

**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DEKSAMETAZON İLACININ ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI, DNA'YA BAĞLANMASININ İN VİTRO VE İN SİLİKO ANALİZİ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇAĞLA ASLAN

MAYIS 2019

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEKSAMETAZON İLACININ ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI, DNA'YA BAĞLANMASININ İN VİTRO VE İN SİLİKO ANALİZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağla ASLAN

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Ebrahim VALİPOUR

ZONGULDAK

Mayıs 2019


KABUL:

Çağla ASLAN tarafından hazırlanan “Deksametazon İlacının Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması, DNA' ya Bağlanması ve İn Vitro ve İn Siliko Analizi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir.

27/05/2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ebrahim VALİPOUR

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



Üye : Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

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



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ

Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım./..../2019



Prof. Dr. Ahmet ÖZARSLAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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



Çağla ASLAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DEKSAMETAZON İLACININ ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI, DNA'YA BAĞLANMASININ İN VİTRO VE İN SİLİKO ANALİZİ

Çağla ASLAN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ebrahim VALİPOUR

Mayıs 2019, 77 sayfa

Anti-inflamatuar etki gösteren bir ilaç olan deksametazon (Dex) dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada ilacın DNA ve bazı flora bakteriyel suşları üzerindeki etkisi araştırıldı.

Dex'in DNA kırılmalarına etkisi, süpersarmal plazmid DNA'sının Dex ile muamele edilmesi ve ardından agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Analiz demir, hidrojen peroksit, askorbik asit, demir artı hidrojen peroksit, bakır ve bakır artı askorbik asit varlığında tekrar edilmiştir. Ek olarak, ilaç-DNA etkileşimleri UV-Vis spektrofotometresi ve in siliko yöntemleri kullanılarak çalışılmıştır. İlacın bazı flora bakteri suşları üzerindeki etkisi, disk difüzyonu ve sıvı besiyeri seyreltme yöntemleri ile araştırılmıştır.

Bu in vitro çalışmada, ilaç, süpersarmal DNA'yı insan plazmasında bulunanlardan daha yüksek konsantrasyonlarda (1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μ M) bile kırmamıştır. Dex'in DNA üzerindeki

ÖZET (devam ediyor)

etkisi, Asc, H₂O₂, demir ve bakır varlığında değişmedi. İlacın DNA ile bağlanma sabiti, 7256 1/M olarak elde edildi. İn siliko analizi, ilacın, -5.84'lük bir bağlanma enerjisi ile çift sarmal DNA'nın minör oluşuna bağlandığını, 3 hidrojen bağı ve hidrofobik bağlar yaptığını gösterdi. İlacın 2264 µM'si, *E. cloacae*, *E. coli*, *E. faecalis* ve *P. mirabilis* koloni oluşturan birimlerini (CFU) sırasıyla % 10, % 23, % 42 ve % 10 arttırmıştır. Aynı zamanda, ilacın 1132 µM'si, *E. coli* ve *E. faecalis*'in CFU' sunu sırasıyla % 30 ve % 19 arttırmaktadır.

Sonuç olarak, deksametazon, bazı flora bakterilerinde bir artışa neden olurken, in vitro durumda DNA üzerinde herhangi bir etki göstermemektedir.

Anahtar Kelimeler: Deksametazon, DNA, *E. cloacae*, *E.coli*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*,

Bilim Kodu: 401.02.00

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

STUDY OF ANTIBACTERIAL EFFECTS OF DEXAMETHASONE DRUG, IN VITRO AND IN SILICO ANALYSIS OF ITS BINDING TO DNA

Çağla ASLAN

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ebrahim VALİPOUR

May 2019, 77 pages

Dexamethasone (Dex), a drug with anti-inflammatory effects, is widely used worldwide. Therefore this study aimed to investigate the effect of the drug on DNA and some flora bacterial strains.

Effect of Dex on DNA breakages was analyzed by treating of supercoiled plasmid DNA with Dex and then analysis on agarose gel electrophoresis. The analysis was repeated at the presence of iron, hydrogen peroxide, ascorbic acid, iron plus hydrogen peroxide, copper and copper plus ascorbic acid. In addition, the drug-DNA interactions were studied using UV-Vis spectrophotometer and in-silico methods. Effect of the drug on some flora bacterial strains was investigated by disc diffusion and broth dilution methods. In this in-vitro study, the drug did not break the supercoiled DNA at any concentrations even at higher concentrations (1700, 170, 17, 1,7 and 0,42 μ M) than those found in human plasma. The effect of Dex on DNA did not change in the presence of Asc, H₂O₂, iron and copper. Binding constant of the drug with DNA

ABSTRACT (continued)

was obtained as 7256 1/M. In-silico analysis showed bonding of the drug on a minor groove of double helix DNA by the binding energy of almost -5.84, making 3 hydrogen bonds and hydrophobic bonds. 2264 μM of the drug increased colony forming units (CFU) of *E. cloacae*, *E. coli*, *E. faecalis* and *P. mirabilis* by 10 %, 23 %, 42 % and 10 % respectively. Also, 1132 μM of the drug cause to increase CFU of *E. coli* and *E. faecalis* by 30 % and 19 % respectively. In conclusion, dexamethasone causes an increase in some of the flora bacteria while it does not show any effect on DNA in in-vitro condition.

Key Words: Dex, DNA, *E. cloacae*, *E. coli*, *E. faecalis* and *P. Mirabilis*

Science Code: 401.02.00

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimiz süresince bilgi ve tecrübelerini bizden esirgemeyen, bizleri iyi birer bilim insanı, aynı zamanda iyi birer insan olarak yetiştirme gayretinde olan, çalışmalarım için gerekli olan her türlü ilgi ve desteği büyük sabır ile gösteren sayın hocam Doktora Öğretim üyesi Ebrahim Valipour'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tanıdığım ilk andan itibaren bana kapısını her daim açık tutan, maddi ve manevi hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sayın hocalarım Profesör Ender Büyükgüzel, Doçent Sevim Karakaş Çelik, Doktora Öğretim üyesi Tolga Acun ve Doktora Öğretim Üyesi Arzu Erol'a Teşekkür ederim.

Enterobacter cloacae, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ve *Proteus mirabilis* bize Zonguldak-TÜRKİYE ZBEU Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü tarafından cömertçe kazandırılmıştır. Teşekkürü bir borç biliriz.

Eğitim sürecimi güzel anılar ile doldurmamı sağlayan kendileriyle çalışmaktan mutluluk ve huzur duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarım Gülsüm Kübra Gümüş ve Sümeyye Zarfa teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca maddi, manevi desteğini esirgemeyen sevgiyle, inançla yanımda ve arkamda olan başta babam Yusuf Ziya Aslan ve annem Nazan Aslan olmak üzere canım aileme verdikleri destek, sabır ve güç için minnettarım, çok teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1 KORTİKOSTREOİDLER.....	1
1.2 ANTİ - İNFLAMATUAR İLAÇ OLARAK DEKSAMETAZON	2
1.3 DNA’NIN YAPISI VE FONSIYONU	6
1.4 DNA - İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ	9
1.5 İNSAN VÜCUDUNDAKİ DEMİR-BAKIR	11
1.5.1 Demir	11
1.5.2 Bakır.....	12
1.6 OKSİDATİF STRES	13
1.6.1 Serbest Radikaller	13
1.6.2 Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	15
1.6.3 Hidroksil Radikalleri (OH•).....	15
1.7 ANTİOKSİDANLAR / ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	16
1.8 GASTROİNTESTİNAL SİSTEMİ	17
1.9 BAĞIRSAK FLORA BAKTERİLERİ	20
1.9.1 <i>Escherichia coli</i>	20

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
1.9.2 <i>Enterobacter cloacae</i>	21
1.9.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	21
1.9.4 <i>Proteus mirabilis</i>	22
BÖLÜM 2 GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
2.1 KULLANILAN CİHAZLAR	25
2.2 KULLANILAN KİMYASAL MADDELE.....	26
2.2.1 Jel Elektrofrezinde Kullanılan Kimyasalla	26
2.2.2 Antibakterial Etki Analizinde Kullanılan Kimyasallar	27
2.2.3 UV – Vis Spektrofotometre Analizinde Kullanılan Kimyasallar	27
2.3 PLAZMİD DNA HAZIRLANMASI	27
2.4 İLAÇ SOLÜSYONUN HAZIRLANMASI	29
2.5 DEKSAMETAZON’UN DNA ÜZERİNDEKİ KIRMA AKTİVİTESİ.....	30
2.6 DEKSAMETAZON’UN H ₂ O ₂ VARLIĞINDA DNA ÜZERİNDEKİ KESME AKTİVİTESİ.....	30
2.7 DEKSAMETAZON’UN ASKORBİK ASİT VARLIĞINDA DNA ÜZERİNDEKİ KESME AKTİVİTESİ	30
2.8 DEMİR KAYNAKLI DNA HASARI ÜZERİNE DEKSAMETAZON’UN ETKİSİ... 31	
2.8.1 Dekametazon’un Farklı Konsantrasyonlarının FeSO ₄ ile DNA Etkileşimi Üzerine Etkisi	31
2.8.2 Dekametazon’un Farklı Konsantrasyonlarının FeSO ₄ + H ₂ O ₂ ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi	31
2.8.3 Dekametazon’un FeSO ₄ (30 mM – 0,3 mM – 0,03 mM) + H ₂ O ₂ ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	32
2.9 BAKIR KAYNAKLI DNA HASARI ÜZERİNE DEKSAMETAZON’UN ETKİSİ ... 32	
2.9.1 Dekametazon’un Farklı Konsantrasyonlarının, CuCl ₂ + Askorbik Asit ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	32
2.9.2 Dekametazon’un CuCl ₂ (40 µM - 20 µM – 2 µM – 0,2 µM) + Askorbik Asit ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	32
2.10 DEKSAMETAZON’UN FLORA BAKTERİLERİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	33

