

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALP İLACI OLAN VERAPAMİL'İN İNSAN FLORA BAKTERİLER ÜZERİNE
ETKİSİ, DNA İLE ETKİLEŞİMİNİN İN VİTRO VE İN SİLİKO ANALİZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLSÜM KÜBRA GÜMÜŞ

MAYIS 2019

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALP İLACI OLAN VERAPAMİL'İN İNSAN FLORA BAKTERİLER ÜZERİNE
ETKİSİ, DNA İLE ETKİLEŞİMİNİN İN VİTRO VE İN SİLİKO ANALİZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülsüm Kübra GÜMÜŞ

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Ebrahim VALİPOUR

ZONGULDAK

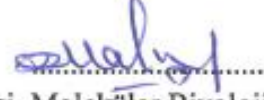
Mayıs 2019

KABUL:

Glsm Kübra GÜMÜŞ tarafından hazırlanan "Kalp İlacı Olan Verapamil'in İnsan Flora Bakteriler zerine Etkisi, DNA İle Etkileşiminin İn Vitro ve İn Siliko Analizi" baŐlıklı 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 VALİPOUR

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



ye: Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

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



ye: Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ

Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım./..../20...



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."

Gülsüm Kübra GÜMÜŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KALP İLACI OLAN VERAPAMIL'İN İNSAN FLORA BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİSİ, DNA İLE ETKİLEŞİMİNİN İN VİTRO VE İN SİLİKO ANALİZİ

Gülsüm Kübra GÜMÜŞ

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ebrahim VALİPOUR

Mayıs 2019, 55 sayfa

Sentetik bir papaverin türevi olan Verapamil, ülkemizdeki yüksek tansiyon ve kalp hastalıklarının tedavisinde milyonlarca hasta tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum kanal blokörü olan antihipertansif ilaçlar kimyasal olarak heterojenite gösterdiklerinden son yıllarda yan etkileri bakımından üzerinde en çok tartışılan ilaç grubu olmuştur. Verapamil-DNA etkileşimini analiz etmek için Verapamil ile süpersarmal plazmid DNA muamele edilmiş ve agaroz jel elektroforezinde analizi yapılmıştır. Bu deney askorbik asit, hidrojen peroksit, demir, demir artı hidrojen peroksit, bakır, bakır artı askorbik asit varlığında tekrarlandı. Verapamil-DNA etkileşimleri UV-Vis spektrofotometre yöntemi ve in siliko analizi yapılarak incelenmiştir. Verapamil'in bazı insan bağırsak flora bakterileri üzerindeki etkisine Broth seyreltme metodu ve agar disk difüzyon metodu kullanılarak bakılmıştır. Agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre Verapamil, süpersarmal plasmid DNA üzerinde doğrudan herhangi bir hasara neden olmadı ve demir ve bakır kaynaklı DNA hasarlarına karşı da hiçbir koruma etkisi göstermedi. UV-Vis spektrofotometre analizinde Verapamil, DNA ile herhangi bir etkileşim göstermedi. Buna karşın, in siliko analizi ilacın 6 hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimleri ve -7,3 bağlanma enerji değeri ile çift sarmal DNA'nın

ÖZET (devam ediyor)

minör oluşuna bağlandığını gösterdi. *Enterococcus faecalis*'in (gram pozitif suşu) ve *Escherichia coli*'nin (gram negatif suşu) büyümesini 9, 18 ve 25 mM ilaç derişimleri % 90'a kadar inhibe etmiştir. 9 mM olan ilaç derişimi iki bakteri suşu için hem MİK hem de MBC değeri olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Verapamil HCL, MIC, MBC, İn siliko, *E.coli*.

Bilim Kodu: 401.02.00



ABSTRACT

M. Sc. Thesis

THE EFFECT OF VERAPAMIL ON HUMAN FLORA BACTERIA, IN VITRO AND IN SILICO ANALYSIS OF ITS INTERACTION WITH DNA

Gülsüm Kübra GÜMÜŞ

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

Thesis Advisor: Asst. Prof. Dr. Ebrahim VALİPOUR

May 2019, 55 pages

Verapamil, a synthetic papaverine derivative, is widely used by millions of patients for treatment of high blood pressure and heart diseases in our country. Since antihypertensive drugs which are calcium channel blockers show chemical heterogeneity, they are the most discussed drug group in terms of side effects in recent years. In order to analyze Verapamil-DNA interaction the supercoiled plasmid DNA was treated with Verapamil and analyzed with agarose gel electrophoresis. This experiment was repeated in the presence of ascorbic acid, hydrogen peroxide, iron, iron plus hydrogen peroxide, copper, copper plus ascorbic acid. Verapamil-DNA interactions were investigated by UV-Vis spectrophotometer method and in silico analysis. The effect of the Verapamil on some human intestinal flora bacteria was investigated using broth medium dilution method and agar disc diffusion method. According to the results of agarose gel electrophoresis, Verapamil did not directly cause any damages on supercoiled plasmid DNA and it showed no protection effect against iron and copper mediated DNA damages. In the UV-Vis spectrophotometer analysis Verapamil did not show any interaction with the DNA. In contrast, in-silico analysis showed the drug to bind to

ABSTRACT (continued)

a minor groove of double helix DNA by 6 hydrogen bonds and hydrophobic interactions and binding energy value of -7.3. The drug inhibit the growth of both *Enterococcus faecalis* (gram positive strain) and *Escherichia coli* (gram negative strain) up to 90% at concentrations of 9, 18 and 25mM. 9mM of the drug was determined as both MIC and MBC value for the two bacterial strains.

Keywords: Verapamil HCL, MIC, MBC, In silico, *E.coli*.

Science Code: 401.02.00



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını yapan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm danışman hoca vasfını hakkıyla taşıyan Dr. Öğr. Üyesi Ebrahim Valipour'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Lisans ve yüksek lisans eğitim hayatımda yardım, bilgi, tecrübe ve güler yüzleriyle bana sürekli destek olan başta Prof. Dr. Ender Büyükgüzel, Doç. Dr. Sevim Karakaş Çelik, Dr. Öğr. Üyesi Tolga Acun ve Dr. Öğr. Üyesi Arzu Erol olmak üzere Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümündeki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmada kullandığımız insan bağırsak flora bakterilerinden *Escherichia coli* ve *Enterococcus faecalis* suşlarını bize kazandıran Zonguldak-TÜRKİYE ZBEU Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü'ne teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında yanımda olarak manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen, kendileriyle çalışmaktan huzur bulduğum, bilgi ve birikimimizi paylaştığımız değerli çalışma arkadaşlarım Çağla Aslan ve Sümeyye Zarf'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini üzerimden biran olsun eksik etmeyen, her ihtiyacım olduğunda sığınağım olan, başta annem Aysel Gümüş ve babam Arif Gümüş olmak üzere tüm aileme sevgi ve şükranlarımı sunuyor onlara çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|----------------------------------|
| KABUL: | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |
| ÖZET..... | iii |
| ABSTRACT | v |
| TEŞEKKÜR | vii |
| İÇİNDEKİLER..... | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xiii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | xvii |
| | |
| BÖLÜM 1 GİRİŞ..... | 1 |
| | |
| 1.1 VERAPAMİL HCL..... | 1 |
| 1.2 DNA’NIN YAPISI VE FONKSİYONU | 2 |
| 1.3 OKSİDATİF DNA HASARI..... | 5 |
| 1.4 SERBEST RADİKALLER..... | 5 |
| 1.5 METAL ARACILI SERBEST RADİKAL OLUŞUMU | 6 |
| 1.6 REAKTİF OKSİJEN BÖLGELERİ (ROS) | 7 |
| 1.6.1 Süperoksit Radikali (O ₂ ⁻) | 7 |
| 1.6.2 Hidroksil Radikali (OH•) | 8 |
| 1.6.3 Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) | 8 |
| 1.7 DNA İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ | 8 |
| 1.8 İNSAN SAĞLIĞI VE GASTROİNTESTİNAL MİKROFLORA..... | 9 |
| 1.8.1 Bağırsak Mikroflorası | 10 |
| 1.8.2 Antimikrobiyal Ajanların Mikrobiyaya Üzerine Etkisi | 12 |
| 1.8.3 <i>Escherichia coli</i> | 14 |
| 1.8.4 <i>Enterococcus faecalis</i> | 15 |
| | |
| BÖLÜM 2 MATERYAL VE METOD..... | 17 |
| | |
| 2.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER | 17 |

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar | 17 |
| 2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler | 18 |
| 2.2 VERAPAMİL'İN ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE ANALİZİ..... | 19 |
| 2.2.1 Plazmid DNA'nın Hazırlanması | 19 |
| 2.2.2 Verapamil'in Kırma Aktivitesi | 21 |
| 2.2.3 Demir Aracılı DNA Hasarı Üzerine Verapamil'in Etkisi..... | 21 |
| 2.2.4 Bakır Aracılı DNA Hasarı Üzerine Verapamil'in Etkisi | 22 |
| 2.3 UV-VİS SPEKTRO İLE VERAPAMİL'İN BAĞLANMA ÖZELLİĞİNİN ANALİZİ22 | |
| 2.3.1 Verapamil'in DNA'ya Bağlanma Aktivitesinin Uv Tarama Yöntemi ile İncelenmesi | 22 |
| 2.3.2 Verapamil'in BSA'ya Bağlanma Aktivitesinin UV Tarama Yöntemi ile İncelenmesi | 23 |
| 2.4 İN SİLİKO ANALİZİ İLE MODELLEME ÇALIŞMASI..... | 23 |
| 2.5 ANTİBAKTERİYAL ETKİ | 24 |
| 2.5.1 Verapamil'in <i>Escherichia Coli</i> Üzerine Etkisi | 24 |
| 2.5.2 Verapamil'in <i>Enterococcus Faecalis</i> Üzerine Etkisi..... | 25 |
| BÖLÜM 3 BULGULAR..... | 27 |
| 3.1 VERAPAMİL'İN ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE ANALİZİ..... | 27 |
| 3.1.1 Verapamil, Verapamil-Asc ve Verapamil-H ₂ O ₂ 'nin DNA Üzerine Etkisi..... | 27 |
| 3.1.2 Demir Aracılı DNA Hasarı Üzerine Verapamil'in Etkisi..... | 28 |
| 3.1.3 Bakır Aracılı DNA Hasarı Üzerine Verapamil'in Etkisi | 30 |
| 3.2 UV-VİS SPEKTRO İLE VERAPAMİL'İN BAĞLANMA ÖZELLİĞİNİN ANALİZİ32 | |
| 3.2.1 Verapamil'in DNA'ya Bağlanma Aktivitesi | 32 |
| 3.2.2 Verapamil'in BSA'ya Bağlanma Aktivitesi | 33 |
| 3.3 İN SİLİKO ANALİZİ İLE MODELLEME ÇALIŞMASI..... | 34 |
| 3.4 ANTİBAKTERİYAL ETKİ | 36 |
| 3.4.1 <i>Escherichia Coli</i> Üzerine Verapamil'in Etkisi | 36 |
| 3.4.2 <i>Enterococcus Faecalis</i> Üzerine Verapamil'in Etkisi..... | 39 |
| BÖLÜM 4 TARTIŞMA | 43 |
| BÖLÜM 5 SONUÇ..... | 47 |

| | |
|----------------|----|
| KAYNAKLAR..... | 49 |
| ÖZGEÇMİŞ | 55 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>No</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 1.1 Soldan sağa doğru A, B ve Z DNA'nın çift sarmal yapısı sarmal yapısı | 3 |
| Şekil 1.2 DNA üzerinde minor ve majör oluk. | 4 |
| Şekil 1.3 Etidyum bromürün B-DNA'ya interkalasyonu. | 4 |
| Şekil 1.4 Amiloid-bpeptid (Ab) mevcudiyetinde metal katalizli reaktif oksijen üretimi..... | 6 |
| Şekil 1.5 Sırasıyla oksijenin temel halden tek değerlikli indirgenmesiyle ROS oluşumu. | 7 |
| Şekil 1.6 Mikrobiyotaya etki eden iç ve dış faktörler. | 9 |
| Şekil 1.7 Bağırsak mikrobiyotasının proksimalden distale (a), epitelden lümeneye (b), yaşa göre (c) değişimi. | 12 |
| Şekil 1.8 <i>E.coli</i> 'nin elektron mikroskobu ile görüntüsü | 14 |
| Şekil 1.9 <i>E.faecalis</i> hücresinin taramalı elektron mikroskopisi ile görüntüsü. | 15 |
| Şekil 2.1 Verapamil HCL'nin kimyasal yapısı. | 17 |
| Şekil 3.1 pUC19 plazmit DNA ile farklı Verapamil konsantrasyonları muamele edilmiştir. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e, f sırasıyla 5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM. | 27 |
| Şekil 3.2 Farklı konsantrasyonlarda Verapamil ile muamele edilen DNA'ya ek olarak 0,0185 mM Askorbik asit eklenmiştir. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e, f sırasıyla 5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM..... | 28 |
| Şekil 3.3 Farklı konsantrasyonlarda Verapamil ile muamele edilen DNA'ya ek olarak 32 µM H ₂ O ₂ ile analiz yapılmıştır. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e sırasıyla 32 – 16 – 1,6 – 0,8 – 0,2 µM. | 28 |
| Şekil 3.4 Farklı konsantrasyonlarda bulunan Verapamil ile 1,5 mM FeII + 12 mM H ₂ O ₂ 'nin DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e, f sırasıyla 5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM..... | 29 |
| Şekil 3.5 0,611 µM Verapamil ile FeII derişimleri + 6 mM H ₂ O ₂ 'nin DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c sırasıyla 30 mM, 0,3 mM, 0,03 mM..... | 29 |
| Şekil 3.6 Farklı konsantrasyonlarda bulunan Verapamil ile 30 µM FeII'nin DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e sırasıyla 32 – 16 – 1,6 – 0,8 – 0,2 µM..... | 30 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

| <u>No</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 3.7 Farklı konsantrasyonlarda bulunan Verapamil ile 60 µM CuII + 60 µM Asc'in DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e, f sırasıyla 5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM..... | 31 |
| Şekil 3.8 Farklı konsantrasyonlarda bulunan CuII ile 0,611µM Verapamil + 0,611µM Asc'in DNA üzerine etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d sırasıyla 40 – 20 – 2 – 0,2 µM CuCl ₂ 'ı temsil eder. | 31 |
| Şekil 3.9 Farklı konsantrasyonlarda bulunan Verapamil ile yalnızca 20µM CuII'nin DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e sırasıyla 32 – 16 – 1,6 – 0,8 – 0,2 µM..... | 32 |
| Şekil 3.10 DNA-Verapamil absorbans dalga boyu grafiği. | 32 |
| Şekil 3.11 DNA-Verapamil etkileşimine göre oluşturulan grafik..... | 33 |
| Şekil 3.12 BSA-Verapamil'in absorbans dalga boyu grafiği. | 33 |
| Şekil 3.13 BSA-Verapamil etkileşimine göre oluşturulan grafik. | 34 |
| Şekil 3.14 (a) Verapamil HCL'nin pdb formatı; (b) DNA'nın pdb formatı; (c) DNA'nın minör oluk tarafı ile Verapamil'in moleküler yerleştirme perspektifi. | 35 |
| Şekil 3.15 (a) Verapamil HCL ve DNA arasındaki hidrofobik etkileşim; (b) Hidrojen bağlanma etkileşiminin moleküler modellenmesi. | 35 |
| Şekil 3.16 <i>E.coli</i> kültürlerine sulandırma metodu ile yapılan antibakteriyal üreme. 5, 4, 3, 2 ve 1. Test tüplerinin konsantrasyonları sırasıyla 0,75 – 1,5 – 9 – 18 – 25 mM'dır. Kontrol tüpünde ilaç bulunmamaktadır. Deney üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. | 36 |
| Şekil 3.17 <i>E.coli</i> 'nin MBC değerini belirlemek için yapılan katı besiyeri. | 37 |
| Şekil 3.18 Disk metodu ile <i>E.coli</i> üzerinde antibakteriyal üreme. Sağdaki resim farklı konsantrasyonlarda Verapamil ile muamele edilmiş, sol resimde kontrol olarak (amfisilin) kullanılmıştır..... | 37 |
| Şekil 3.19 Farklı Verapamil konsantrasyonları içeren besiyeri ortamlarında <i>Escherichia coli</i> 'nin relatif büyümesi. A, B, C, D, E sırasıyla 25 – 18 – 9 – 1,5 – 0,75 mM'dır. | 38 |
| Şekil 3.20 <i>Escherichia coli</i> suşunun standart üreme grafiğidir..... | 38 |
| Şekil 3.21 <i>E.faecalis</i> kültürlerine sulandırma metodu ile yapılan antibakteriyal üreme deneyi. 5, 4, 3, 2 ve 1. Test tüplerinin konsantrasyonları sırasıyla 0,75 – 1,5 – 9 – 18 – 25 mM'dır. Kontrol tüpünde ilaç bulunmamaktadır. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. | 39 |
| Şekil 3.22 <i>E.faecalis</i> 'in MBC değerini belirlemek için yapılan katı besiyeri..... | 39 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

| <u>No</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 3.23 Disk metodu ile <i>E.faecalis</i> üzerinde antibakteriyal üreme. Sağdaki resim farklı konsantrasyonlarda Verapamil ile muamele edilmiş, sol resimde kontrol olarak (amfisilin) kullanılmıştır. | 40 |
| Şekil 3.24 Farklı Verapamil konsantrasyonları içeren besiyeri ortamlarında <i>Enterococcus faecalis</i> 'nin relatif büyümesi. A, B, C, D, E sırasıyla 25 – 18 – 9 – 1,5 – 0,75 mM'dır. | 40 |
| Şekil 3.25 <i>Enterococcus faecalis</i> suşunun standart üreme grafiği. | 41 |



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| % | : yüzde |
| °C | : Santigrat derece |
| µg | : Mikro gram |
| µl | : Mikro litre |
| µM | : Mikro molar |
| mg | : Mili gram |
| ml | : Mili litre |
| mM | : Mili molar |
| M | : Molar |
| nm | : Nanometre |
| Fe | : Demir |
| Cu | : Bakır |
| OH | : Hidroksil radikali |
| H ₂ O ₂ | : Hidrojen peroksit |
| FeSO ₄ | : Demir II sülfat |
| CuCl ₂ | : Bakır II klorür |

KISALTMALAR

| | |
|-------------------------|------------------------|
| Amp ⁺ | : Amfisilin içeren |
| Asc | : Askorbik asit |
| BSA | : Bovine Serum Albümin |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

| | |
|-------------------|------------------------------------|
| CFU | : Koloni oluşturan üniteler |
| dk | : Dakika |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| E.coli | : <i>Escherichia coli</i> |
| E.faecalis | : <i>Enterococcus faecalis</i> |
| GI | : Gastro intestinal |
| K | : Bağlanma Sabiti |
| MBC | : Minimum Bakteriyal Konsantrasyon |
| MIC | : Minimum İnhibitör Konsantrasyon |
| OD | : Optik yoğunluk |
| PBS | : Phosphate saline buffer |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| ROS | : Reaktif Oksijen Türleri |
| VDW | : Van der waals |
| Vera | : Verapamil HCL |

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 VERAPAMİL HCL

Sentetik bir papaverin türevi olan Verapamil, fenilalkilamin gurubu kalsiyum kanal blokörü ilaçların prototipidir (Yazan ve Özer 1993). Verapamil, yüksek tansiyon, kalp hastalıkları, migren hastalıkların, durumların ve semptomların tedavisinde, kontrol altına alınmasında, önlenmesinde ve iyileştirilmesinde kullanılır (Alp vd. 2018). Verapamil voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını inhibe ederek düz kas hücrelerinde ve kalp iletim sistemi hücrelerinde Ca^{2+} 'un hücre içine girişini engelleyerek kalp iletim sistemini etkiler (Yenil 2009).

Milyonlarca hasta şu anda hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler problemleri tedavi etmek için Verapamil dahil olmak üzere kalsiyum antagonistleri almaktadır. Kalsiyum kanal blokörü olan antihipertansif ilaçlar kimyasal olarak heterojenite gösterdiklerinden etkilerinde de farklılık görüldüğü için son yıllarda yan etkileri bakımından üzerinde en çok tartışılan ilaç grubu olmuştur. Bununla birlikte aşırı doz Verapamil alımının, multi organ yetmezliğine ve kanıtlanmış antidot tedavisi olmayan, ölümcül zehirlenmelere yol açabildiği görülmüştür (Akıncı ve Köylü 2013). Oral ve parenteral olarak kullanılan Verapamil HCl, ticari olarak kapsül, tablet ve enjeksiyon formlarında bulunmaktadır (Yenil 2009). Verapamil, kalp hastalarına oral olarak uygulandığından, bu ilacın uzun süre boyunca mide bağırsak sisteminde mikrobiyo ile doğrudan temas edebileceği düşünülebilir (Davis ve Lin 2011).

