunan bir element olup, canlı fonksiyonları için gerekli bir eser elementtir (Uysal 1999). Fizyolojik plazma demir toplam konsantrasyonu (serbest ve bağlı) 0.6-1.7 mg/L (11–31 M) arasında değişmektedir (Letelier vd. 2010). Elektron alıp verme özelliği nedeniyle oksijen taşınması, enerji yapımı, DNA, RNA ve protein sentezinde rol oynar ayrıca birçok enzimin yapı ve fonksiyonu için gereklidir (Uysal 1999). Vücut sıvılarında ve hücrelerde taşınan demir, ferrik (Fe⁺³) veya ferröz (Fe⁺²) olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Fakat sitoplazmada önemli bir kısmı Fe⁺²'ye indirgenmektedir. Demirin bu redoks aktivitesi bir taraftan gerekli ve yararlı olurken, diğer taraftan fazlalığı durumlarında oluşan serbest demir, vücutta toksik etkiye sebep olan serbest oksijen radikallerinin yapılmasına yol açar (Baltacı 2018). Bu nedenle demir hiçbir zaman serbest bırakılmamaya çalışılır. Transferrinle taşınır, ferritinde depolanır ve organizmada demir konsantrasyonu daima çok sıkı kontrol altında tutulur (Uysal 1999). Canlılar için esansiyel fonksiyonları yerine getirecek ama reaktif özelliğinden dolayı organizmada hasar oluşturmayacak kadar demirin sağlanabilmesi için çeşitli mekanizmalar geliştirilmiştir (Başol vd. 2007).

1.8.2 Bakır

Kimyasal olarak Cu simgesiyle gösterilen bakır, bakteriden insana kadar tüm biyolojik organizmalar için esansiyel iz elementtir (Yılmaz 2015). Fizyolojik plazma bakır toplam konsantrasyonu (serbest ve bağlı) 0.9-1.2 mg/L (~14–19 M) arasında değişmektedir (Letelier vd. 2010). Bakır atomunun üç oksidasyon basamağı vardır: Cu(I), Cu(II) ve Cu(III). Merkez atomun geometrisi oksidasyon durumuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Cu(0) bileşikler kararlı değildir ve genellikle ara ürün olarak oluşmaktadır. Sulu çözeltilerde Cu(I) ve Cu(II)'nin kararlılıkları anyonların veya diğer ligandların tabiatına bağlı olarak değişir. Çoğu Cu(I) bileşiği Cu(II) bileşiklerine oksitlenebilir, ancak Cu(III) bileşiklerine oksidasyonu daha zordur. Bakır kompleksleri genellikle mavi veya yeşil renktedir (İnci 2018).

Bakır, hem esansiyel hem de toksik bir elementtir (Aksoy 2009). Bakır vücut fonksiyonları açısından önemli olmakla beraber özellikle saç, deri esnek kısımları, kemik ve bazı iç organların temel bileşenidir. Birçok enzim ve proteinin yapısında bulunan bakır, demirin fonksiyonlarını yerine getirmesinde aktivatör görevi üstlenir (Kartal vd. 2004). Bakır kromatin içinde esansiyel bir mikro elementtir ve DNA bazlarıyla yakından ilişkilidir; aynı zamanda hücrelerde bulunan redoks aktif metal iyonlarından biridir (Li vd. 2012). Bazı hastalıkların nedeni için plazmada yüksek bakır seviyeleri önemlidir (Kuybu 2018). Bakır konsantrasyonunun kanser hücrelerinde normal hücrelere göre çok daha yüksek olduğu bulunmuştur (Li vd. 2012). Buna ilaveten bakırın tıbbi kullanımları, biyolojik olarak aktif ligandlar ve ilaçların kompleksleştirici bir iyonu olarak dikkat çekmektedir (Kuybu 2018). Cu serbest veya kompleks formda divalent katyon olarak organizmaların dokularında bulunabilmekte ve 2 değerlikten 1 değerliğe geçebilmektedir (Kuybu 2018). Bakır, askorbik asit gibi redoks ajanlarının varlığında ROS oluşumunu artırır (Cervantes-Cervantes vd. 2005). Fizyolojik koşullar altında serbest bakır iyonları askorbik asit varlığında hidroksil radikalleri üretebilirler ve DNA'ya hasar verebilirler (Yokawa vd. 2011). DNA oksidasyonu sırasında, abasik bölgelerin oluşumu, AT → GC ve GC → AT geçişleri gibi mutasyonlar, çift sarmal kırılması ve yeniden düzenlenmeler görülebilir. Öte yandan, ROS'a maruz kalan proteinler, amino asit kalıntılarının geri dönüşümsüz modifikasyonuna neden olarak ısıl kararlılıklarının artması ve biyolojik rollerinin kaybı gibi konformasyonel değişikliklere yol açar (Cervantes-Cervantes vd. 2005). Bundan dolayı da biyolojik olaylar için önem teşkil etmektedir (Kuybu 2018).

1.9 REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)

ROS, yapısında en az bir tane eşlenmemiş elektron içeren reaktif özellikteki atom veya moleküllere denir (Sezer ve Keskin 2014). Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin en yaygın kaynağı ise oksijendir (Gürgöze vd. 2007). Oksijenin dış yörüngesine bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron eklenmesiyle bu molekül güçlü bir toksine, yani bir serbest oksijen radikaline dönüşür (Gökhan 2007). Oksijen mitokondride, solunum tepkimeleri sonucu suya dönüşür fakat O_2 'nin %2-3 kadarı suya dönüşmeyip, O_2 kaynaklı radikallerin oluşmasını sağlar (Büyüksulu ve Yiğitbaşı 2015). Oksijen temelli serbest radikallere örnek olarak ROS verilebilir (Yıldıoğan Beker 2011). Kararsız yapıdaki ROS, kararlı hale gelmek için hücrelere saldırmakta ve hücre bileşenlerine hasar vererek çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır (Sezer ve Keskin 2014). Nötralize edilemeyen ROS kanser gibi ciddi hastalıkların gelişiminde önemli rol oynar. Çok kademeli karsinogenezin hem başlamasında hem de artmasında ROS'u işaret eden güçlü bulgular vardır (Çiftçi 2017).

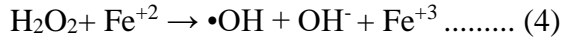
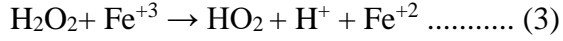
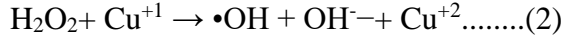
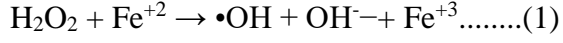
Başlıca reaktif oksijen türevleri; Süperoksit radikali (O_2^-), Hidroksil radikali ($OH\bullet$) ve Hidrojen peroksit (H_2O_2) 'dir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu O_2^- , 2 elektron alarak indirgenmesi sonucu H_2O_2 , 3. elektronun ilavesi ile yüksek derecede reaktif $OH\bullet$ ve 4. elektronun eklenmesi ile H_2O meydana gelir (Özcan vd. 2015).

1.9.1 Süperoksit radikalleri (O_2^-)

Aerobik hücrelerde O_2 'in bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşan ilk ürün O_2^- 'dir (Kaya vd. 2019). Zayıf bir oksidant, güçlü bir indirgendir (Altuntaş 2007).

1.9.2 Hidrojen peroksit (H_2O_2)

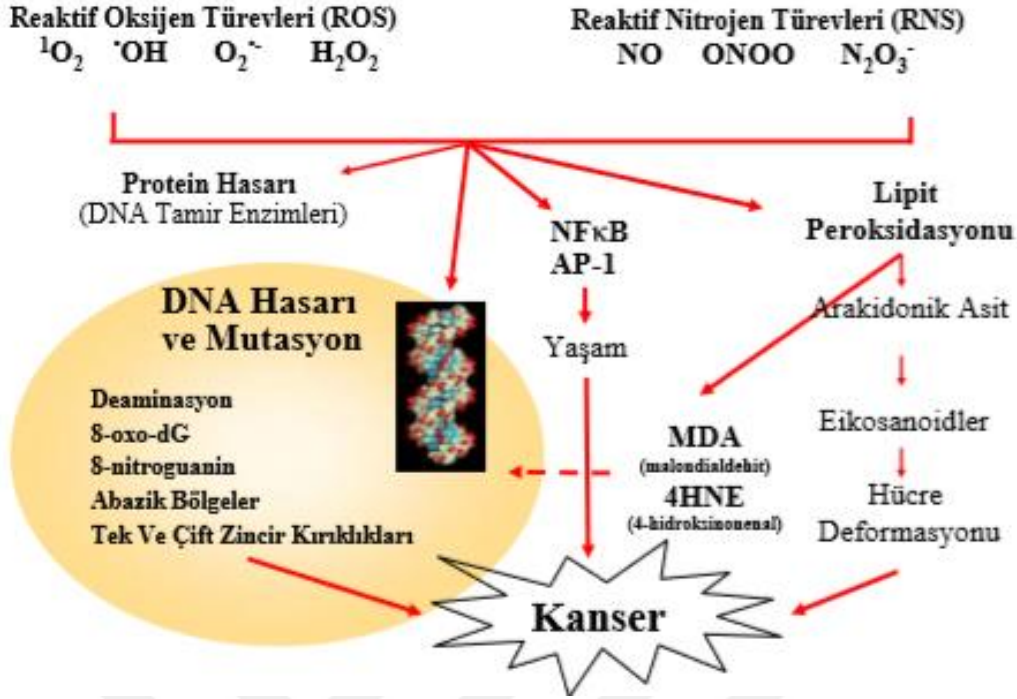
H_2O_2 bir radikal olmamakla birlikte aktivitesi ve etkileri bakımından radikallere çok benzer (Altuntaş 2007), $OH\bullet$ üretiminden önemli ölçüde sorumlu olduğundan ROS sınıfındadır. H_2O_2 , O_2^- 'den farklı olarak yağda çözünür yapısından dolayı hem meydana geldiği yerden uzakta hemde Fe^{+2} içeren hücrel membranlarda hasar oluşturabilir (Özcan vd. 2015).



Haber - Weiss reaksiyonu (1 ve 2 numaralı denklemler), H_2O_2 , O_2^- ile reaksiyona $\text{OH}\bullet$ radikali girerek oluşur (Yıldıoğan Beker 2011). Fenton reaksiyonu (3 ve 4 numaralı denklemler) ise, asidik şartlar altında Fe^{+2} metalinin H_2O_2 ile tepkimesi sonucu oluşur. Bu tepkime sonucu $\text{OH}\bullet$ meydana gelir. Demir iyonu, H_2O_2 'in ayrışmasını kataliz eder ve $\text{OH}\bullet$ meydana gelir. Radikallerin meydana gelişı bir kompleks tepkime zinciri şeklindedir. Meydana gelen Fe^{+3} iyonlar da H_2O_2 'i kataliz ederek H_2O ve O_2 'e ayrıştırır. Demir iyonları ve radikaller de tepkimelerde meydana gelir. Fe^{+3} iyonunun H_2O_2 ile tepkimesi Fenton benzeri proses olarak adlandırılmaktadır (Gürtekin ve Şekerdağ 2008).

1.9.3 Hidroksil radikalleri ($\text{OH}\bullet$)

Son derece reaktif radikallerdir ve ROS'ların en güçlüsüdürler. Oldukça kararsızdır ve çoğu biyolojik molekül ile hızla ve spesifik olmayan bir şekilde reaksiyona girer (Özcan vd. 2015). Nükleusta $\text{OH}\bullet$ radikali Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu meydana gelir (Altuntaş 2007). $\text{OH}\bullet$ radikalinin DNA üzerinde etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında meydana gelmesi gerekir. DNA çok sayıda (-) yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyon durumundadır. $\text{Fe}^{+2/+3}$ ve $\text{Cu}^{+1/+2}$ iyonları ya (-) yüklü DNA ya sürekli bağlı bulunurlar ya da oksidatif stres altında proteinlerden ayrılarak DNA'ya bağlanırlar. Bu bağlanma ile DNA'yı H_2O_2 'nin hedefi haline getirirler (Altuntaş 2007).



Şekil 1.8 Serbest radikallerin hücresel fonksiyonlara olan etkisi (Altuntaş 2007).

1.10 ANTIOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI

Serbest radikaller oldukça reaktif özellikte olduklarından hücre organellerine zarar verebilirler ve birçok hastalıkta rol oynayabilirler (Kaya vd. 2019). Bu hasar, DNA tamir mekanizmaları tarafından tersine çevrilmezse, mutasyonlara ve muhtemelen kansere neden olabilir (Tunç 2017). ROS'un meydana getirdiği hasarları önlemek için bu reaktif türleri elimine edebilecek veya oluşumunu engelleyecek savunma sistemlerine "antioksidan savunma sistemleri" ya da "antioksidanlar" adı verilir (Karabulut ve Gülay 2016). Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler (Ugar 2016). Böylece oksidatif hasarın DNA'ya olan etkisini ve hücre bölünmesindeki anormal artışı azaltıp kansere karşı koruyucu rol oynarlar (Dündar 2000).

Antioksidan savunma sistemleri, endojen ve eksojen antioksidanlar olarak iki gruba ayrılırlar. Endojen antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir (Karabulut ve Gülay 2016). Eksojen antioksidanlar, daha çok organizmanın dışarıdan aldığı antioksidanlar bu gruba girer. Enzimlerden sonra vücudun serbest radikal

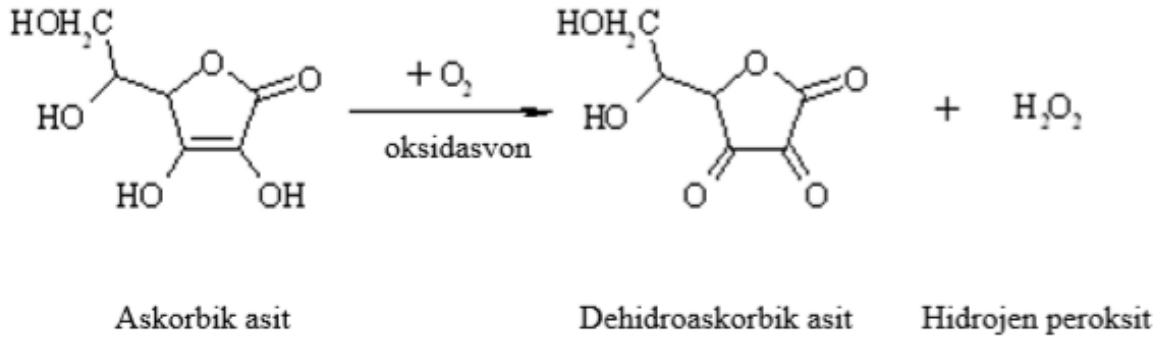
zararına karşı ikincil savunma sistemini oluştururlar. Vitamin ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olmak üzere iki alt grupta sınıflandırılabilir (Karabulut ve Gülay 2016).

ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	α -lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin
EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR		
VİTAMİN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	
α -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)	
β -karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar)	
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)	
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	

Şekil 1.9 Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırılması (Karabulut ve Gülay 2016).

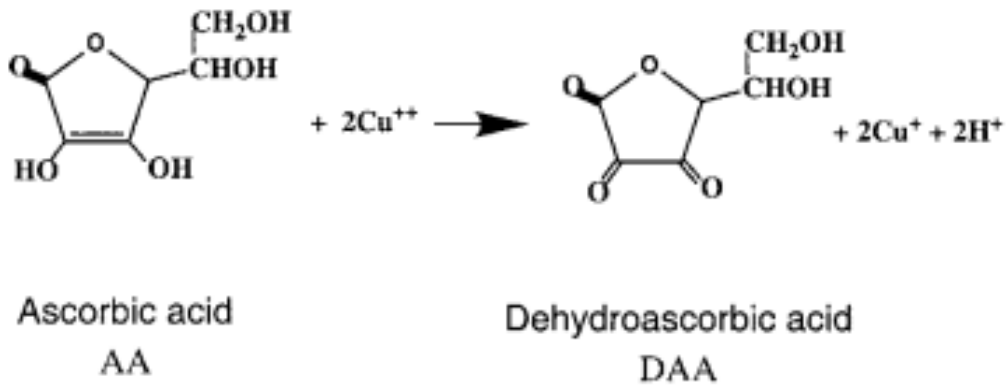
1.10.1 Askorbik Asit (C Vitamini)

Askorbik asit (Asc) birçok biyokimyasal reaksiyona katılan, suda çözünen güçlü antioksidan bir vitamindir. Birçok fizyolojik fonksiyon için hayati önem taşıyan asc insanlarda sentezlenemediği için dışarıdan alınması zorunludur (Ağırbaş vd. 2015). İndirgenmiş (L-askorbik asit) ve yükseltgenmiş (dehidroaskorbik asit) olmak üzere iki formu mevcut olup ikisinin de biyolojik etkisi bulunmaktadır (Yıldıoğan Beker 2011).



Şekil 1.10 Askorbik Asit Oksidasyonu (Karasakal 2007).

Redoks potansiyeli olduğundan, indiren ajan ve serbest radikal yakalayıcısı olarak davranır ve bir H iyonu vererek serbest radikal zincirini inhibe eder (Karasakal 2007). Böylece oksidasyonun hücre metabolizmasına karşı oluşturduğu zararlı etkileri azaltır (Yıldıoğan Beker 2011). Asc hem bir antioksidan hem de prooksidan olarak davranır. Asc, uygun bir ligand (L), bakır iyonları ve oksijen varlığında, L-Cu(I)-O₂, Cu⁺² türleri ve H₂O₂'e dönüşür (Yavaşça 2009). Asc'nin oksidasyonunda Cu gibi geçiş metallerinin katalizör etkisi bulunur (Imer vd. 2009). Metal iyonları, asc'nin dehidroaskorbik aside veya dehidroaskorbik asidin 2,3diketogulonik aside ve diğer oksidasyon ürünlerine oksidasyonunu artırır. Burada Cu⁺² iyonu çok etkilidir. Asc'nin Cu⁺² iyonu ile oksidasyonundan oluşan bir ara kompleks spektrofotometrik olarak kanıtlanmıştır (Yıldıoğan Beker 2011). Asc'nin geçiş metali ve kompleksleriyle birinci oksidasyon adımı sonucu askorbat radikali oluşur (Yıldıoğan Beker 2011). Genellikle askorbat düşük konsantrasyonlarında prooksidan, yüksek konsantrasyonlarda ise antioksidan eğilimi gösterir (Yavaşça 2009). Asc metal iyonları ve metal kompleksler tarafından oksitlenirken, metal iyonları indirgenir. Örneğin; Cu(II), Cu(I)'e; Fe (III), Fe(II)'e indirgenir. Metal ve askorbik asit molekülleri arasındaki bağlar beklenilenden daha zayıftır (Yıldıoğan Beker 2011).



Şekil 1.11 Askorbik asitin bakır ile tepkimesi (Cross vd. 2003).

Pozitif yüklü metal iyonları, DNA'daki olası bölgelere direk veya dolaylı olarak sıkıca bağlanabilmektedirler (Aksoy 2009). Cu^{+2} iyonları, daha çok guanin ve sitozince zengin bölgelerde mevcuttur. Bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA'nın özellikle G bazlarına yüksek afinite ile bağlandığı ve H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığı gösterilmiştir. Bu nedenle en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen baz hasarı 8-OHdG'dir (Altuntaş 2007). Guanin, DNA yapısındaki en düşük iyonizasyon özelliği ile serbest radikal etkilerine karşı en açık molekül olarak göze çarpar. 8-OHdG, guaninin 8. karbon atomuna $OH\bullet$ radikali atakları ile meydana gelen modifiye bir bazdır ve DNA replikasyonu sırasında GC'den AT'ye dönüşüme yol açtığından mutasyona teşvik eder. Dolayısıyla, ROS oluşumunu artıran tüm faktörler oksidatif DNA hasarını da arttırabilmektedir (Şeyhanlı 2008).

8-OHdG seviyeleri üzerine antioksidan takviyesinin pozitif etkileri olabilir. Deneysel hayvan modellerinde, antioksidan girişimlerle 8-OHdG düzeylerinde azalma görüldüğü saptanmıştır (Şeyhanlı 2008). ROS ve bunların hücrel yapılar üzerine etkisi hakkında çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen birçok hastalığa sebebiyet vermesi ile ilişkili bulunduğu hala güncelliğini koruyan bir alandır. Bu yönüyle yeni ve daha kapsamlı araştırmaların gelecekte hastalıkların ve ilaçların kliniğini açıklamada önemli bir rol oynayacağını düşünüyoruz.

1.11 MİKROBİYOM VE MİKROBİYATA

Normal flora, patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonuna ve fırsatçı mikroorganizmaların çoğalmasına karşı bir bariyer görevi görür (Sullivan vd. 2001). Normal flora olarak bilinen insanlardaki mikroorganizmaların tamamına "İnsan Mikrobiyom Projesi" tarafından mikrobiyata olarak adı verilmiştir (Süzük 2015). Bu mikroorganizmaların genomuna ise "mikrobiyom" adı verilmektedir (Yüksel Altuntaş ve Batman 2017). Bu projenin çalışmalarından elde edilen sonuçlar ışığında, bağırsak mikrobiyotasının insan sağlığında ve birçok hastalığın gelişmesinde etkili bir organ olduğunu ortaya koymuştur (Süzük 2015).

1.11.1 Bağırsak Mikrobiyatası

İnsan sağlığı ve gastrointestinal mikroflora bağlantısı son zamanlarda üzerinde çok durulan bir meseledir (Gürsoy vd. 2005). İnsan mikrobiyomu, sağlığımızla sıkı sıkıya bağlantılı olan ve tüm memelilerin bağırsaklarında yaşayan çeşitli bakteri, arke, mantar, protozoa ve virüslerden oluşan son derece kompleks bir ekosistemdir (Barko vd. 2018). Doğumda bebeğin bağırsakları

sterildir (Coşkun 2006). Doğumdan çok kısa bir süre içinde gelişmeye başlayan ve tüm yaşamı boyunca da orada var olan bu kompleks ekosistem içerisinde yaklaşık 10-100 trilyon mikroorganizmanın varlığı gösterilmiştir (Saka 2017). Doğumdan sonra bağırsak mikrobiyotasını oluşturan bakterilerin türü ve miktarını etkileyen çok sayıda etken bulunmaktadır. Bu etkenler arasında doğum şekli (vajinal veya cerrahi), annenin mikrobiyotası, anne sütü alımı, gebelik yaşı, bakterilere çevresel maruziyet, antibiyotik/probiyotik kullanımı ve beslenme şekli bulunmaktadır (Coşkun 2006).