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.10.1 Dekسامetazon'un <i>Enterobacter cloacae</i> 'nin Büyümesi Üzerine Etkisi	33
2.10.2 Dekسامetazon'un <i>Escherichia coli</i> 'nin Büyümesi Üzerine Etkisi.....	33
2.10.3 Dekسامetazon'un <i>Enterococcus faecalis</i> 'in Büyümesi Üzerine Etkisi	34
2.10.4 Dekسامetazon'un <i>Proteus mirabilis</i> 'in Büyümesi Üzerine Etkisi	34
2.11 DEKSAMETAZON'UN DNA'YA BAĞLANMASININ ANALİZİ	35
2.11.1 UV- Vis Tarama Yoluyla Dekسامetazon'un DNA'ya Etkisi.....	35
2.11.2 İn-siliko Yoluyla Dekسامetazon - DNA Etkileşimi	35
2.12 DEKSAMETAZON'UN PROTEİN İLE ETKİLEŞİMİNİN ANALİZİ	36
2.12.1 UV – Vis Tarama Yoluyla Dekسامetazon'un Sığır Serum Albumin (BSA) ile Etkileşimi	36
BÖLÜM 3 BULGULAR.....	37
3.1 DEKSAMETAZON'UN DNA ÜZERİNDEKİ KIRMA AKTİVİTESİ.....	37
3.2 DEKSAMETAZON'UN H ₂ O ₂ VARLIĞINDA DNA ÜZERİNDEKİ KESME AKTİVİTESİ.....	37
3.3 DEKSAMETAZON'UN ASKORBİK ASİT VARLIĞINDA DNA ÜZERİNDEKİ KESME AKTİVİTESİ	39
3.4 DEMİR KAYNAKLI DNA HASARI ÜZERİNE DEKSAMETAZON'UN ETKİSİ... 39	
3.4.1 Dekسامetazon'un Farklı Konsantrasyonlarının FeSO ₄ ile DNA Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	39
3.4.2 Dekسامetazon'un Farklı Konsantrasyonlarının FeSO ₄ + H ₂ O ₂ ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi	40
3.4.3 Dekسامetazon'un FeSO ₄ (30 mM – 0,3 mM – 0,03 mM) + H ₂ O ₂ ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	41
3.5 BAKIR KAYNAKLI DNA HASARI ÜZERİNE DEKSAMETAZON'UN ETKİSİ ... 41	
3.5.1 Dekسامetazon' un Farklı Konsantrasyonlarının, CuCl ₂ + Askorbik Asit ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	41
3.5.2 Dekسامetazon'un CuCl ₂ (40 µM - 20 µM – 2 µM – 0,2 µM) + Askorbik Asit ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi.....	42

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.6 DEKSAMETAZON'UN <i>ENTEROBACTER CLOACAEN</i> 'İN BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİ	43
3.7 DEKSAMETAZON'UN <i>ESCHERİCHIA COLI</i> 'NİN BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	45
3.8 DEKSAMETAZON'UN <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> 'NİN BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİ	48
3.9 DEKSAMETAZON'UN <i>PROTEUS MİRABİLIS</i> 'İN BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	50
3.10 UV- VİS TARAMA YOLUYLA DEKSAMETAZON'UN DNA'YA ETKİSİ.....	53
3.11 İN-SİLİKO YOLUYLA DEKSAMETAZON'UN DNA' YA ETKİSİ.....	54
3.12 UV- VİS TARAMA YOLUYLA DEKSAMETAZON'UN SIĞIR SERUM ALBUMİN (BSA) İLE ETKİLEŞİMİ	55
BÖLÜM 4 TARTIŞMA	57
BÖLÜM 5 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Anti - inflamatuvar etki mekanizması.....	2
Şekil 1.2. Deksametazon'un kimyasal yapısı.....	3
Şekil 1.3. DNA zincirindeki baz, şeker ve fosfat bağları.....	6
Şekil 1.4 DNA'nın Çift sarmal yapısı.....	7
Şekil 1.5 A, B ve Z DNA yapısı.....	7
Şekil 1.6 DNA yapısındaki minör ve major oluklar.....	8
Şekil 1.7. DNA molekülünde bifonksiyonel interkalatörlerin interkalasyon tipleri: I - intramoleküler çapraz bağ ve II - intermoleküler çapraz bağ.....	10
Şekil 1.8. Oksidatif Stres'in çeşitli hastalıklara katkısı.....	14
Şekil 1.9. Oksijenin indirgenme reaksiyonu.....	16
Şekil 1.10. Oksidatif mekanizmalarla DNA'da oluşan hasar mekanizması.....	16
Şekil 1.11. Antioksidanların sınıflandırılması.....	17
Şekil 1.12. <i>Escherichia Coli</i> 'nin SEM görüntüsü.....	20
Şekil 1.13. <i>Enterobacter Cloacae</i>	21
Şekil 1.14. <i>Enterococcus faecalis</i> SEM görüntüsü.....	22
Şekil 1.15. <i>Proteus mirabilis</i>	23
Şekil 2.1 Deksametazon'un kimyasal yapısı.....	25
Şekil 3.1 pPUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bp) Dex ile muamele edilmesi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analiz. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 µM Dex'i temsil eder.....	37
Şekil 3.2 pPUC19 plazmid DNA' sının (0,247 µM bp) Dex ve sabit 6 mM H ₂ O ₂ ile muamele edilmesi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 µM Dex'i temsil eder.....	38
Şekil 3.3 H ₂ O ₂ 'nin kontrolü katalaz testi. (a) Kanlı agardaki <i>E. coli</i> bakteri kolonisinde okla gösterilen yerlere H ₂ O ₂ damlatılmıştır. (b) <i>E. coli</i> bakteri kolonisinde okla gösterilen yerlere H ₂ O ₂ damlatılmıştır. Oluşan hava kabarcıkları gözlemlenmektedir.....	38
Şekil 3.4 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bp) Dex ve sabit 40 µM Asc ile muamele edilmesi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 µM Dex'i temsil eder.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 3.5 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bp) Dex ve sabit 1,5 mM FeSO ₄ ile muamele edilmesi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 µM Dex'i temsil eder. R, L ve S bağları sırasıyla relax (sirküler), linear (doğrusal) ve süpercoil (süpersarmal) plazmid DNA'dır.....	40
Şekil 3.6 PUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bp), Dex, sabit 1,5 mM FeSO ₄ ve sabit 6 mM H ₂ O ₂ ile muamele edilmesi ve % 1 lik agaroz jel elektroforezinde analizi. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 µM Dex'i temsil eder. R, L ve S bağları sırasıyla relax (sirküler), linear (doğrusal) ve süpercoil (süpersarmal) plazmid DNA'dır.....	40
Şekil 3.7 Dex'in demir varlığında DNA kırılması üzerindeki etkisi. DNA, pUC19 plazmid DNA (0,247 µM bp) idi. H ₂ O ₂ konsantrasyonu 6 mM idi. FeSO ₄ konsantrasyonları, 30, 0,3 ve 0,03 mM idi. Dex c: 17 µM'dır. R, L ve S bağları sırasıyla relax (sirküler), linear (doğrusal) ve süpercoil (süpersarmal) plazmid DNA'dır.....	41
Şekil 3.8. pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bp) sabit 60 µM CuCl ₂ , sabit 60 µM askorbik asit ve Dex ile muamele edilmesinin % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. Dex konsantrasyonları sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 µM'yi temsil eden a, b, c, d ve e olarak gösterilmiştir.	42
Şekil 3.9. pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 µM bp) sabit 40 µM Asc, Dex ve CuCl ₂ (40 µM - 20 µM – 2 µM – 0,2 µM) konsantrasyonları ile muamele edilmesinin % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. Dex c: 17 µM plazma konsantrasyonunda idi.	42
Şekil 3.10 (a) Mueller Hinton sıvı besiyerinde farklı konsantrasyonlardaki Dex'in <i>Enterobacter cloacae</i> ile muamele edilmesi. 1-2-3-4-5 sırayla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex konsantrasyonları idi. (b) üçlü tekrarı göstermektedir. ..	43
Şekil 3.11 <i>Enterobacter cloacae</i> 'nin farklı konsantrasyonlarda Dex içeren sıvı besiyerinde göreceli büyümesi. A-B-C-D-E sırasıyla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex temsil etmektedir. Grafikte % 100 olarak gösterilen üreme 2.71E+19 hücre sayısını göstermektedir.	44
Şekil 3.12 (a) Steril diskler kullanarak <i>Enterobacter cloacae</i> Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan plaka yarılarında bulunan disklerin Dex konsantrasyonları sırasıyla 0, 141,5, 283,08, 566, 1132, 2264 µM'dır. (b) <i>Enterobacter cloacae</i> 'nin amfisilinli disk yöntemi (amp ⁺). Diskler etrafında da üremenin olduğu gözlemlenmektedir.	44
Şekil 3.13 <i>Enterobacter cloacae</i> Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. Dex konsantrasyonları 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM idi.	45
Şekil 3.14 <i>Enterobacter cloacae</i> suşunun standart üreme grafiği.....	45
Şekil 3.15 (a) Mueller Hilton sıvı besiyerinde farklı konsantrasyonlardaki Dex'in <i>Escherichia coli</i> ile muamele edilmesi. 1-2-3-4-5 sırayla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex konsantrasyonları idi. (b) üçlü tekrarı göstermektedir. ..	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 3.16 <i>Escherichia coli</i> 'nin farklı konsantrasyonlarda Dex içeren sıvı besiyerinde göreceli büyümesi. A-B-C-D-E sırasıyla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex temsil etmektedir. Grafikte % 100 olarak gösterilen üreme 7,6735E+14 hücre sayısını göstermektedir.	46
Şekil 3.17 (a) Steril diskler kullanarak <i>Escherichia coli</i> Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan plaka yarılarında bulunan disklerin Dex konsantrasyonları sırasıyla 0, 141,5, 283,08, 566, 1132 ve 2264 µM idi. (b) <i>Escherichia coli</i> 'nin amfisilinli disk yöntemi (amp ⁺). Diskler etrafında üremenin olmadığı halkalar görülmektedir.	47
Şekil 3.18 <i>Escherichia coli</i> 'nin Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. Dex konsantrasyonları 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM idi.	47
Şekil 3.19 <i>Escherichia coli</i> suşunun standart üreme grafiği	47
Şekil 3.20 (a) Mueller Hilton besiyerinde farklı konsantrasyonlardaki Dex'in <i>Enterococcus faecalis</i> ile muamele edilmesi. 1-2-3-4-5 sırayla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5µM Dex konsantrasyonları idi. (b) üçlü tekrarı göstermektedir	48
Şekil 3.21. <i>Enterococcus faecalis</i> 'in farklı konsantrasyonlarda Dex içeren sıvı besiyerinde göreceli büyümesi. A-B-C-D-E sırasıyla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex temsil etmektedir. Grafikte % 100 olarak gösterilen üreme 5,5745E+21 hücre sayısını göstermektedir	49
Şekil 3.22 (a) Steril diskler kullanarak <i>Enterococcus faecalis</i> Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan plaka yarılarında bulunan disklerin Dex konsantrasyonları sırasıyla 0, 141,5, 283,08, 566, 1132 ve 2264 µM idi. (b) <i>Enterococcus faecalis</i> 'in amfisilinli disk yöntemi (amp ⁺). Diskler etrafında üremenin olmadığı halkalar görülmektedir.	49
Şekil 3.23 <i>Enterococcus faecalis</i> Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. Dex konsantrasyonları 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM idi.	50
Şekil 3.24 <i>Enterococcus faecalis</i> suşunun standart üreme grafiği	50
Şekil 3.25 (a) Mueller Hilton sıvı besiyerinde farklı konsantrasyonlardaki Dex'in <i>Proteus mirabilis</i> ile muamele edilmesi. 1-2-3-4-5 sırayla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex konsantrasyonları idi. (b) üçlü tekrarı gösterir.	51
Şekil 3.26 <i>P.mirabilis</i> 'in çeşitli konsantrasyonlarda Dex içeren besiyerinde göreceli büyümesi. A-B-C-D-E sırasıyla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex temsil etmektedir. Grafikte % 100 olarak gösterilen üreme 1,84E+22 hücre sayısını göstermektedir.	51
Şekil 3.27 (a) Steril diskler kullanarak <i>P.mirabilis</i> Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan plaka yarılarında bulunan disklerin Dex konsantrasyonları sırasıyla 0, 141,5, 283,08, 566, 1132 ve 2264 µM idi. (b) <i>P.mirabilis</i> 'in amfisilinli disk yöntemi (amp ⁺). Diskler etrafında üremenin olmadığı halkalar görülmektedir.	52
Şekil 3.28 <i>P.mirabilis</i> Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. Dex konsantrasyonları 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM idi.	52