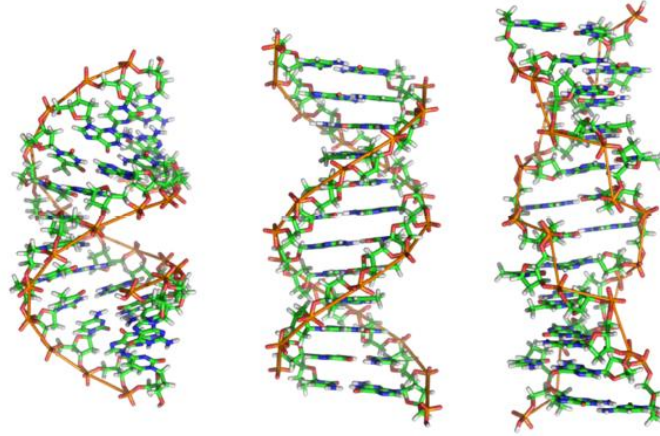
Şimdiye kadar, birçok çalışma bazı kimyasal bileşiklerin DNA hasarını indükleyebileceğini göstermiştir. Bu bileşikler arasında; L-Dopa, N-asetilsistein, prokarbazin, gentamisin, AZT ve kloramfenikol gibi bazı ilaçlar vardır. Bunlar belirli koşullar altında ve bir geçiş metali iyonunun varlığında DNA hasarına yol açabilir (Roriz ve Moya 2017). Karsinogenez ile yakından ilişkili olan bazı ilaçlar vücutta genotoksik etkilere yol açabilir. Bu nedenle DNA modifikasyonlarına ve hücrelerde büyük hasara neden olabilirler. Ahmad vd. (2016) MTT yöntemi kullanarak Verapamil ilacının etkisinin insan embriyonik böbrek hücrelerinde

(hek293) yaptıkları araştırmada Verapamil'in sitototoksik etkisinin olduğunu ispatladılar (Ahmad vd. 2016). Grujicic vd. (2007) periferel kan lenfositlerini Verapamil ilacı ile muamele ederek yaptıkları araştırmada mikronükleus oranının arttığını gösterdiler. Mikronükleus çoğalması ve ilacın genotoksik efektinin olduğunu göstermişlerdir (Grujicic vd. 2007). Milosevic vd. (2012) Mikronükleus testi ve Fish yöntemi kullanarak Verapamil ilacının insan lenfositleri üzerine etkisini araştırdılar. Araştırma sonucunda Verapamil'in yüksek dozda sitototoksik etkisinin olduğunu gösterdiler (Milošević vd. 2011).

Günümüze kadar kalsiyum antagonist ilaçların genotoksitesitesi ve/veya sitotoksitesisiyle ilgili yapılmış bazı çalışmalar bulunmaktadır. İlaç ile ilgili yapılan literatür taramalarında şuana kadar, ilacın genotoksik ve sitotoksik etkisini gösteren örnek çalışmalar incelenmiştir ancak ilacın DNA ile etkileşiminin analiz ve modellenmesi ve bu ilacın ağız yoluyla kullanıldığında flora bakterilerinin üzerinde muhtemel etkisi hakkında herhangi bir bilgiye ulaşılamamıştır. Çok yaygın bir şekilde kullanılan bu ilacın genetik materyale saldırması durumu, ilaç ile DNA etkileşiminin incelenmesinin göz ardı edilemeyecek kadar önem arz eden bir durum olduğunu göstermektedir. DNA (Deoksiribonükleik asit), tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve gelişmeleri için gerekli genetik materyalleri taşıyan bir nükleik asittir. Dolayısıyla antihipertansif, antibiyotik ve antitümörel ilaçların hedef molekölü seçilmiştir (Gökçe 2012). Genetik bilginin sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemli olduğundan çekirdekte DNA hasarını onaran çeşitli onarım sistemleri yer almaktadır (Dinçer ve Kankaya 2010).

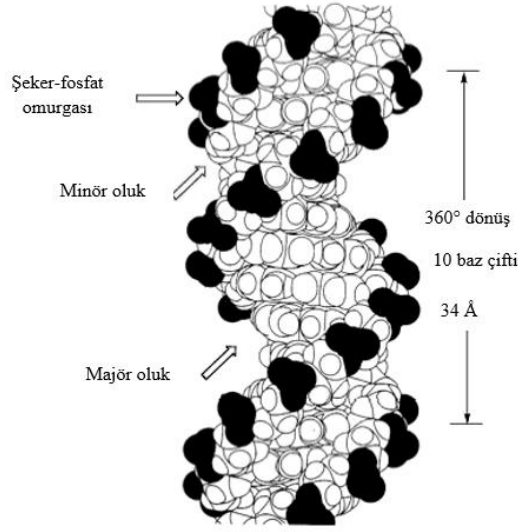
1.2 DNA'NIN YAPISI VE FONKSİYONU

Yaşamın kodu olan DNA, anne ve babadan evlatlarına aktarılan genetik bilgilerin saklanmasına uygun kalıtsal bir materyaldir. Birbirini tamamlayan anti paralel iki sarmal zincirden oluşmuştur. DNA, her nükleotitinde 2-Deoksiriboz şekeri, bir fosfat grubu ve bir azotlu baz bulunan, polinükleotid zincirlere sahiptir. Deoksiriboz şekeri ve fosfat grubu azotlu bazlara bir iskelet oluşturarak onların DNA iskeletine doğrudan bağlanmasını sağlarlar (Toptancı vd. 2016). DNA'nın çift sarmal yapısı şekil 1.1'de gösterilmektedir.



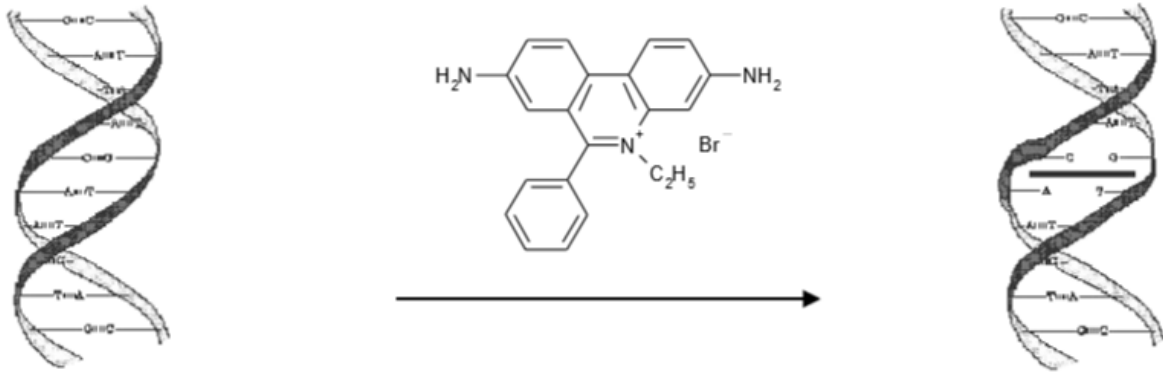
Şekil 1.1 Soldan sağa doğru A, B ve Z DNA'nın çift sarmal yapısı sarmal yapısı

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). Bu esnada DNA'daki bilgi RNA'ya kopyalanır. Bütün bu prosesler, DNA'ya bağlanabilen ya da onunla etkileşime girebilen moleküller tarafından düzenlenir (Biçen 2011). Deoksiriboz fosfat iskeletinde meydana gelen kopmalar ise replikasyonu bloke eder. Bu durum aşırı miktarlarda oluştuğunda hücre ölümüne yol açmaktadır. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak 10^4 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir (Dinçer ve Kankaya 2010). Replikasyon, transkripsiyon, gibi temel biyolojik olayların DNA tamiri ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğu bilinmektedir. DNA tamir yollarındaki hasarlar, DNA hasarına neden olan ajanlara karşı duyarlılık gösteren genetik hastalıkların moleküler temelini anlamasını sağlamaktadır (Müftüoğlu 2003). Ağır hasar oluştuğunda veya DNA onarım aktivitesi defektif ise DNA hasarı kısa sürede replikasyon, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, uzun vadede ise mutasyona ve kromozom anomalilerine sebep olmaktadır (Dinçer ve Kankaya 2010). Genomik DNA'nın bütünlüğü, farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar ile sürekli tehdit altındadır. Hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır (Müftüoğlu 2003). İlaçlar kimyasal yapılarına bağlı olarak DNA'nın belli nükleofilik kısımlarına selektivite gösterirler (Toptancı vd. 2016). İki zincirin birbirine yaklaştığı dar derin bölge minör oluk (Şekil 1.2) daha az bağlantı alanı sağlar fakat minör olukların en yararlı özellikleri, genellikle korumasız olduklarından dolayı, küçük ilaç moleküllerinin saldırılarına açık olmaları olmuştur. İki zincirin birbirinden uzaklaştığı geniş sığ bölge olan majör oluk (Su 2015) ise birden fazla etkileşim alanı gösterir, buda ilaçlarla nispeten daha fazla kuvvetli bağ oluşturmasını sağlamaktadır.



Şekil 1.2 DNA üzerinde minor ve majör oluk.

Klinik kullanımda olan veya metal bazlı antikanser ilaçları da dahil olmak üzere ileri klinik çalışmalarda bulunan ilaçların birçoğu için DNA birincil hedefdir. Metal komplekslerinin nükleik asitlerle etkileşim mekanizması yoğun olarak incelenmiştir. DNA'ya bağlanan küçük moleküller, fonksiyonları değiştirebilir veya inhibe edebilir, gen ekspresyonunu bozabilir, çoğalmaya müdahale edebilir, hücre büyümesinde veya bölünmesinde hayati etkileri bulunabilir (Topalâ vd. 2014). Etidyum bromür (Şekil 1.3) en iyi bilinen DNA interkalatörlerindedir. DNA ile etkileşen ilaçların bazıları DNA interkalatörleri gibi bazların arasına girerler daha sonra uygun koşullarda DNA ile etkileşimi DNA zincirinin kırılmasına sebep olacak olan radikalleri oluştururlar (Toptancı vd. 2016).



Şekil 1.3 Etidyum bromürün B-DNA'ya interkalasyonu.

DNA onarım sistemleri, canlılarda meydana gelen DNA hasarlarını düzeltmekle görevlidirler. Bu onarım sistemlerinin DNA hasarıyla dengeli bir şekilde işlev görebilmesi gerekir ancak

dengeinin bozulması durumunda onarım mekanizmaları yetersiz kalacak ve bu durumda DNA da hücre ölümü, kanser, mutasyon gibi kalıcı zararlar meydana gelecektir. Bu nedenle DNA hasarını önlemek için ya hasara neden olan durumlardan uzak durulması ya da hasarı önleyici önlemler alınması gerekmektedir (Yıldırım 2015).

1.3 OKSİDATİF DNA HASARI

Kararlı bir molekül olan DNA, spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. Oksidanlar canlı dokularda sürekli kontrollü bir şekilde üretilir (Süleyman vd. 2018) ancak reaktif oksijen türlerinin artması, antioksidan enzim düzeylerinin azalışı ve DNA onarım mekanizmalarının yetersiz kalma durumları oksidatif DNA hasarlarının artmasına neden olmaktadır. Bu oksidanlar elektron alma yetenekleri nedeniyle, hedef molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarına yol açtığı bilinmektedir. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme) meydana gelebilir (Eken 2017). Bundan dolayı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin serbest radikaller ile reaksiyona girmesi olarak gösterilebilir (Süleyman vd. 2018). Küçük moleküllerin DNA'ya bağlanma çalışmaları ilaç-DNA etkileşimlerini anlamak, klinik uygulamalar için yeni ve etkili ilaçların geliştirilmesi alanlarında bilgi sahibi olmak için oldukça gereklidir. Ayrıca klinisyenlerin antihipertansif ilaçların yan etkilerinden haberdar olmaları hastaya uygun ilaç seçimi ve doz ayarlanmasında çok önemli yere sahiptir (Alp vd. 2018).

1.4 SERBEST RADİKALLER

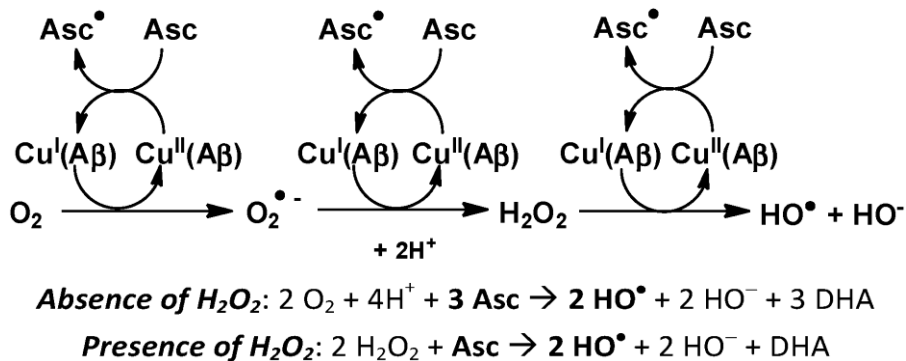
Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren moleküller veya moleküler fragmanlar olarak tanımlanabilir. Eşleşmemiş elektronların varlığı genellikle serbest bir radikal üzerinde önemli derecede reaktivite derecesine neden olur. Oksijenden türetilen bu radikaller, canlı sistemlerde üretilen bu türlerin en önemli sınıfını temsil eder (Valko vd. 2006). Serbest radikallerin ekzojen kaynakları ilaçlar, metal iyonları, kirleticiler ve radyasyondur. Metal iyonları, H₂O₂ ile biyolojik sistemlerde hidroksil serbest radikali ve metal-oksijen kompleksleri gibi çok reaktif türleri üretmek için reaksiyona girerler ve sonuçta oksidatif DNA hasarı oluşur (Mercan 2004).

1.5 METAL ARACILI SERBEST RADİKAL OLUŞUMU

Demir (Fe) ve Bakır (Cu) gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip olmalarına rağmen serbest radikal sayılmazlar. Ancak reaksiyonları katalizledikleri için serbest radikal oluşumuna yardımcı olurlar (Kaya vd. 2019). Canlı fonksiyonlar için gerekli bir eser element (Uysal 2007) olup insan vücudunda toplam 4g kadar bulunmakta ve eksikliğinde ciddi sorunlarla karşılaşılabilir (Akın 2014).

Vücut sıvılarında ve hücrelerde taşınan demirin önemli bir kısmı sitoplazmada 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 oluşumuna sebep olmaktadır (Baltacı 2018). Demir kaynaklı serbest radikal oluşumu DNA ve lipit hasarına yol açar (Valko 2006). Bu nedenle demir konsantrasyonu organizmada daima çok sıkı kontrol altında tutulur (Uysal 2007). Bir diğer geçiş elementi olan ve serbest radikal oluşumunu katalizleyen bakır, bakteriden insana kadar tüm biyolojik organizmalar için esansiyel iz elementtir (Yılmaz 2015).

Yetişkin insanlarda ortalama 50-120 mg bulunan bakır, amino asitler, yağ asitleri ve vitaminlerin normal koşullarda gerçekleşen metabolizma reaksiyonlarının vazgeçilmez ögesidir (Akın 2014). Bakır serbest veya kompleks formda divalent katyon olarak organizmaların dokularında bulunabilmekte ve 2 değerlikten 1 değerliğe geçebilmektedir (Kuybu, 2018). Fizyolojik koşullar altında serbest bakır iyonları askorbik asit varlığında hidroksil radikalleri üretebilirler ve DNA'ya hasar verebilirler (Yokawa vd. 2011).

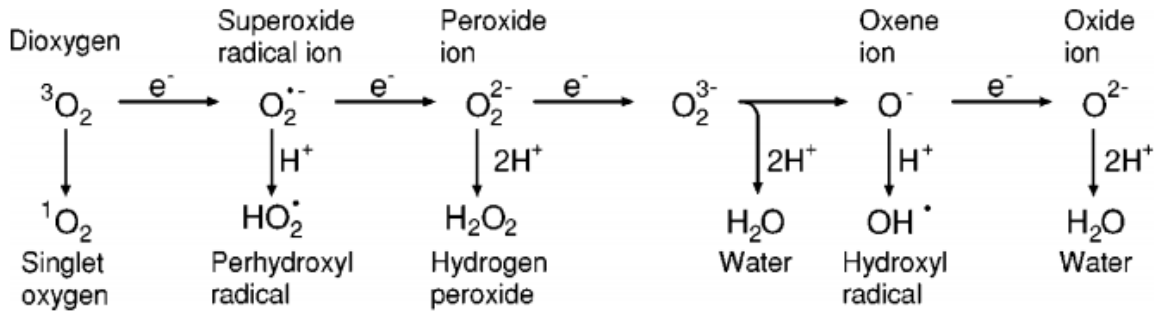


Şekil 1.4 Amiloid-bpeptid (Ab) mevcudiyetinde metal katalizli reaktif oksijen üretimi; (Asc: askorbat, DHA: dehidroaskorbat).

Şekil 1.4'te amiloid-bpeptid (Ab) mevcudiyetinde metal kaynaklı reaktif oksijen türleri aktif olarak –OH üretimini indükleyebilmektedir (Cheignon vd. 2016). Bu nedenle bakır canlı organizmalar için esansiyel bir molekül olmasının yanı sıra kontrol altında tutunması halinde toksik etki gösterebilmektedir (Aksoy 2009).

1.6 REAKTİF OKSİJEN BÖLGELERİ (ROS)

Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen bölgesi (ROS) oluşturma eğilimindedir (Altınışık 2006). Reaktif oksijen bölgeleri tarafından oluşturulan serbest radikaller, yapılarında en az birer tane eşleşmemiş elektron bulunduran reaktif karakterdeki atom veya molekülleri ifade ederler. Kararsız yapıda olan reaktif oksijen türleri, kararlı hale gelmek için hürelere saldırarak hücre bileşenlerine zarar vermek suretiyle çeşitli hastalıklara yol açmaktadırlar (Sezer ve Keskin 2014).



Şekil 1.5 Sırasıyla oksijenin temel halden tek değerlikli indirgenmesiyle ROS oluşumu.

Başlıca reaktif oksijen türleri; süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksittir. Şekil 1.5'te görüldüğü üzere oksijen bir elektron alarak indirgenir ve süperoksit radikalini oluşturur. İki elektron alarak indirgenmesiyle hidrojen peroksit ve üç elektron alarak indirgenmesiyle ise yüksek derecede reaktif olan hidroksil radikalini meydana getirir (Özcan vd. 2015).

1.6.1 Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Aerobik organizmalara zarar verme potansiyeline sahip süperoksit radikali, hücrelerde çeşitli indirgenmiş elektron taşıyıcılarının ve redoks enzimlerinin oksidasyonu yoluyla oluşturulur. DNA'ya karşı yüksek reaktiviteye sahip değildir ancak ROS ve H_2O_2 üretimini içeren

biyokimyasal reaksiyonlarda rol oynar. Örneğin; demir, bakır ve nikel gibi geçiş metalleriyle reaksiyona girerek DNA'nın oksidatif hasarına neden olur (Kelly 2008).

1.6.2 Hidroksil Radikali (OH•)

OH, hidrojen atomlarını soyutlayabilen ve hızlı bir şekilde çift bağlara ekleyebilen elektrofilik ve oldukça reaktif bir radikaldir. OH radikali Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile oluşur (Altuntaş 2007). OH'ın tüm biyomoleküllerle tepkimeye girdiği bilinmektedir ve bunun sonucu olarak hasarı DNA nükleobazları ile sınırlı değildir. Hidroksil radikal saldırısının %20'sinin riboz şekerini hedef aldığı yapılan çalışmalarda tesbit edilmiştir. Riboz şeker ünitesine saldıran OH, tek zincir kırıklıklarına neden olmasıyla birlikte transversiyon mutasyonlarına (G→T) yol açarak yetersiz onarım sonrasında mutajenezeye neden olabilir (Kelly 2008).

1.6.3 Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Serbest radikal olmadığı halde ROS kapsamına girer ve serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar. Fe⁺² veya diğer geçiş metallerinin ve süperoksit radikalinin varlığında en güçlü radikal olan hidroksil radikalini oluşturur (Özcan, Erdal vd. 2015). Örneğin; Fe^{+2/+3} ve Cu^{+1/+2} iyonları oksidatif stres altında proteinlerden ayrılarak negatif yüklü DNA'ya bağlanırlar ve bu bağlanma ile DNA'yı H₂O₂'nin hedefi haline getirirler (Altuntaş 2007). Sonuç olarak, bu tür oksidan maddeler kimyasal zincir reaksiyonları başlatarak hücrelere zarar verebilir (Tunç 2017). Bu oksidanlar fazla miktarda olduğunda membrandaki lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak permeabilitenin bozulmasına, dolayısıyla hücre içi iyon dengesizliğine neden olmaktadır. Ayrıca, proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin yapısını bozarak birçok hastalığın oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar (Sezer ve Keskin 2014).