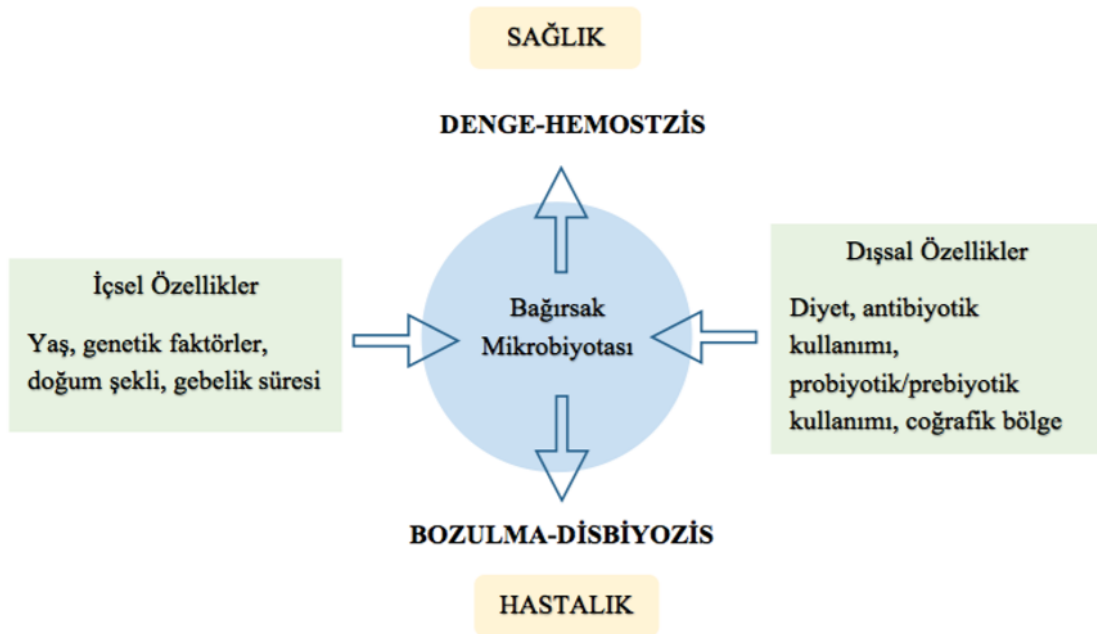
Mikroorganizmalar, sağlıklı bir insanın vücut kitlesinin %1-2'sini oluşturmasına rağmen (Çetinbaş vd. 2017) bağırsaktaki mikroorganizma sayısı, insan vücudundaki hücrelerin sayısından on kat daha fazladır (Söylemez 2018). İnsan bağırsaklarında 400.000'den fazla bakteri çeşidinin varlığı tespit edilmiş olup bunların yaklaşık %98'i yararlı bakteriler olup, sindirime yardımcı rol oynarlar (Saka 2017, Söylemez 2018). Bu ilişki simbiyotik bir ilişki örneğidir (Koca 2015).

İnsan mikrobiyomunun büyük kısmı başta gastrointestinal sistem (GİS) olmak üzere deri, genitoüriner sistem ve solunum sisteminde kolonize olmuştur. GİS, 200 m² gibi geniş bir yüzey alanına sahip olması ve mikroorganizmalar için zengin besin içeriği sebebiyle yerleşim(kolonize) için en uygun ortamı sağlamaktadır (Bozok vd. 2014). Bağırsak mikroflorası, bağırsağın zengin besiyeri içeriğinde gelişirken aynı zamanda patojenik bakterilerin kolonileşmesine engel olması gibi birçok fayda sağlamaktadır. Böylece konak ile konakçı arasında komensal bir ilişkisi kurulmuş olur (Söylemez 2018). Mikroorganizmalar geçici veya kalıcı olarak kolonize olabilir. Geçici floranın çoğu hastalık oluşturmaz ve konak misafirliği birkaç saat ile birkaç hafta arasında değişir. Kalıcı flora ise devamlılık gösteren mikroorganizma topluluğudur. Kalıcı floranın ortadan kalkması halinde, geçici flora sayısı artarak kolonize olur ve patojen özellik kazanabilirler (Çetinbaş vd. 2017).

Sağlıklı bireylerde, bağırsak mikrobiyota popülasyonlarının çeşitliliği ve bileşimi bağırsak homeostazını korumak için immün sistem ile etkileşim halindedir. Bağırsak mikrobiyotası insan vücudundaki bir organ gibi hareket ederek, konağın metabolizma, enerji homeostazisi, beslenme, bağışıklık sistemi ve nörodavranışsal gelişimi dahil olmak üzere sağlık için hayati öneme sahip bir sürü fizyolojik sürecini etkilemektedir (Barko vd. 2018). Örneğin, proteinleri aminoasitlere, karbohidratları disakkaritlere ve yağları da yağ asitlerine dönüştürerek sindirim sisteminde de rol oynarlar (Söylemez 2018).

1.11.2 Simbiyoz ve Disbiyozis

Flora içindeki bakteri çeşitliliği kadar popülasyon dengesi de önem taşımaktadır (Kateeb 2015). Konak ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki dengeli yapıya simbiyoz adı verilir (Saka 2017). Mikrobiyata hem sayısal hem de çeşitlilik olarak kişinin yaşı, diyet alışkanlıkları, yaşam tarzı ve genetik yatkınlıkları gibi faktörler sonucu değişikliklere uğrayabilmektedir (Yüksel Altuntaş ve Batman 2017). İlaçların alındığı doz miktarı ve kullanım sıklığı, dengesiz beslenme, sezaryen doğum, aşırı hijyen ve sürekli stres gibi etmenlerin mikrobiyomu kalıcı olarak değiştirebilmektedir (Söylemez 2018).



Şekil 1.12 Mikrobiyotaya etki eden iç ve dış faktörler (Süzük 2015).

Mikrobiyotanın yapısının herhangi bir nedenle değişmesi veya bozulmasına disbiyozis olarak adlandırılır. Günümüzde mikrobiyotadan kaynaklanan hastalıkların temelinde disbiyozisin var olduğu kabul edilmektedir (Süzük 2015). Dolayısıyla bu durum insan sağlığı açısından oldukça önem teşkil etmektedir. Bozulan bağırsakta patojenlerin sayısı artar, detoksifikasyon yapacak yararlı floranın bulunmaması sonucu toksik maddeler birikir (Kateeb 2015).

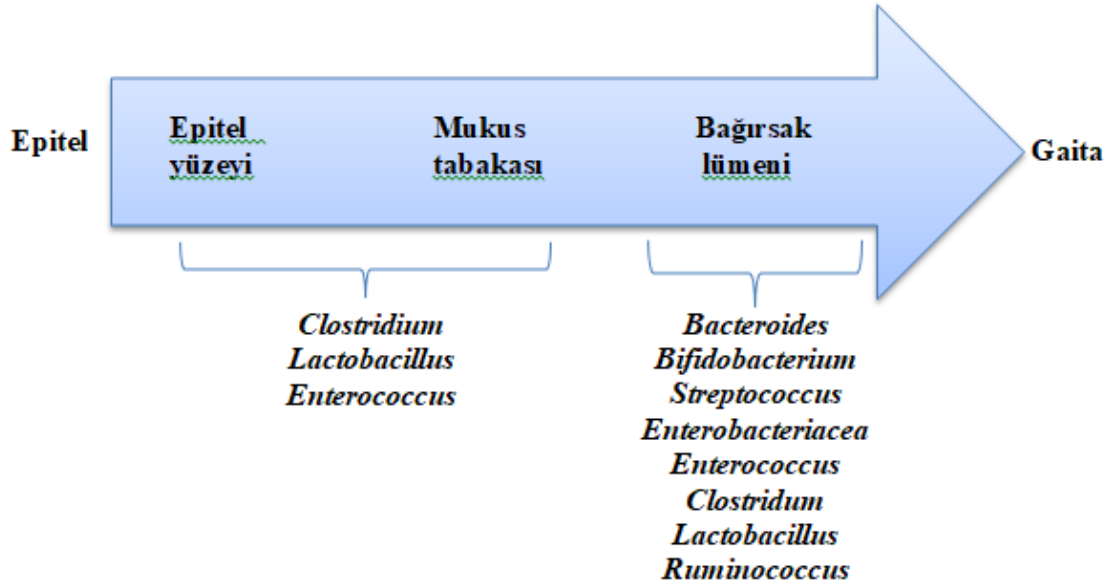
Genel olarak, disbiyoz üç başlık altında incelenir:

- 1) Faydalı organizmaların kaybı,
- 2) Potansiyel olarak zararlı organizmaların aşırı büyümesi,
- 3) Mikrobiyal çeşitliliğin kaybolması.

Bu üç olası ihtimal çoğu zaman aynı anda gerçekleşebilmektedir. Disbiyoz, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), obezite, alerjik bozukluklar, Tip 1 diabetes mellitus, otizm, astım, Parkinson hastalığı, çölyak hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, insan ve hayvan gastrointestinal sistemlerinde kolorektal kanser gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili bulunmuştur (Söylemez 2018).

1.12 BAĞIRSAK FLORA BAKTERİLERİ

Bağırsak boyunca, mikrobiyotanın miktarı ve türü değişkenlik gösterir. Memeli bağırsağında başlıca 9 bakteri türü bulunmaktadır. Bunlar; *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes* ve *TM7*'dir. Büyük çoğunluğu oluşturan bakteri aileleri *Bacteroidetes* veya *Firmicutes* türüne aittir



Şekil 1.13 Bağırsak mikrobiyotasının epitelten lümeneye değişimi (Süzük 2015).

Mikroorganizmaların sağlıklı bir insanın hayatını sürdürmesinde önemli fonksiyonları olduğu gibi, bazen de bağırsaktaki bakterilerin çeşitliliği ve dengesinde ki bozukluklar diğer patojen bakterilerin vücuda hâkim olmasına yol açabilir (Çetinbaş vd. 2017).

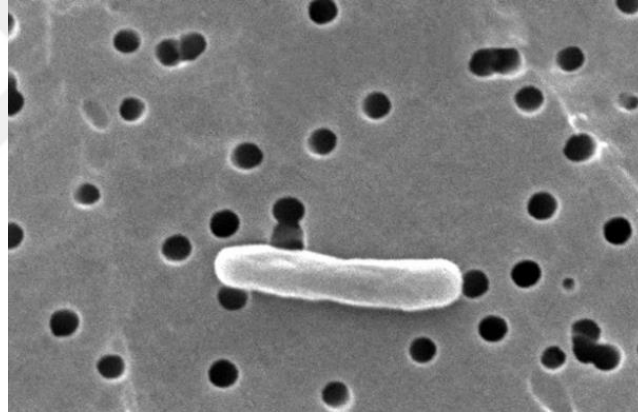
1.12.1 *Enterobacteriaceae* Ailesi

Enterobacteriaceae familyası, ince ve kalın bağırsakda kolonize olan birçok tür ve suştan oluşup, patojenik olmayan kommensal mikrobiyota ayrıca patojen üyelerini içerir (Schierack vd. 2007).

Enterobacteriaceae ailesinin yada kısaca enterik bakterilerin genel özellikleri şunlardır: 0,3-0,5 mm en ve 1-6mm boyunda (Yazgı 2002), gram negatif basıl olmaları, sporsuz olmaları, peritrik kirpiklerle hareketli veya hareketsiz olmaları, genel kullanım besiyerlerinde kolaylıkla üremeleri, MacConkey agarda iyi üremeleri, fakültatif üremeleri (aerop ve anaerop), katalaz pozitif olmaları, oksidaz negatif olmaları, nitratları nitrite çevirmeleri, DNA’da G+C oranları %39 – 59 arasında olmaları, Enterobacteria antijeni (Erwinia cinsi hariç) bulundurulur (Yazgan 2010).

Enterobacteriaceae ailesi içinde 30’dan fazla cins ve 130’dan fazla tür bulunmaktadır. Bu 130 tür bakteriden klinik örneklerde en sık izole edilenler *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*’dir (Yazgı 2002).

1.12.1.1 *Escherichia coli*

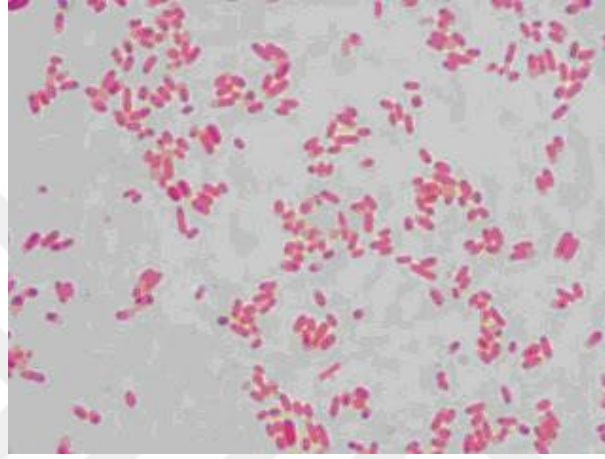


Şekil 1.14 *Escherichia coli* SEM görüntüsü (URL-1).

Escherichia coli, *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan gram (-), fakültatif anaerobik, hareketli, spor oluşturmeyen bir çomak bakteri türüdür (Turgut 2015). Sıvı kültürlerde hızlı üreyerek, tek başına ya da çiftler halinde görülür (Omerovic vd. 2018). Optimal üreme 37 °C ve nötral pH’da gerçekleşir fakat 18-44.5 °C ve pH 5-8 aralıklarında daha yavaş şekilde üreme gözlenir. Üremesi sonucu sıvı besiyerlerinde homojen bulanıklık gözlenirken, katı besiyerlerinde düzgün kenarlı, 2-3 mm çapında, pigmentsiz S koloniler gözlemlenmektedir (Taşdemir 2009). Çoğu suşun genellikle protein yapısında fimbriya denilen peritrik kirpikleri vardır bu sayede hareketli bakterilerdir (Al-Dulaimi 2015).

E.coli, normal bağırsak florasına ait olup patojen mikroorganizmaların bağırsaklarda kolonizasyonunu önler ve kalın bağırsak florası içinde bulunan en yaygın türdür (Turgut 2015). İnsan bağırsak flora üyesi olan *Escherichia coli*, üriner sistem enfeksiyonları, hemolitik üremik sendrom, pnömoni, sepsis, menenjit, ishal, apse, peritonit, sinüzit vb. enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Duman vd. 2010).

1.12.1.2 *Proteus mirabilis*



Şekil 1.15 *Proteus mirabilis* (URL-2).

Gram(-) bir basil olan *Proteus* türleri, *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesidir. Bu türü familyanın diğer gruplarından ayıran tanımlanmış en önemli özellikleri, herhangi bir durum karşısında kümelenerek toplu halde büyümektedirler (Keleşoğlu 2010). *Proteus*'lar gram(-), kokobasil veya daha büyük basil görünümünde, peritrik kirpikleri sayesinde hareketli, sporsuz ve kapsülsüzdür (Türkseven 2018). Bakteriyojik boyalarla oldukça iyi boyanır ve genel besiyerlerinde kolaylıkla ürerler (Uslu vd. 2011).

Proteus cinsi bakteriler, insan ve hayvan bağırsağında bulunmaktadır. *Proteus* cinsi şu anda beş tür içermektedir: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. myxofaciens* ve *P. hauseri* (Türkseven 2018). *Proteus* türleri, uygun koşullar altında; immunolojik enfeksiyonlara ve çeşitli patolojik durumlara yol açmaktadır (Keleşoğlu 2010). *Proteus*'ların sıklıkla üriner enfeksiyonlarda, böbrek taşı oluşumu ve böbrek tubuluslarında nekrozlara yol açtığı gösterilmiştir (Uslu vd. 2011). Bu tür enfeksiyonlara *P.vulgaris*, *P.penneri* ve *P.mirabilis* türleri neden olmaktadır. Bununla birlikte *P.mirabilis* en bilinen patojendir. Bu türün insan bağırsağında enfeksiyon yapma oranı %25 olarak açıklanmaktadır (Keleşoğlu 2010).

1.12.1.3 *Enterobacter cloacae*



Şekil 1.16 *Enterobacter cloacae* (URL-3).

Enterobacter cloacae, *Enterobacteriaceae* familyasından çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik gram negatif bir bakteridir. Bu bakterilerin boyutu 0.3-0.6 x 0.8-2.0 µm arasında değişmektedir. *E.coli*, 37°C'de optimal sıcaklığı ile mezofilik ortamda yaşar ve hareket için peritrik flagella kullanır. Bu bakteri oksidaz negatif fakat katalaz pozitifdir (Nishijima 1999).

14 *Enterobacter* türü bulunmaktadır. Bunlar arasında en sık karşılaşılan türler *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *E.agglomerans* ve *E.sakazakii*'dir (Türkseven 2018). Bu bakteriler özellikle *E.cloacae*, bakteriyemi, alt solunum yolu enfeksiyonu, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, endokardit, intraabdominal enfeksiyonlar, septik artrit, osteomyelit ve oftalmik enfeksiyonlar gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilen hastane dışı patojenlerdir (Yazgan 2010).

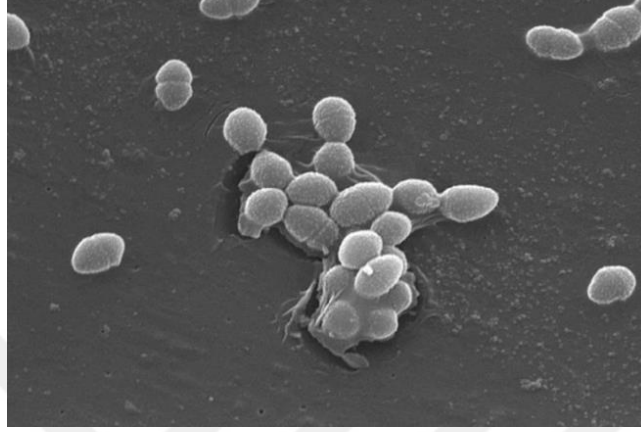
E.cloacae, peritrik flagella'yı hareket için kullanır. Flagella, yağ dokuyu etkileyerek obezite ve hepatik yağ birikimi ile ilişkili olan flagellin proteini tarafından üretilen ve bakteriyi hareket ettirici bir organeldir (Munukka vd. 2016).

1.12.2. *Enterococcus* Ailesi

Enterokoklar tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunan gram(+) koklardır. Enterokok cinsi içinde 32 tür olmasına karşın bunlar arasında *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus*

faecium probiyotik açıdan en önemli iki tür olup, insan GIS'in doğal florasında bulunurlar (Dişçioğlu 2014).

1.12.2.1 *Enterococcus faecalis*



Şekil 1.17. *Enterococcus faecalis* SEM görüntüsü (URL-4).

İnsan bağırsak florasından en sık izole edilen *E.faecalis*, ikinci sıklıkta görülen tür *E. faecium*'dur (Bulanık 2015). Enterokoklar, yaklaşık 1 µm çapında, gram (+), fakültatif anaerob bakterilerdir. Birkaç istisna dışında hareketsiz, sporsuz, katalaz negatiftir. Mikroskopta kok yapıları (genellikle diplokok), çiftler halinde veya kısa zincir olarak görülür (Herkmen 2015). Enterokoklar 5-50 °C arasında farklı ısılarda üreme özelliklerine sahiptir. Optimum üreme ısıları 42,7 °C, en düşük üreme ısıları 6,5 °C ve en yüksek üreme ısıları ise 47,8 °C'dir. *E. faecalis* ve *E. faecium* 4,6 ila 9,9 pH aralığında üreyebilmektedir. Optimum üreyebildikleri pH 7,5'dur (Bulanık 2015).

Enterococcus türlerinin çoğu insanın gastrointestinal sisteminin normal florasıdır. İnsandan klinik olarak izole edilen enterokokların çoğu (%80-90) *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur, bunlar enterokok enfeksiyonlarının %5-10'unda bulunurlar. Diğer Enterokok türlerine daha az sıklıkla rastlanır (Dişçioğlu 2014). Özellikle immun sistemi zayıflamış kişilerin endojen florasından kaynaklanarak intra-abdominal veya pelvik enfeksiyonlar, menenjit, bakteriyemi gibi çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilmektedirler (Aguş vd. 2006).

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOT

2.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

- UV-Vis Spektrofotometre (OptiSen, UV-1800)
- Otoklav (Nüve, steam art)
- Mikrodalga Fırın (Altus, Almd 17B)
- Inkübatör (THERMO SCIENTIFIC, 866-9-thermo)
- Çalkalayıcı Inkübatör (Mipro)
- Elektroforez Cihazları (horizontal) (Thermo)
- -20°C ve 4°C Buzdolabı (Bosch)
- Hassas Terazı (Radwag, AS 220.R2)
- Jel Görüntüleme Sistemi (VILBER, E-BOX- VX2)
- Laminer Akış Kabini (Core, LN 090)
- Santrifüj (Elektro-mag)
- Santrifüj (Nüve NF 800R)
- Su Banyosu (Nüve Bath NB 20)
- Vorteks (Nüve NM 110)
- Mikropipet seti (Thermo Scientific- Finnpiquette)

2.2 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

2.2.1 Elektroforez İçin Kullanılan Kimyasallar

- NucleoSpin Plasmid, Plasmid DNA Pürfikasyon Kiti (Macherey-Nagel)
- Gliserol (84 mM)
- Etanol (%100)

- Fosfat Tamponu (5 mM)
- LB Broth (Luria Broth), (Miller's LB Broth) (Conda)
- CaCl₂ (0,1 M)
- H₂O₂ (6 mM)
- Askorbik Asit (0,0185- 6 mM)
- FeSO₄ (1,5-30-0,3-0,03 mM)
- CuCl₂ (60- 40 - 20 - 2 – 0,2 µM)
- Distile Su (Ezracıbaşı)
- 1X Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) Tamponu
- Agarose (Biomax)
- Ethidium Bromide

2.2.2 Besiyeri Hazırlamak İçin Kullanılan Kimyasallar

- Agar
- Mueller Hinton Besiyeri (Sigma Aldrich)
- Amfisilin (10mg / ml)

2.2.3 Fosfat Tamponu Hazırlamak İçin Kullanılan Kimyasallar

- 0,0272 g KH₂PO₄
- 0,0348 g K₂HPO₄

2.2.4 50X TAE Buffer Hazırlamak İçin Kullanılan Kimyasallar

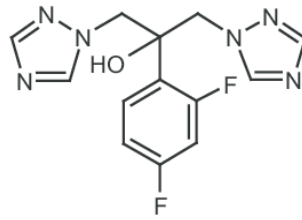
- 242 g Tris base
- 57,1 ml Glicial Asetik Asit
- 37,2 g Na₂EDTA.2H₂O
- H₂O ile 1 litreye tamamlanır (ph 8-8.5)

2.2.5 UV – Vis Spektrofotometre Analizinde Kullanılan Kimyasallar

- 0,5 M EDTA
- Tris (50 mM), Sigma
- Tris – EDTA Tamponu
- 3,3 mM Calf Thymus DNA
- Sığır Serum albümin (BSA)

2.3 FLUKONAZOL’UN HAZIRLANMASI

Flukonazol’un saf hali Sigma-Aldrich (PHR1160-1G) firmasından satın alındı ve test maddesi olarak kullanıldı. Flukonazol’un moleküler ağırlığı 306,27 g/mol idi ve kimyasal yapısı Şekil 2.1’de gösterildiği gibidir. Saf flukonazol 5 mM fosfat tamponu (ph 7,5) içerisinde vorteks yapılarak çözdürüldü. Maksimum derişimi 24 mM olan bu çözeltiden farklı konsantrasyonlarda ilaç yoğunluğu (8800, 880, 88, 44 ve 22 µM) hazırlandı.



Şekil 2.1 Flukonazol’un kimyasal yapısı

2.4 DNA’NIN HAZIRLANMASI

DNA’nın hazırlanması için gereken kompetent hücre hazırlama, transformasyon ve pürfikasyon aşamaları aşağıda anlatılan prosedüre göre sırasıyla yapıldı.