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.29 <i>P.mirabilis</i> suşunun standart üreme grafiği	53
Şekil 3.30 Absorbans - Dalga boyu grafiği. DNA üzerine Dex'in titre edilmesi.	53
Şekil 3.31 Absorbans-Deksametazon grafiği. DNA üzerine Dex'in titre edilmesi.	54
Şekil 3.32 (a) DNA'nın küçük oluk (minör) tarafı ile birlikte Dex'in moleküler yerleştirme perspektifi. (b) Dex ile DNA arasındaki hidrojen bağları etkileşiminin ve nükleotid bağlarının moleküler modellenmesi.	54
Şekil 3.33 Dex ile DNA arasındaki hidrofobik bağların modellenmesi.	55
Şekil 3.34 Absorbans-Dalga boyu grafiği. BSA üzerine Dex'in titre edilmesi.	56
Şekil 3.35 Absorbans-Deksametazon grafiği. BSA üzerine Dex'in titre edilmesi	56



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Etki sürelerine göre kortikosteroidler	3
Çizelge 1.2 Deksametazon plazma konsantasyonları	4
Çizelge 1.3 Deksametazon çözücüleri	5





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

mg	: Miligram
g	: Gram
%	: Yüzde
ng	: Nano gram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
A,T,G,C	: Adenin, Timin, Guanin, Sitozin
°C	: Santigrat derece
Å	: Ångström
Fe	: Demir
Cu	: Bakır
Fe ⁺³	: Ferrik
Fe ⁺²	: Ferröz
Cu ⁺²	: Cupric
•OH	: Hidroksil Radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
O ₂	: Oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
H ₂ O	: Su
Ca	: Kalsiyum
Asc	: Askorbik asit
g	: Santrifüj dönme hızı
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
m ²	: Metrekare

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

μg	: Mikrogram
FeSO_4	: Demir II sülfat
CuCl_2	: Bakır II klorür
M	: Molar
nm	: Nanometre
μm	: Mikrometre
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
rpm	: Revolutions per Minute
bp	: Basepair

KISALTMALAR

Amp⁺	: Amfisilin içerir
Asc	: Askorbik Asit
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Sığır Serum Albümin
CFU	: Koloni oluşturan üniteler
Dex	: Deksametazon
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>E. cloacae</i>	: <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
ETBR	: Etidyum Bromür
IBD	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
İYT	: İdrar Yolu Enfeksiyonları
Kb	: Bağlanma Sabiti
KS	: Kortikosteroid
LB	: Luria Broth Besiyeri
NEB5α	: Kompetent Hücre
OD	: Optik yoğunluk
PBS	: Fosfat Salin Tamponu
pH	: Potansiyel Hidrojen

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

<i>P. mirabilis</i>	: <i>Proteus mirabilis</i>
PUC19	: Vektör
RNA	: Ribonükleik asit
ROS/ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SEM	: Scanning Electron Microscop
Sn	: Saniye





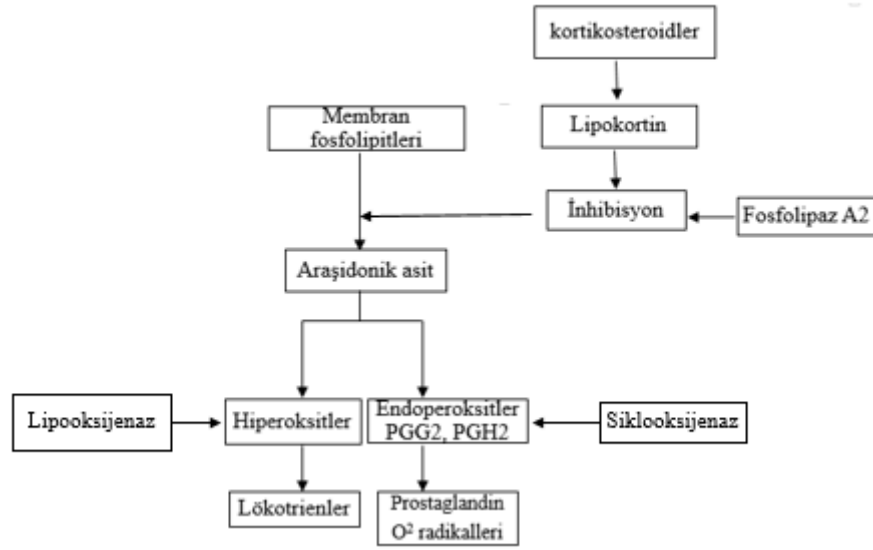
BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 KORTİKOSTREOİDLER

Kortikosteroidler (KS'ler) böbrek üstü bezlerinden salgılanan endokrin bezlerdir. Kortikosteroidler; Karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması, santral sinir sistemi, anti - inflamatuvar etki, immünosupresif etki, kardiyovasküler sistem vb. üzerine etkileri vardır (Palancıoğlu vd. 2012). Böbrek üstü bezlerinin korteks katmanından mineralokortikoid, gonadokortikoid ve glukokortikoidler salgılanmaktadır (Hantash 2016).

Kortikosteroidler, inflamatuvar yanıtta yer alan çoklu sinyal yollarına müdahale ederek inflamasyonu kontrol edebilmektedir. Ancak anti - inflamatuvar mekanizmaları tam olarak anlaşılammıştır. Hasta da glukokortikoid salgılanması ya da sentetik glukokortikoid verilmesi durumunda genelde ilk olarak iltihap bölgesinde lökosit ve makrofaj birikiminin baskılanması ve buna bağlı olarak da araşidonik asit parçalanmasını bozarak prostoglandin oluşumunu engellemesiyle iltihaplanmayı durdurduğu, yani anti-inflamatuvar etki gösterdiği düşünülmektedir (Şekil 1.1) (Graziani vd. 2006).



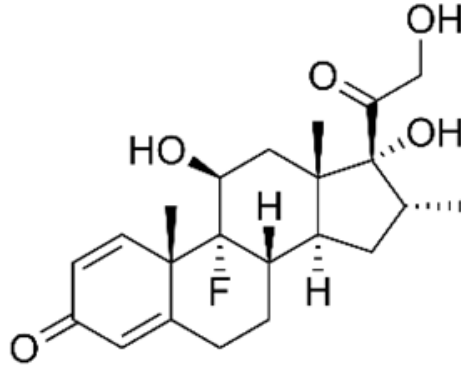
Şekil 1.1 Anti - inflamatuvar etki mekanizması (Hanttash 2016).