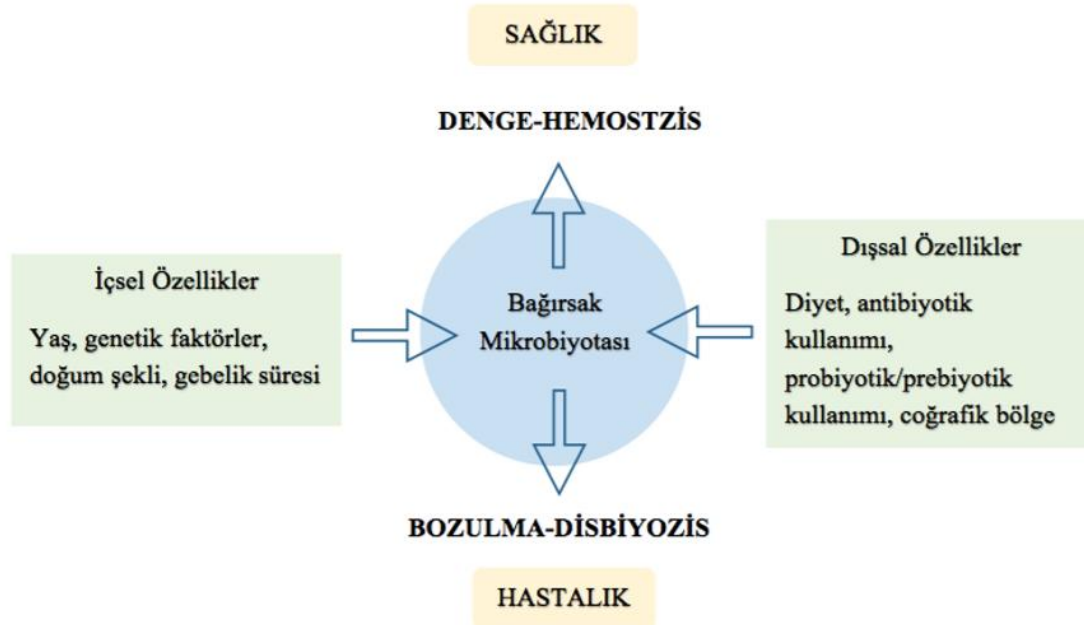
1.7 DNA İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ

DNA ile ilaç etkileşim çalışmaları hem etkileşim mekanizmasının anlaşılmasında hem de yeni ilaçların dizaynında ilgi çekici ve önemli bir konudur. Küresel pazarda rağbet gören bu ilaçlar çeşitli kanser türlerinin tedavisinde aktif olmasına rağmen, yan etkileri onun potansiyel etkinliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle daha etkili ve düşük toksisiteye sahip olan geçiş metal kompleksleri ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (Su 2015). Metal iyonlarıyla nükleik asitler

arasındaki etkileşimin biyolojik önemi oldukça köklü bir gerçek haline gelmeye başlamıştır. Nükleik asitlerin baskın rol oynadığı birçok doğal prosesin metal iyonları varlığında meydana gelmesi bunlardan bir tanesi olarak söz edilebilir (Gökçe 2012). Toptancı vd. (2016) yapmış olduğu bir çalışmada Bleomycinde pirimidin, β -aminoalanin ve β -hidroksiimidazol'un Fe(II) ile DNA kesim etkisi olan kararlı bir kompleks oluşturduğu görülmüştür (Toptancı vd. 2016).

1.8 İNSAN SAĞLIĞI VE GASTROİNTESTİNAL MİKROFLORA

İnsan sağlığı ve gastrointestinal mikroflora son yıllarda üzerinde çok durulan bir konudur. Vücudumuzu paylaştığımız mikroorganizmaların varlığı eskiden beri bilinen bir gerçektir. Ancak yaşamımızdaki değişikliklerle birlikte günümüzün insanı dış dünyada bulunan ve her gün binlercesi üretilen kimyasal ajanlarla tanışmakta ve binlerce çeşit ilaca gastrointestinal kanal yoluyla maruz kalmaktadır (Özden 2005). Karşılaştığımız bu yeni moleküller, mikroorganizmalar üzerinde çeşitli etkilere neden olarak (Bozok vd. 2014) kişinin gastrointestinal florasında meydana gelen denge bozukluğu sebebiyle rotavirüs diyaresi, diyare ve kolon kanseri gibi çeşitli hastalıkların oluşumuna sebep olabilir (Gürsoy vd. 2005).



Şekil 1.6 Mikrobiyotaya etki eden iç ve dış faktörler (Süzük 2015).

Sağlıklı yaşam için gastrointestinal sistemin yapısal ve fonksiyonel olarak normal olması önemlidir (Şekil 1.6). Vücudumuzun en geniş ikinci yüzey alanını sindirim sistemi oluşturmaktadır. Sindirim kanalı yüzeyi 250-400 m² (Schiller vd. 2005) alandan oluşmaktadır.

Oral yol ile de dış dünyayla devamlı temastadır (Özden 2005). Normal mikroflora, potansiyel olarak patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonuna ve hali hazırda mevcut fırsatçı mikroorganizmaların çoğalmasına karşı bir bariyer görevi görür. Antimikrobiyal ajanların normal mikroflora üzerindeki etkisi ile ilgili çoğu çalışma bağırsak florası üzerinde yapılmıştır (Sullivan vd. 2001).

İnsan bağırsak mikrobiyotası, doğumda steril olmasına rağmen maternal kolonizasyon, hamilelik süresi, doğum şekli, beslenme içeriği ve doğumla birlikte antibiyotik kullanımı gibi birçok faktörün, yeni doğanın mikrobiyota yapısına etki etmesiyle başlayan mikrobiyata oluşumu iki yaşına kadar devam etmekte ve iki yaşında, çeşitlilik ve sayı olarak bir yetişkin mikrobiyotasına benzer yapı kazanmaktadır (Barko vd. 2018). Oluşan mikrobiyota bireysel bir özellik gösterir ve parmak izi gibi bireysel farklılığını kişinin tüm yaşamı boyunca korur (Süzük 2015). İnsan mikrobiyom projesi, bağırsak mikrobiyota çalışmalarından elde edilen verilere dayanarak bağırsak mikrobiyotasının insan sağlığında ve birçok hastalığın gelişmesinde etkili bir organ olduğunu ortaya koymuştur (Süzük 2015).

Bağırsak mikrobiyotası (insan bağırsağında yaşayan mikroorganizma topluluğu) 3,3 milyon bakteri genini, insan genomu ise 20 bin geni ifade eder. Bağırsak florasında yer alan bakterilerin yaklaşık %98'i yararlı bakteriler olmakla birlikte gıda sindiriminde görev alarak proteinleri aminoasitlere, karbohidratları disakkaritlere ve yağları da yağ asitlerine dönüştürmektedirler (Söylemez 2018). Gastrointestinal mikrobiyom, tüm memelilerin bağırsaklarında yaşayan çeşitli bakteri, arke, mantar, protozoa ve virüslerden oluşur. İnsanlarda ve diğer memelilerde yapılan çalışmalar, gastrointestinal mikrobiyomun enerji homeostazisi, metabolizması, bağırsak epitelyum sağlığı, immünolojik aktivite ve nörodavranışsal gelişimi de dahil olmak üzere, sağlık için hayati öneme sahip bir dizi fizyolojik süreç içermektedir (Barko vd. 2018).

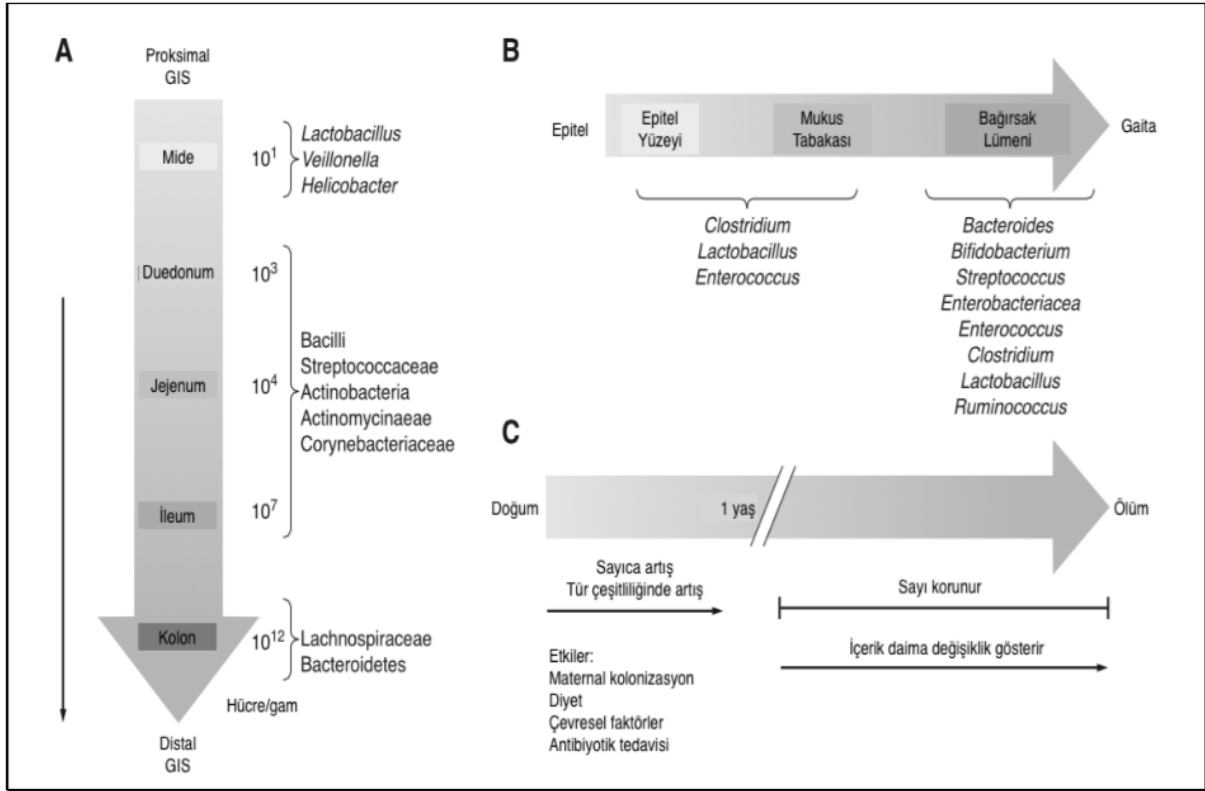
1.8.1 Bağırsak Mikroflorası

Bağırsak mikroflorası, insan fizyolojisinin temel bir bileşenidir, çünkü gastrointestinal sistemin patojenik bakteriler tarafından kolonileşmesine karşı bir engel görevi görürler (Cerniglia ve Kotarski 1999) ve insan vücudundaki metabolik, beslenme, fizyolojik ve immünolojik süreçlerde rol alarak (Söylemez 2018) mikrobiyota ile konakçı arasında kommensal bir yaşam oluşmasını sağlar. Ayrıca mikrobiyota K vitamini sentezleyerek,

selülozun sindirimini sağlayarak ve anjiyogenesiz ile bağırsak-sinir fonksiyonlarının düzenlenmesinde yardımcı olmakla beraber bağırsakta metanogenesiz, asetogenesiz, nitrat redüksiyonu ve sülfat redüksiyonu gibi redüksiyon reaksiyonlarını da düzenler. Patojen mikroorganizmalara karşı bariyer oluşturmak ve antijenlerin tanınmasını sağlamak gibi konularda da immün sisteme yardım etmektedirler (Çetinbaş vd. 2017).

Bağırsak mikrobiyotasının doğumla başlayan serüveni, ince bağırsaklardan anüse, epitel tabakadan lümeneye kadar geçen yaşamla birlikte birçok farklılıklara sahip olmuştur. Genel olarak bağırsak mikrobiyotasının bu süreçlerdeki farklılıkları şekil 1.7'de gösterilmiştir. Oral yol, ilaç alımı için tercih edilen en temel yol olmasına rağmen oral yoldan başlayan salınım, ilaç dağıtımının en karmaşık yoludur. Bu nedenle oral yoldan verilen bir ilacın etkili olması için; ilacın (Şekil 1.7a) gastrointestinal (GI) kanalın sınırlarında çözülmesi ve lümeneye bozulmadan kalması (Şekil 1.7b) epitel zarını geçmesi ve minimal ilk geçiş metabolizmasına maruz kalması gerekmektedir (Sousa vd. 2008).

Mikroorganizmalar kişilerde geçici veya kalıcı olarak kolonize olabilir; ayrıca hastalık da oluşturabilir. Normal mikrobiyal flora üyeleri; geçici flora ve kalıcı flora olmak üzere iki grupta incelenebilir. Geçici floranın çoğu hastalık oluşturmaz, nadiren patojen olabilir, konak misafirliği birkaç saatten birkaç haftaya değişebilen mikroorganizma topluluğudur. Kalıcı flora ise; yerleştiği belirli alanlarda ikamet eder, kısa süreli olarak ortadan kalkmış olsa bile yeniden oluşabilen, süreklilik gösteren mikroorganizma topluluğudur. Kalıcı flora üyelerinin ortadan kalkması halinde, geçici flora üyeleri kolonize olarak, çoğalır ve hastalık yapıcı özellik kazanabilirler (Çetinbaş vd. 2017). Mikroorganizmalar, sağlıklı bir insanın vücut kitlesinin %1-2'sini oluşturmaktadır. Buna rağmen insan vücudundaki mikrobiyal hücre sayısı insan hücresinin 10 katı kadardır. İnsan mikrobiyomunun büyük bir kısmı başta gastrointestinal sistem olmak üzere deri, ağız, boğaz, burun ve ürogenital bölgelerde yer aldığı bilinmektedir. Gastrointestinal sistem yaklaşık 200 m² gibi geniş bir yüzey alanına sahip olması ve mikroorganizmalar için yeterli düzeyde besin öğeleri içermesi nedeniyle yerleşim için en uygun ortamdır (Çetinbaş vd. 2017). Bağırsak duvarına yerleşen bakteri hücreleri bağırsaktaki toksin oranını belirleyen önemli bir faktördür (Gürsoy vd. 2005).



Şekil 1.7 Bağırsak mikrobiyotasının proksimalden distale (a), epitelden lümeneye (b), yaşa göre (c) değişimi (Süzük 2015).

Bağırsak florasında bulunan bazı bakteriler vücut için zararlı olmasına rağmen gastrointestinal sistem hem zararlı bakterilere hem de yararlı bakterilere aynı zamanda ev sahipliği yapabileceğine sahiptir. Sağlıklı gastrointestinal sistemde konak olarak kullanılan insan vücudu ile bağırsakta bulunan mikroorganizma arasında çapraz düzenleme ile çapraz bir iletişim sistemi vardır. Böylece gastrointestinal sistem sağlıklı kalarak patojenik bakterilerin aşırı büyümesini engeller. Bu şekilde konak ile konakçı arasında komensal bir ilişki kurulur ve bakteriler, bağırsağın zengin ortamında gelişirken konakçı da, bakterilerin sağladığı birçok fonksiyonel işlevlerden yararlanmaktadır (Söylemez 2018).

1.8.2 Antimikrobiyal Ajanların Mikrobiyata Üzerine Etkisi

Antimikrobiyal ajanların terapötik olarak veya profilaksi olarak uygulanması, konakçı ile normal mikroflora arasındaki ekolojik dengede bozulmalara neden olur. Mikrofloradaki bozukluklar, maddelerin özelliklerine, emilimine ve eliminasyon yoluna bağlıdır (Sullivan vd. 2001). Bir ilacın mikrobiyotaya karşı stabilitesi klinik olarak önemlidir: metabolizma bir ilacı farmakolojik olarak aktif, inaktif veya toksik hale getirebilir. Örneğin, 1993'te bakteriyel fermentasyonla toksik bir ilaç metabolitinin üretildiği bir ilaç etkileşimi nedeniyle on sekiz

ölüm yaşandı (Sousa vd. 2008). Dolayısıyla, bu çalışmanın amacı bu alana kapsamlı bir genel bakış sunmaktır; gastrointestinal mikrobiyota, ilaç substratları ve metabolik mekanizma çalışmalarının önü açılmalı ve daha fazla incelemeler yapılarak elde edilen yaklaşımlar tartışılmalıdır. Mikrobiyotanın yapısında herhangi bir nedenden ötürü oluşan değişim veya bozulma disbiyozis olarak adlandırılır. Disbiyozis oluşumu, kişide ciddi metabolik ve inflamatuvar rahatsızlıklara sebep olarak birçok hastalığın ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (Süzük 2015).

Genel olarak, disbiyoz 3 farklı başlık altında incelenir: Bunlar faydalı organizmaların kaybı, potansiyel olarak zararlı organizmaların aşırı büyümesi ve mikrobiyal çeşitliliğin kaybolması şeklindedir. Bu üç olası ihtimal karşılıklı olarak birbirlerinden etkilenmezler ve çoğu zaman aynı anda, üç ihtimal birden gerçekleşebilmektedir. Disbiyoz, inflamatuvar bağırsak hastalığı, obezite, alerjik bozukluklar, tip 1 diabetes mellitus, otizm, insan ve hayvan gastrointestinal sistemlerinde kolorektal kanser gibi çeşitli hastalıkları meydana getirebilir (Söylemez 2018). Mikroorganizmaların sağlıklı bir vücudun yaşamına devam etmesinde önemli rolleri olduğu, bazen de enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıktıkları bilinmektedir (Çetinbaş vd. 2017). Ayrıca ilaçlar fitiller veya lavmanlar şeklinde rektal uygulama yoluyla bakterilerle doğrudan temas edebilir. Bu durumda, mikrobiyota aracılı metabolizma fırsatlarının artması bağırsak bakterileri üzerinde ilaç stabiliteilerinin değerlendirilmesinin önemini arttırmıştır (Sousa vd. 2008).

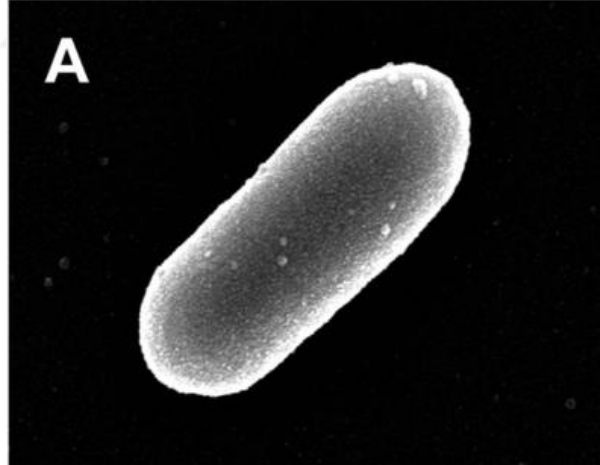
Son yıllarda yapılan çalışmalar, bağırsak mikrobiyomunun optimum sağlık durumu için önemini ortaya koymuştur. İlaçların alındığı doz miktarı ve sıklık durumuna göre kullanımı, dengesiz beslenme, sezaryen doğum, aşırı hijyen ve sürekli stres gibi etmenlerin mikrobiyomu kalıcı olarak değiştirmekte olduğu bilinmektedir ayrıca ağızdan alınan gıdalar ile sağlıklı mikrobiyata üzerinde etkisi olan bakteri kolonizasyonu arasında bakteri çeşitliliği ve dengesi açısından da net bir ilişki vardır (Söylemez 2018). Bağırsaktaki bakterilerin çeşitliliği ve dengesinde ki bozukluklar diğer patojen bakterilerin vücuda hâkim olmasına sebep olabilir (Çetinbaş vd. 2017). Gastrointestinal kanal dış dünyadan beslenme yoluyla gelen patojen mikroorganizma, kimyasal ajanlara ve diyet kaynaklı antijenlere karşı devamlı bir savunma halindedir. Vücudun bu savunma sistemi hayatta kalmamızı sağlamaktadır (Özden 2005). Gastrointestinal bağışıklık sisteminin vereceği yanıtı çok iyi belirlemesi gerekmektedir. Mukozal bağışıklık sisteminin düzenlenmesindeki bir bozukluk veya eksiklik yangı, alerji, otoimmün hastalıklar gibi birçok rahatsızlığın ortaya çıkmasına yol açar. Gastrointestinal

kanal immün sistem fonksiyonlarını yerine getirebilmek için vücuda oranla genel immün sistemin %70'den fazlasını bulundurmaktadır (Özden 2005).

Gram negatif bakterilerin etken olarak görüldüğü enfeksiyonların başında gastrointestinal enfeksiyonlar ve üriner yangı gelmektedir. Toplum kökenli sepsisler için de önemli bir kaynak oluşturan toplum kökenli üriner yangıların en sık görülen etkeni *Escherichia coli* (*E.coli*)'dir (Doğantekin ve ark. 2013).

1.8.3 *Escherichia coli*

Gram (-), az hareketli, 2-6 μ m. boyunda (Alataş 2011), çubuk şekilli, fakültatif anaerob bir bakteri türüdür. Memeli ve insan bağırsak florasında doğal olarak bulunur (Arısoy 2013). Bazı kültürlerinde koklara benzer (Şekil 1.8), bazı kültürlerinde ise daha uzun flamanlı şekilleri görülebilir. Sporsuzdurlar ve genel kullanım besiyerinde ürerler. *E.coli*, normal bağırsak florası üyelerinden olup bağırsaklarda enterit, enterokolit gibi enfeksiyonlar oluşturabilirler (Alataş 2011).

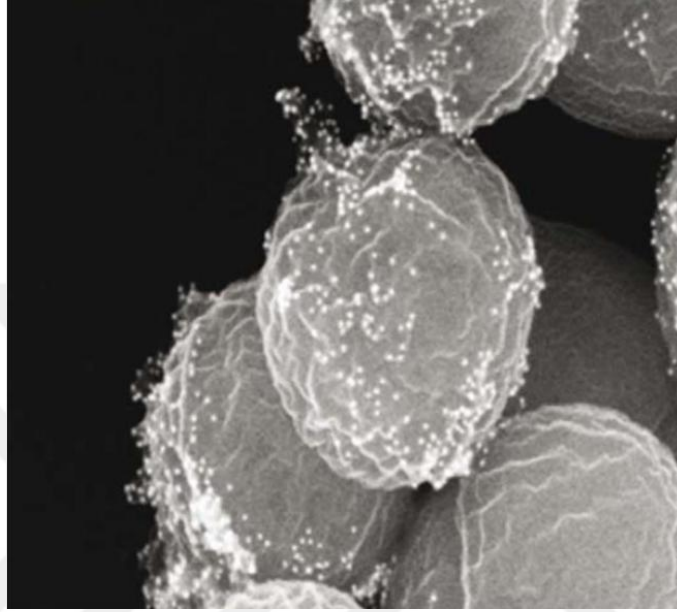


Şekil 1.8 *E.coli*'nin elektron mikroskobu ile görüntüsü (Wong, Chen vd. 2015).