2.4.1 Kompetent Hücre Hazırlama

Öncelikle plazmid DNA pürfikasyonu için *Escherichia coli*’nin NEB5α suşu kompetent hücre haline getirildi ve pUC19 plazmidini bu kompetent hale getirilmiş suşa transforme edildi. NEB5α suşunun kompetent hale getirmek için 20 ml sıvı kültür hazırlandı ve otoklavlandı. Steril kabin içerisinde katı besiyerindeki NEB5α suşu öze ile sıvı kültüre ekilerek inkübasyona

birakıldı. Ertesi gün bir tane 50 ml'lik erlende LB Broth (Luria Broth) sıvı besiyeri, bir tane 0,1 M CaCl₂ ve bir tane 100 ml'lik erlende LB katı besiyeri hazırlanarak otoklavlandı. Otoklav sonrası LB sıvı besiyerine gecelik NEB5α suşu ekildi ve inkübasyona bırakıldı. LB katı besiyeri içerisine amfisilin eklendi ve petrilere dökülerek donmaya bırakıldı. Daha sonra inkübasyondan alınan gecelik NEB5α suşu spektrofotometrede 550 nm 'de OD'sine bakılarak 0,35-0,4 arasında olacak şekilde ayarlandı. Bu aşamadan sonra buz üstünde çalışıldı. 50 ml'lik kültür 10'ar ml şeklinde 5 tüpe ayrıldı. Bu tüpler 5000 rpm de 5 dk santifürüj edildi, sıvı fazlar atılarak pelletle çalışmaya devam edildi. Pelletin üstüne 5 ml 0,1 M CaCl₂ eklendi ve 20 dk 0°C'de bekletildi. Bu aşamada pellet vortekslemeden nazikçe çözdürülmeye çalışıldı. 20 dk inkübasyonun ardından 5000 rpm de 5 dk santifürüj edildi, sıvı fazlar atılarak pelletle çalışmaya devam edildi. Pelletlerin üstüne 500 µl CaCl₂ + 84 mM gliserol eklendi ve pellet vortekslemeden nazikçe çözdürüldü. Bu tüpler 100'er µl şeklinde 1,5 ml'lik santifürüj tüplerine aktarıldı ve -80°C'ye kaldırıldı. Böylece kompetent hücre stoğu oluşturulmuş oldu.

2.4.2 Transformasyon

Hazırlanan kompetent hücre stoğundan bir tane buz üstüne alınarak steril kabin içerisinde çalışmaya başlandı. 5 ml plazmid (pUC19) kompetent hücre üzerine aktarıldı, hafifçe karıştırıldı ve 30 dk 0°C'de beklendi. Arkasından 1 dk 42°C'de beklendi ve bu aşamada tüpe hassas davranılmalıdır. Daha sonra 2 dk 0°C'de beklendi ve yine bu aşamada tüpe hassas davranılmalıdır. Daha sonra tüpün içine 900 µl taze besiyeri eklendi ve 1 saat boyunca 37°C/125 rpm'de inkübasyona bırakıldı. En son olarak da amfisilinli katı besiyeri üzerine 100 µl yayma ekimi yapıldı ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu aşamada transform olan bakterileri seçmek için yapıldı. NEB5α suşunun amfisilin direnci olmadığından sadece pUC19 plazmid aktarımı gerçekleşen yani transform olan bakteriler katı besiyerinde üreyebildi. Üreyen kolonilerden biri alındı, amfisilin içeren sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu suşlardan plazmid pürfikasyonu aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı. Kalan transform bakteriler 100'er µl şeklinde aliquotlanarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.4.3 pUC19 Plazmid DNA Pürfikasyonu

NucleoSpin Plasmid, Plasmid DNA Pürfikasyon Kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak plazmid DNA saflaştırıldı.

Pürfikasyon öncesi hazırlık:

1. Tampon A2'de bir çökelti varsa şişe birkaç dk 30-40°C'de inkübe edilerek iyice karıştırıldı.
2. RN_{ase}'a 1 ml A1 tampon eklendi ve vorteks yapıldı. Daha sonra şişenin tamamı A1 solüsyonu içerisine geri aktarıldı ve iyice karıştırıldı (tarih yazılarak +4'de saklandı).
3. A4 ve AQ solüsyonlarına % 96-100'lük etanol eklendi. 12 ml A4 ve 6 ml AQ solüsyonlarına sırasıyla 48 ml ve 24 ml etanol eklendi.
4. AW solüsyonu 50°C'de su banyosunda bekletildi.
5. AE solüsyonu 70°C'de ısıtıldı.

Pürfikasyon aşaması:

50 ml LB sıvı besiyeri hazırlandı ve otoklavlandı. Otoklav sonrasında sıvı besiyerine 500 µl amfisilin eklendikten sonra -80°C stoğundaki transform bakterilerden bir tane alınarak ekim yapıldı ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün gecelik kültürde üreyen pUC19 hücreleri adaptasyon ve çok sayıda plazmid kopya sayısı elde etmek amacıyla bir gece daha inkübasyona bırakıldı. Bunun için 100 ml'lik LB sıvı besiyeri hazırlanıp otoklavlandı. Otoklav sonrası gecelik kültürden 1000 µl pUC19+1000 µl amfisilin eklenerek inkübasyona bırakıldı.

- Kültür inkübasyondan alındı ve 10'ar ml şeklinde tüplere paylaştırıldı.
- Tüpler 15 dakika boyunca 11.000 g'de santifürüj yapıldı. Santifürüj sonrası süpernatant atıldı ve kalan sıvı pipetle çekilerek atıldı.
- Pellet üzerine 250 µl A1 solüsyonu eklendi ve vortekslenerek pellet tamamen çözdürüldü. Daha sonra 250 µl A2 solüsyonu eklendi ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı (mavi renk gözlemlenir).
- İnkübasyon sonrasında 300 µl A3 solüsyonu eklendi ve mavi renk belirsizleşene kadar hafifçe alt üst edildi. Tüpler 11.000 g'de 10 dk santifürüj edildi (süpernatant temiz değilse bu aşama tekrar edildi).

- 2 ml tüpe kolon yerleştirildi ve üzerine 750 µl süpernatant eklendi. Tüpler 11.000 g' de 1 dk santifürüj edildi. Santifürüj sonrası kolonun alt kısmında sıvı atıldı ve kolon tüpe geri yerleştirildi.
- Kolonun üzerine 50°C'de ısıtılmış 500 µl tampon AW eklendi ve 11.000 g' de 1 dk santifürüj edildi. Santifürüj sonrası dipteki sıvı atıldı ve kolon tüpe geri yerleştirildi.
- Kolonun üzerine 600 µl A4 solüsyonu eklendi ve 11.000 g'de 1 dk santifürüj edildi. Santifürüj sonrası dipte kalan sıvı atılarak kolon tüpe geri yerleştirildi. Tüpler 11.000 g'de 2 dk santifürüj edildi ve dipte kalan sıvı atıldı.
- Kolon kısımları 1,5 ml'lik santifürüj tüpüne yerleştirildi. 70°C'de önceden ısıtılmış 50 µl AE solüsyonu kolonun tam orta kısmına eklendi ve 70°C'de 2 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası tüpler 11.000 g'de 1 dk santifürüj edildi. Plasmid DNA'lar bir yerde toplandı ve 100'er µl şeklinde aliquotlanarak – 20°C'ye kaldırıldı.

DNA'nın saflığı ve miktarı hem lambert beer yasası hem de % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Pürfikasyon ile elde edilen DNA konsantrasyonu 260 nm'de 0,008 için 8 µg/ml'dir.

2.5 FLUKONAZOL'UN DNA ÜZERİNE OLAN KIRMA AKTİVİTESİ

2.5.1 Flukonazol Konsantrasyonlarının DNA Üzerine Etkisi

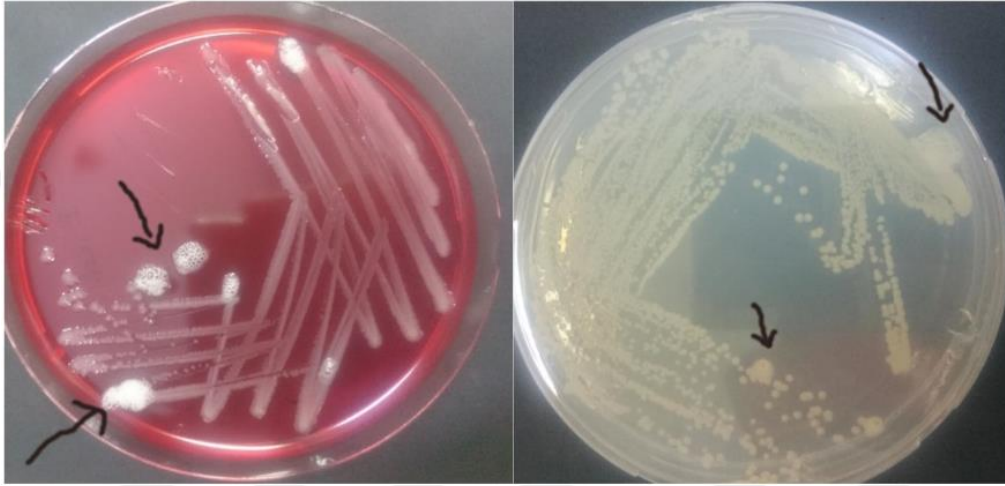
Flu'un DNA'ya zarar verme derecesi süpersarmal DNA (pUC19 plazmid DNA) üzerinden değerlendirildi. Bu amaçla 0,247 µM bp pUC19 plazmid DNA'lar flukonazolun farklı konsantrasyonları (8800-880-88-44-22 µM) ile 37°C de 45 dakika muamele edildi. Flukonazol ile muamele edilmemiş pUC19 plazmid DNA da kontrol amaçlı kullanıldı. İnkübasyon sonrası, reaksiyon karışımları % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 V'da 55 dakika boyunca yürütüldü. Görüntüleme için DNA bantları (süpersarmal, sirküler, doğrusal) etidyum bromür ile boyanarak Jel Doc cihazında analiz edildi.

2.5.2 Flukonazol'un Askorbik Asit (Asc) Varlığında DNA Üzerine Etkisi

Flu'un Asc varlığında DNA'yı kırma veya koruma yeteneğini anlamak için, Flu'un farklı konsantrasyonları (8800-880-88-44-22 µM), 0,0185 mM Asc varlığında 0,247 µM bp plazmid

pUC19 DNA ile muamele edildi. Reaksiyon pcr tüpleri içerisinde gerçekleştirildi. Bu tüplere ek olarak, kontrol amaçlı bir tüpte Flu bulunmayıp diğer bütün herşey miktarları dahil aynıdır. İkinci kontrol tüpü ise sadece DNA'ya sahiptir. Reaksiyon tüpleri 37°C de 45 dakika boyunca muamele edildi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 V'da 55 dakika boyunca yürütülerek sonuçlar Jel Doc cihazında analiz edildi.

2.5.3 Flukonazol'un H₂O₂ Varlığında DNA Üzerine Etkisi



Şekil 2.2 Kanlı Agar ve Muller Hinton katı besiyerlerindeki *E.coli* bakteri kolonileri üzerine H₂O₂ damlatılması.

Katalaz enzimi H₂O₂'i parçalar ve ortamda O₂ açığa çıkarır. *E.coli* katalaz pozitif bir bakteridir ve **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı..**'de gösterildiği gibi koloniler üzerine H₂O₂ damlatıldığında katalaz enzimi H₂O₂ 'i parçalayarak hava kabarcıkları oluşturdu yani O₂ açığa çıkardı. Kontrol amaçlı yapılan bu işlem kullanılan H₂O₂'nin sağlam olduğunu göstermektedir.

0,247 µM bp pUC19 plazmid DNA, oksidatif ajan olan 6 mM H₂O₂ varlığında flukonazolun farklı konsantrasyonlarını (8800-880-88-44-22 µM) ile 37°C de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 V'da 55 dakika boyunca yürütülerek sonuçlar Jel Doc cihazında analiz edildi. Flu ile muamele edilmemiş aynı miktarda DNA ve H₂O₂ içeren örnekler kontrol amaçlı kullanıldı.

2.6 DNA ÜZERİNDE DEMİR KAYNAKLI HASARA FLUKONAZOL'UN ETKİSİ

2.6.1 Flukonazol'un Demir (FeSO₄) Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

0,247 µM bp plazmid DNA, 1,5 mM demir varlığında flukonazolun farklı konsantrasyonları (8800-880-88-44-22 µM) ile muamele edildi. Kontrol olarak sadece DNA kullanıldı. Reaksiyon tüpleri 37°C de 1 saat boyunca inkübe edildi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 V'da 55 dakika boyunca yürütülerek sonuçlar Jel Doc cihazında analiz edildi.

2.6.2 Flukonazol'un Demir ve H₂O₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

Oksidatif ajanlara karşı Flu'un DNA üzerindeki koruyucu veya kırıcı etkisini incelemek için Ul-Haq ve diğerleri (2012) tarafından kullanılan prosedür takip edildi. 0,247 µM bp pUC19 plazmid DNA, 1,5 mM demir ve 6 mM H₂O₂ varlığında Flu'un farklı konsantrasyonları (8800-880-88-44-22 µM) ile muamele edildi. Bu tüplere ek olarak, kontrol amaçlı bir örnekte Flu bulunmayıp diğer bütün herşey miktarları dahil aynıdır. İkinci kontrol örneği ise sadece DNA'ya sahiptir. Reaksiyon tüpleri 37°C de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 V'da 55 dakika boyunca yürütülerek sonuçlar Jel Doc cihazında analiz edildi.

2.6.3 Flukonazol'un Farklı Konsantrasyonlardaki Demir ve H₂O₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

Konsantrasyonu sabit tutulan Flu (88 µM)'un demirin farklı konsantrasyonları (30– 0,3– 0,03 mM) varlığında DNA üzerindeki koruyucu veya kırıcı etkisini incelemek için Ul-Haq ve diğerleri (2012) tarafından kullanılan prosedür takip edildi. Demirin bu oranlarını seçerken insan vücudunda bulunan demir aralığına (0.6-1.7 mg/L) dikkat edildi (Letelier vd. 2010). Flu'un molar konsantrasyonları Çizelge 1.2'deki değerler göz önüne alınarak hesaplandı. 0,247 µM bp pUC19 plazmid DNA, demirin 30– 0,3– 0,03 mM konsantrasyonları ve 6 mM H₂O₂ varlığında Flu'nun 88 µM konsantrasyonu ile muamele edildi. Kontrol olarak sadece DNA kullanıldı. Reaksiyon tüpleri 37°C de 1 saat boyunca inkübe edildi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 V'da 55 dakika boyunca yürütülerek sonuçlar Jel Doc cihazında analiz edildi.

2.7 DNA ÜZERİNDE BAKIR KAYNAKLI HASARA FLUKONAZOL'UN ETKİSİ

2.7.1 Flukonazol'un Bakır (CuCl₂) Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

Flu'un CuCl₂ varlığında DNA'yı kırma veya koruma yeteneğini anlamak için, 0,247 µM bp plazmid DNA, 60 µM CuCl₂ varlığında Flu'nun farklı konsantrasyonları (8800-880-88-44-22 µM) ile muamele edildi. Bakırın bu oranı seçilirken insan vücudunda bulunan bakır aralığına (0.9-1.2 mg/L) dikkat edildi (Letelier vd. 2010). Ek olarak, kontrol amaçlı bir örnekte Flu olmayıp diğer bütün herşey aynıdır. İkinci kontrol örneği CuCl₂, Asc ve DNA içermektedir. Üçüncü kontrol örneği ise sadece DNA içermektedir. Reaksiyon tüpleri 37°C de 1 saat boyunca inkübe edildi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 V'da 55 dakika boyunca yürütülerek sonuçlar Jel Doc cihazında analiz edildi.

2.7.2 Flukonazol'un Farklı Konsantrasyonlardaki Bakır Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

Bu reaksiyonda Asc kullanılmadığı için Cu(II) olarak kalır ve Flu'nun Cu(II) varlığında DNA'yı kırma veya koruma etkisi incelenmiştir. 0,247 µM bp plazmid DNA, CuCl₂'nin farklı konsantrasyonları (40- 20- 2- 0,2 uM) varlığında Flu'nun 88 µM konsantrasyonu ile muamele edildi. Bakırın bu oranları seçilirken insan vücudunda bulunan bakır aralığına (0.9-1.2 mg/L) dikkat edildi (Letelier vd. 2010). Kontrol olarak sadece DNA kullanıldı. Reaksiyon tüpleri 37°C de 1 saat boyunca inkübe edildi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 V'da 55 dakika boyunca yürütülerek sonuçlar Jel Doc cihazında analiz edildi.

2.8 FLUKONAZOL'UN GRAM NEGATİF (*ESCHERİCHİA COLİ*, *ENTEROBACTER CLOACAE* VE *PROTEUS MİRABİLİS*) VE GRAM POZİTİF (*ENTEROCOCCUS FAECALİS*) FLORA BAKTERİLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Bu çalışmada kullanılan flora bakterileri şunlardır:

Escherichia coli ATCC-25922

Enterococcus faecalis ATCC-29212

Proteus mirabilis ATCC7002

Enterobacter cloacae ATCC 13047

İlacın hazırlanması:

Flu'un 24 mM konsantrasyonu için tartım yapıldı ve erlen içerisindeki Mueller Hinton sıvı besiyerine aktarılıp manyetik karıştırıcı üzerinde çözülmeye bırakıldı. Çözünen Flu 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Ardından farklı Flu konsantrasyonlarını içeren Mueller Hinton besiyerleri (24mM başlangıç konsantrasyonu ile iki katı şeklinde seyreltilerek yapılan seri dilüsyonlar) hazırlandı.

Çalışılan tüm malzemelerin strelliğine özen gösterildi. Bütün malzemeler deneyden önce otoklav yapıp steril edildi. Çalışma, kabin içerisinde steril koşullarda yürütüldü. Çalışılan malzemelerden yada ellerden gelecek herhangi bir kontaminasyon olmamasına özen gösterildi.

2.8.1 Flukonazol'un *Enterobacter cloacae* Suşu Üzerine Etkisi

Flukonazol'un farklı konsantrasyonlarını içeren (24, 12, 6, ve 3 mM) Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlanıp mcfarland 0,5'e ayarlanacak şekilde bakteri süspansiyonu ile aşılama yapıldı. Test tüpleri, 24 saat boyunca 37 °C'de 150 rpm'de inkübe edildikten sonra suşun üremesi UV-Vis spektrofotometre (Optizen 2120 UV) ve CFU (koloni oluşturan birim) sayımı kullanılarak incelendi.

Ek olarak, suşun üremesi Mueller Hinton katı besiyeri üzerinde Flu konsantrasyonlarını (24, 12, 6, ve 3 mM) içeren steril diskler kullanılarak tekrarlandı. Kontrol amaçlı Mueller Hinton katı besiyeri üzerine suş ekimi yapıldıktan sonra Amp⁺ diskler yerleştirilerek bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.8.2 Flukonazol'un *Escherichia coli* Suşu Üzerine Etkisi

Flukonazol'un farklı konsantrasyonlarını içeren (24, 12, 6, ve 3 mM) Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlanıp mcfarland 0,5'e ayarlanacak şekilde bakteri süspansiyonu ile aşılama yapıldı. Test tüpleri, 24 saat boyunca 37 °C'de 150 rpm'de inkübe edildikten sonra suşun üremesi UV-Vis spektrofotometre (Optizen 2120 UV) ve CFU (koloni oluşturan birim) sayımı kullanılarak incelendi.

Ek olarak, suşun üremesi Mueller Hinton katı besiyeri üzerinde Flu konsantrasyonlarını (24, 12, 6, ve 3 mM) içeren steril diskler kullanılarak tekrarlandı. Kontrol amaçlı Mueller Hinton katı besiyeri üzerine suş ekimi yapıldıktan sonra Amp⁺ diskler yerleştirilerek bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.8.3 Flukonazol'un *Enterococcus faecalis* Suşu Üzerine Etkisi

Flukonazol'un farklı konsantrasyonlarını içeren (24, 12, 6, ve 3 mM) Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlanıp mcfarland 0,5'e ayarlanacak şekilde bakteri süspansiyonu ile aşılama yapıldı. Test tüpleri, 24 saat boyunca 37 °C'de 150 rpm'de inkübe edildikten sonra suşun üremesi UV-Vis spektrofotometre (Optizen 2120 UV) ve CFU (koloni oluşturan birim) sayımı kullanılarak incelendi.

Ek olarak, suşun üremesi Mueller Hinton katı besiyeri üzerinde Flu konsantrasyonlarını (24, 12, 6, ve 3 mM) içeren steril diskler kullanılarak tekrarlandı. Kontrol amaçlı Mueller Hinton katı besiyeri üzerine suş ekimi yapıldıktan sonra Amp⁺ diskler yerleştirilerek bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.8.4 Flukonazol'un *Proteus Mirabilis* Suşu Üzerine Etkisi

Flukonazol'un farklı konsantrasyonlarını içeren (24, 12, 6, ve 3 mM) Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlanıp mcfarland 0,5'e ayarlanacak şekilde bakteri süspansiyonu ile aşılama yapıldı. Test tüpleri, 24 saat boyunca 37 °C'de 150 rpm'de inkübe edildikten sonra suşun üremesi UV-Vis spektrofotometre (Optizen 2120 UV) ve CFU (koloni oluşturan birim) sayımı kullanılarak incelendi.

Ek olarak, suşun üremesi Mueller Hinton katı besiyeri üzerinde Flu konsantrasyonlarını (24, 12, 6, ve 3 mM) içeren steril diskler kullanılarak tekrarlandı. Kontrol amaçlı Mueller Hinton katı besiyeri üzerine suş ekimi yapıldıktan sonra Amp⁺ diskler yerleştirilerek bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.9 FLUKONAZOL'UN DNA VE PROTEİNE BAĞLANMA OLASILIĞININ ANALİZİ

2.9.1 UV Titrasyon Metodu ile Flukonazol'un DNA'ya Bağlanma Aktivitesinin Ölçülmesi

Flu ve DNA'nın etkileşimi sonucu yapı ve konformasyonda meydana gelen değişiklikleri araştırmak için UV-Vis Spektrofotometre cihazında spektrofotometrik titrasyon metodu kullanılarak yapıldı.

Tüm ölçümler, Tris-EDTA tamponu kullanılarak yapıldı. 10 µl 0,5 M EDTA'dan alınır ve 5 ml Tris (50 mM) ile karıştırılarak tampon hazırlandı. Flu, aynı tampon içerisinde çözündürülerek maksimum derişimi olan 24 mM ile çalışıldı. 3,3 mM Calf thymus DNA'da bu tampon içerisinde hazırlandı. Daha sonra DNA iyice pipetaj ve vorteks yapılarak 1 cm'lik kuvars küvetlere 600 µl eklenerek spektroda ölçüm alındı. Tris-EDTA tamponunda 260 nm'de Calf Thymus DNA'nın pik değeri beklenen şekildedir. DNA için ölçüm alındıktan sonra test tüpünün üstüne hazırlanan Flu konsantrasyonu (24 mM) eklendi ve 5 dk inkübasyonun ardından absorpsiyon sonucu kaydedildi. Bu işleme totalde 17 kez devam edildi. DNA'nın üzerine ilacın titre edilmesi sonucu UV-Vis Spektrofotometre'de kaydedilen absorpsiyon verilerinden aşağıdaki 2.1 kullanılarak bağlanma sabiti (K_b) hesaplandı.

$$\frac{1}{A-A_0} = \frac{1}{A_\infty-A_0} + \frac{1}{K(A_\infty-A_0) C_{\text{ligand}}} \quad (2.1)$$

Bu formülde; A_0 , ligand yokluğunda 260 nm'de DNA'nın absorbansıdır. A_∞ , DNA ve Flu'nun doymuş halinin son absorbans değeridir. A , farklı Flu konsantrasyonlarında kaydedilen absorbans değeridir. C_{ligand} ise flukonazole aittir (Kanakis vd. 2009).