Hücre zarında yayılan glukokortikoidler, hücre içi reseptörü aktive eder ve reseptör - steroid kompleksi hücre çekirdeğine translokasyona uğrar. Buna bağlı olarak spesifik genlerin ekspresyonları üzerine transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Yani ekspresyonu uyarır ya da inhibe eder. Gen ekspresyonu için gereken zamana bağlı olarak KS'lerin çoğunun etkisi hemen oluşmaz birkaç saat sonra etkileri gözlenir. Bu klinik açıdan çok önemlidir (Kim vd. 2009).

1.2 ANTİ - İNFLAMATUAR İLAÇ OLARAK DEKSAMETAZON

Kortikosteroidler, inflamatuvar tedavi için yaygın olarak kullanılan bir ilaç grubu olarak bilinmektedir. Histaminler ve prostaglandinler gibi bazı inflamatuvar endeksleri inhibe ederek anti - inflamatuvar etkiler sağlarlar. Sentetik bir glukokortikoid olarak Deksametazon (Dex), doğal glukokortikosteroidleri taklit eder ve anti - inflamatuvar etki gösterir (Barnes 1999, Newton 2000, Wong vd. 2018).

Oral kortikosteroidler astımın, inflamatuvar eklem bozukluklarının, gastrointestinal sistemi ve merkezi sinir sistemini etkileyen hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Van Staa vd. 2000).



Şekil 1.2 Deksametazon'un kimyasal yapısı (Singh vd. 1994).

Deksametazon $C_{22}H_{29}FO_5$ kimyasal formüllü (Şekil 1.2), 392,5 moleküler ağırlığı olan uzun süreli etki gösteren sentetik glukokortikoid ilaçlardan biridir. Anti - inflamatuvar ve immünoşüpresan ilaç olarak birçok organ sistemleri rahatsızlıklarında kullanılmaya başlandı. Deksametazon ve türevlerinin doğal glukokortikoidlerin (kortizon) su ve tuz tutucu yan etkilerini taşıyamaması ve kuvvetli anti - inflamatuvar etkilere sahip olmalarıdır (Hanttaş 2016). Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi daha uzun süre etkili, güçlü anti - inflamatuvar etkiye sahiptir (Palancıoğlu vd. 2012).

Deksametazon doğal kortizolden çok daha güçlüdür ve neredeyse saf glukokortikoid etkiye sahiptir. Deksametazon'un 0,75 mg'lık dozu, 20 mg kortizol (hidrokortizon) ve 25 mg kadar kortizon eşdeğeridir. Bu nedenle dentoalveolar cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır (Hanttaş 2016).

Çizelge 1.1 Etki sürelerine göre kortikosteroidler (Palancıoğlu vd. 2012).

Kortikosteroid	Anti inflamatuvar Etk.	Etki Plazma Yarı Ömrü	Etki Süresi	Doz	Mineralokort. Potansiyeli	Glukokort. Potansiyeli
Kısa Etkili						
Hidrokortizon	1	90 dk	8-12 saat	20	1	1
Kortizon	0,8	60 dk	8-12 saat	25	0,8	0,8
Orta Etkili						
Prednisolon	4	200 dk	18-36 saat	5	0,8	4
Uzun Etkili						
Deksametazon	25	200 dk	36-54 saat	0,75	0	25-80
Betametazon	25	200 dk	36-54 saat	0,75	0	25-30

Çizelge 1.2 Deksametazon plazma konsantrasyonları.

Deksametazon	Plazma Konsantrasyonu	Uygulama yolu	Kaynak
2 ng/ml Deksametazon	% 3,78 % 3,83	oral	(Kasuya vd. 1984)
5 ng/ml Deksametazon	% 1,29 % 2,64	oral	(Kasuya vd. 1984)
6 ng/ml Deksametazon	% 76,56	UPLC-PDA	(Klintip vd. 2016)
10ng/ml Deksametazon	% 119,8	Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)	(Song vd. 2004)
25 ng/ ml Deksametazon	% 60,50	UPLC-PDA	(Klintip vd. 2016)
50 ng/ml Deksametazon	% 79,4	Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)	(Song vd. 2004)
50 ng/ml	% 54,30	UPLC-PDA	(Klintip vd. 2016)
200 ng/ml Deksametazon	% 88,8	Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)	(Song vd. 2004)

Deksametazon'un biyolojik yarı ömrü 36-54 saattir (Singh vd. 1994). Deksametazon'un plazma derişimleri yapılan literatür taramalarında belirlenmiş ve Çizelge 1.2 olarak sunulmuştur.

PLA2 araşidonik asit salınımında görevli olan enzim fosfolipaz A2'yi engelleyerek araşidonik asit salınımını engeller ve buna bağılı olarak hem siklooksijenaz hem de lipooksijenaz yolunu bloke eder. Bunun sonucunda prostoglandinlerin, lökotrienlerin sentezi ve nötrofillerin birikimi azalmaktadır (Önder 2016). Deksametazon fosfolipaz A2 enzimini inhibe ederek anti inflamatuvar etki gösterir. Bu nedenle, PONV'nin (Postoperatif bulantı ve kusma) azaltılmasında, artroplasti hastalarında ağrının hafifletilmesinde, dentoalveolar cerrahide, deri alerjileri, astım ve romatizmal sorunların tedavisinde kullanılan çeşitli formları olan bir ilaçtır. Bu formlar oral, intravenöz, intramüsküler olarak alınabilirken, göz damlası, kulak ve burun spreyi şeklinde kullanılabılır (Hanttash 2016, Fan vd. 2018).

Ödem gelişimini önlemek için özellikle beyin ödemi tedavisinde, alerjik şokta, spinal kord basılarında nasal sprey olarak da kullanılır (Önder 2016).

Yan etkilerine bakıldığında yüksek dozda ve uzun süre kullanılmaları halinde fizyolojik ve farmakolojik etkilerin şiddetlenmesi şeklinde ciddi yan etkileri görülür. İştah açılması ve kilo alma, huzursuzluk, Hiperglisemi, Diabetes Mellitus, ödem, menstruasyon düzensizliği, miyopati, gastrit, vb. birçok yan etkiye sahiptir (Önder 2016). Deksametazon'un kemoterapinin neden olduğu bulantı ve kusmanın önlenmesinde etkili olduğu rapor edilmiştir (Chu vd. 2014).

Çizelge 1.3 Deksametazon çözücüleri.

Çözücüler	Derişim Özellikleri	Kaynak
PBS Tamponu	10 mg / ml	(Sun vd. 2015)
Metanol	10 µl (20ng Dex)	Kasuya vd. 1984)
Su	Çözünmüş Dex mg / ml: 0,056	(Yu vd. 2007)
PBS	Çözünmüş Dex mg / ml: 0,057	(Yu vd. 2007)
PBS containing 0,2 % Tween-20	Çözünmüş Dex mg/ml: 0,110	(Yu vd. 2007)
PBS containing 1 % SDS	Çözünmüş Dex mg/ml: 0,896	(Yu vd. 2007)

Çalışmalarda kullanılan Dex çözücüleri çizelge 3'de yer alan literatür taramaları göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

Sing ve arkadaşlarının (1994) yaptığı çalışmaya göre tüm Deksametazon konsantrasyonları fare - ilaç tedavisi çalışmalarında 30 saatlik uygulamada fare kemik iliğinin eritrosit hücrelerindeki mikronükleus oranında doza bağlı artışın indüksiyonu yani yüksek mikronükleus insidansı olduğunu gösterir.

Chen ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada, Deksametazon, insan yumurtalık kanseri hücrelerinde hücre dışı matrise yapışmayı artırarak kemoterapiye karşı hücre direncini arttırdığını göstermişlerdir.

Yeung ve arkadaşları (2004) Deksametazon'un sitotoksik etkisini insan retinal pigment epithelium (ARPE19 hücre hattı) üzerinde araştırmışlar ve bu ilacın toksik etkisini tespit etmişlerdir.

Oliveira ve arkadaşları (2017) Deksmetazon'un, Allium cepa meristematik kök hücrelerinde kromozom sapmaları endeksini doza bağlı bir şekilde anlamlı şekilde arttırdığını göstermiştir. Ek olarak, Queiroz ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmanın bulguları, hidrokortizonun farelerin kemik iliğinde genotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

1.3 DNA'NIN YAPISI VE FONSIYONU

Canlıların tüm genetik bilgisini DNA (deoksiribonükleik asit) içerir. İlaçların ve kimyasalların DNA ile etkileşimi ve bunun sonucunda ortaya çıkan DNA hasarı genellikle kanserle ilişkilendirilir (Davis ve Lin 2011). Canlılığın sürdürülebilmesi için gerekli işlevler, hücrede üretilen proteinlerin genetik kodları, proteinlerin miktarı gibi tüm bunlar DNA'da planlanır ve kodlanır (Dursun 2009).

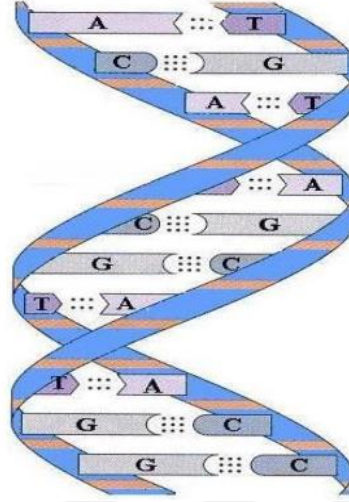
DNA molekülünde meydana gelen hasar kanser gibi birçok hastalığa neden olduğu gibi gelecek nesillere aktarılan genetik bilgide değişikliklere neden olur. Canlılarda meydana gelen DNA hasarları DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilmektedir. Hasar ve tamir belirli bir denge halindeyse de bu dengenin bozulması durumunda tamir mekanizmaları yetersiz olacaktır ve bu durumda DNA da hücre ölümü, kanser, mutasyon gibi kalıcı zararlar meydana gelecektir. DNA hasarı ya hasara sebebiyet veren durumlardan uzak durularak ya da hasarı önleyici önlemler alınarak engellenmelidir (Yıldırım 2015).