Escherichia coli, kalın bağırsağın normal florasının ortak bir üyesidir. Bu bakteriler virülans faktörlerini kodlayan genetik elementler edinmediği sürece, iyi huylu olarak kalırlar (Evans Jr ve Evans 1996). Flagella ve fimbria içeren bakteriyel yüzey yapıları, yapışma işleminde önemli faktörler olarak tanımlanmıştır. *E.coli*'nin yüzey hidrofobikliği, yüzey yapıları ifade edildiğinde artar ve daha sonra ek işlemlerine yardımcı olabilir. Bu bağlilik faktörlerinin tümü serotipler veya suşlar arasında değişiklik gösterir ve büyüme koşullarına ve hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak değişebilir (Rivas vd. 2006).

1.8.4 *Enterococcus faecalis*

Gram (+), fakültatif aneorob (Şekil 1.9) bir bakteridir. Bağırsaklarda, ağız boşluğunda, vajinal kanalda doğal olarak bulunmaktadır ve bu bölgelerde düşük patojenik potansiyele sahiptir (Arısoy 2013).



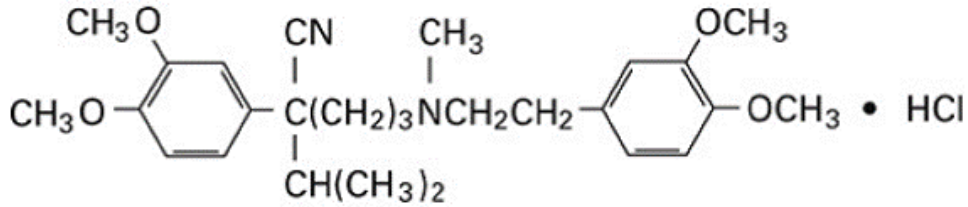
Şekil 1.9 *E.faecalis* hücresinin taramalı elektron mikroskopisi ile görüntüsü (Arısoy 2013).

Enterococcus faecalis doğada her yerde bulunur ve gastrointestinal sistem, dışkı, kan, idrar, su ve fermente gıdalar dahil olmak üzere çeşitli nişlerden izole edilmiştir (He vd. 2018). Enterokokların bakteriyemiye, üriner sistem enfeksiyonlarına, endokardine, yumuşak doku enfeksiyonlarına neden oldukları gösterilmiştir. Bu bakteriler kalp kapakçıklarına ve böbrek epitel hücrelerine tutunma yeteneğine sahiptirler (Yıldırım 2007).

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada insan bağırsak flora bakterilerinden olan *Escherichia coli* ATCC-25922 ve *Enterococcus faecalis* ATCC-29212 suşları Zonguldak-TÜRKİYE ZBEU Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü tarafından temin edilmiştir. Verapamil HCL (katalog No: 2811) olarak Acros Organics'den pudra halinde Eczane'den ise çözelti halinde İsoptin® IV (5 mg/2 ml) satın alındı ve test maddesi olarak kullanıldı. Her 2 ml'lik ampulde 5 mg Verapamil hidroklorür içeren İsoptin® IV (5 mg/2 ml)'in yardımcı maddeleri sodyum klorür ve enjeksiyonluk damıtık sudur. Yoğun derişim gereken deneylerde Verapamil'in pudra formu daha düşük derişimlerin gerekli olduğu deneylerde ise ampul kullanımını tercih edildi. Verapamil HCL'nin moleküler ağırlığı 491,07 g / mol'dür ve kimyasal yapısı şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Verapamil HCL'nin kimyasal yapısı (C₂₇H₃₈N₂O₄•HCl).

2.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- İnkübatör (Thermo Scientific, 866-9-thermo)
- Çalkalamalı İnkübatör (Mipro)
- Mikropipet seti (Thermo Scientific- FinnpiPETte)
- Mikrodalga Fırın (Altus ALMD 17B)
- UV-vis spectrophotometer (OptiSen, UV-1800)

- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Bio-Print ST4)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo Scientific EC 300XL)
- Elektroforez Tankı (JUNYI®)
- Derin Dondurucu (Bosch)
- Otoklav (Nüve, steam art)
- Hassas Terazî (Rad-Wag)
- Laminer Flow Cabinet (Nüve, LN 090)
- Su Banyosu (Nüve bath nb 20)
- Buzdolabı (Bosch)
- Santrifüj (Nüve NF 800R)
- Santrifüj (Elektro-mag)
- Vorteks (Nüve NM 110)

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- NucleoSpin Plasmid, Plasmid DNA Pürfikasyon Kiti (Macherey-Nagel)
- CaCl₂ 0,1 M
- Gliserol 84 mM
- Amfisilin (10mg/ml)
- Agaroz (Biomax)
- 1X TAE Tamponu
- % 99'luk Etil Alkol
- Etidyum Bromür
- Askorbik Asit (40 µM - 60 µM)
- Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (6mM)
- FeSO₄ (0 - 0,3 - 0,3 - 1,5 - 30 mM)
- CuCl₂ (0,2 - 2 - 20 - 40 - 60 µM)
- PBS (pH 7- 7,5)
- Müller hinton Sigma Aldrich
- LB Broth Sigma Aldrich
- Agar
- Distile Su (Ezcacıbaşı)

- EDTA (0,5 M)
- Tris (50 mM) Sigma
- Tris – EDTA Tamponu (0,5 M EDTA 10 µl + 50 mM 5 ml Tris)
- BSA (Sığır Serum albümin) (0,025 g BSA + 5 ml 50 mM Tris)

2.2 VERAPAMİL'İN ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

2.2.1 Plazmid DNA'nın Hazırlanması

NEB5α bakterileri kompetent hücre haline getirildi ve vektör pUC19 aktarımı yapıldı. Plazmid aktarımı gerçekleşen bakteriler amfisilin (10 mg/ml) içeren katı besiyerine ekildi (overnight 37°C). Normalde NEB5α bakterilerinin amfisiline karşı dirençliliği yoktur bu nedenle sadece plazmid transsformasyonunun gerçekleştiği NEB5α bakterileri üreme yapabilecektir. Üreme olan kolonilerden öze ile örnek alındı ve amfisilin içeren sıvı besiyerine ekim yapılarak gecelik kültür (37°C) hazırlandı. Gecelik kültür sonrasında pUC19'un transform olduğu NEB5α hücrelerini içeren sıvı besiyerinden plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Bu işlemler aşağıda yer alan protokoller takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

NEB5α bakterilerinden kompetent hücre hazırlanması;

- 250 ml'lik erlende 50 ml LB sıvı besiyeri hazırlandı ve otoklav yapıldı.
- Steril olan sıvı besiyerlerine NEB5α ekimi yapıldı.
- 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde (125 rpm) gece boyunca inkübasyona bırakıldı.
- OD değeri 0,35 veya 0,4 olduğunda erlen steril buzlu ortama alındı.
- 5 ayrı tüpe 10 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernetand uzaklaştırıldı.
- 5 ml 0,1 M CaCl₂ pellet üzerine eklendi ve hafifce karıştırıldı.
- Daha sonra 20 dakika, 0°C buzlu ortamda bekletildi.
- 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernetand uzaklaştırıldı.
- Üzerine 500 µl CaCl₂ 84 mM gliserol eklendi.
- Her tüp 1,5 ml'lik ependorf tüplerine 100'er µl paylaştırıldı.
- Depolanmak üzere -80'e kaldırıldı.

NEB5α bakterilerine pUC19 plazmid transsformasyonu;

- Plazmid transsformasyonu için -80'den NEB5α kompetent hücreleri alındı.

- Kompetent hücre üzerine 5 µl plazmid aktarıldı ve yavaşça karıştırıldı.
- 0°C'de 30 dakika bekletildi.
- Sonrasında ependorf tüpleri 1 dakika boyunca 42°C sıcaklıktaki su banyosuna koyuldu.
- Tekrar 0°C'de 2 dakika bekletildi.
- Üzerine 900 µl LB besiyeri eklendi ve 37°C, 125 rpm'de 1 saat boyunca çalkalayıcı inkübatöre bırakıldı.
- Daha sonra transform olan plazmidlerin belirlenmesi için 100 ml'lik amfisilin içeren katı besiyerlerine ekim yapıldı.
- Tranforme olan bakterilerde koloni halinde üreme görülmüştür.

Plazmid DNA saflaştırma işlemi NucleoSpin®Plazmid pürifikasyon protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu protokole göre;

- pUC19 plazmid DNA'ların bulunduğu gecelik kültür her bir tüpe 7 ml olmak üzere paylaştırıldı.
- 15 dakika, 11000 rpm de santrifüj yapılır, süpernetand döküldü.
- Pellet üzerine 250 µl A1 solüsyonu (1 ml A1 solüsyonu RNase'a eklenerek vortekslendi ve tekrar A1 şişesine aktarılır) eklendi ve hiç pellet kalmayınca kadar vortekslendi.
- Daha sonra üzerine 250 µl A2 solüsyonu eklendi.
- Aşağı yukarı hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika beklenir bu esnada solüsyonun rengi maviye döndü.
- Sonrasında üzerine 300 µl tampon madde olarak A3 eklenir ve mavi renk belirsizleşene kadar hafifçe alt-üst edildi.
- 11000 rpm, 10 dakika santrifüj yapıldı.
- Daha sonra DNA bağlama aşamasında ependorf tüplerine sütun yerleştirildi.
- Üzerine 750 µl süpernetand eklenir.
- 1 dakika, 11000 rpm'de santrifüj yapıldı.
- Kolondan süzülen solüsyon atılır ve kalan lizat sütuna tekrar eklenerek işlem tekrarlandı.
- Daha sonra yıkama aşamasına geçilir. Bu aşama için önceden 50°C'de ısıtılmış olan Aω solüsyonundan 500 µl eklendi.
- 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve pellet atıldı.

- 600 µl tampon A4 eklendi.
- 1 dakika, 11000 rpm'de santrifüj yapıldı ve dipte toplanan atıldı.
- Yıkama solüsyonunun kolondan tamamen uzaklaşması için tekrar 11000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı ve dipte toplanan kısım atıldı.
- Sonrasında kolon 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne yerleştirildi.
- Üzerine önceden 70°C'de ısıtılmış AE solüsyonundan 50 µl eklendi.
- 70°C'de 2 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Son olarak 1 dakika, 11000 rpm'de santrifüj yapıldı ve dipte toplanan DNA'lar biraraya getirildi.

Saflaştırma ve DNA miktarını belirleme tayini için Beer-Lambert yasası ve agaroz jel (% 1) elektroforezi ile analiz yapılmıştır.

2.2.2 Verapamil'in Kırma Aktivitesi

Verapamil, Verapamil-Asc ve Verapamil-H₂O₂'nin DNA üzerine etkisi incelenmiştir. Verapamil'in DNA hasar potansiyelini belirlemek için 0,247 µM pUC19 plazmid DNA 45 dakika boyunca 37°C'de 5 mM – 1,85 mM – 0,185 mM – 0,0185 mM – 0,00185 mM – 0,000185 mM Verapamil konsantrasyonları ile muamele edildi. Deney, hem oksidatif bir ajan H₂O₂ (32 µM) hem de bir indirgeyici ajan olan askorbik asit (0,0185 mM) varlığında tekrarlandı. İnkübasyondan sonra, reaksiyon karışımları %1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 voltta 55 dakika boyunca yürütüldü, ardından etidyum bromür ile boyama gerçekleştirildi. Deneylerin tümü, phosphate saline buffer (PBS) (pH = 7,5) yapıldı (Cervantes-Cervantes vd. 2005).

2.2.3 Demir Aracılı DNA Hasarı Üzerine Verapamil'in Etkisi

Verapamil'in oksidatif maddeye karşı DNA üzerindeki koruyucu etkilerini incelemek için Yi vd. (2009) tarafından kullanılan prosedür takip edilerek 0,247 µM bp pUC19 plazmit DNA, farklı yoğunluk miktarlarında Verapamil (5 mM – 1,85 mM – 0,185 mM – 0,0185 mM – 0,00185 mM – 0,000185 mM), 1,5 mM FeSO₄ ve 12 mM H₂O₂ ile muamele edildi. Daha sonra, 37°C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ek olarak, negatif kontrol olarak Verapamil hariç her şeyi içeren bir tüp kullanılırken pozitif kontrol olarak sadece DNA kullanılmıştır.

Ayrıca deney 0,611 µM Verapamil, farklı demir konsantrasyonlarıyla (FeSO₄ 30 - 0,3 - 0,03 mM) ve 6 mM H₂O₂ varlığında tekrarlanmıştır. Verapamil'in kanda bulunan derişimi (Winek vd. 2001) ve demirin plazma seviyesi (Letelier vd. 2010) göz önüne alınarak bahsi geçen derişimler seçilmiştir.

2.2.4 Bakır Aracılı DNA Hasarı Üzerine Verapamil'in Etkisi

Deneyin bu kısmı Yokawa vd. (2011) kullandığı yöntem takip edilerek 0,247µM pUC19 plazmid DNA'sı 60 µM CuCl₂ ve 60 µM Asc varlığında 5 mM - 1,85 mM - 0,185 mM - 0,0185 mM - 0,00185 mM - 0,000185 mM Verapamil ile 37°C'de 45 dakika süre muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı 90 voltta 55 dakika boyunca %1'lik agaroz jel elektroforezinde analize tabi tutuldu. Deney 0,611 µM Verapamil, 0,611 µM Asc ve bakırın farklı derişim varlığında (40 - 20 - 2 - 0,2 µM) tekrarlandı. Bu bölümde üç kontrol kullanılmıştır. Birincisi hiçbir maddeyle muamele edilmemiş plazmid DNA, ikincisi sadece CuCl₂ (60 µM) ile muamele edilmiş plazmid DNA ve son olarak üçüncü kontrolde plazmid DNA ilaç dışındaki maddelerle muamele edilmiştir. Verapamil'in kanda bulunan derişimi (Winek vd. 2001) ve bakırın plazma seviyesi (Letelier vd. 2010) göz önüne alınarak bahsi geçen derişimler seçilmiştir. Tüm testler PBS (pH 7,4) tamponda yapıldı.

2.3 UV-VİS SPEKTRO İLE VERAPAMİL'İN BAĞLANMA ÖZELLİĞİNİN ANALİZİ

UV-Vis spektrometresi (OptiSen UV-1800) sahip olduğu yüksek hassasiyet, basitlik, yeniden kullanılabilirlik ve çok yönlülük gibi özellikleri nedeniyle en çok kullanılan tekniklerdendir (Su 2015).

2.3.1 Verapamil'in DNA'ya Bağlanma Aktivitesinin UV Tarama Yöntemi ile İncelenmesi

Bu çalışmada Verapamil ve calf timus DNA arasındaki etkileşim UV-Vis spektrofotometre ile araştırılmıştır. Dorraji ve Jalali'nin (2013) kullandığı metod takip edilerek calf timus DNA 50 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA içeren tamponda (pH 7,4) çözüldü, üzerine Verapamil solüsyonu ekleyerek UV-Vis Spektrofotometre cihazında UV taraması 225-300 nm dalga boyları arasında yapıldı ve absorpsiyon spektrumunda oluşan değişiklikler izlendi. Her eklenen Verapamil solüsyonundan sonra küvet 5 dk inkübasyona bırakıldı.

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_\infty - A_0} + \frac{1}{K(A_\infty - A_0)} \frac{1}{[Vera]} \quad (2.1)$$

Bağlanma sabitinin (K) değeri, 2.1 numaralı denkleme göre 260 nm'de DNA absorpsiyonundan elde edildi, burada A₀, Verapamil'in yokluğunda 260 nm'de DNA'nın absorpsiyonudur; A_∞, Verapamil'in varlığında nihai emilimdir. A, Verapamil–DNA'nın absorbansıdır. Absorbans değerlendirme ölçümlerinde pH 7,4'te calf timus DNA konsantrasyonu 3,3 mM'da sabit tutulurken, Verapamil derişimi 0,16 mM ve 1,6 mM arasında değişkenlik göstermiştir.

2.3.2 Verapamil'in BSA'ya Bağlanma Aktivitesinin UV Tarama Yöntemi ile İncelenmesi

Bu çalışmada Verapamil ve BSA proteini arasındaki etkileşim UV-Vis spektrofotometre ile araştırılmıştır. Dorraji ve Jalali (2013) kullandığı metod takip edilerek BSA (0,5 g/l) proteini 50 mM Tris-HCl tamponunda (PH 7,4) çözüldü, üzerine Verapamil solüsyonu eklenerek UV-Vis Spektrofotometre cihazında UV taraması 220-320 nm dalga boyları arasında yapıldı ve absorpsiyon spektrumunda oluşan değişiklikler izlendi. Her eklenen Verapamil solüsyonundan sonra küvet 5 dk inkübasyona bırakıldı. Bağlanma sabitinin (K) değeri, 2.1 numaralı denkleme göre 280 nm'de DNA absorpsiyonundan elde edildi, burada A₀, Verapamil'nin yokluğunda 260 nm'de DNA'nın absorpsiyonudur; A_∞, Verapamil'in varlığında nihai emilimdir. A, Verapamil–BSA'nın absorbansıdır. Absorbans değerlendirme ölçümlerinde pH 7,4'te BSA derişimi 2,4mM'da sabit tutulurken, Verapamil derişimi 0,16 mM ve 1,6 mM arasında değişkenlik göstermiştir.

2.4 İN SİLİKO ANALİZİ İLE MODELLEME ÇALIŞMASI

In-siliko analizi için, UCSF Chimera programı (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>), AutoGrid4 ve AutoDock4'e giriş yapılarını hazırlamak için kullanıldı. DNA sekansı (PDB ID: 1BNA) Protein Veri Bankasından elde edildi. Verapamil HCL yapısı <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> veri tabanından elde edildi ve Discovery studio yazılımı tarafından pdb formatına dönüştürüldü. Makromolekül (DNA) ve ligand (ilaç) dosyaları AutoDock4 programı kullanılarak hazırlandı. Bağlanma bölgesinde ligand için olası bir konformasyon ve oryantasyon elde etmek için kenetleme yapıldı. Yazılım kullanılarak,

DNA'ya polar hidrojen atomları ilave edildi ve polar olmayan hidrojen atomları birleştirildi. Kompleks sistem, x * y * z yönlerinde (50 * 50 * 100) grid aralığı bulunan bir kutu içine alınarak Auto Dock4'de uygulanan Lamarckian genetik algoritmaları, yerleştirme hesaplamalarını yapmak için kullanıldı (Hemachandran vd. 2016). Yerleştirme araması tamamlandıktan sonra en iyi yerleştirme en düşük yerleştirilmiş enerji ile seçilmiştir. Kompleks DNA'nın Verapamil konformasyonu ile etkileşimi Discovery moleküler görüntüleyici kullanılarak analiz edildi.

2.5 ANTİBAKTERİYAL ETKİ

Bu amaç için, insan flora bakterilerinden olan gram pozitif bakteri *Enterococcus faecalis* ve gram negatif bakteri *Escherichia coli* kullanılmıştır.

2.5.1 Verapamil'in *Escherichia Coli* Üzerine Etkisi

Sulandırma metodu yoluyla yapılan deney için farklı Verapamil konsantrasyonlarını 0,75 mM – 1,5 mM – 9 mM – 18 mM – 25 mM içeren Mueller Hinton besiyeri hazırlandı. Bir gece önce hazırlanmış ve 37°C'de üremeye bırakılmış olan *Escherichia coli* süspansiyonundan 0,5 McFarland standartlarına göre ayarlama yapılarak inoküle edildi ve 37°C'de 48 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bakteri üreme yoğunluğu UV spektrofotometre (OptiSen UV-1800) yöntemi ve CFU (koloni oluşturan üniteler) sayısı seri seyreltme metodu kullanılarak belirlendi.

Verapamil'in deney koşullarında bakteri üremesini engelleyen en düşük derişim MIC (minimum inhibisyon derişimi) değeri olarak belirlendi. MBC (minimum bakterisidal derişimi) değerinin belirlenmesi için MIC değeri ve daha yüksek derişim içeren kültürler Mueller Hinton katı besiyerine aktarılarak, 37°C'de, 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin ölümüne sebep olan en düşük derişim MBC değeri olarak belirlendi.

Ek olarak, Verapamil'in antibakteriyal etkisi disk difüzyon metodu ile tekrarlanan deneyde *Escherichia coli* ekili olan Mueller Hinton agar üzerinde 0,75 mM – 1,5 mM – 9 mM – 18 mM – 25 mM Verapamil içeren steril diskler kullanarak (Valipour vd. baskıda), disklerin etrafında oluşan zonlara göre değerlendirildi (Alataş 2011). Kontrol grubu olarak amfisilin içeren ve hiçbir madde içermeyen disk numuneleri kullanıldı.