2.9.2 UV Titrasyon Metodu ile Flukonazol'un Proteine (BSA) Bağlanma Aktivitesinin Ölçülmesi

Flu ve BSA (Sığır Serum Albumin)'nin etkileşimi sonucu yapısı ve konformasyonunda meydana gelen değişiklikleri gözlemlemek için UV-Vis Spektrofotometre cihazında spektrofotometrik titrasyon metodu kullanılarak yapıldı.

Protein olarak, sığır serum albümin (BSA) kullanıldı. Serum albüminler, özellikle dolaşım sisteminde çeşitli ligandların yayılması ve taşınması gibi birçok fizyolojik fonksiyona sahip olan başlıca en önemli protein bileşenleridir (Wani vd. 2017).

24 mM Flu ve 2,9 mM BSA'nın hazırlanmasında Tris (50 mM) tamponu kullanıldı. 0,025 g BSA+5 ml Tris tamponu içerisinde çözülerek hazırlandı. BSA'nın 220–320 nm dalga boyları arasındaki değişimleri izlendi. BSA'nın pik değeri istenilen gibiydi ve baseline alınarak deneye başlandı. BSA'nın üstüne hazırlanan Flu konsantrasyonu (24 mM) eklendi ve 5 dk inkübasyonun ardından absorpsiyon sonucu kaydedildi. Bu işleme totalde 10 kez devam edildi. BSA'nın üzerine ilacın titre edilmesi sonucu UV-Vis Spektrofotometre'de kaydedilen absorpsiyon verilerinden aşağıdaki 2.2 kullanılarak bağlanma sabiti(K_b) bulundu.

$$\frac{1}{A-A_0} = \frac{1}{A_{\infty}-A_0} + \frac{1}{K(A_{\infty}-A_0)} \frac{1}{C_{ligand}} \quad (2.2)$$

Bu formülde; A_0 , ligand yokluğunda BSA'nın absorbansıdır. A_{∞} , BSA ve Flu doymuş halinin son absorbans değeridir. A , farklı Flu konsantrasyonlarında kaydedilen absorbans değeridir. C_{ligand} ise flukonazole aittir (Kanakis vd. 2009)

2.10 FLUKONAZOL'UN DNA'YA BAĞLANMASININ İN-SİLİKO ANALİZ İLE İNCELENMESİ

In-siliko analizi için, UCSF Chimera programı (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>), AutoGrid4 ve AutoDock4 giriş yapılarını hazırlamak için kullanıldı. AutoGrid4 ve AutoDock4'le birlikte ilaç ve DNA dizisi arasında kör yerleştirme hesaplamaları yapmak ve uygulamak için kullanıldı. B-DNA (PDB ID: 1BNA) kristal yapısı Protein Veri Bankasından indirildi. İlacın 3D yapısı PubChem veri tabanından SDF formatında indirildi ve PDB formatına dönüştürüldü. PDB formatındaki makromolekül (DNA) ve ligand (ilaç) dosyaları AutoGrid, AutoDock, Analyze ve Discovery programı kullanılarak hazırlandı. Kompleks sistem, x * y * z yönlerinde (50, 50, 100) grid kutusu içine alındı. Auto Dock'da uygulanan Lamarckian genetik algoritmaları, yerleştirme hesaplamalarını yapmak için kullanıldı. Tüm hesaplamalar, işletim sistemi olarak MS Windows 10 Intel CORE i5 tabanlı bir bilgisayarda yapıldı (Shahabadi vd. 2016).



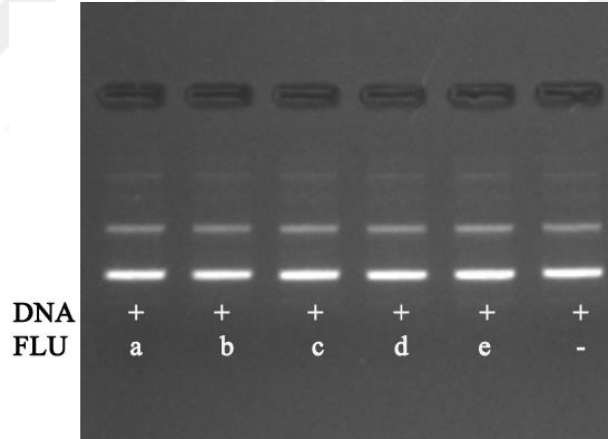
BÖLÜM 3

BULGULAR

3.1 FLUKONAZOL'UN DNA ÜZERİNE OLAN KIRMA AKTİVİTESİ

3.1.1 Flukonazol Konsantrasyonlarının DNA Üzerine Etkisi

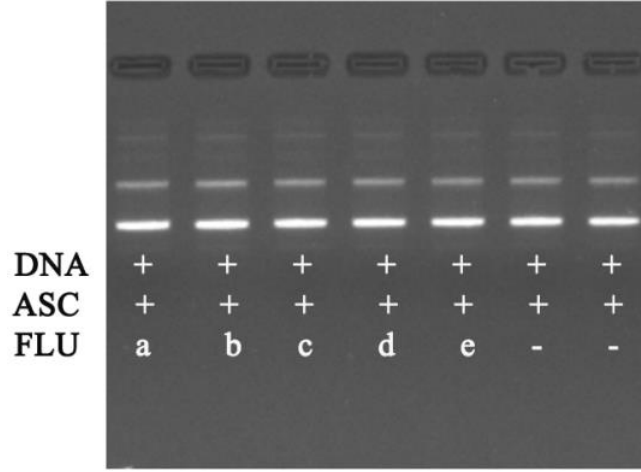
Flu'nun farklı konsantrasyonları (8800-880-88-44-22 μM) ile muamele edilmiş süpersarmal plazmid DNA, işlenmemiş DNA'ya kıyasla agaroz jel elektroforezinde Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi değişiklik göstermedi.



Şekil 3.1 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μM bazları) Flu ile muamelesi ve agaroz jel (% 1) elektroforezinde analizi. a,b,c,d ve e sırasıyla Flukonazol'un (FLU) 8800-880-88-44 ve 22 μM konsantrasyonlarını temsil eder. Tüm testler fosfat tamponunda yapıldı.

3.1.2 Flukonazol'un Askorbik Asit (Asc) Varlığında DNA Üzerine Etkisi

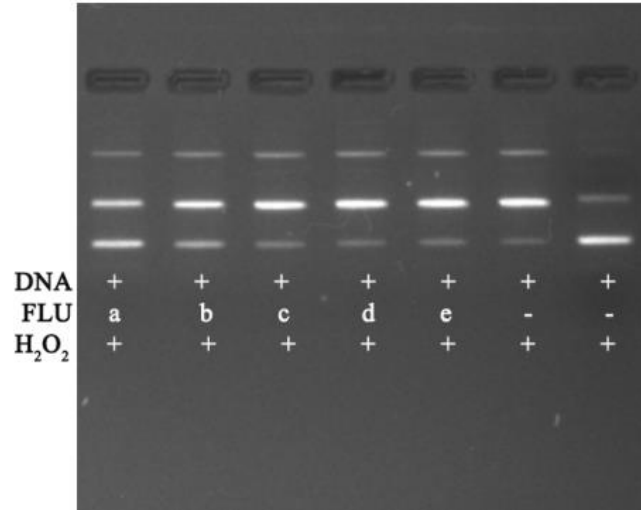
Flu'un farklı konsantrasyonları, indirgeyici bir madde olan askorbik asit varlığında süpersarmal DNA üzerinde kırılma yaratmadı ve Şekil 3.12.'de gösterildiği gibi, DNA'nın sadece askorbik asit ile muamele edilmesi DNA'ya zarar vermedi.



Şekil 3.1 pUC19 plazmid DNA'nın (0,247 μ M bazları) asc varlığında Flu ile muamelesi ve agaroz jel (% 1) elektroforezinde analizi. a,b,c,d ve e sırasıyla Flukonazol'un (FLU) 8800-880-88-44 ve 22 μ M konsantrasyonlarını temsil eder. Asc sabit konsantrasyonu 0,0185 mM'dir.

3.1.3 Flukonazol'un H₂O₂ Varlığında DNA Üzerine Etkisi

Oksidatif bir ajan olan H₂O₂ varlığında süpersarmal yapıdaki DNA' yı OH radikalleri kırmıştır fakat Flu buna karşı koruma sağlamıştır. Şekil 3.3. 'de gösterildiği gibi özellikle flukonazolun en yüksek derişimi kırılmaya karşı koruma sağlamıştır.

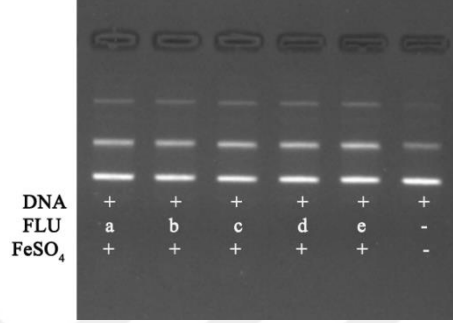


Şekil 3.3 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μ M bazları) H₂O₂ varlığında Flu ile muamelesi ve agaroz jel (% 1) elektroforezinde analizi. a,b,c,d ve e sırasıyla Flukonazol'un (FLU) 8800-880-88-44 ve 22 μ M konsantrasyonlarını temsil eder. H₂O₂'nin sabit konsantrasyonu 6 mM idi.

3.2 DNA ÜZERİNDE DEMİR KAYNAKLI HASARA FLUKONAZOL'UN ETKİSİ

3.2.1 Flukonazol'un Demir Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

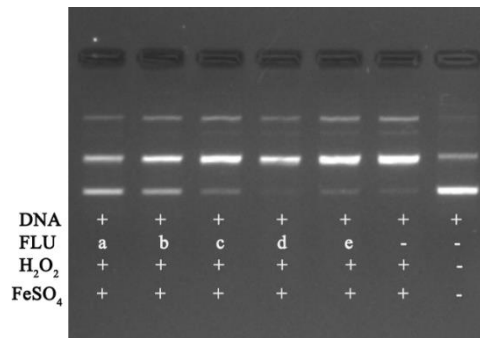
Flukonazol, Şekil 3.4.' de gösterildiği gibi DNA ve demir etkileşimi üzerine herhangi bir pozitif (koruma) ya da negatif (tetikleme) etki göstermemiştir.



Şekil 3.4 Flu'un demir varlığında DNA ile etkileşimi üzerine etkisi. DNA, pUC19 plazmid DNA (0,247 μ M bazları) idi. Flu'un konsantrasyonları sırasıyla 8800-880-88-44 ve 22 μ M'yı temsil eden a, b, c, d ve e olarak gösterilmiştir. FeSO₄'un konsantrasyonu 1,5 mM idi.

3.6.2 Flukonazol'un Demir ve H₂O₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

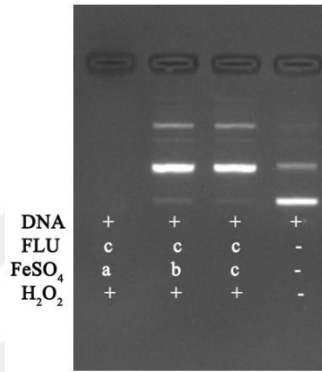
Süpersarmal PUC19 plazmid DNA'nın demir (1,5 mM) ve H₂O₂ (6 mM) varlığında, kırılmalar nedeniyle sirküler forma ve doğrusal forma dönüştüğü gözlenmiştir. Flu, H₂O₂ ve FeSO₄ arasındaki etkileşimden kaynaklanan ve DNA'ya zarar veren hidroksil radikallerine karşı koruma sağlamıştır. Şekil 3.5'de gösterildiği gibi, Flu'nun farklı konsantrasyonlarındaki bu koruma jel bantlarından açıkça anlaşılmaktadır.



Şekil 3.5 Flu'un demir ve H₂O₂ varlığında DNA ile etkileşimi üzerine etkisi. Flu'un konsantrasyonları sırasıyla 8800-880-88-44 ve 22 μ M'yı temsil eden a, b, c, d ve e olarak gösterilmiştir. FeSO₄ ve H₂O₂'nin konsantrasyonu sırasıyla 1,5 mM ve 6 mM idi.

3.2.3 Flukonazol'un Farklı Konsantrasyonlardaki Demir ve H₂O₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

Süpersarmal pUC19 plazmid DNA'nın demirin artan konsantrasyonları (0,03-0,3-30 mM) ve H₂O₂ (6 mM) varlığında, kırılmalar nedeniyle sirküler ve doğrusal forma dönüştüğü Şekil 3.6.'da gözlenmiştir. Özellikle demirin 30 mM konsantrasyonu DNA'nın tamamen kaybolmasına neden olmuştur. Flu'un 88 µM konsantrasyonun bu hasara karşı koruyucu bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

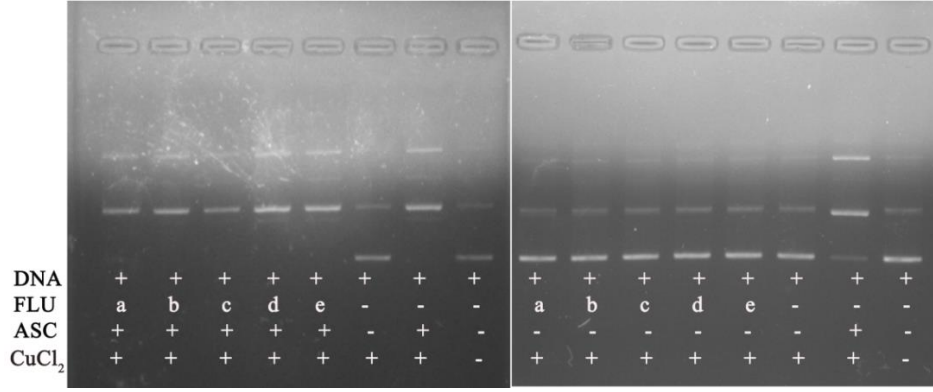


Şekil 3.6 Flu'un farklı konsantrasyonlardaki demir ve H₂O₂ varlığında DNA ile etkileşimi üzerine etkisi. Flu'un 88 µM konsantrasyonu c olarak gösterilmiştir. FeSO₄ konsantrasyonları ise sırasıyla 30, 0,3 ve 0,03 mM'yi temsil eden a, b ve c olarak gösterilmiştir. H₂O₂ konsantrasyonu 6mM idi

3.3 DNA ÜZERİNDE BAKIR KAYNAKLI HASARA FLUKONAZOL'UN ETKİSİ

3.3.1 Flukonazol'un Bakır Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

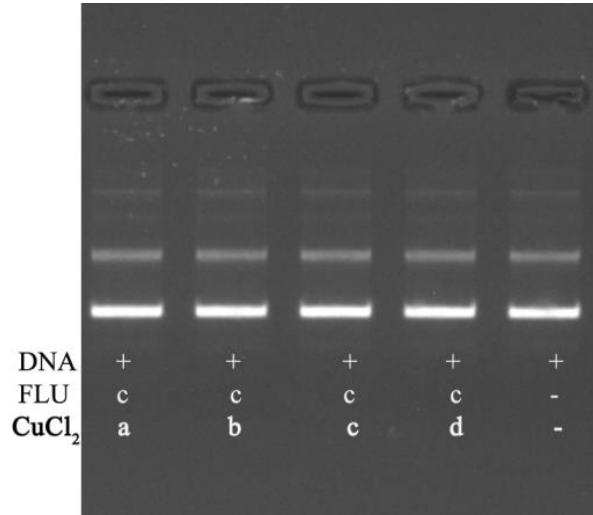
Süpersarmal pUC19 plazmid DNA'nın, CuCl₂ ve indirgeyici bir madde olan askorbik asit varlığında hem sirküler hem de doğrusal forma dönüştüğü Şekil 3.7.'de gözlenmiştir. Asc ve CuCl₂ arasındaki etkileşimin DNA'ya verdiği hasara karşı Flu koruyucu etki sağlayamamıştır. Asc olmadan CuCl₂ ile Flu muamele edildiğinde DNA'yı etkilemedi ve flukonazol DNA'yı kırmak için CuCl₂'yi tetiklememiştir.



Şekil 3.7 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μ M bazları) CuCl₂ varlığında Flu ile muamele edilmesi ve agaroz jeli (% 1) elektroforezinde analizi. Flu konsantrasyonları sırasıyla 8800-880-88-44 ve 22 μ M'yı temsil eden a, b, c, d ve e olarak gösterilmiştir.

3.3.2 Flukonazol'un Farklı Konsantrasyonlardaki CuCl₂ Varlığında DNA ile Etkileşimi Üzerine Etkisi

Flu'un 88 μ M derişimi, DNA ve farklı konsantrasyonlardaki bakırın (60, 40, 20 ve 2 μ M) etkileşimi üzerine Şekil 3.8'de gösterildiği gibi herhangi bir pozitif (koruma) ya da negatif (tetikleme) etki göstermemiştir.

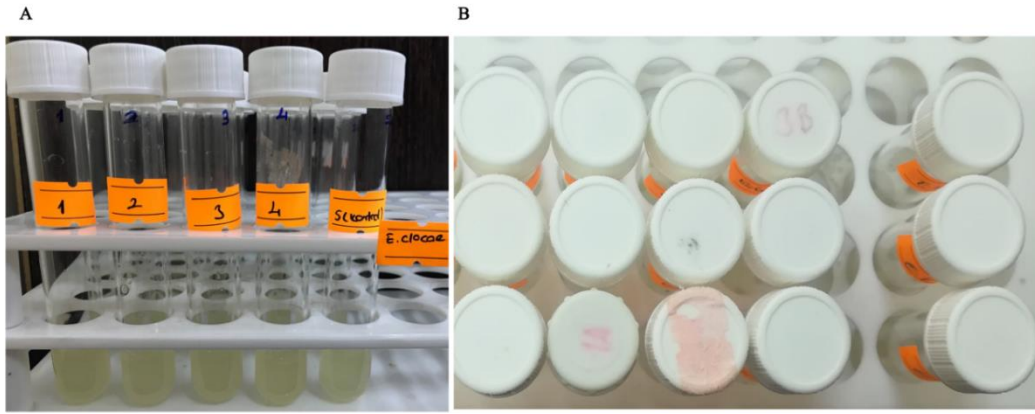


Şekil 3.8 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μ M bazları) farklı konsantrasyonlardaki CuCl₂ varlığında Flu ile muamele edilmesi ve agaroz jeli (% 1) elektroforezinde analizi. Flu'un 88 μ M konsantrasyonu c olarak gösterilmiştir. CuCl₂'nin konsantrasyonları sırasıyla 60, 40, 20 ve 2 μ M temsil eden a, b, c ve d olarak gösterilmiştir.

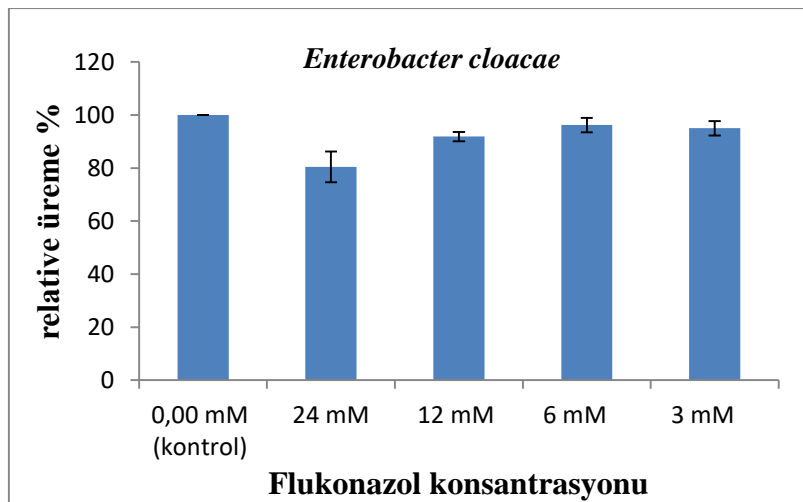
3.4 FLUKONAZOL'UN GRAM NEGATİF (*ESCHERİCHİA COLİ*, *ENTEROBACTER CLOACAE* VE *PROTEUS MİRABİLİS*) VE GRAM POZİTİF (*ENTEROCOCCUS FAECALİS*) FLORA BAKTERİLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

3.4.1 Flukonazol'un *Enterobacter cloacae* Suşu Üzerine Etkisi

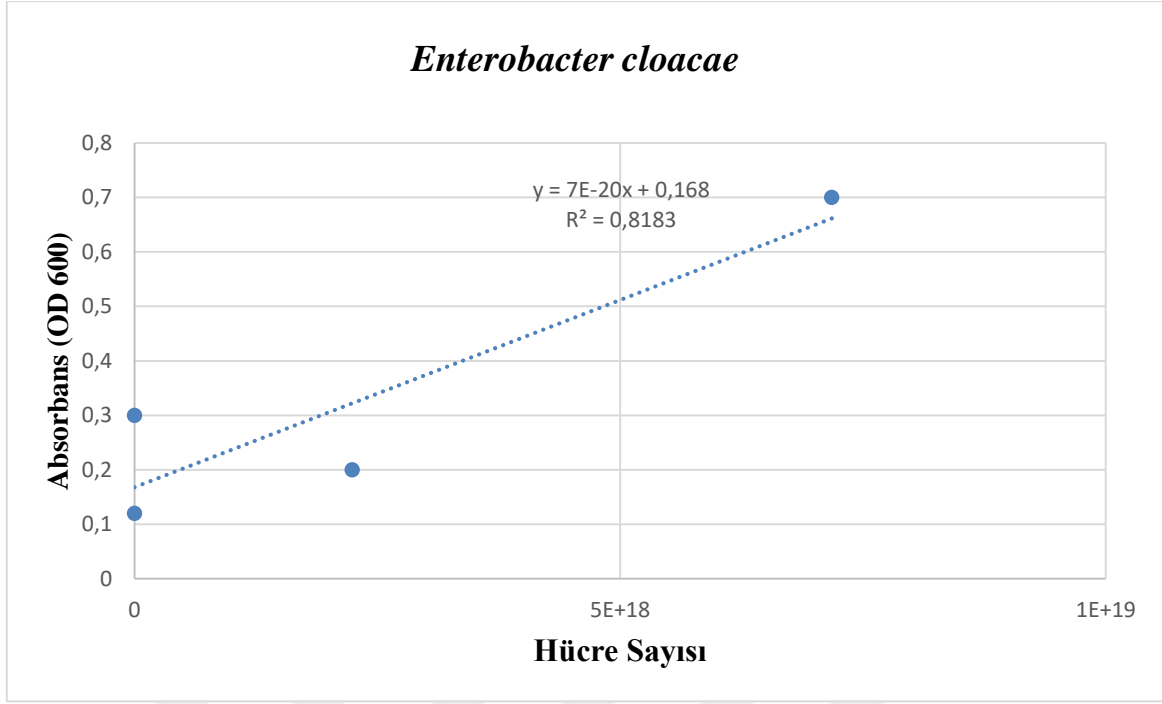
Flu'un maksimum derişimi (24 mM), *Enterobacter cloacae* suşu üzerine inhibitör etki gösterdi. İlacın maksimum konsantrasyonu (24 mM) ile muamele edilen kültür yoğunluğunda %20 azalma olmuştur. Şekil 3.9.'da görüldüğü üzere yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyonlara doğru gidildikçe bakterinin üremesi üzerindeki inhibitor etki daha az görülmektedir.