DNA genetik bilgiyi gelecek nesillere aktaran birbirine anti paralel, sarmal iki uzun polimer zincirden oluşmaktadır. Watson ve Francis Crick açıklamış oldukları bu çift sarmal DNA molekülü; 5' - 3' yönünde şeker fosfat omurgasından oluşan iki zincirin birbirine antiparalel olarak sarılmasıyla meydana gelmiş bir yapıdır (Şekil 1.3) (Çakmak 2013).

C		T		G		A		...
Sugar	Phosphate	Sugar	Phosphate	Sugar	Phosphate	Sugar	Phosphate	...

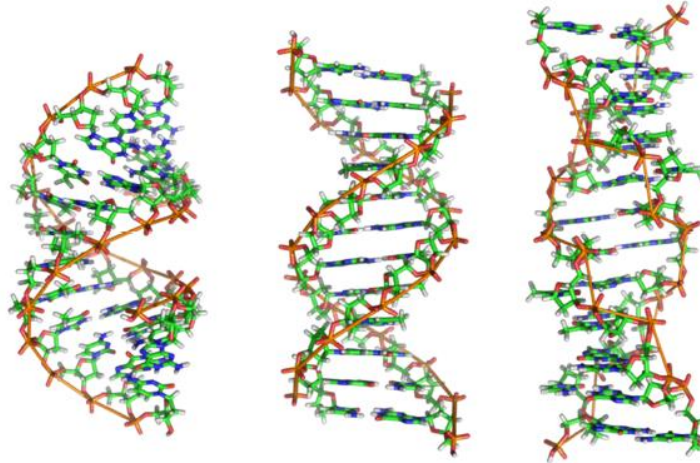
Şekil 1.3 DNA zincirindeki baz, şeker ve fosfat bağları (Dursun 2009).

Her bir nükleotitinde 2 - Deoksiriboz şekeri, bir azotlu baz ve bir fosfat grubu bulunmaktadır. Pürin grubunda Adenin (A) ve guanin (G) yer alırken pirimidin grubunda sitozin (C) ve timin (T) bazı yer almaktadır (Şekil 1.4). Adenin ile timin, guanin ile sitozin birbirine hidrojen bağları ile bağlanmaktadır (Toptancı vd. 2016).



Şekil 1.4 DNA'nın Çift sarmal yapısı (Dursun 2009).

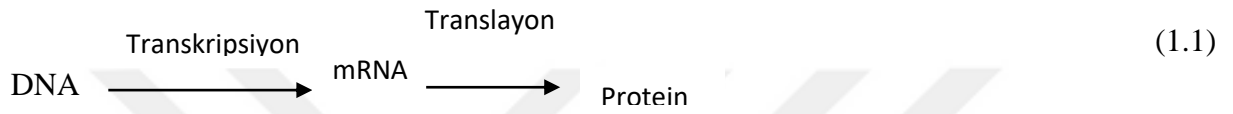
Çift sarmal yapıdaki DNA'nın A, B ve Z olmak üzere 3 değişik şekli bulunmaktadır (Şekil 1.5) ve kromozomal DNA'nın sağa yönelik B formunda olduğu düşünülmektedir (Çakmak 2013).



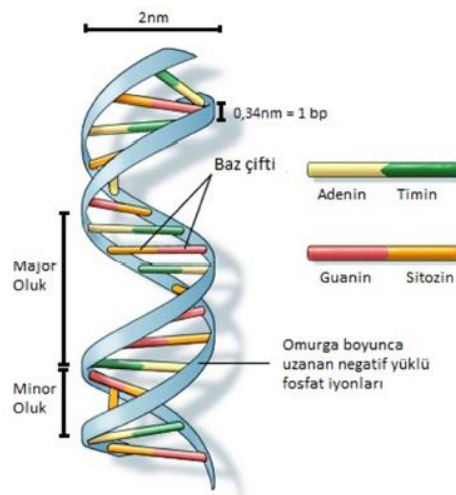
Şekil 1.5 A, B ve Z DNA yapısı (Çakmak 2013).

DNA, prokaryotlar da dairesel kromozomlar içinde iken ökaryotlar da ise doğrusal kromozomlar içinde yer alır. Kromozomlardaki genler DNA yapısındadır. Bir hücrede bulunan kromozomlar topluluğuna genom denilmektedir ve insan genomunda yaklaşık 46 kromozom

ve bunlar içinde bulunan yaklaşık 3 milyar baz çifti bulunmaktadır (Yıldırım 2015). DNA'nın iki temel işlevi vardır. Bunlardan ilki hücre bölünmesi sırasında kendini kopyalamaktır (Replikasyon veya duplikasyon da denilir). Kromozomların bölünmesi sırasında kendini kopyalar ve bölünme sonrasında yeni hücrede aynı özelliklerin ortaya çıkması için gereklidir. İkincisi Transkripsiyon olarak adlandırılan kendinde toplanan bilgileri RNA'ya (ribonükleik asit) aktarmaktır. Transkripsiyon RNA'nın DNA kalıbı üzerine senteziyle DNA'daki bilgiler RNA molekülüne aktarılır. RNA da toplanan bilgiler ribozomlarda okunur ve protein, enzim sentezinde kullanılır. Bu sürece ise Translasyon denilmektedir. Tüm bu döngüye 'Santral Doğma' denilmektedir (1.1) (Dursun 2009).



DNA üzerindeki büyük (majör) ve küçük (minör) oluklar baz çiftlerinin dizilişine bağlı olarak oluşmaktadır (Şekil 1.6). Her oluğun çevresi genişlik ve yükseklik olarak farklılık göstermektedir. Büyük oluk 11,6 Å genişlik ve 8,5 Å derinlik gibi daha geniş etkileşim alanı içerdiğinden ilaçlar ve hacimli moleküllerin kolayca bağ oluşturmalarını sağlar. Küçük oluklar derinlikleri 8,2 Å kadardır ve daha küçük etkileşim alanına sahiptir. Antibiyotikler ve antikanser ilaçları küçük moleküller olduğu için bu küçük oluktan bağlantı kurarlar (Toptancı vd. 2016).



Şekil 1.6 DNA yapısındaki minör ve majör oluklar (Çakmak 2013).

Majör ve minör oluklarla etkileşen moleküller DNA'ya Van Der Waals bağları ile bağlanırlar ve bu küçük moleküller DNA fonksiyonlarını bozarak bir hastalığın kontrolü ve tedavisinde bir ilaç rolünü üstlenirler (Sirajuddin vd. 2013).

1.4 DNA - İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ

DNA ile ilaç molekülleri arasındaki etkileşim incelendiğinden ilaç moleküllerinin DNA'ya kovalent veya kolavalent olmayan bağlanmalar ile etkileştiği görülmüştür (Sirajuddin vd. 2013).

Kovalent bağlanmalarda: DNA ile etkileşime giren molekül DNA'daki süreçlerin inhibisyonuna ve buna bağlı olarak hücre ölümüne neden olur. DNA'ya kovalent bağlanan moleküllerin kanser tedavisindeki rolleri, DNA'ya alkil grupları bağlamaktır. Bu görevlerinden dolayı alkilleyici ajanlar olarak da adlandırılırlar. Bu alkilasyon ajanları DNA'ya kovalent olarak bağlanırlar ve bunun sonucunda bazlar da yanlış eşleşmeler, yer değiştirmeler, yapıdan ayrılan gruplar DNA sentezinin durmasına ya da apoptozise (hücre ölümüne) neden olur (Sirajuddin vd. 2013).

Kovalent olmayan bağlanmalar: İlaçların DNA'ya kovalent olmayan bağlanması geri dönüşümlüdür. İlaç metabolizması ve potansiyel toksik etkiler göz önüne alındığında, kovalent bağlanma ile karşılaştırıldığında daha fazla tercih edilir. Bununla birlikte, kovalent olmayan DNA etkileşimli maddeler, DNA konformasyonunu, DNA burulma gerilimini, protein - DNA etkileşimini kesebilir ve potansiyel olarak DNA iplik kopmalarına neden olabilir (Aleksić ve Kapetanović 2014).

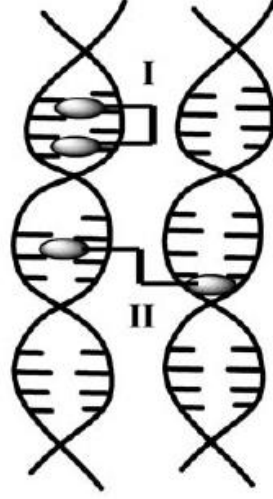
DNA ile kovalent olmayan şekilde reaksiyona giren ilaçların sınıflandırılması;

1. İnterkalatörler
2. Küçük (minör) ve büyük (majör) oluk bağlayıcılar
3. Dış bağlayıcılar

1. DNA İnterkalatörleri

DNA interkalatörleri DNA'ya kovalent olmayan bağlarla bağlanırken bazlar arasındaki hidrojen bağlarını parçalamadan DNA omurgasına dik istiflenen moleküllerdir (Şekil 1.7).

İnterkalasyon DNA çift sarmalını stabilize eder, uzatır, sertleştirir ve çözer. Etidyum Bromür, Proflavin DNA interkalatörlerine örnek olarak verilebilir (Aleksić ve Kapetanović 2014).



Şekil 1.7 DNA molekülünde bifonksiyonel interkalatörlerin interkalasyon tipleri: I - intramoleküler çapraz bağ ve II - intermoleküler çapraz bağ (Aleksić ve Kapetanović 2014).