2.5.2 Verapamil'in *Enterococcus Faecalis* Üzerine Etkisi

Sulandırma metodu yoluyla yapılan deney için farklı Verapamil konsantrasyonlarını 0,75 mM – 1,5 mM – 9 mM – 18 mM – 25 mM içeren Mueller Hinton besiyeri hazırlandı. Bir gece önceden hazırlanmış ve 37°C' de üremeye bırakılmış olan *Enterococcus faecalis*'den 0,5 McFarland standartlarına göre ayarlama yapılarak inoküle edildi ve 37°C'de 48 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bakteri üreme yoğunluğu UV spektrofotometre (OptiSen UV-1800) yöntemi ve CFU (koloni oluşturan üniteler) sayısı seri seyreltme metodu kullanılarak belirlendi. Büyüme engelleyen en düşük ilaç konsantrasyonu MIC olarak belirlendi. MBC değerinin belirlenmesi için MIC değeri ve daha yüksek derişim içeren kültürler Mueller Hinton katı besiyerine aktararak, 37°C'de, 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin ölümüne sebep olan en düşük derişim MBC değeri olarak belirlendi.

Ek olarak, Verapamil'in antibakteriyal etkisi disk difüzyon metodu ile tekrarlanan deneyde *Enterococcus faecalis* ekili olan Mueller Hinton agar üzerinde 0,75 mM – 1,5 mM – 9 mM – 18 mM – 25 mM Verapamil içeren steril diskler kullanarak (Valipour vd. baskıda), disklerin etrafında oluşan zonlara göre değerlendirildi (Alataş 2011). Kontrol grubu olarak amfisilin içeren ve hiçbir madde içermeyen disk numuneleri kullanıldı.

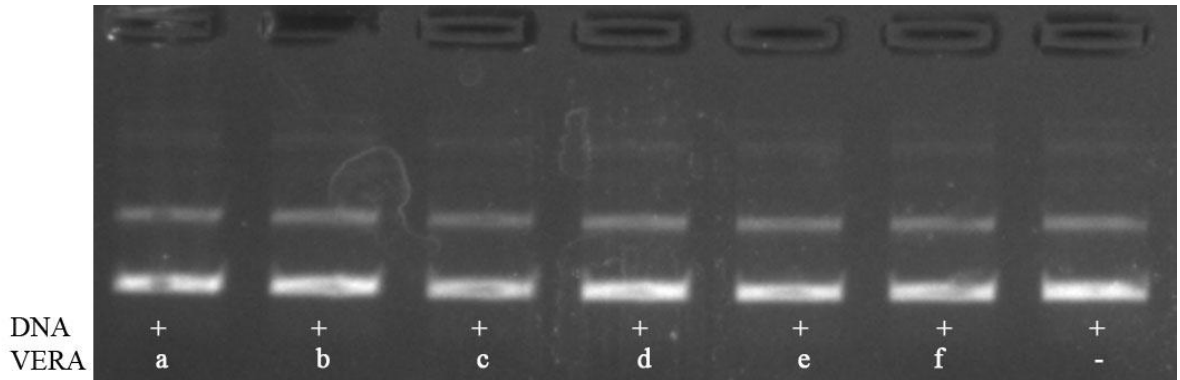
BÖLÜM 3

BULGULAR

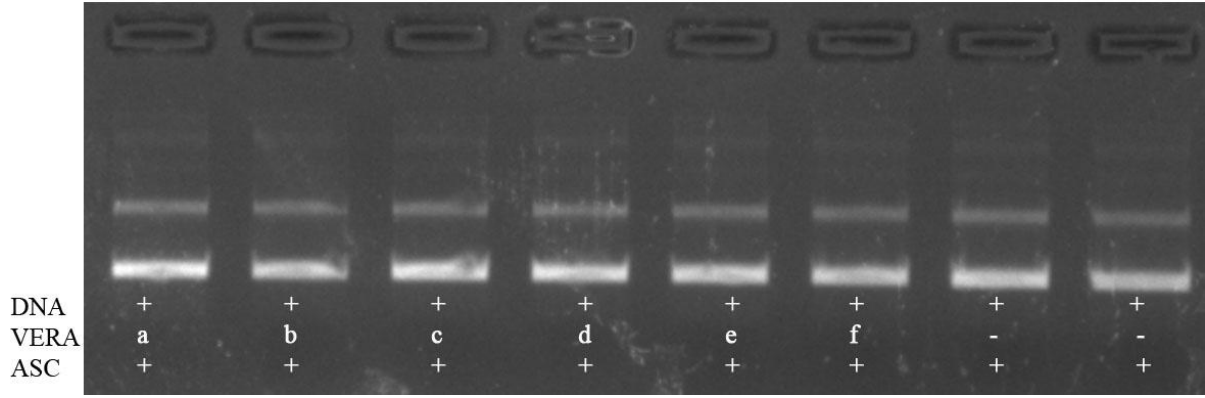
3.1 VERAPAMIL'İN ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

3.1.1 Verapamil, Verapamil-Asc ve Verapamil-H₂O₂'nin DNA Üzerine Etkisi

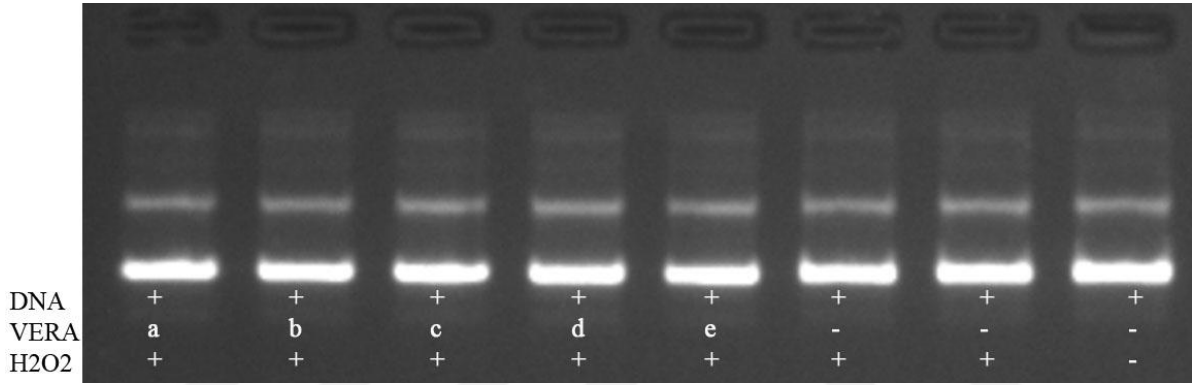
Farklı konsantrasyonlarda Verapamil (5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM) ile muamele edilen çift zincirli süpersarmal plazmit DNA üzerinde ilacın bir etkileşimin bulunmadığı muamele edilmemiş plazmit DNA ile birlikte yürütülen agaroz jel elektroforezinde açıkça görülmektedir (Şekil 3.1). Ayrıca şekil 3.2'de indirgeyici bir ajan olan askorbik asit ile ve şekil 3.3'de oksitleyici bir ajan olan H₂O₂ ile muamelesi sonucunda Verapamil'in DNA üzerinde hasara neden olmadığı açıkça görülmektedir.



Şekil 3.1 pUC19 plazmit DNA ile farklı Verapamil konsantrasyonları muamele edilmiştir. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e, f sırasıyla 5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM Vera, Verapamil'i temsil eder.



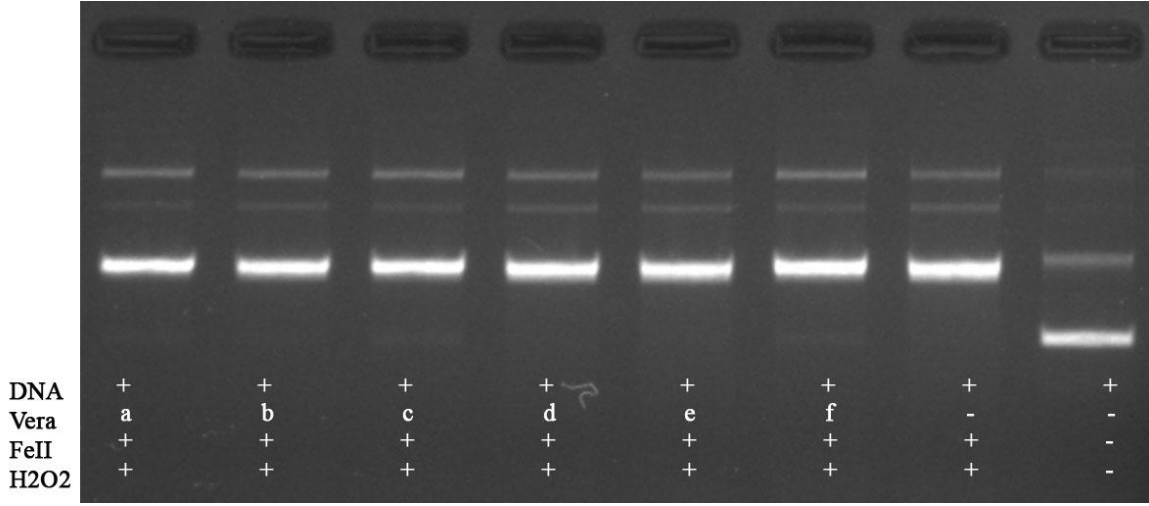
Şekil 3.2 Farklı konsantrasyonlarda Verapamil ile muamele edilen DNA'ya ek olarak 0,0185 mM Askorbik asit eklenmiştir. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e, f sırasıyla 5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM.



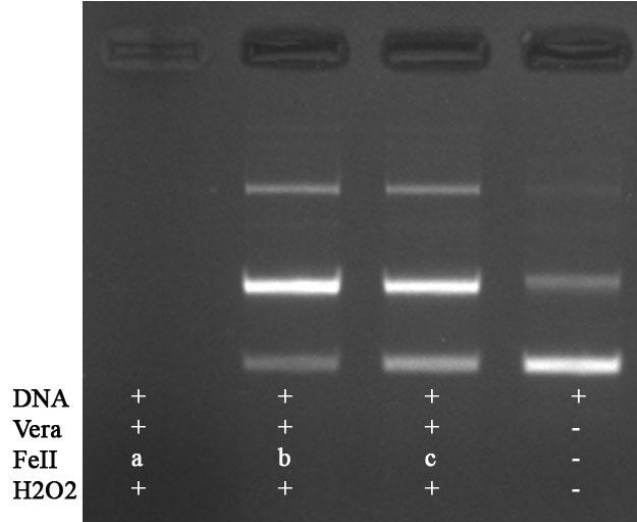
Şekil 3.3 Farklı konsantrasyonlarda Verapamil ile muamele edilen DNA'ya ek olarak 32 µM H2O2 ile analiz yapılmıştır. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e sırasıyla 32 – 16 – 1,6 – 0,8 – 0,2 µM.

3.1.2 Demir Aracılı DNA Hasarı Üzerine Verapamil'in Etkisi

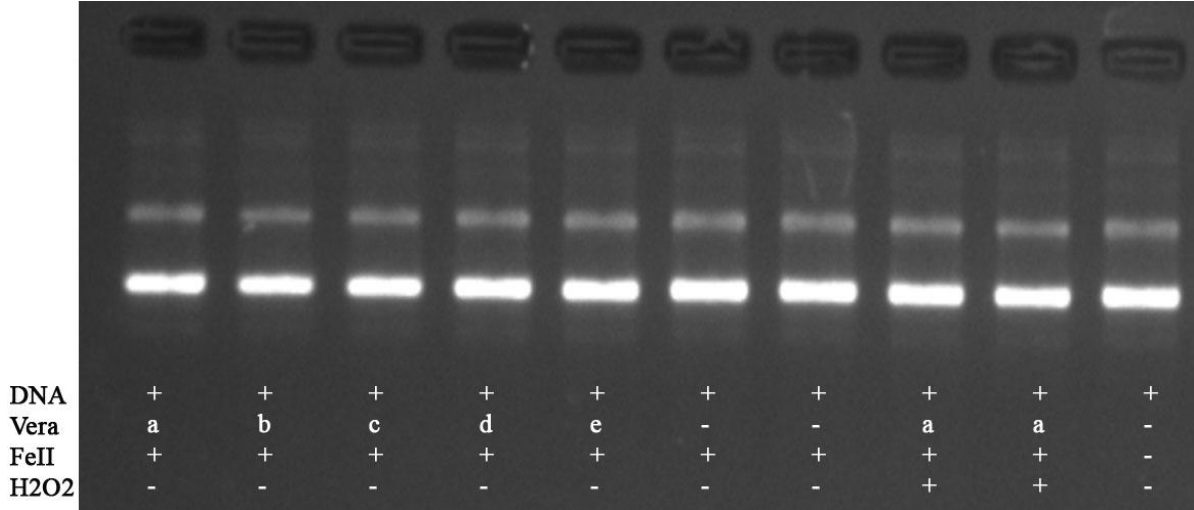
Farklı konsantrasyonlarda Verapamil (5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 - 0,00185 – 0,000185 mM) ile muamele edilen çift zincirli süpersarmal plazmit DNA üzerinde oluşan demir kaynaklı hasar Verapamil tarafından önlenememiştir. Yürütülen agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre Verapamil'in demir kaynaklı hasar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı açıkça görülmektedir (Şekil 3.4, 3.5, 3.6). Yalnızca FeII ile yapılan muamele sonucunda da Verapamil ve FeII'nin DNA üzerinde değişikliğe sebep olacak bir etkileşime girmediği Şekil 3.6'da gösterilmektedir.



Şekil 3.4 Farklı konsantrasyonlarda bulunan Verapamil ile 1,5 mM FeII + 12 mM H₂O₂'nin DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e, f sırasıyla 5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM.



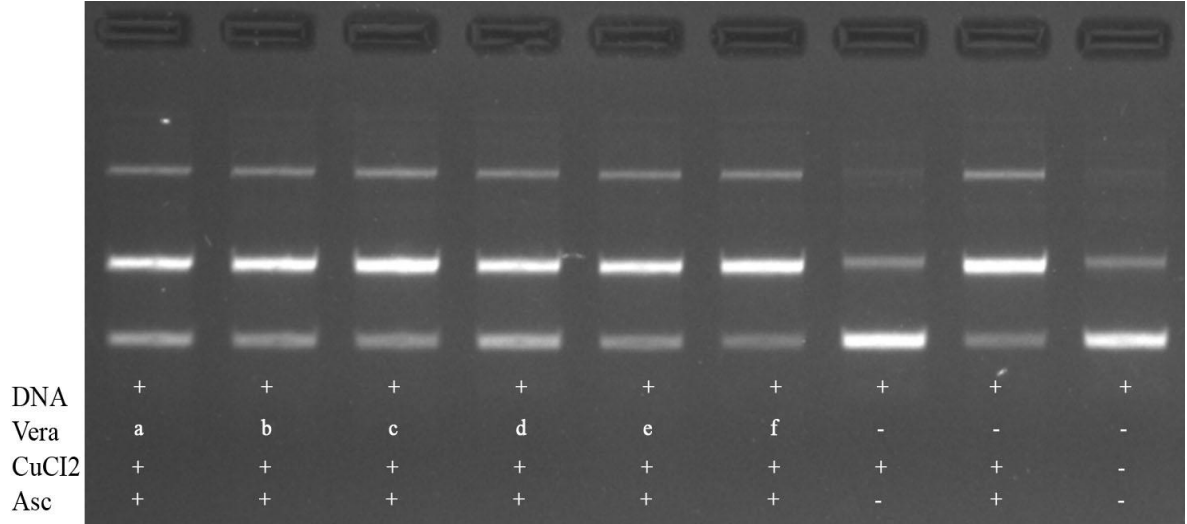
Şekil 3.5 0,611 µM Verapamil ile FeII derişimleri + 6 mM H₂O₂'nin DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c sırasıyla 30 mM, 0,3 mM ve 0,03 mM.



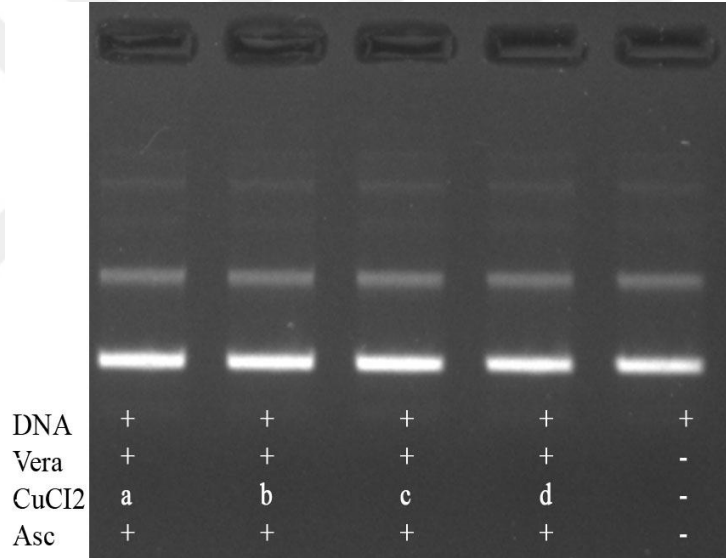
Şekil 3.6 Farklı konsantrasyonlarda bulunan Verapamil ile 30 μM FeII'nin DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e sırasıyla 32 – 16 – 1,6 – 0,8 – 0,2 μM .

3.1.3 Bakır Aracılı DNA Hasarı Üzerine Verapamil'in Etkisi

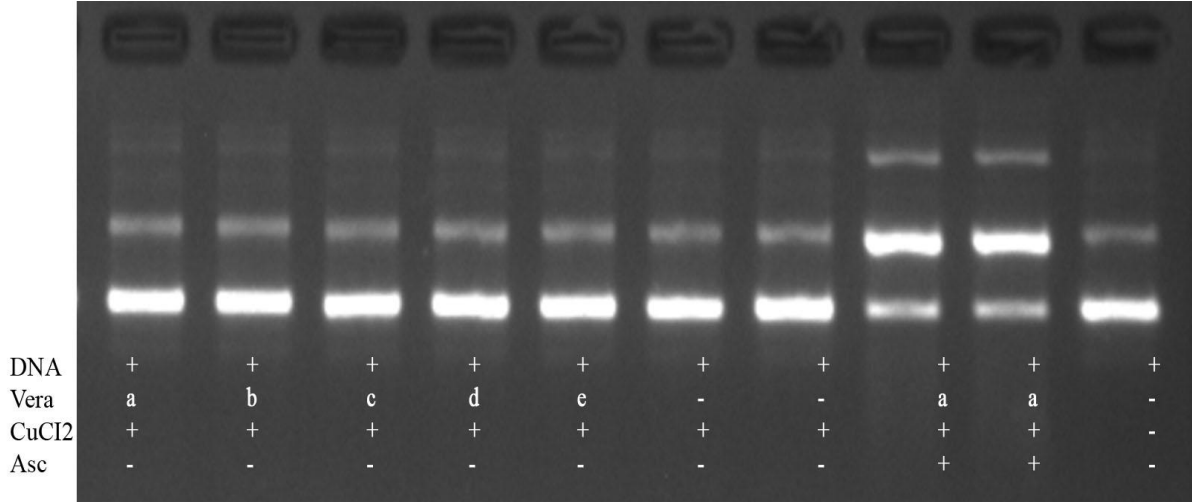
Farklı konsantrasyonlarda Verapamil (5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM) ile muamele edilen çift zincirli süpersarmal plazmit DNA üzerinde oluşan bakır kaynaklı hasar Verapamil tarafından önlenememiştir. Yürütülen agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre Verapamil'in bakır kaynaklı hasar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı açıkça görülmektedir (Şekil 3.7, 3.8). Yalnızca CuII ile yapılan muamele sonucunda da Verapamil ve CuII'nin DNA üzerinde değişikliğe sebep olacak bir etkileşime girmediği şekil 3.9'da gösterilmektedir.



Şekil 3.7 Farklı konsantrasyonlarda bulunan Verapamil ile 60 μ M CuII + 60 μ M Asc'in DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e, f sırasıyla 5 – 1,85 – 0,185 – 0,0185 – 0,00185 – 0,000185 mM.



Şekil 3.8 Farklı konsantrasyonlarda bulunan CuII ile 0,611 μ M Verapamil + 0,611 μ M Asc'in DNA üzerine etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d sırasıyla 40 – 20 – 2 – 0,2 μ M CuCl₂'i temsil eder.

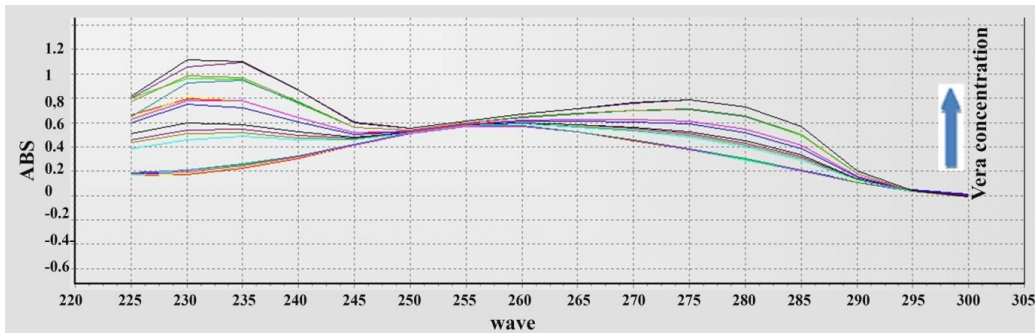


Şekil 3.9 Farklı konsantrasyonlarda bulunan Verapamil ile yalnızca 20 μ M CuII'nin DNA üzerine olan etkisi. %1'lik agaroz jel elektroforez sonucuna göre a, b, c, d, e sırasıyla 32 – 16 – 1,6 – 0,8 – 0,2 μ M.