Şekil 3.9 A) *Enterobacter cloacae*'nin Flu'nun farklı konsantrasyonlarını içeren Mueller Hinton sıvı besiyerinde göreceli üremesi. B) Her konsantrasyon (24 mM, 12 mM, 6 mM, 3 mM ve kontrol) üç tekrarlı şekilde yapılmıştır.

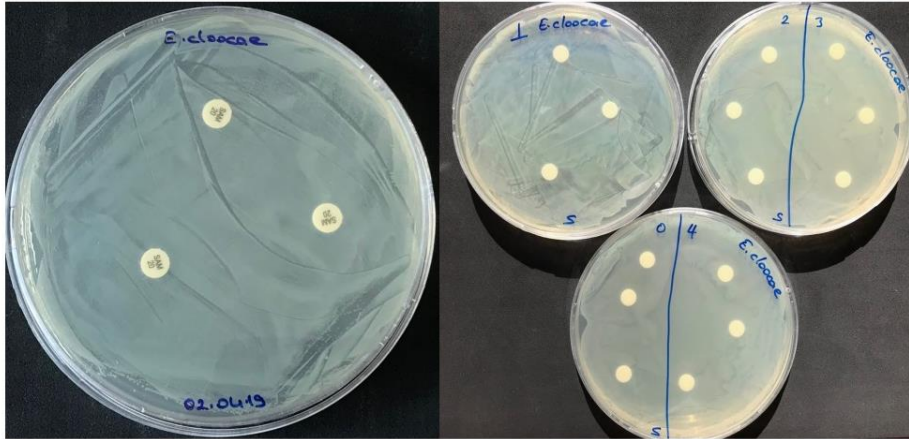


Şekil 3.10 *Enterobacter cloacae*'nin Flu'nun farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde göreceli üremesi. Grafikde %100 olarak gösterilen üreme $2,72E-21$ hücre sayısını göstermektedir.



Şekil 3.11 *Enterobacter cloacae*'nin standart üreme grafiği.

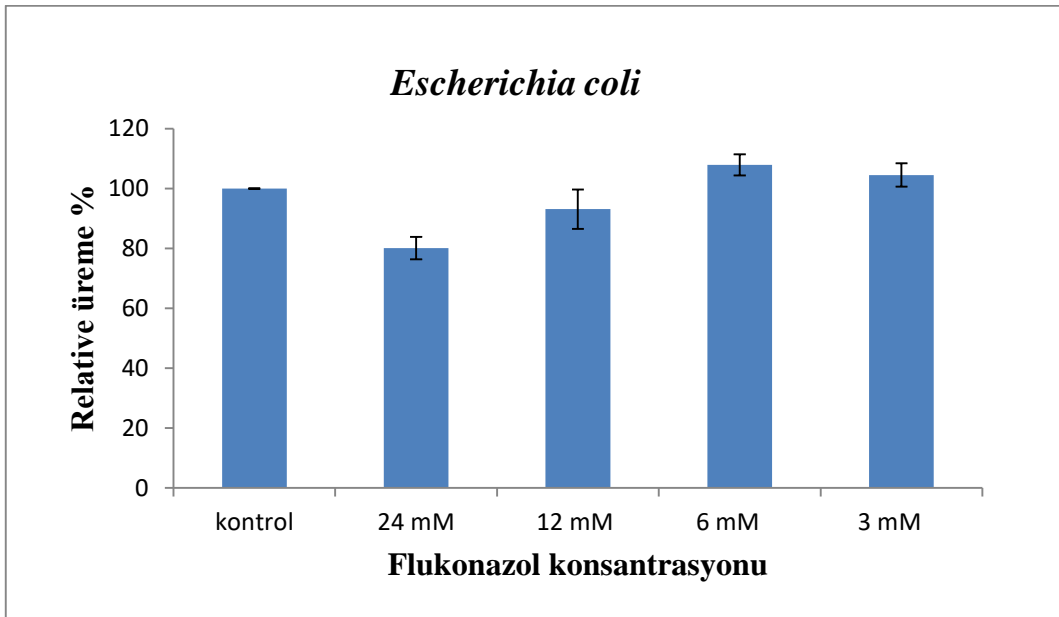
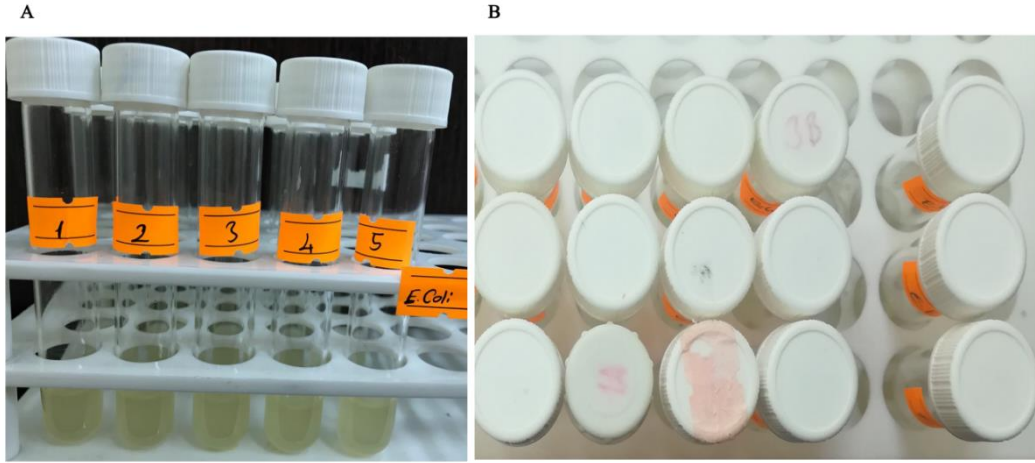
Kontrol amaçlı yapılan, Mueller Hinton katı besiyeri üzerine yerleştirilen amp⁺ disklerin çevresinde halkasal zon gözlemlenmedi. Şekil 3.12.'de gösterildiği gibi Mueller Hinton katı besiyeri üzerinde Flu konsantrasyonlarını (24 mM, 12 mM, 6 mM ve 3 mM) içeren steril disklerin çevresinde halkasal bir bölge gözlemlenmedi.



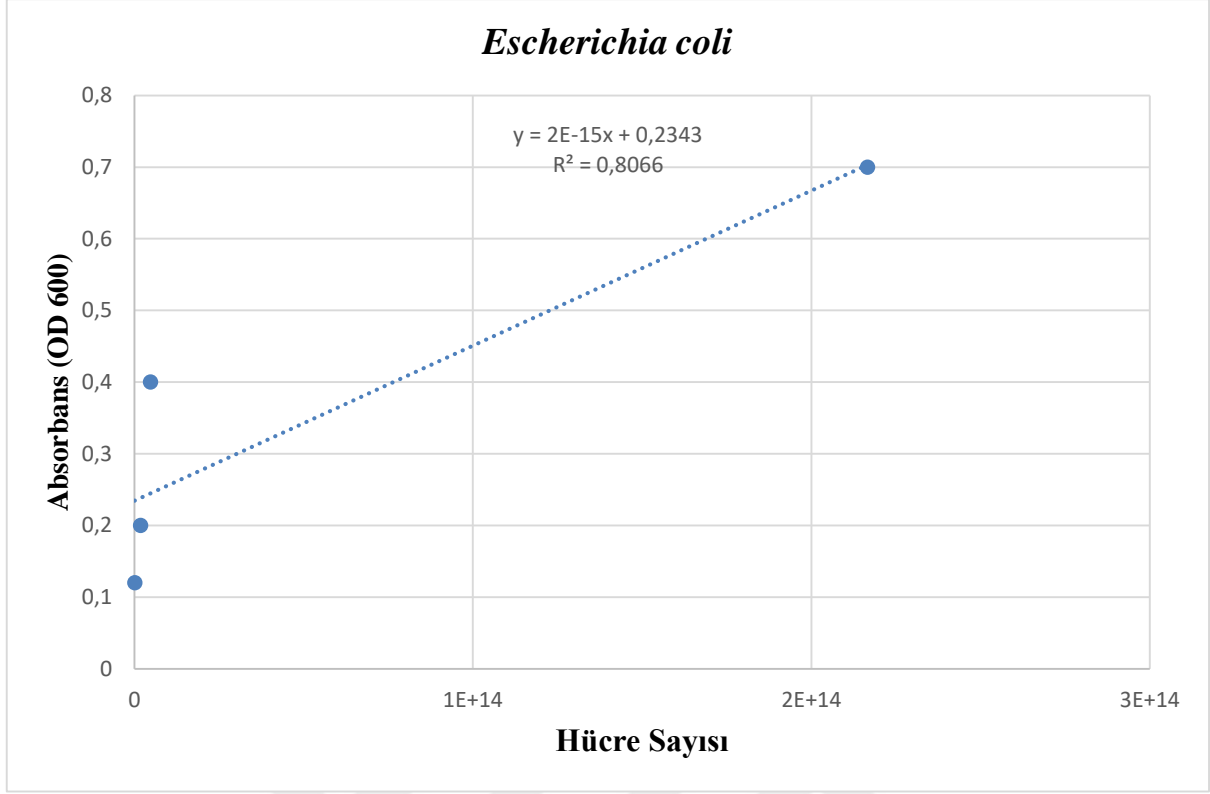
Şekil 3.12 Steril diskler kullanılarak *Enterobacter cloacae*'nin Mueller Hinton agarlı katı besiyeri üzerinde üremesi. 0, 1, 2, 3 ve 4 şeklinde etiketlenmiş olan petriler içerisindeki disklerin Flu konsantrasyonları sırasıyla kontrol, 24 mM, 12 mM, 6 mM ve 3 mM idi.

3.4.2 Flukonazol'un *Escherichia coli* Suşu Üzerine Etkisi

Flu'un maksimum derişimi (24 mM), *Escherichia coli* bakterisi üzerine inhibitör etki gösterdi. İlacın maksimum konsantrasyonu (24 mM) ile muamele edilen kültür yoğunluğunda %20 azalma olmuştur. Şekil 3.13.'de görüldüğü üzere yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyonlara doğru gidildikçe bakterinin üremesi üzerindeki inhibitor etki daha az görülmektedir.

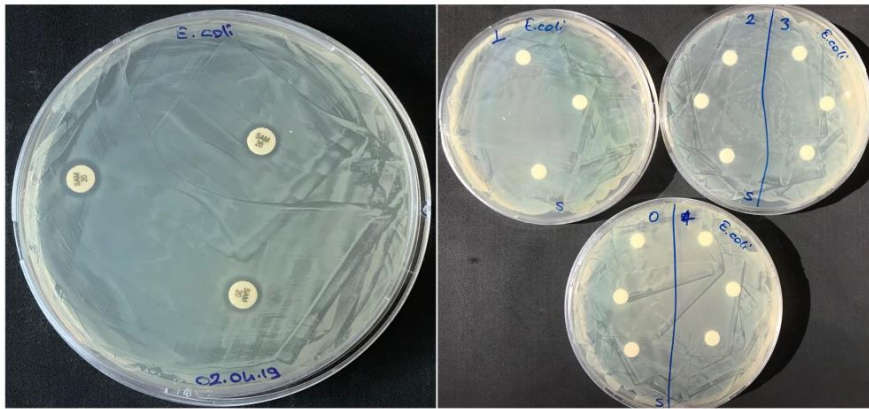


Şekil 3.14 *Escherichia coli* 'nin Flu'un farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde göreceli üremesi. Grafikte %100 olarak gösterilen üreme 0,7645E+15 hücre sayısını göstermektedir.



Şekil 3.15 *Escherichia coli* 'nin standart üreme grafiği.

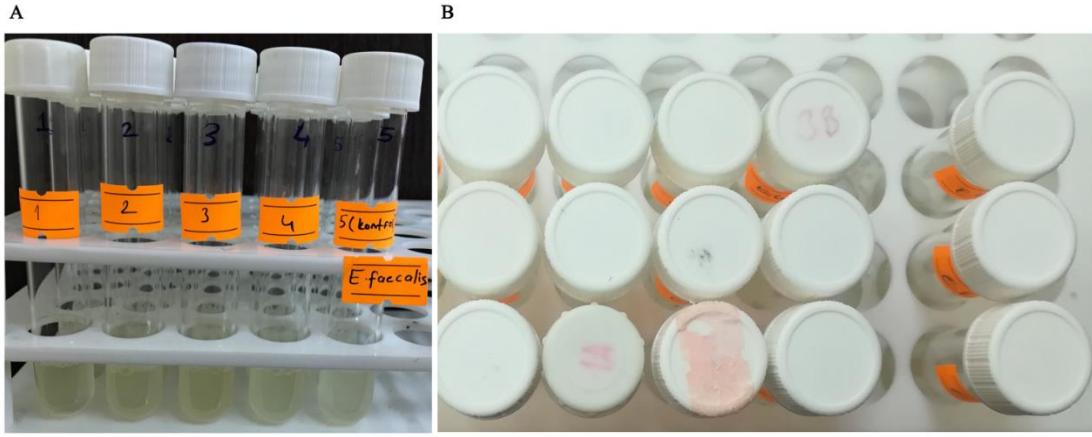
Kontrol amaçlı yapılan, Mueller Hinton katı besiyeri üzerine yerleştirilen amp⁺ disklerin çevresinde halkasal zon gözlemlendi. Şekil 3.16.'da gösterildiği gibi Mueller Hinton katı besiyeri üzerinde Flu'un konsantrasyonlarını (24 mM,12 mM,6 mM ve 3 mM) içeren steril disklerin çevresinde herhangi bir zon gözlenmedi.



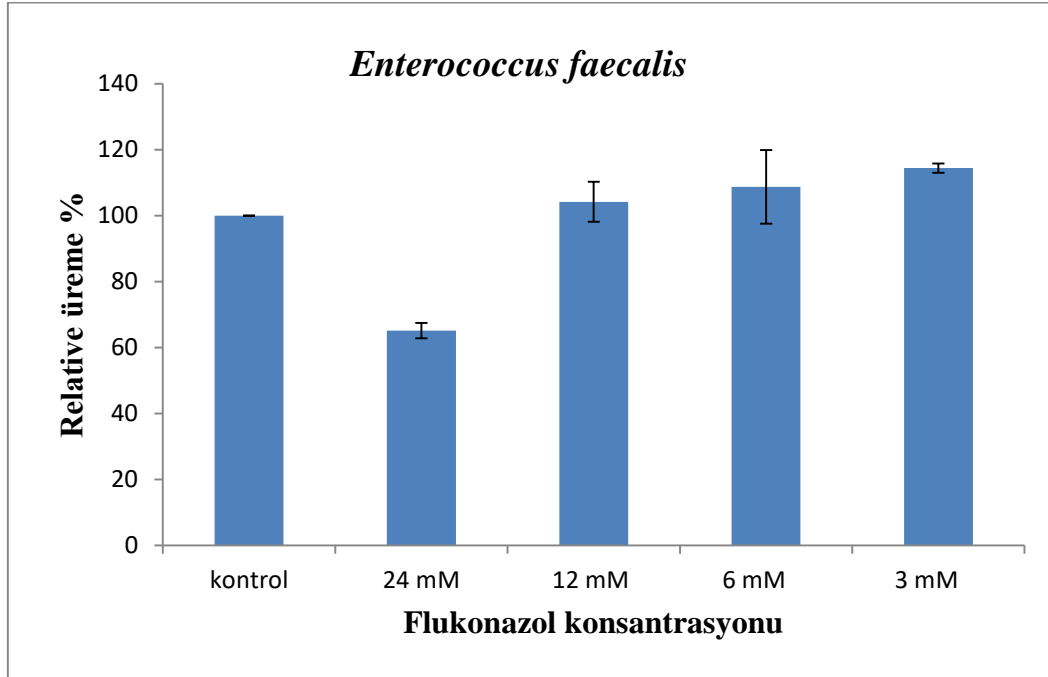
Şekil 3.16 Steril diskler kullanılarak *Escherichia coli* 'nin Mueller Hinton agarlı katı besiyeri üzerinde üremesi. 0, 1, 2, 3 ve 4 şeklinde etiketlenmiş olan petriler içerisindeki disklerin Flu konsantrasyonları sırasıyla kontrol, 24 mM,12 mM,6 mM ve 3 mM idi.

3.4.3 Flukonazol'un *Enterococcus faecalis* Suşu Üzerine Etkisi

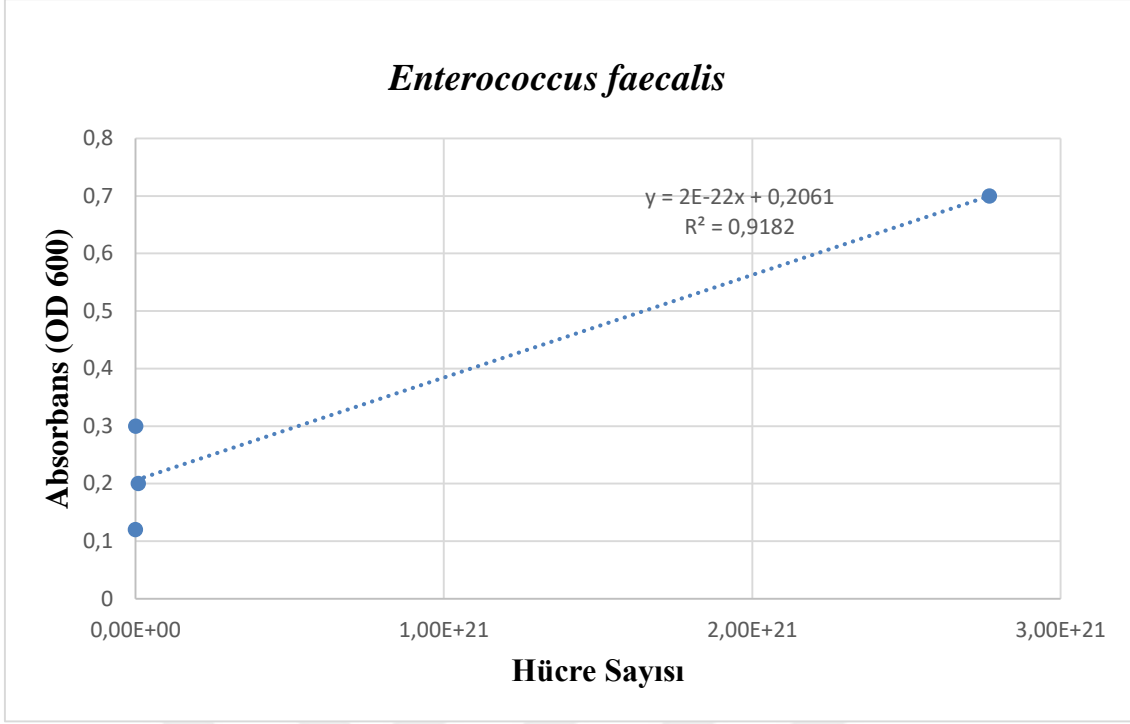
Flu'un maksimum derişimi (24 mM), *Enterococcus faecalis* bakterisi üzerine inhibitör etki gösterdi. İlacın maksimum konsantrasyonu (24 mM) ile muamele edilen kültür yoğunluğunda %35 azalma olmuştur. Şekil 3.17.'de görüldüğü üzere yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyonlara doğru gidildikçe bakterinin üremesi üzerindeki inhibitor etki daha az görülmektedir.



Şekil 3.17 A) *Enterococcus faecalis*'in Flu'nun farklı konsantrasyonlarını içeren Mueller Hinton sıvı besiyerinde göreceli üremesi. B) Her konsantrasyon (24 mM, 12 mM, 6 mM, 3 mM ve kontrol) üç tekrarlı şekilde yapılmıştır.

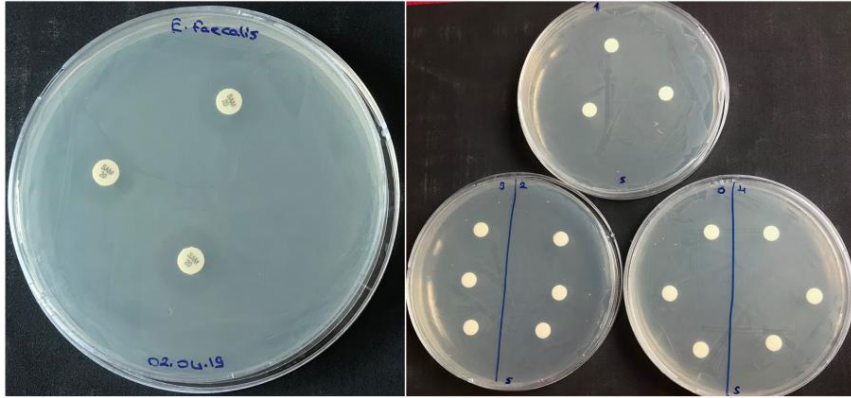


Şekil 3.18 *Enterococcus faecalis* 'nin Flu'un farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde göreceli üremesi. Grafikde %100 olarak gösterilen üreme 0,5E+22 hücre sayısını göstermektedir.



Şekil 3.19 *Enterococcus faecalis* 'in standart üreme grafiği.

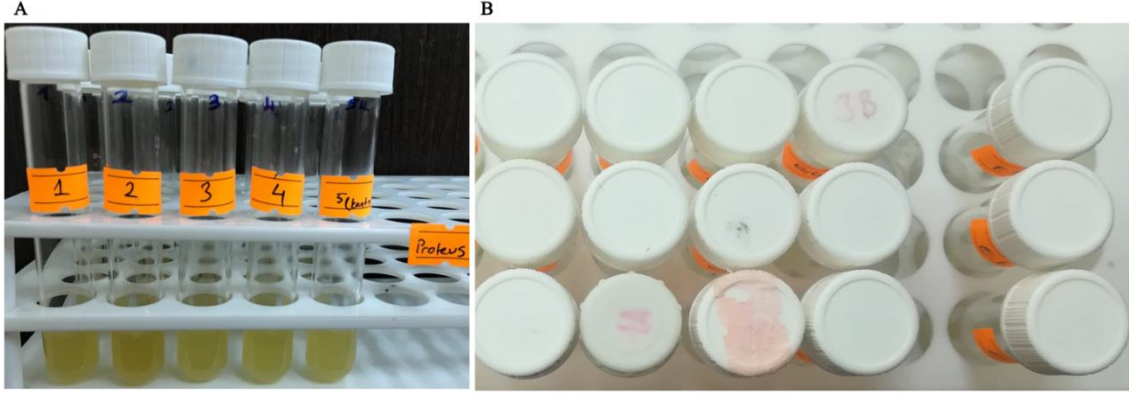
Kontrol amaçlı yapılan, Mueller Hinton katı besiyeri üzerine yerleştirilen amp⁺ disklerin çevresinde halkasal zon gözlemlendi. Şekil 3.20.'de gösterildiği gibi Mueller Hinton katı besiyeri üzerinde Flu'un konsantrasyonlarını (24 mM,12 mM,6 mM ve 3 mM) içeren steril disklerin çevresinde herhangi bir zon gözlenmedi.