2. Küçük (Minör) ve Büyük (Majör) oluk bağlayıcılar

Küçük oluk bağlayıcıları oluğun şeklini tamamlayan hilal şekline sahiptirler. Bu grupta yer alan ilaçlar aromatik halkaya sahiptir. İlaç küçük oluğa sıkıca oturur. Netropsin ve Berenil en ünlü küçük oluk bağlayıcı ilaçlardır. Az sayıda madde büyük oluğa bağlanmaktadır. DNA oluğu bağlayıcı ilaçların çoğu, hedef olarak küçük oluğu seçer. Bu ilaçlar pozitif bir elektrostatik potansiyele sahip olan yay şeklindeki, düzlemsel ve kaynaşık olmayan aromatiklerdir (Aleksić ve Kapetanović 2014).

3. Dış bağlayıcılar

Bu tip bağlanma doğada elektrostatiktir. Bazı ligandlar, DNA fosfat omurgası ile spesifik olmayan, dış kenar istifleme etkileşimleri oluşturabilirler. Bazı metal kompleksleri, harici bağlanma yoluyla DNA ile etkileşime girer (Aleksić ve Kapetanović 2014).

DNA molekülünde meydana gelen hasar kanser gibi birçok hastalığa neden olduğu gibi gelecek nesillere aktarılan genetik bilgide değişikliklere neden olur. Canlılarda meydana gelen DNA

hasarları DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilmektedir (Yıldırım 2015). Hasar ve tamir belirli bir denge halindeyse de bu dengenin bozulması durumunda tamir mekanizmaları yetersiz olacaktır ve bu durumda, kanser, nörodejenerasyon gibi öldürücü ve tedavi edilemeyen hastalıklar meydana gelmektedir (Kelly 2008). İlaçların ve kimyasal maddelerin DNA ile etkileşmesi ve bunun sonucu olarak meydana gelen DNA hasarları genellikle kanserle ilişkilendirilmektedir (Davis ve Lin 2011).

DNA'ya zarar veren ilaçlar kanserli hücrelerin büyümesini teşvik eder. Birçok kadının kullandığı genotoksik ilaçlar onlar da meme kanseri riskini iki katından fazla olacak şekilde arttırmıştır (Sharpe vd. 2002). Şu ana kadar yapılan birçok çalışmaya bakıldığında prokarbazin, L-Dopa, kloramfenikol, N-asetilsistein ve gentamisin gibi bazı kimyasal bileşikler içeren ilaçlar DNA hasarını indükleyebilmiştir. Bunlar bir metal iyonunun varlığında ve belirli koşullarda DNA hasarına yol açabilir (Roriz ve Moya 2017). Bazı ilaçlar genotoksik etki gösterirler ve buna bağlı olarak karsinogeneze, DNA hasarına ve sonuç olarak hücre hasarına neden olurlar (De Oliveira vd. 2017).

1.5 İNSAN VÜCUDUNDAKİ DEMİR-BAKIR

Bakır (Cu) ve demir (Fe) yaşamın temel unsurlarıdır. Her ikisi de kromozom yapısının korunmasında önemli unsurlardır (Bertoncini vd. 2016). Demir ve bakır insan vücudunda esastır ama aynı zamanda toksik metallerdir. Gerekli olarak bilinirler ancak genetik aşırı yük hastalığı, Wilson hastalığı vb. hastalıklar haricinde toksisiteleri çok iyi bilinmemektedir. Her iki metal de geçiş elemanlarıdır. Her iki metal de aşırı zararlı oksidan radikallerinin üretimine katkıda bulunur. Geçiş metallere bir özelliği iki veya daha fazla oksidasyon durumu sergilemeleridir. Oksitlenmiş durumlar Cu^{+2} ve Fe^{+3} 'dir ve indirgenmiş durumlar Cu^{+} ve Fe^{+2} 'dir. Bu redoks yeteneği onları enerji üretiminin çeşitli aşamalarında yararlı kılan şeydir. Ama aynı zamanda bu özellikleri onların zarar verici ROS oluşumunu katalize etmelerini sağlar (Brewer 2009).

1.5.1 Demir

Demir canlıların fonksiyonları için önemli bir unsurdur (Takatsuka vd. 2011). Oksijen taşınması, DNA, RNA ve protein sentezinde, enerji yapımında görev almaktadır. Ayrıca pek çok enzimin yapı ve fonksiyonu için gereklidir. Demir ferritin proteini aracılığıyla depolanır.

Demir organizma için temel bir element olması yanında zararlı da olabilmektedir. Bu nedenle canlı organizmalar demir homeostazını kontrol eder (Takatsuka vd. 2011). Demir dönüşmek için, öncelikle transferrin ve ferritin denilen kandaki moleküller tarafından taşınır. Demir yeterliliği hem erkek hem de kadınlarda normal aralık % 15 - 45'tir (Brewer 2009). Demir, oksijen taşınması ve hücrel oksidatif metabolizmada rol oynayan temel bir mineraldir, ancak aynı zamanda çevresel bir toksindir. Her ne kadar demir emilimi limitler dahilinde düzenlenebilse de, demir birikir, çünkü kaloriler gibi fazla miktarları atmak için homeostatik bir mekanizma yoktur. Zamanla yükselen demir depolarının olası toksik etkileri, malignite, nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus, enfeksiyonlar ve ateroskleroz dahil olmak üzere yaygın yaşlanma hastalıklarının patogenezinde rol oynamıştır. Yüksek reaktif demir (Fe^{+2}) ve nispeten kararlı demir (Fe^{+3}) oksidasyon durumları arasında geri dönüşümlü bir şekilde dolaşma, reaktif oksijen türlerinin oluşması bu biyomoleküller için toksiktir (Zacharski vd. 2000).

1.5.2 Bakır

Bakır tüm biyolojik organizmalar için iz elementtir. Ancak aynı zamanda toksik bir etki gösterebilir (Cervantes-Cervantes vd. 2005). Çekirdekte bakır da bulunur, kromozomlar ve DNA bazları, özellikle guanin ile yakından ilişkilidir (Li ve Trush 1994).

Kandaki bakır 2 büyük havuz olarak düşünüldüğünde, insan kanındaki bakırın % 85 - 95'i, seruloplazmin adlı bir moleküle kovalent olarak bağlanır ve böylece toksisiteye neden olmayacağı anlamında güvenlidir. Diğer % 5 - 15'i albümin ve kandaki küçük moleküllere gevşek bir şekilde bağlanır. Bu gevşek olarak bağlı olan bakır aslında serbest bakır dediğimiz şeydir. Serbest bakır ROS oluşması yoluyla bir oksidan mekanizması tarafından toksisiteye neden olur. Oksidasyon, lipitler, proteinler ve DNA dahil olmak üzere birçok moleküle zarar verir. Wilson hastalığında, kandaki serbest bakır havuzu büyük ölçüde genişlemiştir (Brewer vd. 2009). Daha önce yapılan çalışmalara göre Cu^{+2} fizyolojik pH'ta G ve C bazlarına kuvvetli bir şekilde bağlanır ve buna bağlı olarak A - T baz çiftlerini bozarak DNA'nın çift sarmal yapısını bozar (Yokawa vd. 2011). Cervantes ve arkadaşları yaptıkları (2005) çalışmaya göre bakır askorbik asit gibi redoks ajanlarının varlığında ROS oluşumunu artırır. Askorbik asit ve Cu^{+2} kombinasyonu verimli bir şekilde hidroksil radikali ($\bullet OH$) üretir. $\bullet OH$ bir hidrojen atomunun DNA omurgası boyunca deoksiribozlardan çıkarılmasıyla DNA parçalanmasının başlatıcısı olarak kabul edilir. Küçük boyutu nedeniyle $\bullet OH$ hızla yayılır ve daha sonra DNA

moleküllerini herhangi bir pozisyonda böler. Cu^{+2} sistemleri tarafından üretilen ROS, $\bullet\text{OH}$ hem bakteriyofaj λ DNA hem de proteinlerin kimyasal yapısını derinden değiştirdiğini göstermişlerdir. Cu^{+2} komplekslerini içeren DNA hasarı ile ilgili çalışmaların çoğu, hidrojen peroksit ve askorbik asit varlığında yapıldı (Alipázaga vd. 2009).

1.6 OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres; canlı organizmalarda patolojik olarak ya da normal metabolizmada ortaya çıkan serbest radikaller ve bunlara karşı olan antioksidan savunma sistemindeki dengenin bozulması yani serbest radikallerin üretimi ile biyolojik sistemin bunlara direnç yeteneği arasındaki dengesizlik durumudur (Esen 2013, Lee vd. 2017). Serbest radikaller DNA, gibi birçok biyolojik materyale zarar verebilir ve beraberinde immün sistemde zayıflama, kalp-damar hastalıkları, kanser gibi birçok hastalığa sebep olabilecekleri yapılan literatür taramalarında gözlenmiştir. Örneğin demirin serbest formları DNA'ya saldırmak gibi toksik etkiye neden olur (Koca ve Karadeniz 2003).