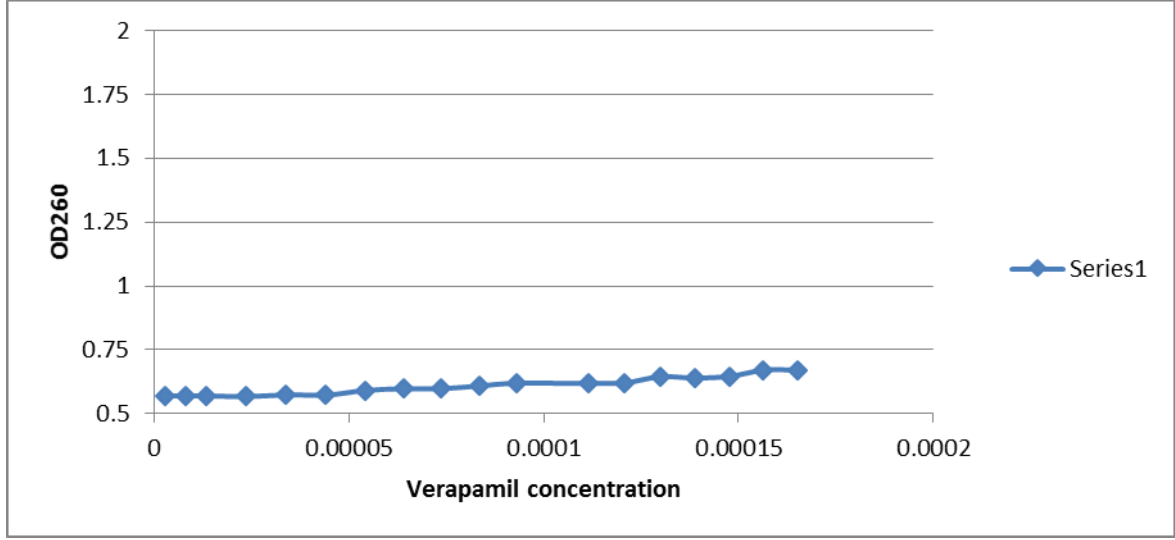
3.2 UV-VİS SPEKTRO İLE VERAPAMİL'İN BAĞLANMA ÖZELLİĞİNİN ANALİZİ

3.2.1 Verapamil'in DNA'ya Bağlanma Aktivitesi

UV-Vis tarama yöntemiyle incelenen Verapamil-DNA etkileşimlerinde spektrofotometre sonucunda elde edilen verilere göre absorbans - dalga boyu grafiği çizilmiştir (Şekil 3.20). Deney, DNA üzerine Verapamil titre edilerek gerçekleştirilmiştir. Dalga boyu aralığı 225-300 nm arasındadır. Verapamil'in DNA'ya bağlanmadığı Verapamil'in ayrı DNA'nın ayrı pik vermesiyle ortaya çıkmıştır. Bu sonuca göre DNA 260 nm de pik vermiş ki bu DNA'nın pik değeridir. Verapamil ise 230-235 nm dalga boylarında pik vermiştir. Bu dalga boylarında Verapamil'in kendi dalga boylarıdır. Böylece Verapamil'in DNA ile etkileşime girmediği anlaşılmıştır.



Şekil 3.10 DNA-Verapamil absorbans dalga boyu grafiği.

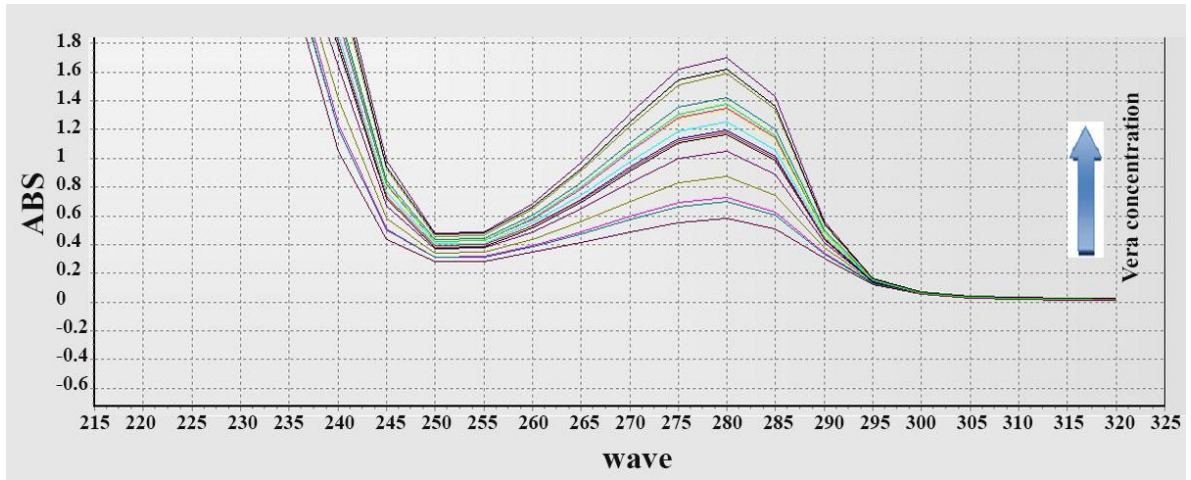


Şekil 3.11 DNA-Verapamil etkileşimine göre oluşturulan grafik.

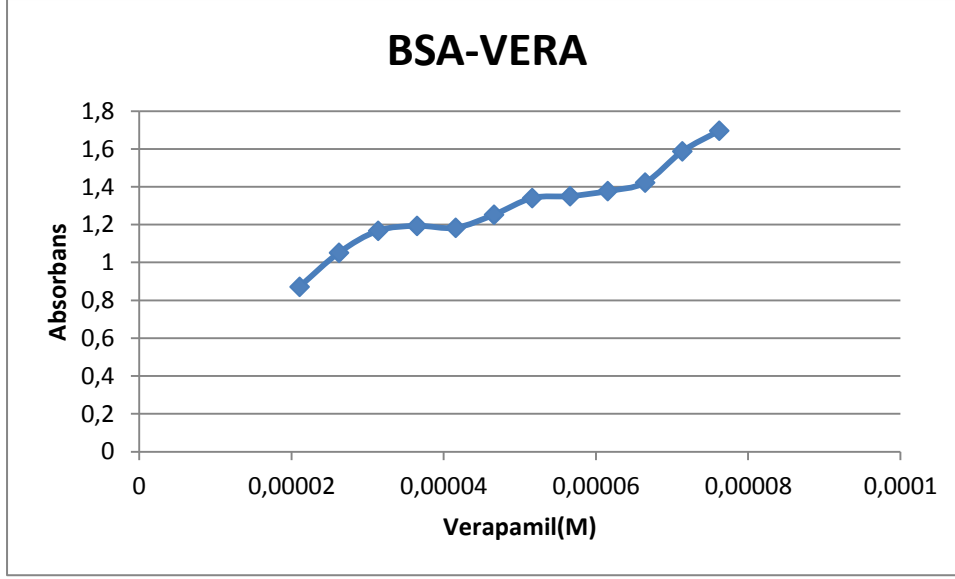
Şekil 3.11'de 260 nm dalga boyunda ölçüm alınarak oluşturulan DNA-Verapamil etkileşim grafiğinde Verapamil'in derişiminin 1,6 mM'a kadar arttırılmasına rağmen herhangi bir değişim olmamıştır. Bu durum Verapamil'in DNA ile etkileşime girmediğini açıkça göstermiştir.

3.2.2 Verapamil'in BSA'ya Bağlanma Aktivitesi

UV-Vis spektrofotometre ile analizi yapılan BSA-Verapamil absorbans grafiği spektrofotometre sonucunda elde edilen verilere göre çizilmiştir (Şekil 3.12). Deney, BSA üzerine Verapamil titre edilerek gerçekleştirilmiştir ve 280 nm'de Verapamil'in BSA ile etkileşime girdiği görülmektedir.



Şekil 3.12 BSA-Verapamil'in absorbans dalga boyu grafiği.



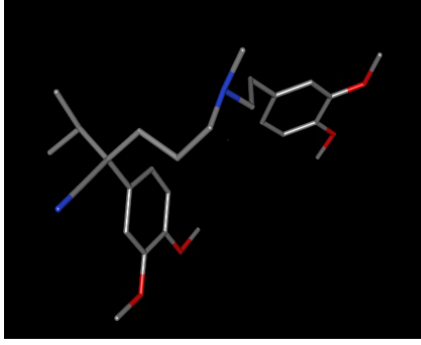
Şekil 3.13 BSA-Verapamil etkileşimine göre oluşturulan grafik.

Şekil 3.13'e bakıldığında etkileşim sonucu absorbans değerlerinde artış görülmektedir. Buna göre bağlanma sabiti değeri (K) = $2,45 \cdot 10^3 M^{-1}$ dir. K tutunma sabitine göre absorbans artışı Verapamil-BSA etkileşimini göstermektedir.

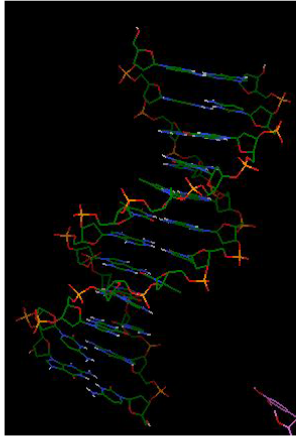
3.3 İN SİLİKO ANALİZİ İLE MODELLEME ÇALIŞMASI

Bağlanma paterni, Verapamil'in bilinen 3D yapısının DNA ile etkileşimini tahmin etmek için AutoDock4.0 kullanılarak analiz edildi. Ligand (verapamil) ve makromolekül (DNA) girdi olarak verildi ve Verapamil'in konformasyonel enerjisini bulmak için esnek yerleştirme yapıldı. Burada çalışan her bir AutoDock4 sadece bir bağlanma konformasyonu öngörmekle kalmaz, aynı zamanda Kcal/mol'de bağlanma serbest enerjisi ve μM 'de tahmini bir inhibitör konsantrasyon (K_i) için bir değer belirtir.

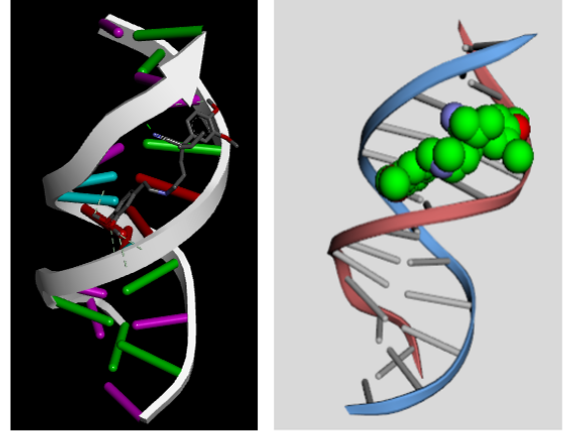
Sonuç olarak, ligand (verapamil) minör oluğa bağlanarak hedef DNA'ya oturmuştur (Şekil 3.14). Verapamil'in bağlanma enerji değeri $-7,3$ 'dir. Hata payını gösteren cIRMS değeri $0,0$ 'dir. Verapamil, DNA'ya 6 yerden hidrojen bağı kurarak bağlanmıştır (Şekil 3.15b) ve minör oluğa oturmuştur. Yerleştirme sonuçlarına göre DC3, DA6, DT7, DG22 ve DT20 nükleotidleriyle etkileşimde bulunulmuştur. Hidrofobik etkileşiminin varlığı da şekil 3.15a'da gösterilmiştir.



(a) Verapamil HCL'nin 3D yapısı

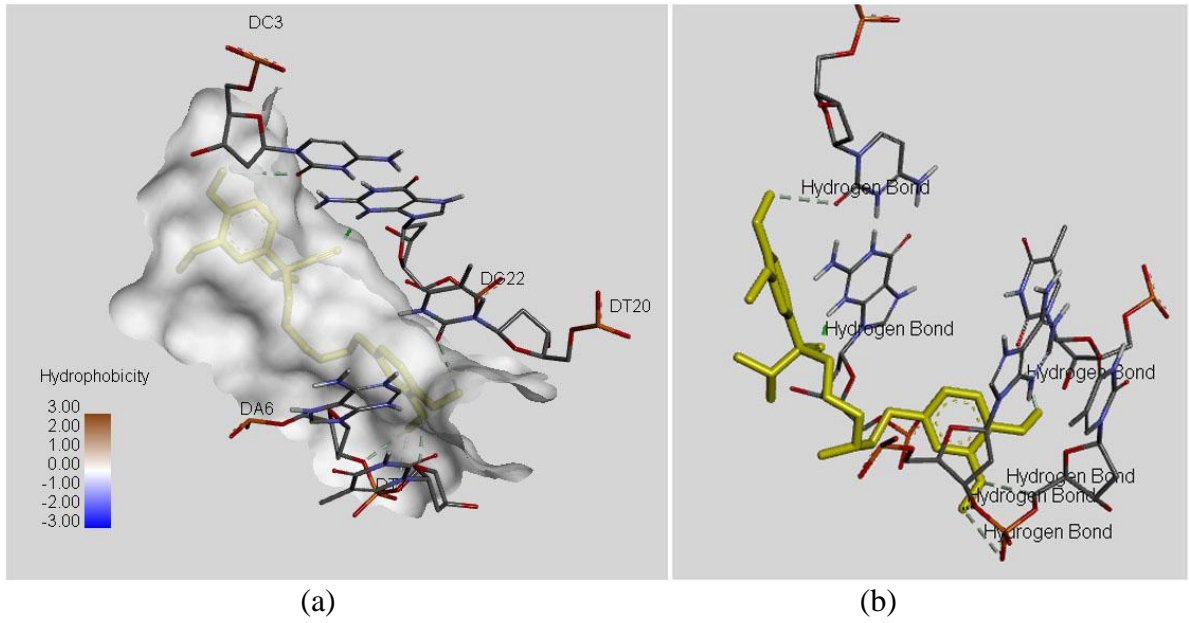


(b) BNA1'in 3D yapısı



(c) Verapamil DNA etkileşiminin in siliko modellemesi

Şekil 3.14 (a) Verapamil HCL'nin pdb formatı; (b) DNA'nın pdb formatı; (c) DNA'nın minör oluk tarafı ile Verapamil'in moleküler yerleştirme perspektifi.

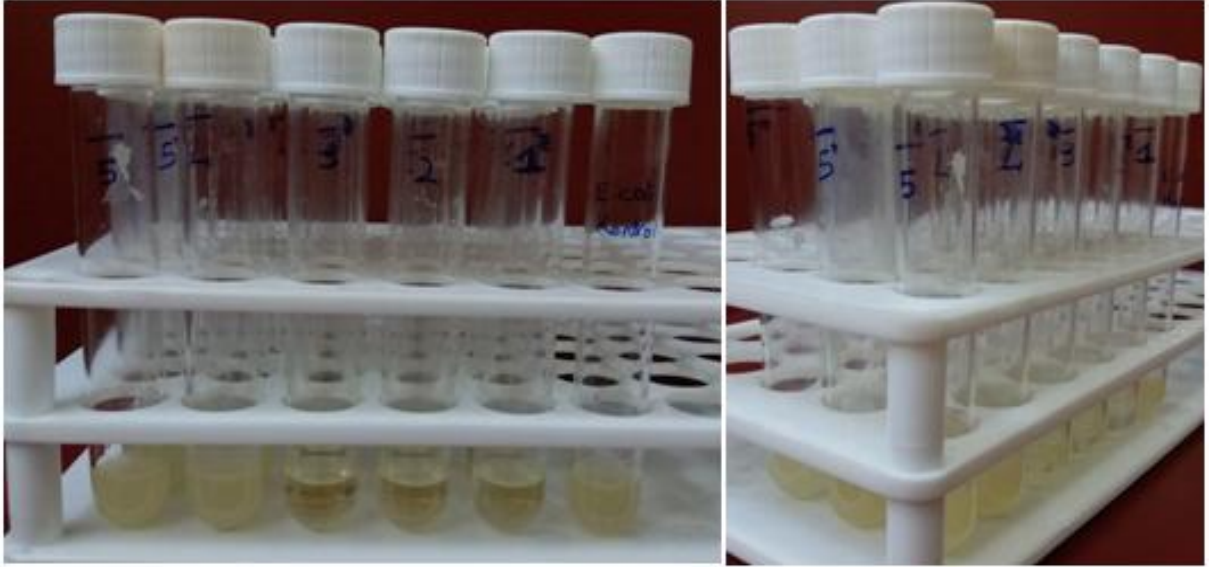


Şekil 3.15 (a) Verapamil HCL ve DNA arasındaki hidrofobik etkileşim; (b) Hidrojen bağlanma etkileşiminin moleküler modellenmesi.

3.4 ANTİBAKTERİYAL ETKİ

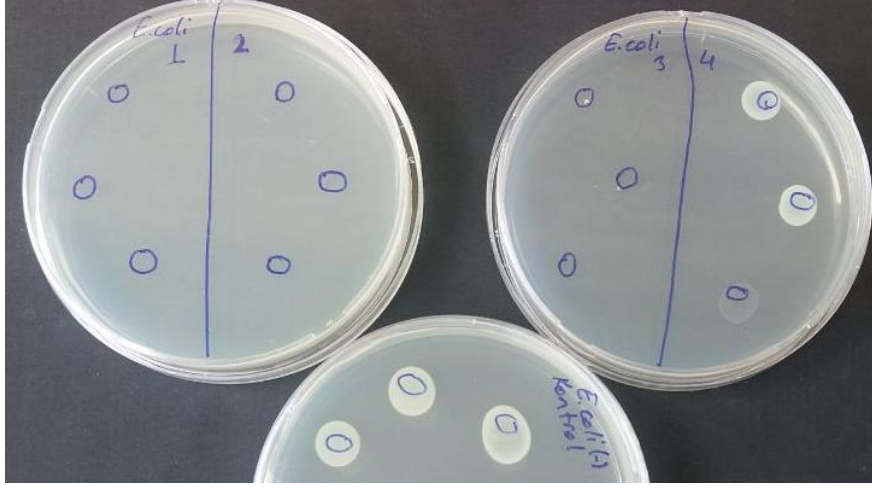
3.4.1 *Escherichia Coli* Üzerine Verapamil'in Etkisi

Sulandırma metodu ile yapılan antibakteriyal deneyi sonuçlarına göre en yoğun olan üç konsantrasyonlarda (25mM – 18mM – 9mM) ilacın antibakteriyal etki göstererek üremeyi durdurduğu saptanmıştır (Şekil 3.16). MIC değeri 3. Tüp (9 mM) olarak belirlendi.



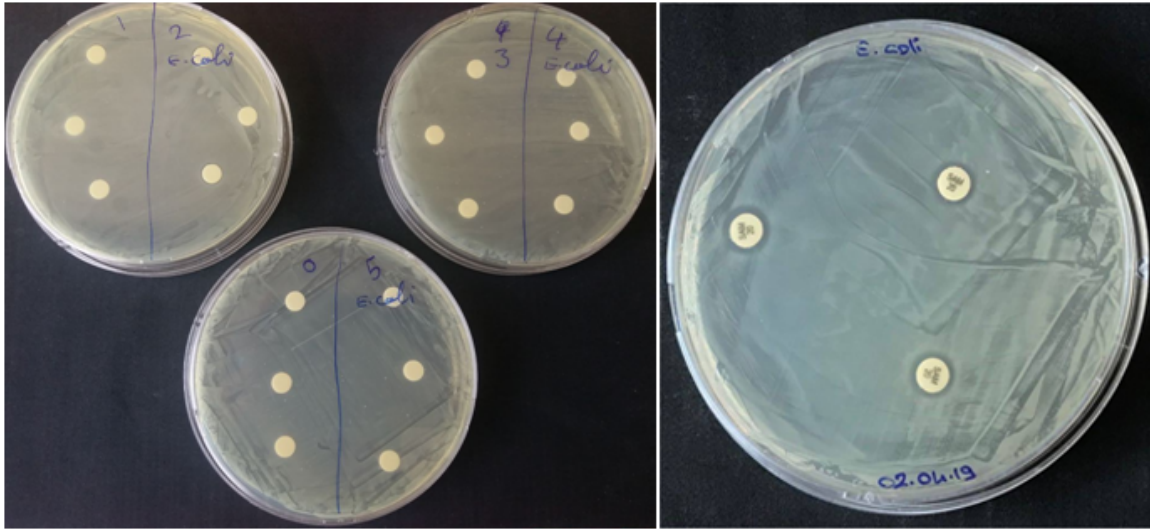
Şekil 3.16 *E.coli* kültürlerine sulandırma metodu ile yapılan antibakteriyal üreme. 5, 4, 3, 2 ve 1. Test tüplerinin konsantrasyonları sırasıyla 0,75 – 1,5 – 9 – 18 – 25 mM'dır. Kontrol tüpünde ilaç bulunmamaktadır. Deney üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

MBC değerini belirlemek için ise 1. 2. ve 3. test tüplerinden numune alınarak katı besiyerine ekim yapıldı. 3. test tüpündeki derişim bakteri hücrelerini öldürdüğü (Şekil 3.17) için 9mM MBC değeri olarak kabul edilmiştir.