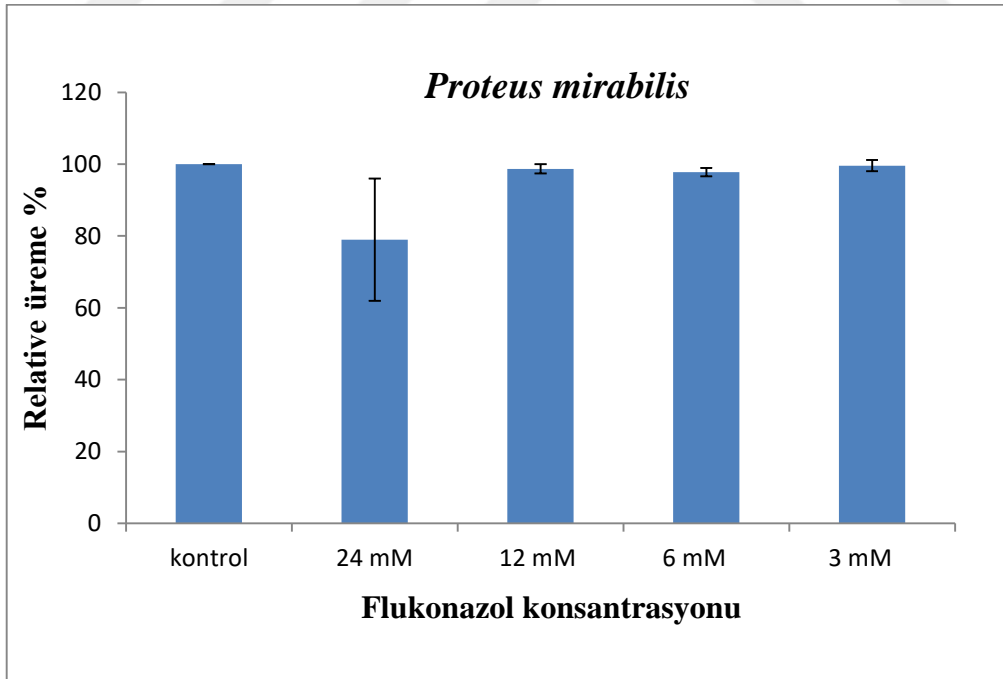
Şekil 3.20 Steril diskler kullanılarak *Enterococcus faecalis* 'in Mueller Hinton agarlı katı besiyeri üzerinde üremesi. 0, 1, 2, 3 ve 4 şeklinde etiketlenmiş olan petriler içerisindeki disklerin flukonazol konsantrasyonları sırasıyla kontrol, 24 mM,12 mM,6 mM ve 3 mM idi.

3.4.4 Flukonazol'un *Proteus mirabilis* Suşu Üzerine Etkisi

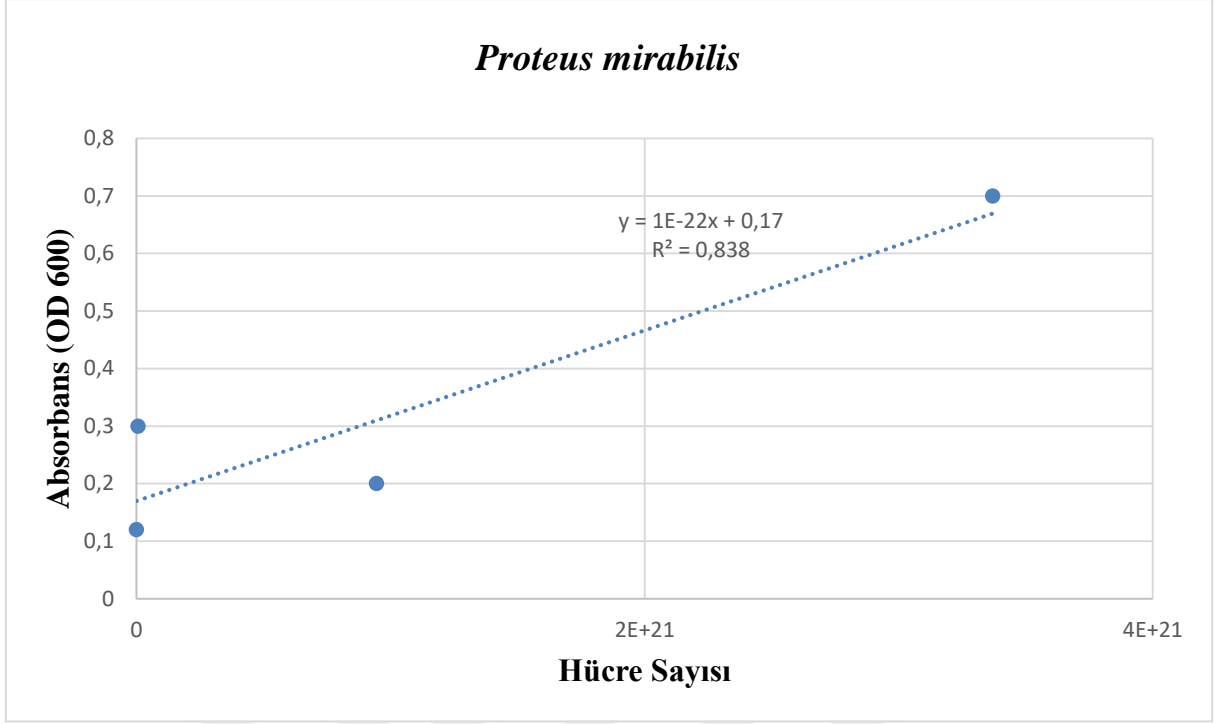
Flu'un maksimum derişimi (24 mM), *Proteus* bakterisi üzerine inhibitör etki gösterdi. İlacın maksimum konsantrasyonu (24 mM) ile muamele edilen kültür yoğunluğunda %22 azalma olmuştur. Şekil 3.21.'de görüldüğü üzere yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyonlara doğru gidildikçe bakterinin üremesi üzerindeki inhibitör etki daha az görülmektedir.



Şekil 3.21 A) *Proteus mirabilis*'in Flu'un farklı konsantrasyonlarını içeren Mueller Hinton sıvı besiyerinde göreceli üremesi. B) Her konsantrasyon (24 mM, 12 mM, 6 mM, 3 mM ve kontrol) üç tekrarlı şekilde yapılmıştır.

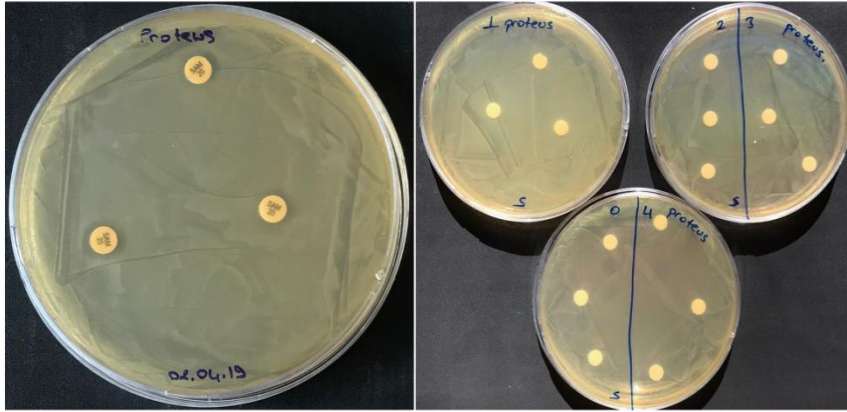


Şekil 3.22 *Proteus mirabilis*'in Flu'un farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde göreceli üremesi. Grafikde %100 olarak gösterilen üreme 2,037E+22 hücre sayısını göstermektedir.



Şekil 3.23 *Proteus mirabilis*'in standart üreme grafiği.

Kontrol amaçlı yapılan, Mueller Hinton katı besiyeri üzerine yerleştirilen amp⁺ disklerin çevresinde halkasal zon gözlemlendi. Şekil 3.24'de gösterildiği gibi Mueller Hinton katı besiyeri üzerinde Flu'un konsantrasyonlarını (24 mM,12 mM,6 mM ve 3 mM) içeren steril disklerin çevresinde herhangi bir zon gözlenmedi.

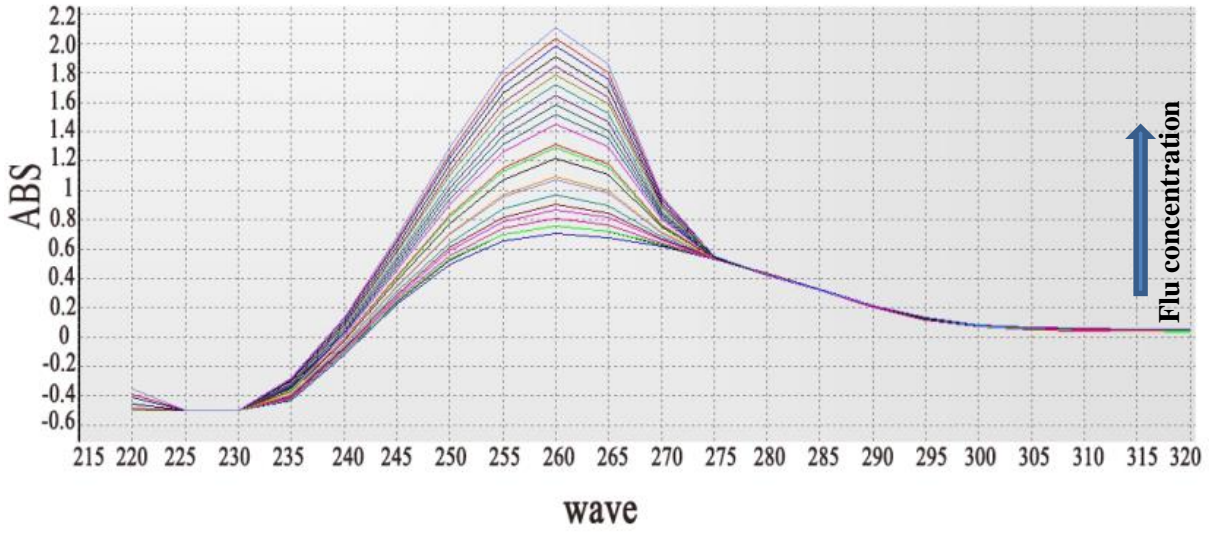


Şekil 3.24 Steril diskler kullanılarak *Proteus mirabilis*'in Mueller Hinton agarlı katı besiyeri üzerinde üremesi. 0, 1, 2, 3 ve 4 şeklinde etiketlenmiş olan petriler içerisindeki disklerin Flu konsantrasyonları sırasıyla kontrol, 24 mM,12 mM,6 mM ve 3 mM idi.

3.5 FLUKONAZOL'UN DNA VE PROTEİNE BAĞLANMA OLASILIĞININ ANALİZİ

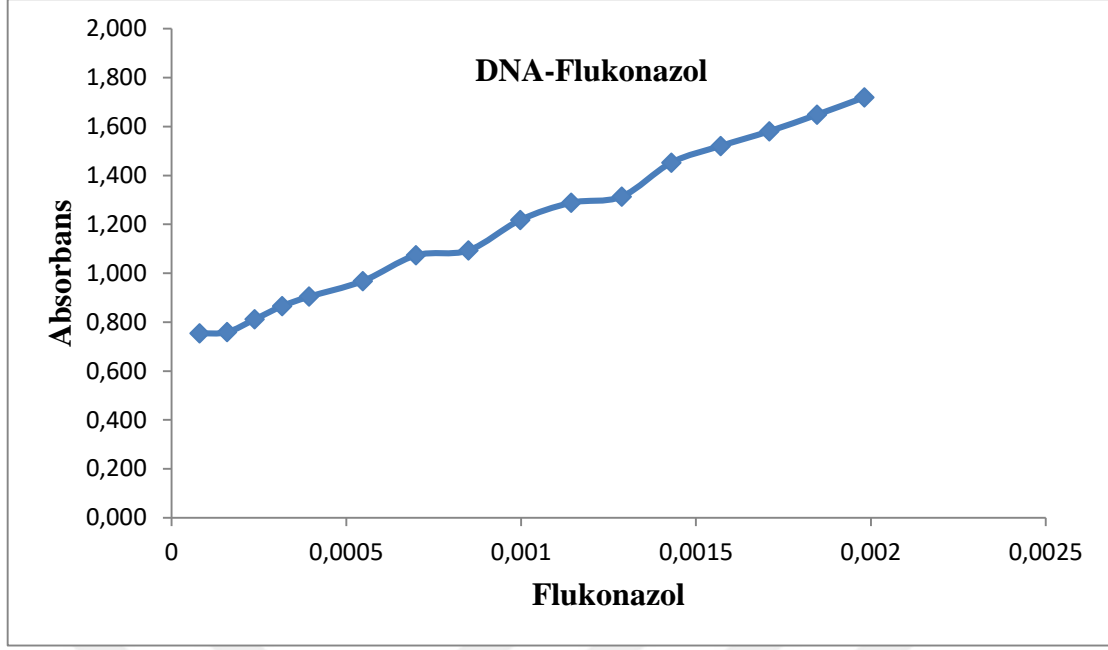
3.5.1 UV Titrasyon Metodu ile Flukonazol'un DNA'ya Bağlanma Aktivitesinin Ölçülmesi

UV-Vis spektrofotometre de DNA üzerine Flu titrasyonu ile yapılan ölçümde Flu-Absorbans grafiği elde edilen verilere göre çizilmiştir. UV titrasyon metodu ile yapılan çalışmanın sonucunda Şekil 3.25'de gösterildiği üzere absorbansta artış gözlemlendi. Absorbans artışı, Flu ile DNA'nın etkileşimini göstermektedir.



Şekil 3.25 DNA üzerine Flu'un titre edilmesi sonucu elde edilen Absorbans-Dalga boyu grafiği.

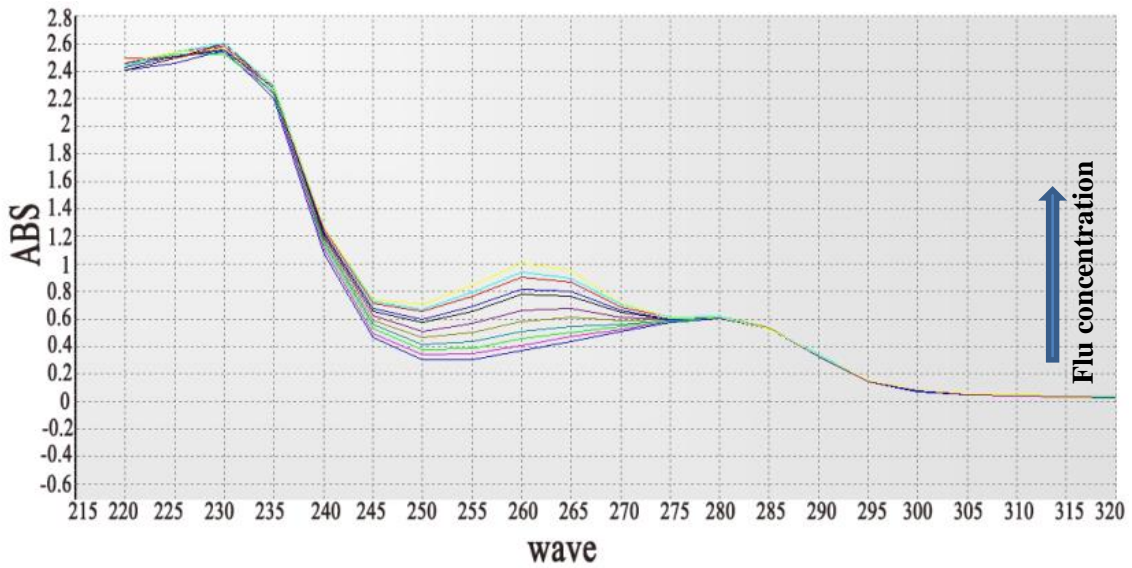
Bağlanma sabiti (K_b) 179,05 $1/M$ olarak Şekil 3.26'da verilen grafik eğiminden hesaplanmıştır. K_b sabitine göre Flu DNA'nın yüzeyinde bir yere zayıf şekilde bağlanmıştır.



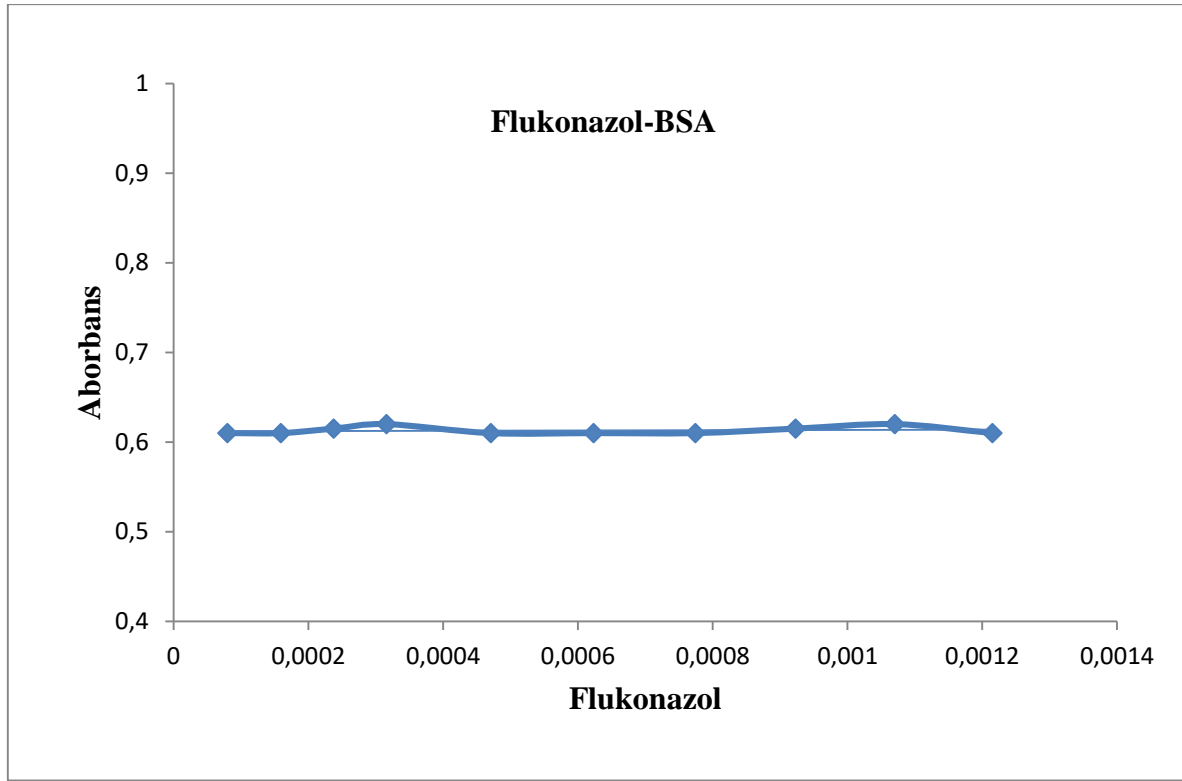
Şekil 3.26 DNA üzerine Flu'un titre edilmesi sonucu elde edilen Absorbans-Flukonazol grafiği.

3.5.2 UV Titrasyon Metodu ile Flukonazol'un Proteine (BSA) Bağlanma Aktivitesinin Ölçülmesi

UV-Vis spektrofotometre de BSA üzerine Flu titrasyonu ile yapılan ölçümde Flu-Absorbans grafiği elde edilen verilere göre çizilmiştir. UV titrasyon metodu ile yapılan çalışmanın sonucunda Şekil 3.27' gösterildiği üzere Flu absorbans değerini etkilememiştir. Absorbansta artış olmaması Flu ile BSA arasında bir etkileşim olmadığı Şekil 3.28.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.27 BSA üzerine Flu'un titre edilmesi sonucu elde edilen Absorbans-Dalga boyu grafiği.

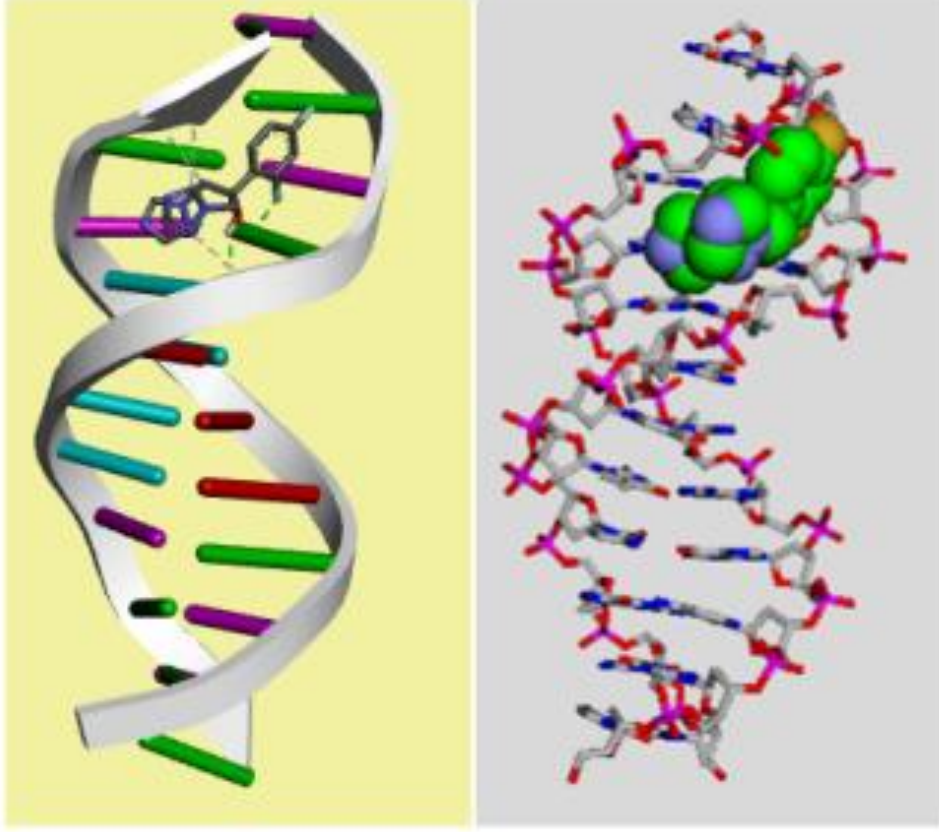


Şekil 3.28 BSA üzerine Flu'un titre edilmesi sonucu elde edilen Absorbans-Flukonazol grafiği.