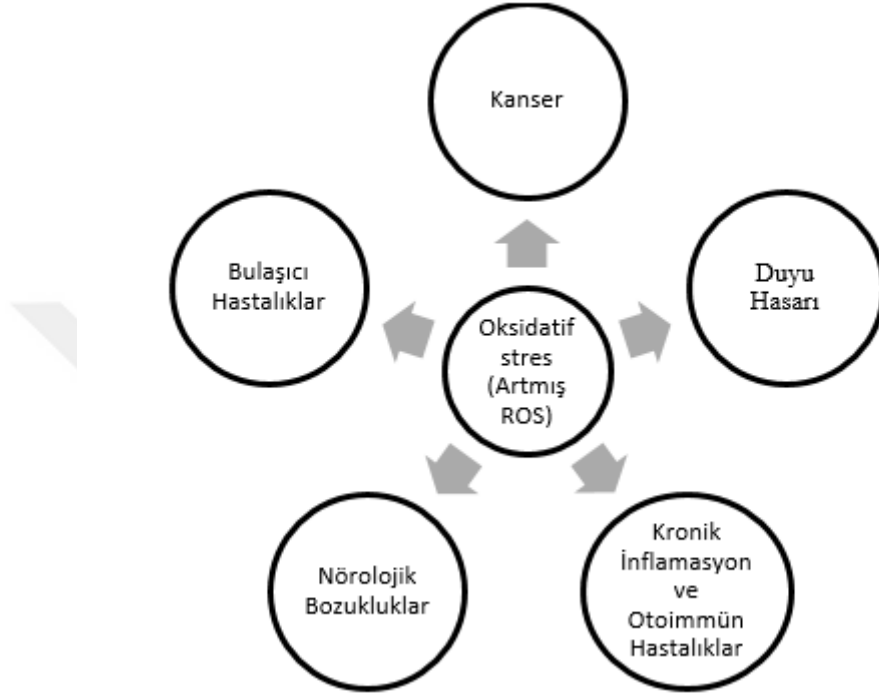
Teorik olarak bakıldığında hücrede serbest demir bulunmamaktadır. Fakat süperoksitler aracılığı ile in vivo ortamda stres altında demir içeren moleküllerden demir serbest forma dönüşür. Serbestleşen demir reaktif hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) oluşumunu sağlayan Fenton reaksiyonunu katalizler. Hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$), 9-10 sn gibi çok kısa bir yarı ömründe tehlikeli reaksiyonlara neden olabilen hidroksil iyonunun bir formudur. Oksidatif hasar ile şekil 1.8'de de gösterildiği gibi DNA'da baz modifikasyonları, baz kırıklıkları, şeker hasarı veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma meydana gelebilir (Esen 2013).

Oksidatif stres mekanizmalarını ve derecesini tespit etmek hastalıklara neden olan mutasyonların nedenlerini ve yayılmasındaki rolünü anlayabilmek için ekstra önem taşımaktadır (Kelly 2008).

1.6.1 Serbest Radikaller

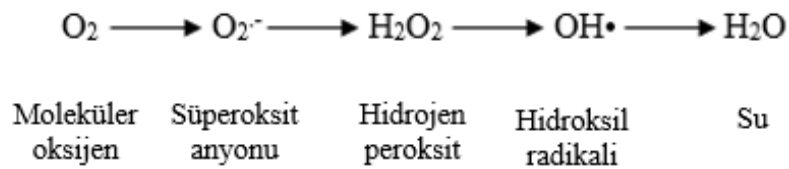
Serbest radikaller son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Demir ve bakır eşleşmemiş elektrona sahip, reaksiyonları katalizleyerek serbest radikal oluşumunu etkilerler (Kaya vd. 2019). RNT/RNS ve ROS/ROT reaktif oksijen türleri vardır.

Reaktif oksijen türleri hücrelerdeki metabolizma ve diğer eksojen çevresel faktörler tarafından Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi geçiş metalleri tarafından katalizlenen redoks döngüsü olarak bilinen bir süreçle üretilir. ROS'un aşırı üretimi karbonhidratlar, nükleik asitler, vb. gibi hücrel biyomoleküllere zarar verebilir. Bunun sonucunda kanser, iltihaplanma, Alzheimer hastalığı, kardiyovasküler hastalık ve yaşlanma gibi birçok hastalık ortaya çıkar (Yi vd. 2009).



Şekil 1.8 Oksidatif Stres'in çeşitli hastalıklara katkısı (Brieger vd. 2012).

Aşağıdaki şekil 1.9'da gösterildiği gibi O_2 'nin birinci ve ikinci elektronun indirgenme reaksiyonu ile sırasıyla O_2^- , H_2O_2 oluşurken üçüncü elektronun eklenmesi ile $OH\cdot$ oluşur (Özcan vd. 2015).



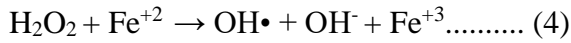
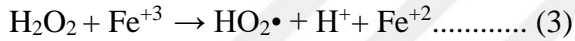
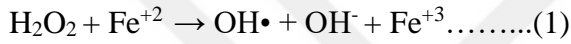
Şekil 1.9 Oksijenin indirgenme reaksiyonu.

1.6.2 Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar. Fe⁺² veya diğer geçiş metallerinin ve süperoksit radikalinin varlığında hidroksil radikalini (OH•) oluşturur. Hidrojen peroksit, demir içeren hücrel membranlarda da hasara neden olabilir (Kumar vd. 2011).

1.6.3 Hidroksil Radikalleri (OH•)

Hidroksil radikalleri elektrofilik ve son derece reaktif bir radikaldır (Kelly 2008). Negatif yüklü DNA'ya Fe⁺² - Fe⁺³ ve Cu⁺¹ - Cu⁺² iyonları sürekli bağlı bulunmakla birlikte oksidatif strese maruz kaldıklarında serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler (Esen 2013).

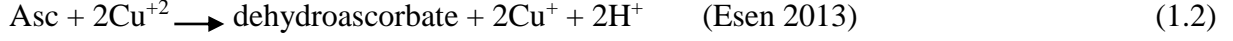


Haber-Weiss reaksiyonları: demir/bakır katalizli (1) ve (2) numaralı reaksiyonlardır. (3) ve (4) numaralı reaksiyonlar ise Fenton reaksiyonlarıdır. Oksidatif hasar mekanizması bu reaksiyonlarla gösterilir. Fenton reaksiyonları, asidik şartlar altında Fe⁺² iyonunun H₂O₂ ile etkileşmesidir ve bunun sonucu hidroksil radikalleri oluşmaktadır (Gürtekin ve Şekerdağ 2008, Esen 2013).

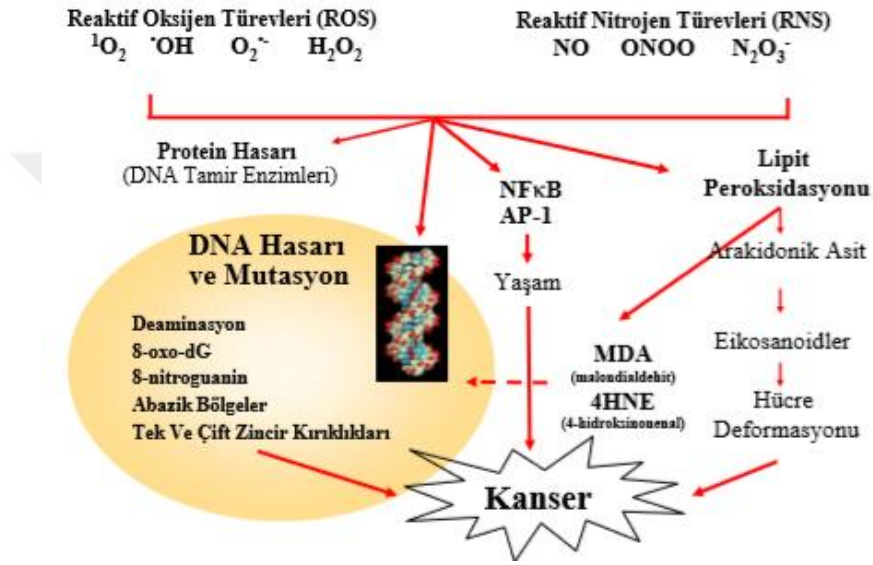
Hidrojen peroksitin kendisi doğrudan DNA'yı oksitleyemez, ancak bir hidroksil radikali oluşturmak için geçiş metalleri ile çok hızlı reaksiyona girer. OH•, DNA'da etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir (Park ve Imlay 2003). Hidroksil radikalleri DNA da bulunan pürin ve pirimidin bazlarında değişikliklere neden olmaktadır (Esen 2013).

Oksidatif mekanizmalarla DNA'da oluşan hasarlanma tipleri şunlardır: Zincir kırılması, DNA-protein çapraz bağlarının oluşması ve mutajenik etkiye yol açar (Şekil 1.10) (Özcan vd. 2015).

Fizyolojik koşullar altında serbest bakır (Cu) iyonları (1.2) de gösterildiği gibi askorbik asit veya hidrojen peroksit varlığında hidroksil radikalleri üretebilirler ve DNA'ya hasar verebilirler (Yokawa vd. 2011).



Askorbik asit metal iyonları ve metal kompleksler tarafından oksitlenirken, metal iyonları indirgenir. Örneğin; Cu^{+2} , Cu^{+} e; Fe^{+3} , Fe^{+2} 'e indirgenir (Yıldıoğan Beker 2011).