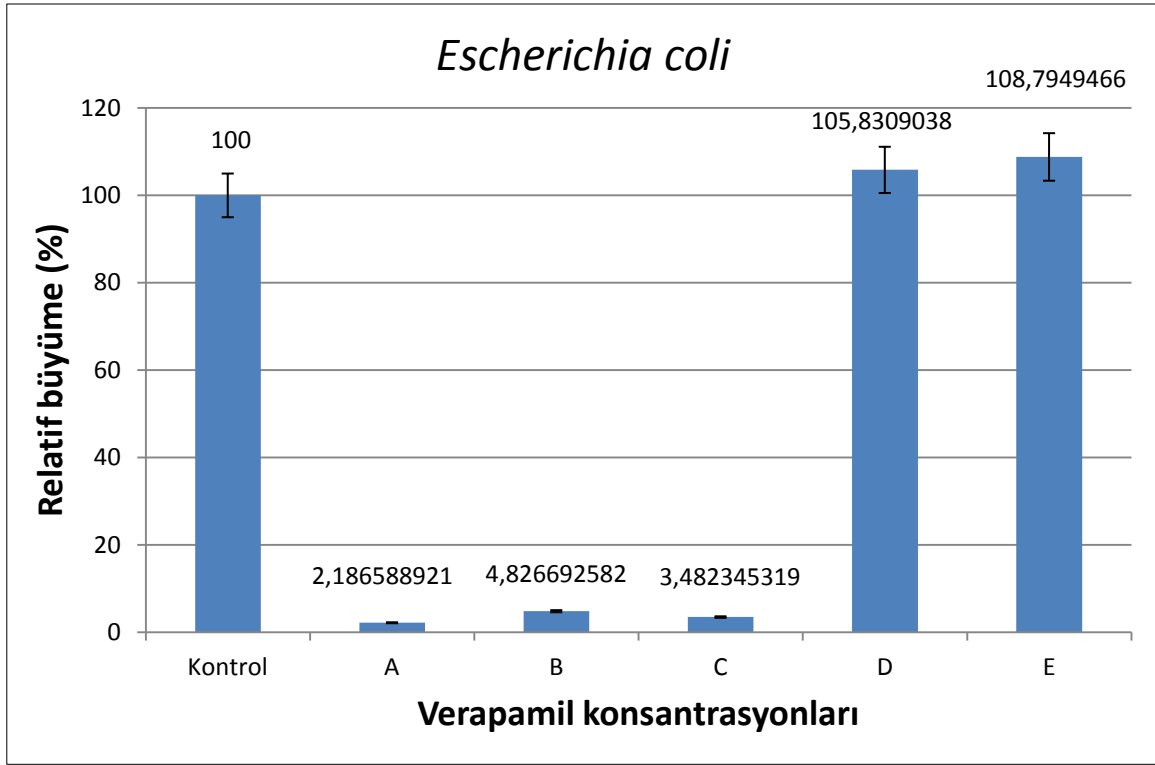


Şekil 3.17 *E.coli*'nin MBC değerini belirlemek için yapılan katı besiyeri.

Disk difüzyon metodu ile yapılan deneyde Verapamil'in konsantrasyonlarını içeren disklerin etrafında zon görülmemiştir (Şekil 3.18). Steril boş diskler kullanarak Mueller Hinton agara ekilen *Escherichia coli* hücrelerinin büyümesi 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan bölgelerde bulunan disklerin üzerine sırasıyla 0 – 0,75 – 1,5 – 9 – 18 – 25 mM Verapamil konsantrasyonları eklenmiştir. Bu nedenle Verapamil'in Mueller Hinton katı besiyerinde *E.coli* üremesine karşı antibakteriyal etki göstermediği anlaşılmıştır.

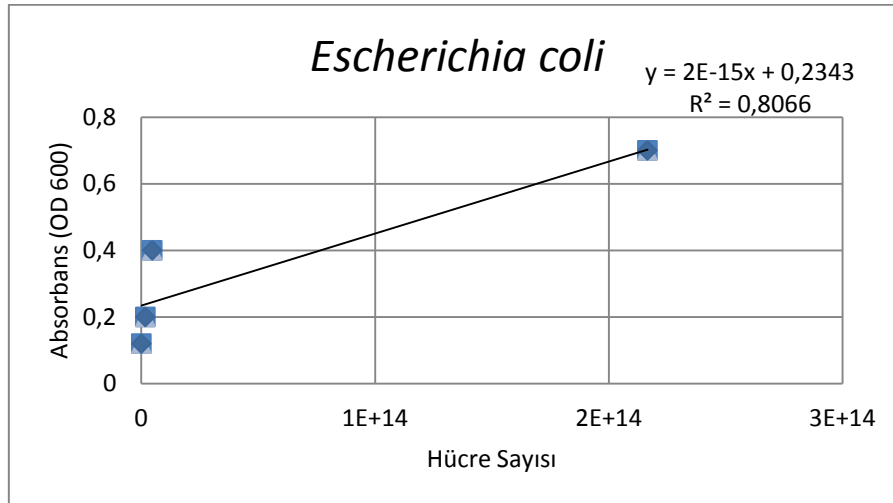


Şekil 3.18 Disk metodu ile *E.coli* üzerinde antibakteriyal üreme. Sağdaki resim farklı konsantrasyonlarda Verapamil ile muamele edilmiş, sol resimde kontrol olarak (amfisilin) kullanılmıştır.



Şekil 3.19 Farklı Verapamil konsantrasyonları içeren besiyeri ortamlarında *Escherichia coli*'nin relatif büyümesi. A, B, C, D, E sırasıyla 25 – 18 – 9 – 1,5 – 0,75 mM'dır.

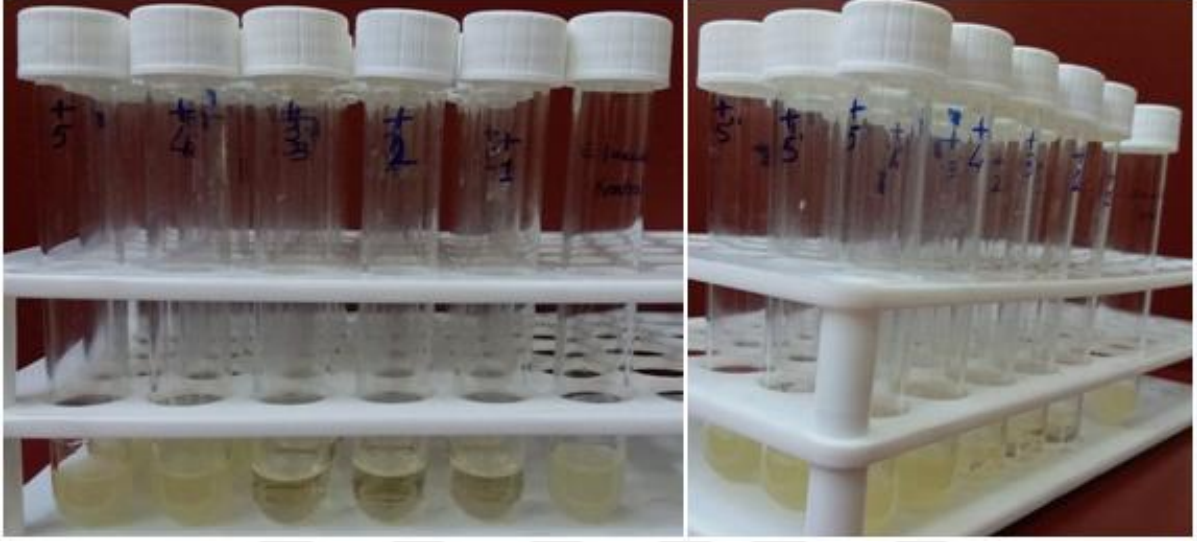
Şekil 3.19'te 25 mM ilaç konsantrasyonu *Escherichia coli* üremesini %92 engellerken 18 mM ve 9 mM konsantrasyonlarında bu oran %96 - %97 arasındadır. %100'lük kontrol sütununda *E.coli* bakteri sayısı $9,118E+14$ olarak belirlenmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3.20 *Escherichia coli* suşunun standart üreme grafiğidir.

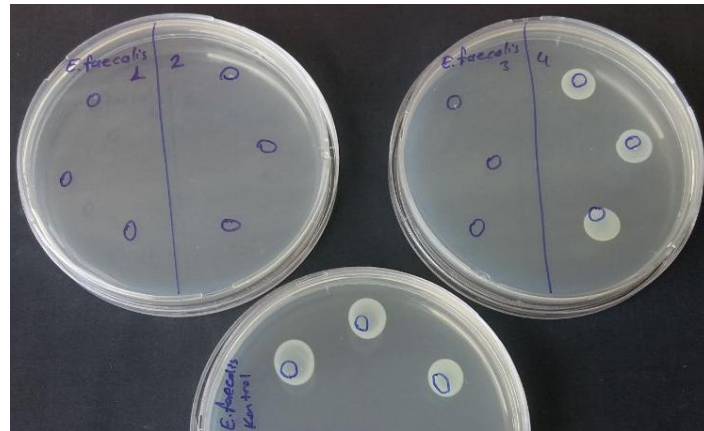
3.4.2 *Enterococcus Faecalis* Üzerine Verapamil'in Etkisi

Sulandırma metodu ile yapılan antibakteriyal deneyi sonuçlarına göre en yoğun olan konsantrasyonlarda (25mM – 18mM – 9mM) ilacın antibakteriyal etki göstererek üremeyi durdurduğu saptanmıştır (Şekil 3.21). MIC değeri 3. Tüp (9 mM) olarak belirlendi.



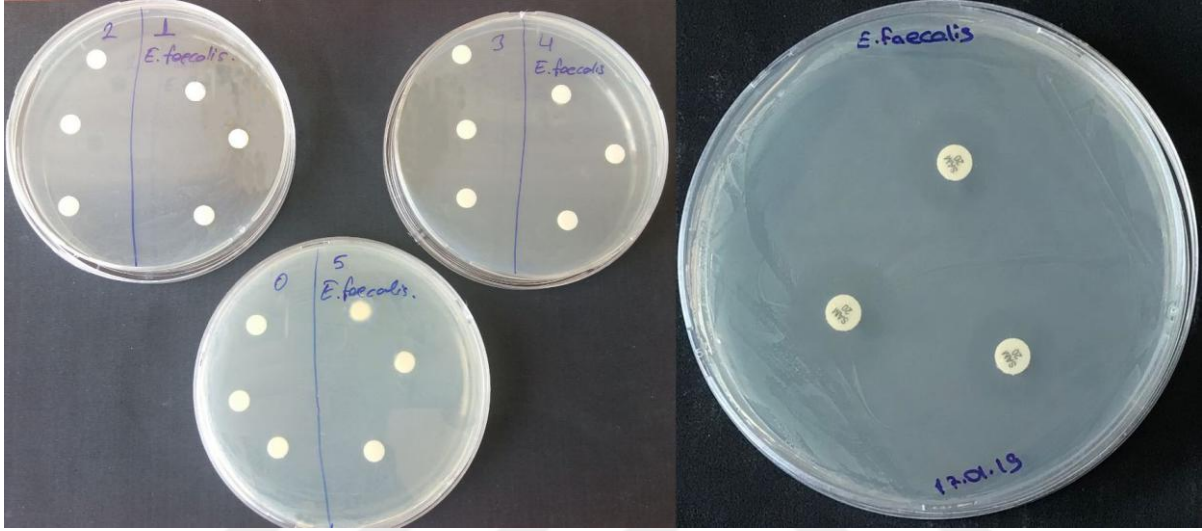
Şekil 3.21 *E. faecalis* kültürlerine sulandırma metodu ile yapılan antibakteriyal üreme deneyi. 5, 4, 3, 2 ve 1. Test tüplerinin konsantrasyonları sırasıyla 0,75 – 1,5 – 9 – 18 – 25 mM'dır. Kontrol tüpünde ilaç bulunmamaktadır. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

MBC değerini belirlemek için ise 1. 2. ve 3. test tüplerinden numune alınarak katı besiyeri ekimi yapıldı. 3. test tüpündeki derişim bakteri hücrelerini öldürdüğü (Şekil 3.22) için 9 mM MBC değeri olarak kabul edilmiştir.

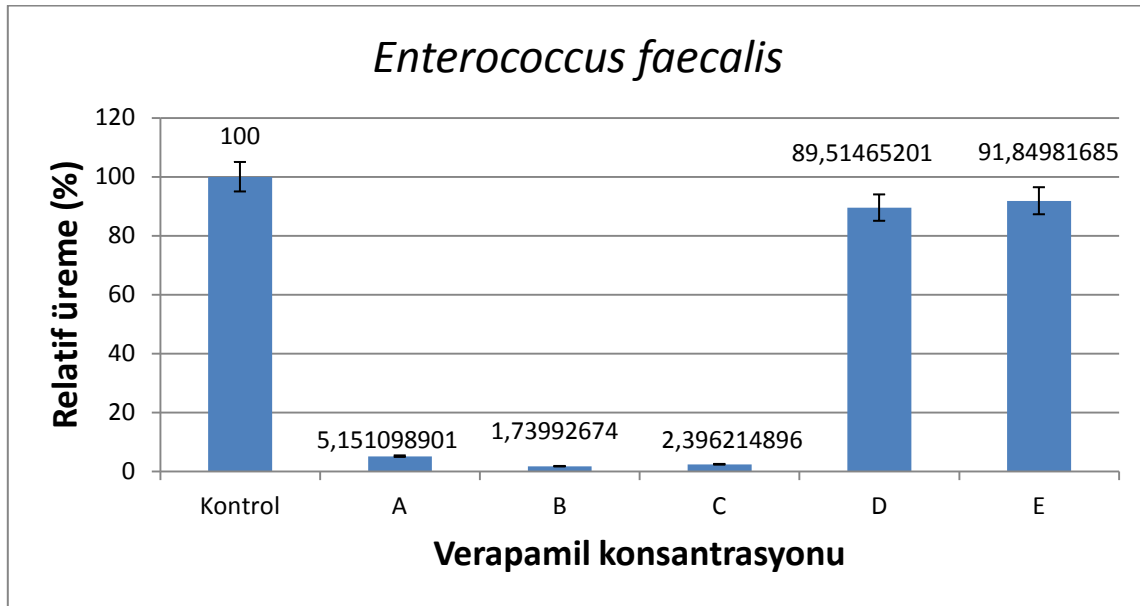


Şekil 3.22 *E. faecalis*'in MBC değerini belirlemek için yapılan katı besiyeri.

Disk difüzyon metodu ile yapılan deneyde Verapamil konsantrasyonlarını içeren disklerin etrafında zon görülmemiştir. Şekil 3.23’de steril boş diskler kullanarak Mueller Hinton agar ekilen *Enterococcus faecalis* hücrelerinin büyümesi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan bölgelerde bulunan disklerin üzerine sırasıyla 0 – 0,75 – 1,5 – 9 – 18 – 25 mM Verapamil konsantrasyonları eklenmiştir. Böylece Verapamil’in Mueller Hinton katı besiyerinde *E.faecalis* üremesine karşı antibakteriyal etki göstermediği anlaşılmıştır.

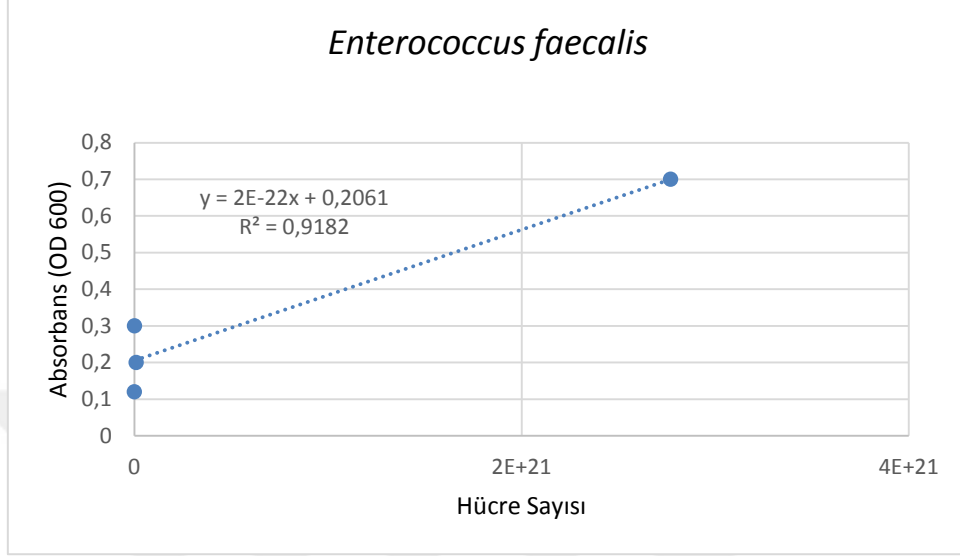


Şekil 3.23 Disk metodu ile *E.faecalis* üzerinde antibakteriyal üreme. Sağdaki resim farklı konsantrasyonlarda Verapamil ile muamele edilmiş, sol resimde kontrol olarak (amfisilin) kullanılmıştır.



Şekil 3.24 Farklı Verapamil konsantrasyonları içeren besiyeri ortamlarında *Enterococcus faecalis*'nin relatif büyümesi. A, B, C, D, E sırasıyla 25 – 18 – 9 – 1,5 – 0,75 mM'dır.

Şekil 3.24’de 25 mM ilaç konsantrasyonu *Enterococcus faecalis* üremesini %95 engellerken 18 mM ve 9mM konsantrasyonlarında bu oran %92-97 arasındadır. %100’lük kontrol sütununda *E.faecalis* bakteri sayısı 9,88E+21 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25 *Enterococcus faecalis* suşunun standart üreme grafiği.

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Bu çalışmada, *in vitro* ortamda Verapamil'in farklı bakır ve demir konsantrasyonları tarafından indüklenen pUC19 plazmid DNA zincir kırılması üzerindeki etkisini açıklıyoruz. DNA ve proteinler reaktif oksijen bölgeleri tarafından üretilen serbest radikallere karşı hassastırlar. Örneğin, OH radikali, bir hidrojen atomunun DNA omurgası boyunca deoksiribozlardan çıkarılmasıyla DNA parçalanmasının başlatıcısı olarak kabul edilir. Küçük boyutu nedeniyle radikal hidroksil hızla yayılır ve daha sonra DNA moleküllerini herhangi bir pozisyonda böler. Böylece DNA zincirinde kırıklıklar ve hasar meydana gelir. DNA çift zincir konformasyonunun bozulması, azot bazlarının kimyasal modifikasyonu gibi farklı seviyelerde yapısal hasara uğrayabilir (Cervantes-Cervantes vd. 2005). Serbest radikaller kanser gibi birçok hastalığa yol açmaktadır. Antioksidanlar ise hasar öncesi radikal oluşumunu önlemelerinin yanında, oluşmuş oksidatif hasarı onararak, çeşitli reaktif ara ürünleri nötralize eder ve okside biyomoleküllerin indirgenmesini sağlarlar (Süleyman vd. 2018). DNA hasarının, süpersarmal pUC19 plazmid DNA'sının açık dairesel ve doğrusal DNA formlarına dönüştürülmesiyle ölçülebileceği bilinmektedir. Hasar görmemiş pUC19 plazmid DNA'sı süpersarmal formda, tek zinciri hasar görmüş olan pUC19 plazmid DNA'sı açık halkasal formda ve son olarak her iki zincirde de hasar meydana gelmiş olan plazmid DNA doğrusal formda bulunur (Jun vd. 2007). Tüm bu bilgilerden yararlanarak DNA üzerinde ki hasar potansiyeli pUC19'un elektroforez jel görüntüleri okunarak belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda analiz edilen plazmid DNA'nın agaroz jel elektroforezi, etidyum bromür ile boyandıktan sonra bir UV aydınlatıcı altında incelenerek pUC19 DNA'nın kırılma etkinliği, Verapamil'in bakır ve demir varlığında süpersarmal DNA'yı (SC) açık dairesel forma (OC) ve doğrusal forma (L) dönüştürme yeteneğiyle belirlenmiştir. Bu araştırmada süpersarmal pUC19 plazmid DNA Verapamil ile etkileşim göstermemiştir. İnsan plazmasındaki Verapamil derişimi 0,09 – 0,36 mg/l'dir. Verapamil'in molar konsantrasyonu (5 - 1,85 - 0,185 - 0,0185 - 0,00185 - 0,000185 mM) insan plazmasındaki derişime göre hesaplanmıştır (Winek vd. 2001). Ayrıca Verapamil konsantrasyonunun insan plazmasında