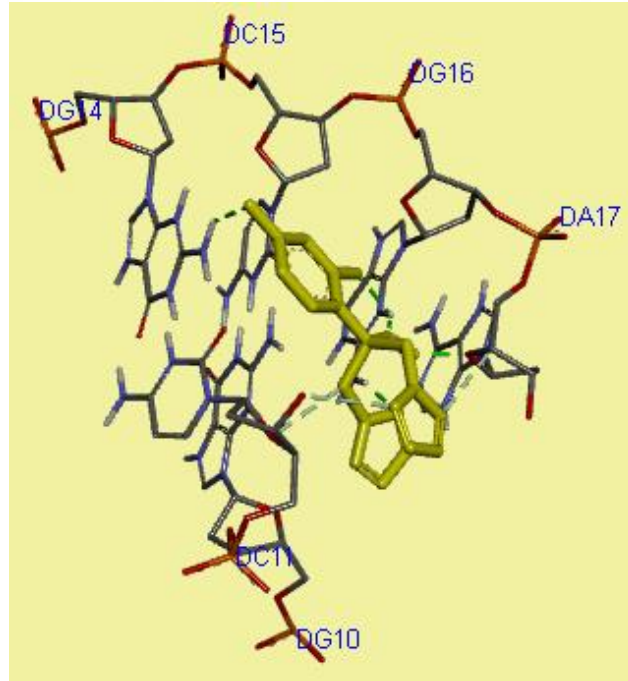
3.6. FLUKONAZOL'UN DNA'YA BAĞLANMASININ İN-SİLİKO ANALİZ İLE İNCELENMESİ

En düşük bağlanma enerjisine sahip docking konformasyonundan biri alınmıştır. Çünkü enerjisi düşük olan daha kuvvetli bağlanmaktadır.

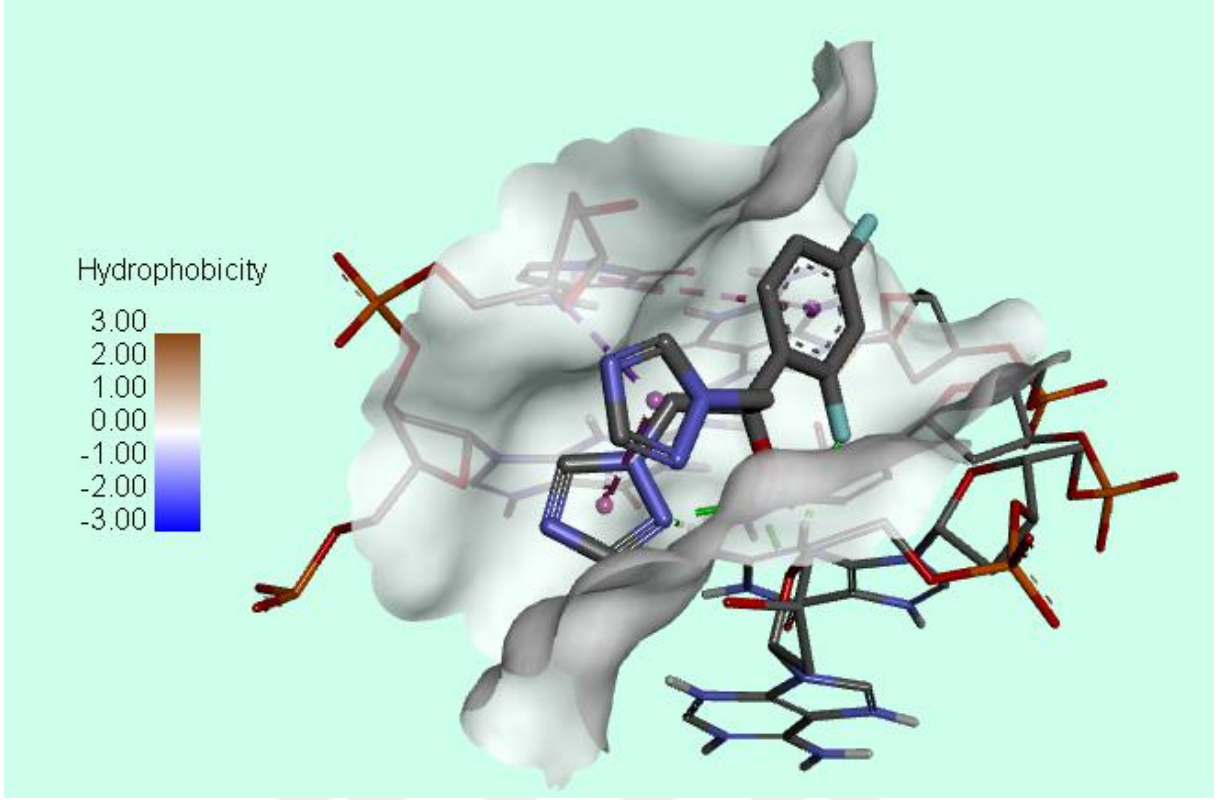
İnsiliko analiz programı sonucunda; bağlanma enerjisinin -6 ve elektrostatik enerjisinin -3,09'dir. Şekil 3.30'daki gibi DG10, DC11, DA17, DG16, DC15 ve DG14 nükleotitleri ile bağ yaptı. Şekil 3.31.'de yapılan hidrofobik etkileşimler gösterilmiştir. Şekil 3.29.'da gösterildiği gibi 3 tane hidrojen bağı kurulmuştur. Minör oluklarla mesafenin uygun olmasından dolayı flukonazol bu kısma tamı tamına oturarak hidrojen bağı kurulmasına izin verir. Analiz sonucunda cIRMS (hata payı)'nin 0.0 olduğu görülmüştür.



Şekil 3.29 Flukonazol'un DNA'ya bağlanmasının in siliko analiz ile incelenmesi.



Şekil 3.30 Flukonazol ve DNA arasında kurulan hidrojen bağlarının in siliko analiz programında gösterimi.



Şekil 3.31 Flukonazol ve DNA arasındaki hidrofobik etkileşimlerin in siliko modellenmesi.

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

DNA, hücresel fonksiyon için gerekli olan tüm genetik bilgiyi içeren ve yaşam sürecinde önemli bir rol oynayan genetik materyaldir (Aslanoğlu ve Öge 2005). Bu genetik materyalin moleküler bütünlüğünde endojen veya ekzojen kaynaklı faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılır. Tüm insan hücresindeki DNA, günde yaklaşık 10.000 kez hasara maruz kalır (Fidan 2005) ve bu hasar mutasyon, kanser, yaşlanma ve hücre ölümü ile sonuçlanan durumlara sebep olur (Atmaca ve Aksoy 2009). Küçük moleküllerin DNA ile bağlanma etkileşimi hem terapötik hem de bilimsel nedenlerden dolayı ilgi çekicidir. Bu etkileşimler ayrıca DNA'nın yeni yapılarını ve DNA sarmalındaki dizilime özgü farklılıkları tespit etmek için de kullanılabilir. DNA bağlanma etkileşimlerini incelemeye, elektroforez ve UV absorpsiyon yöntemleri genel kullanılan yöntemler arasındadır (Aslanoğlu ve Öge 2005). Süpersarmal plazmid DNA'nın belirlenen kimyasal madde ile inkübasyonu ardından yapılan agaroz jel elektroforezi, kimyasalların neden olduğu DNA hasarını plazmid yapı üzerinde belirlemek için kullanılan ucuz ve hızlı yöntemlerden biridir (Schmidt vd. 1999). DNA negatif yüklüdür ve elektrik alanına yerleştiğinde anoda doğru hareket eder. DNA'nın göçüne; elektrik alanının gücü, tampon ve agaroz jelinin yoğunluğu ile DNA'nın büyüklüğü etki eder (Barut 2016). Bir plazmid DNA örneği bu yöntemle analiz edildiğinde, farklı plazmid formlarına ait farklı bantlar gözlenebilir (Schmidt vd. 1999). Jelde gözlenen farklı bant yapıları; süpersarmal (süpercoil), sirküler (relax) ve doğrusal (linear) DNA formlarına aittir. pUC-19 plazmid DNA'sının doğal yapısı süpersarmaldır. Sirküler form, iki sarmalın herhangi birindeki herhangi bir kırılma sonucu gözlenirken; doğrusal form, her iki sarmalda aynı pozisyonda meydana gelen kırılma sonucu iki ucu açık bir yapı gözlenir (Moreno vd. 2007). Küçük moleküllerin plazmid DNA ile etkileşimi süpersarmal formdaki DNA'yı gevşetebilir veya kırabilir bu durum hareket hızını azaltmaya sebep olur (Barut 2016). Böylece doğrusal formun agaroz jelde göçü süpersarmal formdan daha yavaş iken sirküler formdan daha hızlı gerçekleşir (Moreno vd. 2007). Bu çalışmada, Flu'nun oral veya intravenöz uygulanması sonucunda insan serum seviyesindeki konsantrasyonları dikkate alınarak molariteleri hesaplanmıştır. Çalışmamızda,

süpersarmal pUC19 plazmid DNA Flu'nun farklı konsantrasyonları ile muamele edildiğinde hiçbir değişiklik gözlenmedi ve süpersarmal DNA üzerinde herhangi bir kırılma etkisi olmamıştır. Çalışmamıza göre Flu, süpersarmal DNA'yı insan plazmasında bulunma seviyesinden birkaç kat daha yüksek konsantrasyonlarda bile (8800-880-88-44 ve 22 µM) kırmadığı gözlenmiştir. Aksine, Flu ilacının hepatosit hücrelerinin üzerinde doza ve zamana bağlı toksik etkisinin olduğu gösteren birkaç çalışma rapor edilmiştir (Somchit vd. 2002). Fucic vd. (2008) tarafından yayınlanan çalışmada, transplasental olarak 12 mg / kg'lık bir doza maruz kalan genç ve yenidoğan hayvanlarda mikronükleus (MN) sıklığında anlamlı bir artış gösterilmiştir. Ek olarak, Yüzbaşıoğlu vd. (2008) tarafından yayınlanan çalışmada, insan lenfositlerinde kromozom aberasyonunda, kardeş kromatid değişiminde ve MN testleri sonucunda Flu'nun klastojenik ve aneugenik etkiler yaptığı gösterilmiştir. Bu araştırmanın sonucu önceki rapor edilen çalışmalarla örtüşmediğinden, bize göre Flu'un metabolitlerinin, DNA ve mikrotübül proteinlerinin üzerine etkisiyle ilgili olduğunu düşünmekteyiz. Bu yüzden daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bazı ilaçlar, belirli koşullar altında ve metal iyonlarının varlığında DNA hasarına yol açabilir (Roriz ve Moya 2017). Kimyasal karsinogeneziste, metallerin aracılık ettiği oksidatif DNA hasarı önemli rol oynar (Mercan 2004). Kararsız yapıdaki hidroksil radikalleri, kararlı hale gelebilmek için DNA'ya saldırır (Sezer ve Keskin 2014). DNA'da bu radikaller sonucu meydana gelen değişiklikler kanser gibi ciddi hastalıkların gelişiminde büyük rol oynar (Çiftçi 2017). Bu çalışmada bakır ve demirin insan fizyolojik plazma konsantrasyonları dikkate alınarak molarite hesapları yapılmıştır. Flu'un plazmid DNA'ya karşı davranışı Cu-Asc varlığında herhangi bir etki oluşturmazken, H₂O₂-Fe arasındaki etkileşimden kaynaklanan OH• radikallerinin oluşmasını engelleyerek koruma sağlamıştır. Bleomisin (Kobayashi vd. 1998), N-asetilsistein (Oikawa vd. 1999) ve prokarbazin (Ogawa vd. 2003) gibi ilaçların DNA'yı demir veya bakır varlığında kırdığını gösteren birkaç çalışma rapor edilmiştir. Bu gibi DNA'ya hasar veren ilaçların aksine, Flu yüksek konsantrasyonlarda bile, demir ya da bakır tetikleyerek süpersarmal plazmid DNA'da herhangi bir kırılmaya neden olmamıştır. Ek olarak, Flu fenton reaksiyonları sonucu oluşan son derece kararsız ve zararlı hidroksil radikallerinin DNA'da kırık oluşturmalarına karşı koruyucu etki göstermiştir.

DNA-ilaç etkileşimi sonucu ilacın veya DNA moleküllerinin absorpsiyon özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri tespit etmek için UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi en yaygın ve en uygun yoldur (Aleksić ve Kapetanović 2014). DNA'nın UV-Vis absorpsiyon spektrumu, UV bölgesinde geniş bir bant aralığına (200-350 nm) sahip olup 260 nm'de maksimum pik vermektedir. Bu da pürin ve pirimidin gruplarındaki kromoforik grupların bir sonucudur

(Aleksić ve Kapetanović 2014). DNA'nın absorpsiyon özellikleri; teşhiste, miktar tayininde ve saflığının değerlendirilmesinde kullanılabilir. 260 nm'deki absorbans, izole edilmiş nükleotitler için en büyük, tek iplikli DNA için orta, çift iplikli DNA için ise en küçüktür (Barut 2016). Genel olarak, küçük bir molekül DNA ile etkileşime girdiğinde ve yeni bir yapı oluşturduğunda, absorbansta ve bandın pozisyonunda değişiklikler meydana gelmelidir. Bu değişiklik, hiperkromizm ve hipokromizm olarak tanımlanan DNA'nın çift sarmal yapısına ilişkin spektral özellikleridir (Shahabadi ve Hadidi 2012). İlaç interkalasyon yoluyla etkileşiyorsa, ilaca ait aromatik kromofor gruplar ile DNA'ya ait baz grupları arasındaki bağlanma nedeniyle, ilacın spektrumunda hipokromik (absorbans değerinde azalma) ve batokromik (kırmızıya kayma) etki gözlenir (Kapçak 2017). Hiperkromik etki, denatürasyon sonrası DNA'nın absorbansının artmasına neden olur. DNA çift sarmalının denatüre edici ajanlarla işlenmesi durumunda, çift sarmal yapıyı birarada tutan etkileşim kuvvetinin bozulması sonucu rasgele iki tek iplikçik halinde ayrılır. Bu durumda bazlar serbest hale geçtiğinden aralarındaki etkileşim azalır ve UV absorbansı artar. Sonuç olarak, tek sarmallı DNA (ss-DNA) için absorbans, aynı konsantrasyonda çift sarmallı DNA (ds-DNA) için olandan % 40 daha yüksek olacaktır (Aleksić ve Kapetanović 2014). Flu'un UV-Vis spektrofotometresinde DNA ile etkileşimine bakıldığında $R^2 = 0,9053$ ve $K_b=179,05$ 1/M olarak bulunmuştur. Bağlanma sabiti tipik klasik interkalatörler için gözlemlenenenden düşüktür. Örneğin; Etidyum bromür-DNA kompleksi için $K_b 7 \times 10^7$ M⁻¹e eşittir. Hesaplanan bu değer Flu-DNA etkileşiminin zayıf bir bağlanma olduğunu göstermektedir. İnterkalasyon etkileşimleri için gereken K_b değeri olan 10^6 'dan daha düşük bağlanma sabiti göstermesi bileşiklerin oluğa bağlanma yolu ile etkileşim yaptığı anlamına gelmektedir (Barut 2016). Sonuç olarak Flu-DNA etkileşimi sonucu absorbansdaki artışın (hiperkromik etkinin) görülmesi, ilacın DNA ile oluk bağlayıcı olarak bir etkileşim yaptığını göstermektedir. Diğer etkileşimlerden zayıf olmasına rağmen ilaçların biyolojik aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır (Valipour vd. baskı). Serum albümini, ilaç ligandlarını ve metabolitlerini bağlamada yüksek bir afiniteye sahiptir. Ligandlar albümine zayıf veya güçlü olmak üzere iki şekilde bağlanmaktadır. Zayıf bağlanmış ligandlar zayıf dağılım ve hızlı eliminasyona sahipken, güçlü bağlı ligandlar ise plazmadaki serbest ligand miktarını azaltır (Wani vd. 2017). Flu'un UV-Vis spektrofotometrede BSA'ya bağlanma aktivitesinin analizinde, ilaç absorbans değerinde herhangi bir değişim oluşturmamıştır. Dolayısıyla K_b değeri hesaplanamamıştır. Sonuç olarak, absorbansta değişim olmaması Flu ile BSA arasında bir etkileşim olmadığını göstermektedir.

İN siliko modelleme çalışmaları, moleküler biyoloji ve ilaç keşiflerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu yüksek oranda otomatikleştirilmiş docking bilgisayar programlarının kullanılması, kompleksin oluşumu hakkında bilgi vermekten başka, bağlanma tarzının tahmin edilmesine de yardımcı olur. Küçük moleküller ve DNA arasındaki bağlanma afinitesi, moleküler docking çalışmaları sayesinde kolayca elde edilebilir (Shahabadi vd. 2016). Spektrofotometrede, Flu-DNA etkileşimi sonucu hiperkromik etkinin görülmesi bileşiğin DNA'nın yüzeyine oluk bağlayıcı olarak tutunduğunu düşündürmüştür. İN siliko analiz programı sayesinde, ilacın -3.09 bağlanma enerjisi ile 3 hidrojen bağı ve hidrofobik bağlar sayesinde süpersarmal DNA'nın minör oluşuna tutunduğunu göstererek UV Titrasyon yönteminin sonucunu doğruladı.

İnsan bağırsak mikrobiyotası hayati öneme sahip bir sürü fizyolojik sürecini etkilediğinden mikrobiyal kompozisyondaki herhangi bir değişikliğin (disbiyozis) insan sağlığı üzerinde doğrudan etkisi vardır (Barko vd. 2018). Antibakteriyel efekt çalışmamızda, Flu'un maksimum oral doz alımı sonrası ince bağırsaktaki hacmi (105 ± 72 mL ve 54 ± 41 mL) dikkate alınarak ilaç derişim hesabı yapılmıştır (Schiller vd. 2005). Flu hastalara oral yoldan (50, 100, 200 ve 400 mg) verildiğinde, gastrointestinal sistemdeki mikroorganizma popülasyonu ile uzun süre doğrudan temas edebileceği düşünülür. Flu'un maksimum konsantrasyonu (24mM) ile muamele edilen *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis* flora bakterilerinin üreme yoğunluğunda sırasıyla %35, %20, %20 ve %22 azalma gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyonlara doğru gidildikçe bakterinin üremesi üzerindeki inhibitör etki daha az görülmektedir. Balıklar üzerinde yapılan bir çalışmada, *E.faecalis* ile desteklenmiş diyetin kontrol beslemesine kıyasla proteaz ve lipaz aktivitelerini anlamlı derecede arttırdığını ortaya koymuştur. Dahası, *E. faecalis* takviyesi bağırsakta propiyonik ve butirik asit üretimini önemli ölçüde arttırırken, asetik asit üretiminde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Allameh vd. 2017). Flu ile muamele edilen *E.faecalis* kültür yoğunluklarında azalma gözlendiğinden, Flu'un proteaz ve lipaz gibi kesici enzimleri artırıcı etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Ülseratif kolit'li hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, bağırsak mikrofloralarında azalmış miktarda *E.coli* bakterisi görülmüş ve bu da ülseratif kolit'li hastalarda eklem tutulumuna yol açtığı ile ilişkilendirilmiştir (Koca 2015). Flu ile muamele edilen *E.coli* kültür yoğunluklarında azalma gözlendiğinden, Flu kullanan ülseratif kolit'li hastaların bu olumsuz etkiyi göz önünde bulundurmaları gerekir. İnsanlarda *E.cloacae* insidansındaki artış obezite ile ilişkilendirilmiştir (Fei ve Zhao 2013, Keskitalo vd. 2018). İN vitro çalışmalar flagellin tarafından indüklenen adipositlerde, adipositlerden artan lipoliz ve

gliserol sekresyonuna bağlı trigliserit sentezini artırarak hepatik yağ birikimini arttırabileceğini gösterdi (Munukka vd. 2016). Flu ile muamele edilen *E.cloacae* kültür yoğunluklarında azalma gözlendiğinden, Flu'un obezite teşvik edici etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Flu'un maksimum derişimi ile muamele edilen *Proteus mirabilis* flora bakterisinin kültür yoğunluğunda meydana gelen azalmanın bağırsak florasında çeşitli hastalıklara sebebiyet vereceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, bu konu hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.





BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Flukonazol, klinikte sık kullanılan triazolendendir. Oral yolla ya da intravenöz infüzyon yoluyla uygulanan Flu, bağışıklık yetmezliği olan hastaların neredeyse tümünde bütün kandida enfeksiyonları için birincil tedavi seçeneğidir (Yurtdaş 2010). Çalışmamıza göre Flu tek başına ve indirgeyici bir ajan olan Asc varlığında herhangi bir etki oluşturmazken, oksidatif bir ajan olan H₂O₂ varlığında OH radikallerine karşı koruyucu etki göstermiştir. DNA'ya hasar veren ilaçların aksine, Flu yüksek konsantrasyonlarda bile, demir ya da bakırı tetikleyerek süpersarmal plazmid DNA üzerinde herhangi bir kırılmaya neden olmamıştır. Hatta fenton reaksiyonları sonucu oluşan hidroksil radikallerinin DNA'da kırık oluşturmaya karşı koruyucu etki göstermiştir. Spektrofotometrede, Flu-DNA etkileşimi sonucu hiperkromik etkinin görülmesi ilacın DNA'nın yüzeyine oluk bağlayıcı olarak tutunduğunu düşündürmüştür. İn siliko analiz programı sayesinde, Flu-DNA arasında kurulan hidrojen bağları, DG10, DC11, DA17, DG16, DC15 ve DG14 nükleotitler ile bağ kurması ve hidrofobik etkileşimler gösterilerek spektrofotometrede çıkan sonuçların doğruluğu kontrol edilmiş oldu. Spektrofotometrede, Flu ile BSA arasında bir etkileşim olmadığını gözlemlenmiştir. Flu'un maksimum konsantrasyonu (24mM) ile muamele edilen *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis* flora bakterilerinin üreme yoğunluğunda sırasıyla %35, %20, %20 ve %22 azalma gözlenmiştir. İn vitro çalışmamızda ilacın DNA'yı kırmamasına rağmen daha önce rapor edilen in vivo deneylerde kromozom kırılmasının ilacın metabolitlerinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Dolayısıyla bu ilacın metabolitleri ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma; yeni geliştirilen birçok ilacın, DNA ile etkileşimlerinin aydınlatılması sürecine öncülük etmeyi sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Acarkan T, Nazlıkul H and Bayram E R** (2014) Bağırsaklarda *Candida Albicans*. *Bilimsel Tamamlayıcı Tıp, Regülasyon ve Nöral Terapi Dergisi*, 8(1): 20-25.
- Aguş N, Sarıca A, Özkalay N and Cengiz A** (2006) Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antibiyotik Direnci. *Ankem Dergisi*, 20(3): 145-147.
- Ağırbaş Ö, Kışalı N F and Kıyıcı F** (2015) Yoğun Egzersizle Oluşan Oksidatif Stres Ve DNA Hasarı Üzerine Askorbik Asidin Etkisi. *SPORMETRE Beden Eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi*, 13(1): 65-72.
- Aksoy D** (2009) Patlıcan (*Solanum Melongena*) Tohumlarında Bakır (Cu) Stresi ile Oluşan DNA Değişikliklerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 44.
- Al-Dulaimi D A A** (2015) *Escherichia Coli* Klinik İzolatlarında Plazmid Aracılı Florokinolon Direnci. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya, 83.
- Al Dgither S, Yusuf A and Hammami M M** (2009) Fluconazole: stability and analysis in human plasma by simple high performance liquid chromatography. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(4): 179.
- Aleksić M M and Kapetanović V** (2014) An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA–drug interactions. *Acta Chimica Slovenica*, 61(3): 555-573.
- Allameh S, Ringø E, Yusoff F, Daud H and Ideris A** (2017) Dietary supplement of *Enterococcus faecalis* on digestive enzyme activities, short-chain fatty acid production, immune system response and disease resistance of Javanese carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850). *Aquaculture nutrition*, 23(2): 331-338.
- Altuntaş İ** (2007) Otoimmün Tiroid Hastalığının Tanı Ve Takibinde Oksidatif DNA Hasar Belirleyicisi 8-OHdg'nin Önemi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 82.
- Aslanoğlu M and Öge N** (2005) Voltammetric, UV absorption and viscometric studies of the interaction of norepinephrine with DNA. *Turkish Journal of Chemistry*, 29(5): 477-485.
- Atmaca E ve Aksoy A** (2009) Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2): 79-83.
- Auti D, Jadhav L and Gadhav V** (2015) Dissolution Method Development of Fluconazole in Fluconazole Tablets Dossage Form. *PharmaTutor*, 3(5): 29-35.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Baltacı N G** (2018) Tip60 Geninin Demir Metabolizmasının Düzenlenmesindeki Rolünün Fare Karaciğer Dokusunda Araştırılması. *Doktora Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Erzurum, 130.
- Barko P, McMichael M, Swanson K and Williams D** (2018) The gastrointestinal microbiome: a review. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(1): 9-25.
- Barut B** (2016) Suda Çözünür Ti (Iv) Ftalosiyanın Bileşiklerinin DNA Bağlanma, DNA Kesim, Antioksidan, Antimikrobiyal Aktivitelerinin ve Topoizomeraz I İnhibisyonunun İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon,73.
- Başol G, Barutçuoğlu B ve Bozdemir A E** (2007) Demir homeostazının yeni düzenleyicisi Hepsidin. *Türk klinik biyokimya dergisi*, 5(3): 117-125.
- Bilgin K** (2005) Çeşitli Candida Türlerinin Amfoterisin B, Flukonazol Ve Vorikonazole Duyarlılıklarının Resazurin Mikroplak Yöntemiyle İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun,63.
- Bostancı E** (2016) İlaç DNA Etkileşiminin Elektrokimyasal Sensörler İle İncelenmesi ve Geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Sivas, 88.
- Bozok T, Şimşek T, Kömür S ve Ulu A** (2014) Normal mikrobiyal floranın insan sağlığı üzerine etkisi ve insan mikrobiyom projesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23(3): 420-426.
- Bulanık D** (2015) İnfeksiyon Etkeni ve Flora Üyesi Enterokok Kökenlerinde Biyofilm Üretimi İle İlgili Virülans Faktörlerinin Karşılaştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji (Tıp) Anabilim Dalı, Hatay, 65.
- Burçak G ve Andican G** (2004) Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35(4): 159-169.
- Büyükuslu N ve Yiğitbaşı T** (2015) Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*,5(3):197-203.
- Cervantes-Cervantes M P, Calderón-Salinas J V, Albores A and Muñoz-Sánchez J L** (2005) Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. *Biological trace element research*, 103(3): 229-248.
- Charoo N, Cristofolletti R, Graham A, Lartey P, Abrahamsson B and Groot D** (2014) Biowaiver monograph for immediate-release solid oral dosage forms: fluconazole. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(12): 3843-3858.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Corrêa J C R, Duarte Vianna-Soares C and Salgado H R N** (2012) Development and validation of dissolution test for fluconazole capsules by HPLC and derivative UV spectrophotometry. *Chromatography Research International*, 2012.
- Coşkun T** (2006) Pro-, pre-ve sinbiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 49(2): 128-148.
- Cross J, Currier R, Torraco D, Vanderberg L, Wagner G and Gladen P** (2003) Killing of Bacillus spores by aqueous dissolved oxygen, ascorbic acid, and copper ions. *Appl Environ Microbiol*, 69(4): 2245-2252.
- Çakmak H** (2013) Fiziksel ve Kimyasal Çapraz Bağlı DNA Hidrojellerinin Sentezi ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, 45.
- Çetinbaş S, Kemeriz F, Göker G, Biçer İ ve Veliöğlu Y S** (2017) İnsan Mikrobiyomu: Beslenme ve Sağlık Üzerindeki Etkileri. *Akademik Gıda*, 15(4): 409-415.
- Çiftçi N** (2017) Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü: Antioksidanlar Kansere Progresyonunun Yakıtı Olabilir Mi? *Ahi Evran Tıp Dergisi*, 1(1): 8-13.
- Dağ İ** (2007) Kaspofunginin Candida Glabrata'nın Klinik İzolatlarına Karşı Vorikonazol, Flukonazol, İtrakonazol ve Amfoterisin B İle Kombinasyonlarının Time-kill Metodu, E-test Metodu (iki farklı yöntemle) ve Disk Difüzyon Yöntemleriyle İn Vitro Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Doktora Tezi*, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, 89.
- Davis J D and Lin S-Y** (2011) DNA damage and breast cancer. *World journal of clinical oncology*, 2(9): 329.
- de Oliveira V P C, de Sousa G R, de Araujo M P T, Carneiro L C, de Andrade D M L, Porto H K P** (2017) Evaluation of the Mutagenic Potential of Glucocorticoids by Allium cepa. *Mutagenesis*, 7(1): 1-7.
- Debruyne D** (1997) Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses. *Clinical pharmacokinetics*, 33(1): 52-77.
- Dikilitaş M ve Koçyiğit A** (2010) Canlılarda "tek hücre jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 14(2): 77-89.
- Dişcioğlu G** (2014) Bazı Enterococcus Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 103.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Duman Y, Güçlüer N, Serindağ A ve Tekerekoğlu M S** (2010) *Escherichia coli* Suşlarında Antimikrobiyal duyarlılık ve genişlemiş spektrumlu-βeta laktamaz (gsbl) varlığı. *Fırat Tıp Dergisi*, 15(4): 197-200.
- Durmaz B** (1991) Antifungal Tedavide Yeni Triazollerin Önemi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 25(1): 118-123.
- Dursun Ö** (2009) An Application Of Information Theory For DNA Structure. *Master Thesis*, Dokuz Eylül Üniversitesi Graduate School, Natural And Applied Sciences, İzmir, 49.
- Dündar Y** (2000) *Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar*. 29, 9789757150299, Uyum Ajans, Afyon("e-book"),107.
- Fei N and Zhao L** (2013) An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME journal*, 7(4): 880.
- Fidan A F** (2005) DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1): 41-52.
- Fucic A, Markovic D, Herceg Z, Gamulin M, Katic J and Stojkovic R** (2008) Developmental and transplacental genotoxicology: fluconazole. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 657(1): 43-47.
- Gökhan H B** (2007) Balıklarda Serbest Radikaller Ve Antioksidan Savunma Sistemi. *Doktora Semineri*, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Elazığ, 54.
- Gülat S** (2013) Flukonazol Dirençli *Candida Albicans* Suşlarında Atım Pompalarını Kodlayan Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi İle Araştırılması. *Doktora Tezi*, Dokuz Eylül Üniversitesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, 97.
- Gürgöze S Y, Şahin T ve Durak M H** (2007) Memelilerde ortalama yaşam süresi ve yaşlanma sürecinde serbest radikallerin rolü. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(1): 43-49.
- Gürsoy O, Kınık Ö ve Gönen İ** (2005) Probiyotikler ve gastrointestinal sağlığa etkileri. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 35:136-148.
- Gürtekin E ve Şekerdağ N** (2008) Bir ileri oksidasyon prosesi: Fenton Prosesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 14(3): 229-236.
- Herkmen T B** (2015) Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen Enterococcus Faecium Suşlarında Gele, Esp Ve Efaafm Genlerinin Varlığının İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın,52.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Imer F, Kozcaz M and Sönmezoğlu İ** (2009) The Effect of Temperature and pH on The Kinetics of L-ascorbic Acid Oxidation Catalyzed by Copper (II). *Sigma*, 27255-263.
- İnci D** (2018) Bakır(II) ve Palladyum(II) İyonlarının Fenantrolin Türevleri ve Amino Asitler İle Oluşturduğu Komplekslerin Sentezi, Karakterizasyonu, DNA/Protein Etkileşimlerinin Ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması. *Doktora Tezi*, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Bursa, 334.
- İnmez D E** (2007) İnvaziv İnfeksiyonlardan İzole Edilen Kandida Türlerinin Flukonazol, Vorikonazol, Amfoterisin B Duyarlılıklarının Mikrodilüsyon ve Time Kill Yöntemi (Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği) İle Araştırılması. *Uzmanlık Tezi*, Celal Bayar Üniversitesi, Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, 75.
- Irmak O** (2010) Flukonazol dirençli *Candida albicans* suşlarında atılım pompalarını kodlayan CDR1, CDR2 ve MDR1 genlerinin ve 14 alfa lanosterol demetilazı kodlayan ERG11 gen ekspresyon düzeylerinin semi-kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi ile araştırılması. *Uzmanlık Tezi*, Dokuz Eylül Üniversitesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, 62.
- Kami M, Sawada Y, Mori S i, Hirate J, Kojima N and Kanda Y** (2001) Serum levels of fluconazole in patients after cytotoxic chemotherapy for hematological malignancy. *American journal of hematology*, 66(2): 85-91.
- Kanakis C, Nafisi S, Rajabi M, Shadaloi A, Tarantilis P and Polissiou M** (2009) Structural analysis of DNA and RNA interactions with antioxidant flavonoids. *Journal of Spectroscopy*, 23(1): 29-43.
- Kapçak E** (2017) Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Yöntemi ile Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçların Miktar Tayini ve İlaç-Dna Etkileşimlerinin Belirlenmesi. *Doktora Tezi*, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 111.
- Karabulut H ve Gülay M Ş** (2016) Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1): 65-76.
- Karasakal A** (2007) Kuşburnu bitkisinde spektrofotometrik yöntemle askorbik asit tayini. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, 67.
- Kartal G, Güven A, Kahvecioğlu Ö, Timur S ve Metalurji İ** (2004) Metallerin çevresel etkileri-II. *Metalurji Dergisi*, 13746-51.
- Kateeb A A** (2015) Gıda Boyalarının Bağırsak Florası Üzerine Etkileri ve LacZ Gen Ekspresyonunun Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, 64.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kavuşak R G** (2019) Elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazinin kan kültürlerinden izole edilen kandida türleri üzerindeki in vitro etkisinin flukonazol ile karşılaştırılması. *Uzmanlık Tezi*, İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul,56.
- Kaya E, Yılmaz S, Çeribaşı AO and Telo S** (2019) Protective Effect of Lycopene on Diethylnitrosamine-İnduced Oxidative Stress and Catalase expression in rats. *Ankara Üniv Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 66: 43-52.
- Keleşoğlu İ** (2010) Proteus Vulgaris Ox19 Suşunun Tavşan Dalak Hücrelerine Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 38.
- Keskitalo A, Munukka E, Toivonen R, Hollmén M, Kainulainen H and Huovinen P** (2018) *Enterobacter cloacae* administration induces hepatic damage and subcutaneous fat accumulation in high-fat diet fed mice. *PLoS one*, 13(5): e0198262.
- Kobayashi T, Guo L L and Nishida Y** (1998) Mechanism of double-strand DNA cleavage effected by iron-bleomycin. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 53(9-10): 867-870.
- Koca T** (2015) Bağırsak mikroflorasının inflamatuvar hastalık patogenezindeki yeri. *Arşiv kaynak tarama dergisi*, 24(1): 78-91.
- Köksal İ ve Aksoy F** (2008) Azoller. *Flora*, (18.07.2008): 13(3):111-121.
- Kutlu S S** (2017) Azol Grubu Antifungaller. Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- Kuybu A** (2018) Disiyandiamid Temelli Cu(II) Komplekslerinin Sentezi, Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri Ve Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, 98.
- Letelier M E, Sánchez-Jofré S, Peredo-Silva L, Cortés-Troncoso J and Aracena-Parks P** (2010) Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chemico-biological interactions*, 188(1): 220-227.
- Li Z, Yang X, Dong S and Li X** (2012) DNA breakage induced by piceatannol and copper (II): mechanism and anticancer properties. *Oncology letters*, 3(5): 1087-1094.
- Mercan U** (2004) Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1): 91-96.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Moreno R G, Alipázaga M V, Gomes O F, Linares E, Medeiros M H and Coichev N** (2007) DNA damage and 2'-deoxyguanosine oxidation induced by S (IV) autoxidation catalyzed by copper (II) tetraglycine complexes: synergistic effect of a second metal ion. *Journal of inorganic biochemistry*, 101(5): 866-875.
- Munukka E, Wiklund P, Partanen T, Välimäki S, Laakkonen E K, Lehti M** (2016) Adipocytes as a link between gut microbiota-derived flagellin and hepatocyte fat accumulation. *PloS one*, 11(4): e0152786.
- Nishijima K** (1999) *Enterobacter cloacae*. *Crop Knowledge Master*(http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/Type/e_cloac.htm).
- Ogawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Sugimura Y, Kawamura J** (2003) Molecular mechanisms of DNA damage induced by procarbazine in the presence of Cu (II). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 539(1-2): 145-155.
- Oikawa S, Yamada K, Yamashita N, Tada-Oikawa S and Kawanishi S** (1999) N-acetylcysteine, a cancer chemopreventive agent, causes oxidative damage to cellular and isolated DNA. *Carcinogenesis*, 20(8): 1485-1490.
- Omerovic M, Müştak H K and Kaya İ B** (2018) *Escherichia coli* Patotiplerinin Virülens Faktörleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1): 1-6.
- Öncel S ve Keçeli S A** (2018) Flukonazol. *Selçuk Üniversitesi Dergileri Mantar Dergisi*, 9(1):67-75.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G and Yönden Z** (2015) Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3).
- Reddy C B** (2012) Spectrophotometric estimation of Fluconazole in pure drug and pharmaceutical formulation. *Int. J. Sci & Eng Research*, 31-7.
- Roriz B C and Moya H D** (2017) Study of DNA damage caused by dipyrone in presence of some transition metal ions. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(7): 961-966.
- Saka S** (2017) Gasrointestinal İnflamatuar Barsak Hastalığı Nedeniyle Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu (FMT) Yapılması Planlanan Hastaların Nakil Öncesi ve Nakil Sonrası Psikolojik Durumlarının İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Üsküdar Üniversitesi, Klinik Psikoloji Anabilim Dalı, İstanbul,92.
- Salerno C, Carlucci A M and Bregni C** (2010) Study of in vitro drug release and percutaneous absorption of fluconazole from topical dosage forms. *Aaps Pharmscitech*, 11(2): 986-993.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Schierack P, Walk N, Reiter K, Weyrauch K D and Wieler L H** (2007) Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology*, 153(11): 3830-3837.
- Schiller C, Fröhlich C P, Giessmann T, Siegmund W, Mönnikes H and Hosten N** (2005) Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22(10): 971-979.
- Schmidt T, Friehs K, Schleef M, Voss C and Flaschel E** (1999) Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 274(2): 235-240.
- Seyedmousavı S, İlkit M, Durdu M, Ergin Ç, Polat S H and Melchers W** (2015) Candida ve Kandidoz: Epidemiyoloji, Tanı, Tedavi, Antifungal İlaç Direnci ve Konağın Genetik Yatkinlığında Güncel Durum. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45(1):1-11.
- Sezer K ve Keskin M** (2014) Serbest Oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *FÜ Sağ Bil Vet Dergisi*, 28(1): 49-56.
- Shahabadi N, Akbari A, Jamshidbeigi M and Khodarahmi R** (2016) Synthesis, Characterization, Molecular Modeling, and DNA Interaction Studies of Copper Complex Containing Food Additive Carmoisine Dye. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 35(6): 315-333.
- Shahabadi N and Hadidi S** (2012) Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 96278-283.
- Sharpe C, Collet J, Belzile E, Hanley J and Boivin J** (2002) The effects of tricyclic antidepressants on breast cancer risk. *British journal of cancer*, 86(1): 92.
- 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*, 1241-19.
- Somchit N, Hassim S and Samsudin S** (2002) Itraconazole and fluconazole-induced toxicity in rat hepatocytes: a comparative in vitro study. *Human & experimental toxicology*, 21(1): 43-48.
- Söylemez Y** (2018) Folik Asit Düzeyi Bağırsak Flora Bozukluğunun Bir Göstergesi Olabilir mi?. *Tıpta Uzmanlık Tezi*, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kanuni Sultan Süleyman Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul,53.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Sullivan Å, Edlund C and Nord C E** (2001) Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet infectious diseases*, 1(2): 101-114.
- Süzük S** (2015) *Helicobacter pylori* Tedavisinin Mikrobiyota Üzerine Etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 128.
- Şenel F** (2011) Kromozomlar. *Bilim ve Teknik*, 1-2.
- Şeyhanlı D M** (2008) Yeni Tanı Primer Hipertansif Hastalarda Oksidatif DNA Hasarı Göstergesi Olan 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-Ohdg) Düzeyleri Ve Angiotensin II (At1) Reseptor Antagonisti Olmesartan Tedavisinin 8-Ohdg Üzerine Akut Etkisi. *Uzmanlık Tezi*, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin, 41.
- Taşdemir C** (2009) Toplum ve Hastane Kaynaklı İnfeksiyonlardan İzole Edilen Escherichia Coli Suşlarının Antimikrobiyal Direnç Fenotiplerinin Araştırılması. *Uzmanlık Tezi*, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, İstanbul, 62.
- Topal B D** (2011) Bazı Antiviral ve Antineoplastik İlaç Etken Maddelerinin DNA İle Etkileşimi ve Elektrokimyasal Analizleri. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 338.
- Toptancı B Ç, Kızıl G and Kızıl M** DNA Damage Mechanisms Of Anti-Cancer Drugs. *Middle East Journal of Science*, 2(1): 33-49.
- Tunç S** (2017) Dna Hasarı Tayini İçin Grafene Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörlerin Hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi*, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ordu, 59.
- Turgut N** (2015) Aydın İlinde Tüketime Sunulan Marullarda *E.coli* O157-H7 Varlığının Araştırılması. *Doktora Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, 53.
- Türkseven B** (2018) Okul Tuvaletlerindeki Enterik Bakteriyel Kontaminasyonun Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı, Aydın, 41.
- Ugar M** (2016) Glutatyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü İçin Yeni Bir Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi. *Yüksek lisans tezi*, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programı, İstanbul, 62.
- Ul-Haq I, Ullah N, Bibi G, Kanwal S, Ahmad M S and Mirza B** (2012) Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical analysis of Euphorbia wallichii root extract and its fractions. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 11(1): 241.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Uslu H, Şengül G and Aktaş O** (2011) Proteus Vulgaris' in Neden Olduğu Nadir Bir Kraniyal Osteomyelit Olgusu. *Balkan Medical Journal*, 2011(1): 113-115.
- Uysal Z** (1999) Hepsidin ve Demir Metabolizması. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 52(3): 157-164.
- Valipour R** (2019) Antidepresan Escitalopramin Moleküler Modellemesi, DNA Etkileşim Özellikleri, Sitotoksitesi ve Genotoksitesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana, 65.
- Valipour R, Yılmaz M B and Valipour E** (baskıda) Study of DNA-Binding Activity and Antibacterial Effect of Escitalopram Oxalate, an Extensively Prescribed Antidepressant. *Drug research*.
- Wani T A, AlRabiah H, Bakheit A H, Kalam M A and Zargar S** (2017) Study of binding interaction of rivaroxaban with bovine serum albumin using multi-spectroscopic and molecular docking approach. *Chemistry Central Journal*, 11(1): 134.
- Yamreudeewong W, Lopez-Anaya A and Rappaport H** (1993) Stability of fluconazole in an extemporaneously prepared oral liquid. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 50(11): 2366-2367.
- Yavaşca T A** (2009) Bakır(II)-Katalizli C Vitamini Oksidatif Bozunumunun Koruyucu Meyve Asitleri Varlığında Kinetik İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, 80.
- Yazgan A S** (2010) *Enterobacter Cloacae* ve *Enterobacter Aerogenes* Türlerinden Elde Edilen Lipopolisakkarit Yapısındaki Endotoksinlerin Bazı Hastane Enfeksiyonları Üzerine Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi*, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Gebze,94.
- Yazgı H** (2002) KIA ve Triptofanlı Buyyon Besiyerindeki Biyokimyasal Özelliklerine Göre Enterik Bakterilerin Tanımlanmasında Klasik Yöntemlerin Modifikasyonu. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi*, 32(3-4): 260-264.
- Yıldırım İ** (2015) Tip 1 Diabetes Mellituslu Çocuklarda DNA Hasarı ve Oksidatif Metabolizmanın Değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi*, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa,73.
- Yıldıoğan Beker B** (2011) Flavonoidler varlığında askorbik asidin bakır (II) katalizli oksidasyonu ve bakır (II)/askorbik asit nedenli lipit peroksidasyonunun incelenmesi. *Doktora Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul,165.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Yılmaz D** (2015) Bakır(II) İyonunun Karışık Ligant Komplekslerinin In Vitro Sitotoksik, Genotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin Sağlıklı ve Kanser Hücre Hatlarında Belirlenmesi. *Doktora Tezi*, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa, 240.
- Yokawa K, Kagenishi T and Kawano T** (2011) Prevention of oxidative DNA degradation by copper-binding peptides. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*,75(7):1377-9.
- Yokuş B ve Çakır D Ü** (2002) İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22(5): 535-543.
- Yurtdaş G** (2010) Flukonazol ve Ketokonazol'un B-Siklodekstrin Ile Hazırlanan Kompleksleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar. *Yüksek Lisans Tezi*, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, 117.
- Yüksel Altuntaş D ve Batman A** (2017) Mikrobiyota ve Metabolik Sendrom. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 45(3): 286-296.
- Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yılmaz S, Aksoy H and Celik M** (2008) Genotoxicity testing of fluconazole in vivo and in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 649(1-2): 155-160.
- URL-1** <<https://Scopeblog.Stanford.Edu/2011/06/12/Image-Of-The-Week-Another-Look-At-Ecoli/Original-Title-0504592b-Tif/>>, Ziyaret Tarihi: 15.01. 2019
- URL-2** <<https://Traffic-Club.Info/2018pimage-Proteus-Mirabilis-Gram-Stain.Awp>>, Ziyaret Tarihi: 12.01. 2019
- URL-3** <<https://www.Std-Gov.Org/Blog/Enterobacter-Cloacae/>>, Ziyaret Tarihi: 17.02. 2019
- URL-4** <https://commons.Wikimedia.Org/Wiki/File:Enterococcus_Faecalis_Sem_01.Png>, Ziyaret Tarihi: 7.03. 2019



ÖZGEÇMİŞ

10/10/1995 tarihinde Düzce’de doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Düzce’de tamamladım. 2013 yılında Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi tarafından düzenlenen üniversite giriş sınavı sonucunda Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nü kazandım. 2017 yılında 4 senelik üniversite öğrenimimi tamamlayıp Moleküler Biyolog ünvanı ile mezun oldum. 2017 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım ve halen bu eğitimimi sürdürmekteyim.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres : Gümüşpınar Köyü 9680.sokak No:3 Merkez / DÜZCE

Tel : (0546) 6053960

E-posta : sumeyye4870@gmail.com