süpersarmal DNA'yı kırmadığı belirlenmiştir. Verapamil'in DNA üzerine oksidatif hasara sebep olacak bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda alınan Verapamil ile saf DNA muamele edilmiş ve bunun sonucunda Verapamil'in tek başına çift zincirli süper sarmal pUC19 plazmis DNA üzerinde bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Verapamil, ne indirgeyici bir ajan olan askorbik asit ile ne de oksitleyici bir ajan olan hidrojen peroksit ile DNA üzerinde hasara neden olmamıştır. Hidrojen peroksit (H_2O_2), zayıf bir oksitleyici ajandır. Hücre zarını gizlice geçebilir; Hücre içinde olduktan sonra, hidroksil radikalleri oluşturmak için Fe(II) ve Cu(II) iyonları ile reaksiyona girebilir ve böylece oksidatif stres oluşumuna yol açarak hücre hasarına sebebiyet verebilir (Golla ve Bhimathati 2014). H_2O_2 ve FeII molaritesinin yapılan literatür taraması sonucunda sırasıyla 5-25 mM ve 1mM olarak kullanılmış olduğu belirlenmiştir (Li vd. 2018). Buna göre çalışmada kullanılan H_2O_2 oranı 6 mM ve FeII oranı 1,5 mM olarak ayarlanmıştır. Verapamil'in pUC19 plazmid DNA'sını Fenton reaktifi tarafından üretilen hidroksil radikallerinin zararlı etkilerinden koruyabilme kabiliyetinin belirlenmesi için yapılan çalışma sonucunda Verapamil'in oksidatif hasarı koruyucu veya indükleyici bir etki göstermediği anlaşılmıştır. Bakır canlı organizmalarda en bol bulunan ikinci geçiş metalidir ve askorbik asit gibi redoks ajanlarının varlığında askorbik asit ve CuII kombinasyonu ile etkili bir şekilde $\cdot OH$ üreterek oksidan üretimini artırır. Askorbik asit ile CuII tepkimeye girdiğinde $\cdot OH$ ve CuI'in olduğu önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Hsu ve Li 2002, Yokawa vd. 2011). Bu durum Cu(II)/Cu(I) redoks tepkimesi ve Asa/Cu(II) tarafından desteklendiğinde ciddi anlamda DNA zincir kırıklıklarına sebebiyet vermektedir (Subramaniam vd. 2015). Giriş kısmında bahsedilen Amiloid-bpeptid (Ab) mevcudiyetinde metal kaynaklı reaktif oksijen türleri aktif olarak $\cdot OH$ üretimini indükleyebilmektedir (Cheignon vd. 2016) ancak Verapamil'in böyle bir aktivitesi görülmemektedir. Ayrıca Asa/Cu(II) aracılı DNA hasarına karşıda Verapamil'in koruma yeteneği bulunmamıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, reaktif oksijen bölgeleri tarafından pUC19 DNA'sına verilen hasarların kapsamının ve niteliğinin, üretici sisteme ve kendi başına biyomoleküllere zarar vermeyen bir metal iyonu olan Cu (II)'nin varlığına bağlı olduğunu göstermektedir. Bakır, hücrelerde bulunan en redoks aktif metal iyonlarından biridir ve kromatin ile yakından ilişkilidir (Li vd. 2012). H_2O_2 , Cu (II)/Asc ve Cu (II), DNA üzerinde büyük bir etkiye neden olduğu Cerventas vd. (2005) yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca demir ve bakır iyonları, Haber-Weiss ve/veya Fenton reaksiyonları yoluyla reaktif oksijen türlerinin oluşmasına yol açabilir (Letelier vd. 2010). Milosevic vd. (2012) Mikronükleus testi ve Fish yöntemi kullanarak Verapamil ilacının insan lenfositleri üzerine etkisini araştırdıkları çalışma sonucunda Verapamil'in yüksek dozda sitotoksik etkisinin olduğunu

göstermişlerdir. Bu nedenle, İn vitro ortamda gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışma metabolizmaya girmemiş olan Verapamil'in DNA'ya zarar verememesine atfedilecek sonuçlar kapsamına uygun değildir (Singh vd. 1994). Böylece Verapamil metabolitlerinin, DNA ve mikrotübül proteinleri üzerindeki etkilerini analiz etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

UV-Vis tarama yöntemiyle incelenen Verapamil-DNA etkileşimlerinde Verapamil'in DNA'ya bağlanmadığı şekil 3.10'da Verapamil'in ayrı DNA'nın ayrı pik vermesiyle ortaya çıkmıştır. Bu sonuca göre DNA 260nm de pik vermiş ki bu DNA'nın pik değeridir. Verapamil ise 230-235nm dalga boylarında pik vermiştir. Bu dalga boylarında Verapamil'in kendi dalga boylarıdır. Her iki maddede de hiçbir değişim gözlenmemiştir. Bu nedenle zayıf bağlanma eğilimini ifade eden (K) bağlanma sabitine göre 2.1 numaralı denkleme veriler girildiğinde sonuç anlamsız ve negatif çıkmaktadır. Verapamil DNA'ya bağlanmadığı için denklem bize sağlıklı bir K sabiti değeri verememektedir. Verapamil DNA ile etkileşime girmemesine rağmen BSA proteinine tutunmuştur. Bu durum şekil 3.12'de BSA-Verapamil absorbans-dalga boyu grafiğinde açıkça görülmektedir. (2.1) numaralı denkleme göre veriler yerine yazıldığında Verapamil'in BSA proteinine bağlanma sabiti (K) : $2,45 \cdot 10^3$ bulunur. Bu durum doğrusal çıkan Verapamil-BSA absorbans grafiği (Şekil 3.13) ile desteklenmektedir. Nitekim Verapamil BSA proteini ile etkileşime girerek BSA proteininin yapısını bozmuş ve absorbans değerinin yükselmesine sebep olmuştur.

İN siliko çalışmasında van der waals (VDW) enerjilerinin pozitif değeri ligandın aktif bölgeye iyi uymadığını gösterir (Hemachandran vd. 2016). Ancak çalışmanın sonucunda, VDW kuvvet enerjilerinin, DNA molekülüne iyi uyan Verapamil için oldukça negatif olduğu gösterilmektedir. Sonuç olarak Verapamil'in DNA'ya bağlanma potansiyeli vardır ve DNA'ya yönelik Verapamil çalışmalarının artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda Verapamil'in en yoğun üç derişimi *E.coli* üzerinde ciddi bir antibakteriyal etki göstermiştir. Ülseratif kolitli hastalarda eklem bulgularının klinik ve laboratuvar özelliklerinin incelendiği çalışmada; eklem tutulumlu ülseratif kolit hastalarının bağırsak floralarında azalmış miktarda *Escherichia coli* bakterilerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bağırsak mikroflora kompozisyonunun immunitiyi değiştirmek yolu ile ülseratif kolitli hastalarda eklem tutulumuna yol açtığı ortaya çıkmaktadır (Koca 2015). Düşük doz Verapamil alımlarında (1,5 ve 0,75 mM) *E.coli* üremesi üzerine antibakteriyal etki

görülmemiştir. Aksine kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %5 ve %8 oranlarında *E.coli* üreme miktarlarında artış görülmektedir. *E.coli* tarafından ifade edilen kolisin proteinleri benzer türlerdeki bakteriyel büyümeyi inhibe ederler (Omerovic vd. 2017). *E.coli* miktarındaki bu artış kollisin protein miktarında da artışa sebep olacağı için bağırsak homoestazını bozması kaçınılmaz bir durumdur. Çalışma sonucuna göre ise yüksek doz Verapamil kullanımının *E.coli* hücrelerini öldürdüğü, düşük doz Verapamil kullanımının ise *E.coli* üremesini arttırdığı görülmektedir. Ayrıca gram pozitif bakteri olarak kullanılan *E.faecalis* büyümesi üzerine Verapamil'in etkisi incelendiğinde yüksek dozdan düşük doza kadar tüm doz aralıklarında *E.faecalis* bakterilerinin üremesinin engellendiği görülmüştür. Sonuçlarımıza göre en yoğun üç ilaç derişiminin *E.faecalis* üzerinde antibakteriyal etkisi oldukça yüksektir. 1,5 ve 0,75mM derişimlerinin etkisi ise ilaç yoğunluğuna bağlı olarak azalmıştır. Ancak yinede %11-%9 arasında antibakteriyal etki göstermiştir (Şekil 3.24). MIC değeri olarak üremenin olmadığı en düşük derişime sahip olan deney tüpü kabul edilirken MBC değerini belirlemek için üremenin görülmediği tüm deney tüplerinden numuneler alınarak Mueller Hinton katı besiyerine ekim yapılmıştır. Böylece bakteri üremeleri engellenen suşlar katı besiyerinde kendini gösterecektir fakat Verapamil derişimi bakteri suşlarını öldürmüştürse katı besiyerinde üreme görülmeyecektir. Bu şekilde bakteri suşlarını öldüren minimum derişim 9mM olarak belirlenmiştir. Verapamil bu iki bakteri suşlarının normal büyüme süreçlerini etkileyerek bağırsak homoestazında bozulmaya yol açar. Bu durum gastrointestinal sistemde dengenin bozulmasına yol açarak disbiyoz oluşumuna neden olmaktadır. Disbiyoz oluşumu ise mikrobiyotanın yapısında herhangi bir nedenle meydana gelen değışim veya bozulma olarak bilinir. Böylece kişide ciddi metabolik ve inflamatuvar rahatsızlıkların ortaya çıkması ve birçok hastalığın oluşmasına zemin hazırlanması kaçınılmazdır (Süzük 2015). Disk difüzyon metoduyla yapılan çalışmada Verapamil'in bakteri suşlarına karşı antioksidatif bir etki göstermediği ortaya çıkmıştır. Sıvı ortamda Verapamil antioksidatif etkisini gösterirken katı besiyeri ortamında disk difüzyon yöntemiyle herhangi bir etki görülmemiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ

Kalp ilacı olan Verapamil'in, DNA ile etkileşiminin *in vitro* ve *in siliko* analizinin ayrıca insan flora bakterileri üzerine olan etkisinin araştırıldığı bu çalışmada kayda değer bulgular elde edilmiştir. Bulgular, Verapamil'in DNA ile etkileşiminin incelendiği elektroforez jel çalışmalarında Verapamil'in DNA üzerine doğrudan veya dolaylı olarak bir etki göstermediği açıklamaktadır. Ancak makromolekül (DNA) ve ligand (verapamil) etkileşimini simülasyon ortamında gerçekleştiren *in siliko* çalışmasına göre Verapamil'in 6 hidrojen bağı kurarak DNA'nın minör oluklarına bağlanabileceği tespit edilmiştir. Verapamil'in insan bağırsak flora bakterileri üzerine olan antibakteriyal etkisinin ise ciddi boyutta yüksek olduğunu göstermiştir. *In vitro* ortamda gerçekleştirilen bu deneylerin antibakteriyal etki dışında hücre üzerine olan olumsuz etkilerinin belirlenmesi amacıyla ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca Verapamil'in DNA ile ilgili çalışmalarının ilave yöntemlerle desteklenmesine hatta Verapamil metabolitlerinin DNA etkileşiminin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Ahmad J L, Okebaram C C and Samaila A** (2016) Cytotoxic Effect Of Verapamil On Human Embryonic Kidney Cell Line. *IJSTR*, 5(12): 83-87.
- Akın İ** (2014) Demir, Bakır Ve Krom Direnci Gösteren Bakterilerin Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması Ve Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Adı, Kırıkkale, 123.
- Akıncı E ve R Köylü** (2013) Verapamil Poisoning, the Importance of Intravenous Lipid Therapy: Case Report/Verapamil Zehirlenmesi, Intravenöz Lipid Tedavisinin Önemi: Olgu Sunumu. *Akademik Acil Tıp Olgu Sunumları Dergisi*, 4(3): 130.
- 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, 54.
- Alataş Z** (2011) Bupleurum lancifolium Hornem Türünün Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Konya, 65.
- Alp Ç, Karahan İ ve Kalçık M** (2018) Antihipertansif ilaçların kullanımı ile ilişkili yan etkiler: güncel literatürler eşliğinde gözden geçirme. Adverse reactions associated with the use of antihypertensive drugs: review in the light of current literature. *Turkish Journal Of Clinics and Laboratory*, 9(4): 342-347.
- Altınışık M** (2006) Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. Tıp Fakültesi Biyokimya AD eğitim semineri, Aydın.
- 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, 69.
- Arısoy M** (2013) Yeni 2,5-Disüstitübenzoksazol Türevlerinin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması, Antimikrobiyal Etkileri ve Moleküler Modelleme Çalışmaları. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 226.
- 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, 146.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Barko P, McMichael M, Swanson K and Williams D** (2018) The gastrointestinal microbiome: a review. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(1): 9-25.
- Biçen M** (2011) Experimental And Computational Studies Of Interactions Between Small Molecules And Dna. *Master Thesis*, Marmara University, Institute For Graduate Studies In Pure And Applied Sciences, Department Of Chemistry, İstanbul, 74.
- Bozok T, Şimşek T, Kömür S and Ulu A** (2014). Normal mikrobiyal floranın insan sağlığı üzerine etkisi ve insan mikrobiyom projesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23(3): 420-426.
- Cerniglia C E, and Kotarski S** (1999) Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 29(3): 238-261.
- Cervantes C, 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.
- Cheignon C, Faller P, Testemale D, Hureau C and Collin F** (2016) Metal-catalyzed oxidation of A β and the resulting reorganization of Cu binding sites promote ROS production. *Metallomics*, 8(10): 1081-1089.
- Çetinbaş S, Kemeriz F, Göker G, Biçer İ ve Veliöğlü Y S** (2017) İnsan Mikrobiyomu: Beslenme ve Sağlık Üzerindeki Etkileri. *Akademik Gıda*, 15(4): 409-415.
- Davis J D and Lin S Y** (2011) DNA damage and breast cancer. *World journal of clinical oncology*, 2(9): 329.
- Dinçer Y ve Kankaya S** (2010) DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 30(4): 1365-1373.
- Doğantekin E, Doğantekin A ve Aşçı Toraman Z** (2013) Tigesiklinin E.coli ve Klebsiella spp. Suşlarına Karşı İnvitro Etkinliğinin Araştırılması. *Van Tıp Dergisi*, 20(3): 145-149.
- Dorraji P S and Jalali F** (2013) Investigation of the interaction of sertraline with calf thymus DNA by spectroscopic methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(6): 939-945.
- Eken A** (2017). Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 69-73.
- Evans Jr and Evans D G** (1996) Escherichia coli in Diarrheal Disease. *Medical Microbiology*, 4th edition, University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Gökçe C** (2012) Bazı Geçiş Metallerinin Yeni Hidrazon Schiff Bazı Ligandları İle Koordinasyon Bileşiklerinin Hazırlanması, Yapılarının Aydınlatılması, DNA

KAYNAKLAR (devam ediyor)

Etkileşimlerinin Ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Muğla, 120.

Grujicic D, Djordjevic O M, Arsenijevic S and Marinkovic D (2007) The Effect of Combined Therapy with Ritodrine, Erythromycin and Verapamil on The Frequency of Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes of Pregnant Women. *Clinical and experimental medicine*, 7(1): 11.

Gürsoy O, Kınık Ö ve Gönen İ (2005) Probiyotikler ve Gastrointestinal Sağlığa Etkileri. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 35: 136-148.

He Q, Hou Q, Wang Y, Li J, Li W, Kwok L-Y, Sun Z, Zhang H and Zhong Z (2018) Comparative Genomic Analysis of Enterococcus Faecalis: Insights into Their Environmental Adaptations. *BMC Genomics*, 19(1): 527.

Hemachandran H, Anantharaman A, Priya R R, Doss G P and Siva R (2016) Interaction of Catechu Dye with DNA: Spectroscopic and in Silico Approach. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 35(4): 195-210.

Hsu C S and Li Y (2002) Aspirin Potently Inhibits Oxidative DNA Strand Breaks: Implications for Cancer Chemoprevention. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(2): 705-709.

Jun T, Liancai Z and Bochu W (2007) Effects of Quercetin on DNA Damage Induced By Copper Ion. *International Journal of Pharmacology*, 3(1): 19-26.

Kelly M (2008) Analysis of Oxidative Damage to DNA Mediated by Transition Metal-Fenton Reactions. *PhD Thesis*, Dublin City University, Department of Philosophy, Dublin, 235.

Koca T (2015) Bağırsak Mikroflorasının İnflamatuvar Hastalık Patogenezindeki Yeri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24(1): 78-91.

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.

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, 131.

Kaya E, Yılmaz S, Çeribaşı A O and Telo S (2019) Protective Effect of Lycopene on Diethylnitrosamine-Induced Oxidative Stress and Catalase Expression In Rats. *Liver*, 3: 17.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Li Y, Zheng Y, Zhang Y, Xu J and Gao G** (2018) Antioxidant Activity of Coconut (Cocos nucifera L.) Protein Fractions. *Molecules*, 23(3): 707.
- 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.
- Milošević-Djordjević O, Grujić D, Joksić G and Marinković D** (2011) In Vitro Evaluation of The Genotoxicity of Ritodrine and Verapamil in Human Lymphocytes. *Human & Experimental Toxicology*, 30(5): 398-405.
- Müftüoğlu M** (2003) Dna Tamiri ve Erken Yaşlanma Sendromları. *Turk J Biochem* 28(1): 20-24.
- Omerovic M, Müştak H K and Kaya İ B** (2017) Escherichia coli Prototiplerinin Virülans Faktörleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1): 1-6.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G ve Yönden Z** (2015) Oksidatif Stres ve Hücre İçi Lipit, Protein ve DNA Yapıları Üzerine Etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3).
- Özden A** (2005) Gastro-İntestinal Sistem ve Probiyotik Prebiyotik Synbiyotik. *Güncel Gastroenteroloji*, 9(3): 124-133.
- Rivas L, Dykes G A and Fegan N** (2006) Attachment of Shiga Toxigenic Escherichia Coli to Beef Muscle and Adipose Tissue. *Journal of Food Protection* 69(5): 999-1006.
- 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.
- Schiller C, Fröhlich C P, Giessmann T, Siegmund W, Mönnikes H, Hosten N and Weitschies W** (2005) Intestinal Fluid Volumes And Transit Of Dosage Forms As Assessed By Magnetic Resonance Imaging. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22(10): 971-979.
- Sezer K ve Keskin M** (2014) Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Dergisi*, 28(1): 49-56.
- Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B and Basit A W** (2008) The Gastrointestinal Microbiota as A Site for The Biotransformation of Drugs. *International Journal Of Pharmaceutics*, 363(1-2): 1-25.
- 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)

- Su E** (2015) Oksijen Köprülü İki Çekirdekli Mn(II) Antranilik Asit Ve 4-Floro Benzoik Asit Komplekslerinin Sentezi, Katalaz Ve Dna Bağlanma Aktivitelerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Eskişehir, 85.
- Subramaniam S, Vohra I, Iyer A, Nair N K and Mitra I** (2015) A Paradoxical Relationship Between Resveratrol and Copper (II) With Respect to Degradation of DNA and RNA. *F1000Research*, 4: 1-10.
- 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.
- Süleyman, H., Gül V. ve Erhan Ö. Ü. E.** (2018) Oksidatif Stres ve Doku Hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi*, 1(1): 1-4.
- Süzük S** (2015) Helicobacter pylori Tedavisinin Mikrobiyota Üzerine Etkisi, *Doktora Tezi*, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 128.
- Topalã T, Bodoki A, Oprean L and Oprean R** (2014) Experimental Techniques Employed in the Study of Metal Complexes-DNA-Interactions. *Farmacia* 62(6): 1049-1061.
- Toptancı B Ç, Kızıl G ve Kızıl M** (2016) 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, 71.
- Uysal Z** (2007) Hepsidin ve Demir Metabolizması. *Türk Hematoloji Derneği*, 6: 9-15.
- Valipour R, Yilmaz M B and Valipour E** (baskıda) Study of DNA-Binding Activity and Antibacterial Effect of Escitalopram Oxalate, an Extensively Prescribed Antidepressant. *Drug research*.
- Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M and Mazur M** (2006) Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1): 1-40.
- Wong M S, Chen C W, Hsieh C C, Hung S C, Sun D S and Chang H H** (2015) Antibacterial Property of Ag Nanoparticle-Impregnated N-Doped Titania Films Under Visible Light. *Scientific Reports*, 5: 11978.
- Yazan Y ve Özer Y** (1993) Verapamil. *FABAD Farm. Bil. Der.* (Biyo yararlanım Dosyası / Bioavailability File): 51-56.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Yenil Ö** (2009) Verapamil Hcl'in Nazal Dozaj Formları Üzerine Çalışmalar. *Yüksek Lisans Tezi*. T.C. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 93.
- 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, 106.
- Yıldırım M** (2007) Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen enfeksiyonlar. *Düzce Medikal Journal*, 2: 46-52.
- 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, 263.
- Yi Z C, Liu Y Z, Li H X and Wang Z** (2009) Chebulinic Acid and Tellimagrandin I Inhibit DNA Strand Breaks by Hydroquinone/Cu (II) and H₂O₂/Cu (II), but Potentiate DNA Strand Breaks by H₂O₂/Fe (II). *Toxicology in Vitro*, 23(4): 667-673.
- Yokawa K, Kagenishi T and Kawano T** (2011) Prevention of Oxidative DNA Degradation by Copper-Binding Peptides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75(7): 1377-1379.
- Winek C L, Wahba W W and Balzer T W** (2001) Drug and chemical blod-level data 2001. *Forensic Science International*, 122(2-3): 107-123.

ÖZGEÇMİŞ

Gölsüm Kobra Gümüş 1996'da İstanbul'un Fatih ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Eyüp ilçesinde tamamladı. Eyüp Anadolu İmam Hatip Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2013 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi (ZBEÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne girdi. 2017 yılında Bülent Ecevit Üniversitinde mezun olduktan sonra aynı yıl girdiği BEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programını sürdürmektedir.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres: Sakarya Mahallesi, Karadeniz Caddesi, No:4 Daire: 6

Eyüp, İSTANBUL

Tel: (+90) 535 389 21 94

E-posta: gulsumkubragumus@gmail.com