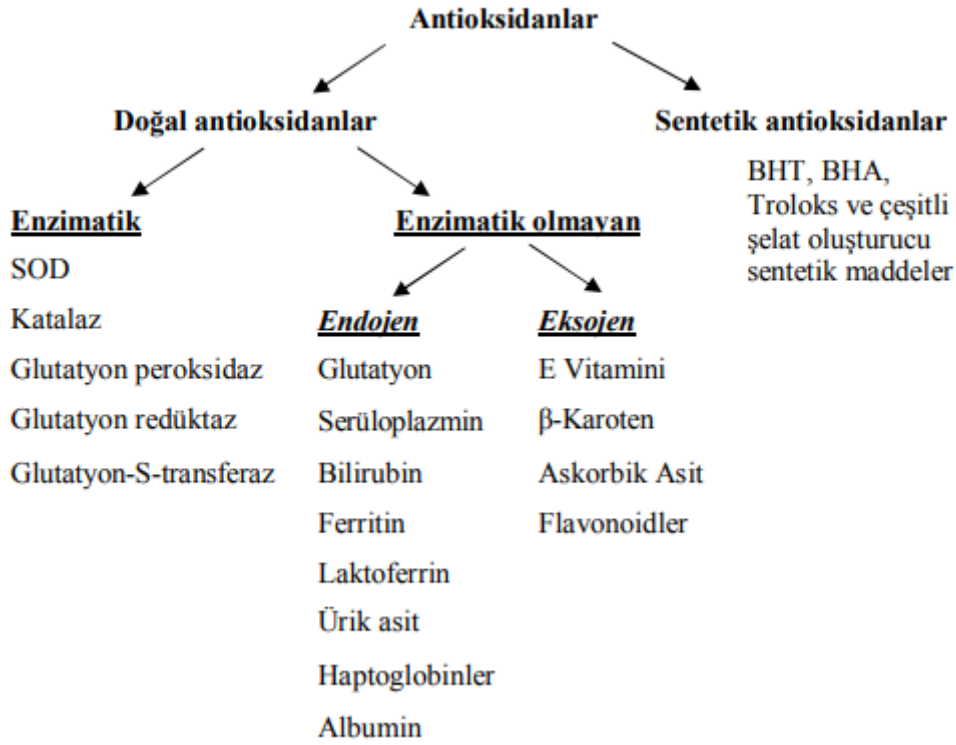


Şekil 1.10 Oksidatif mekanizmalarla DNA'da oluşan hasar mekanizması (Altuntaş ve Batman 2017)

1.7 ANTIOKSİDANLAR / ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

İnsan vücudunu serbest radikallerden veya reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif hasara karşı korur (Kumar vd. 2011).

Antioksidan takviyesiyle oksidatif hasarın inhibe edilmesi; serbest radikal kaynaklı oksidatif hasarların neden olduğu hastalıkların riskini azaltılabileceği ve antioksidan takviyesinin potansiyel sağlık fonksiyonuna sahip olduğu iddia edilmiştir. Bu yüzden DNA gibi biyomoleküllerin oksidatif hasarının inhibitörleri olarak potansiyel aktiviteye sahip olan çeşitli sentetik ve doğal antioksidanların araştırılmasına büyük önem verilmiştir (Yi vd. 2009). Antioksidan savunma sistemleri doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki gruba ayrılırlar (Şekil 1.11).



Şekil 1.11 Antioksidanların sınıflandırılması (Yavaşer 2011).

Demir alımı ile kolorektal kanser (Alexander vd. 2011), Meme kanseri (Guo vd. 2015), Özofagus kanseri (Zhu vd. 2014) ve Akciğer kanseri (Xue vd. 2014) gibi çoklu kanser riski arasındaki korelasyonun varlığını gösteren birçok çalışma vardır. Ek olarak, serum bakır düzeyi ile akciğer kanseri ve rahim ağzı kanseri gibi kanserler arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda rapor vardır (Zhang ve Yang 2018). Ayrıca, bazı ilaçların DNA kırılmasına neden olabileceğini gösteren birkaç rapor vardır. Örneğin, resveratrol (Subramaniam vd. 2015), bleomisin (Kobayashi vd. 1998), kloramfenikol (Ohnishi vd. 2015), N-asetilsistein (Oikawa vd. 1999) ve prokarbazin (Ogawa vd. 2003). DNA'yı demir veya bakır varlığında parçalayabilir.

1.8 GASTROİNTESTİNAL SİSTEMİ

Gastrointestinal sistem, insan üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve fizyolojik koşullar altında dinamik bir dengeyi koruyan karmaşık bir mikroorganizma popülasyonu içerir. Mikrobiyota, bağırsak bütünlüğünü güçlendirmek veya bağırsak epitelyumunu şekillendirmek, enerji toplamak, patojenlere karşı korunmak ve konak immünitelerini düzenlemek gibi birçok fayda sunmaktadır (Canny ve McCormick 2008). Ayrıca bağırsak epitelyum sağlığı ve nöro davranışsal gelişim gibi insanlarda hayati önem arz eden birçok fizyolojik süreci içermektedir

(Barko vd. 2018). Mikrobiyal kompozisyondaki (dysbiosis) herhangi bir değişikliğin insan sağlığı üzerinde doğrudan etkisi vardır (Canny ve McCormick 2008). Gastrointestinal sistemin fonksiyonel ve yapısal olarak normal olması sağlıklı bir yaşam için önemlidir (Schiller vd. 2005).

Mikrobiyota doğumdan sonra kısa bir süre içerisinde gelişmeye başlamaktadır ve yaklaşık olarak 1000 kadar türü içermektedir. Mikrobiyota parmak izi gibi kişiler arasınca farklılık göstermektedir ve bu bireysel farklılık yaşam boyu devam eder. Doğumdan hemen sonra şekillenmeye başlayan bağırsak mikrobiyotası yaş, kişisel alışkanlıklar, beslenme şekli ve çevresel etkenlere bağlı olarak şekillenmeye devam eder (Yılmaz ve Altındış 2017).

Son yıllarda yapılan bağırsak mikrobiyota çalışmalarına bakıldığında bağırsak mikrobiyotasının insan sağlığı ve hastalıkların gelişmesinde önemli bir sistem olduğu İnsan mikrobiyom projesinde ortaya koyulmuştur. Mikrobiyomun büyük bir kısmı başta gastrointestinal sistem olmak üzere deri, ağız, ürogenital vb. bölgelerde yer almaktadır. Gastrointestinal sistem mikroorganizmaların yaşamı için yeterli yüzeye ve gerekli besin öğelerine sahiptir (Çetinbaş vd. 2017).

400-500 m²'lik bir alana sahip olan bağırsaklarımızda beş yüz çeşit bakteri yaşamaktadır ve bu bakterilerin % 98'i faydalıdır (Koca 2015). Bu faydalı flora bakterileri gıda sindiriminde görev alarak proteinleri aminoasitlere, karbohidratları disakkaritlere ve yağları da yağ asitlerine dönüştürmektedirler (Söylemez 2018).

Mikrobiyal flora üyeleri geçici ve kalıcı flora olarak iki sınıfta incelenmektedir. Geçici flora üyeleri konakta kısa süre zarfında bulunan çoğunlukla hastalık oluşturmeyen nadiren patojen olabilen mikroorganizma topluluğu iken kalıcı flora üyeleri ise yerleştiği belirli bölgelerden kısa süreli olarak kalkmış olsa bile o bölgede tekrarlı olarak oluşabilen, her zaman bulunan mikroorganizma topluluğudur. Bu kalıcı ve geçici flora üyelerindeki dengesizlik durumu bir grubun diğer grup alanında yoğunluğunun fazla olması çeşitli hastalıklara neden olabilir. Bağırsaktaki bakterilerin çeşitliliği ve dengesinde ki bozukluklar diğer patojen bakterilerin vücuda hâkim olmasına sebep olabilir (Çetinbaş vd. 2017). İnsan bağırsağı konakçının bağışıklık sistemi ile birlikte yerleşik olarak bulunan çok sayıda kommensal bakteri ile denge halinde olan bir ekosistem olarak düşünölmektedir (Chow vd. 2010)

Disbiyozis; mikrobiyotada meydana gelen değişim veya bozulmadır ve inflamatuara ve metabolik rahatsızlıklar gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir (Süzük 2015).

Dizbiyozis:

- Faydalı organizmaların kaybı,
- Potansiyel olarak zararlı organizmaların aşırı büyümesi ve
- Mikrobiyal çeşitliliğin kaybolması, olarak incelenmektedir ve inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), obezite, alerjik bozukluklar, insan ve hayvan gastrointestinal sistemlerinde kolorektal kanser gibi çeşitli hastalıklarına neden olabilmektedir (Söylemez 2018).

Bağırsak mikrobiyotası ile psikiyatrik bozukluklar depresyon, şizofreni, anksiyete gibi hastalıklar arasında bağlantı olduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Evrensel ve Ceylan 2015).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda insanların gastrointestinal sisteminde bulunan ve flora bakterileri olarak adlandırılarak belirli bir oranda faydalı ve zararlı olan gram negatif ve gram pozitif bakterilerin çeşitli hastalıkların belirlenmesi ve tedavisinde önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Mikrobiyal disbiyozis (bozulmuş bağırsak mikrobiyotası) floradaki bakterilerin yarar ve zarar oranındaki dengesizlik sürecidir ve bu süreç kanser gibi birçok hastalığa neden olmaktadır (Altuntaş ve Batman 2017). Gastrointestinal enfeksiyonlar ve üriner enfeksiyonlar gram negatif bakterilerin etken olarak görüldüğü enfeksiyonların başında gelmektedir. (Doğantekin vd. 2013).

Oral yol ile ilaç alımından başlayan salınım, ilaç dağıtımının en karmaşık yoludur. Bu nedenle oral yoldan verilen bir ilacın etkili olması için; ilacın gastrointestinal kanalın sıvılarında çözülmesi ve lümeninde bozulmadan kalması, epitel zarını geçmesi ve düşük oranda ilk geçiş metabolizmasına maruz kalması gerekmektedir (Sousa vd. 2008). İlaçların mikrobiyotaya karşı kararlılığı klinik açıdan önem arz etmektedir: ilaç metabolizmada aktif, inaktif ve toksik olarak farmakolojik etki gösterebilir. İlaçlar doğrudan bakterilerle temas edebilir (fitiller gibi). İlaçların alındığı doz miktarı ve sıklık durumuna göre kullanımı, mikrobiyomu kalıcı olarak değiştirebileceği bilinmektedir (Söylemez 2018). Bu durum mikrobiyota da değişimlere neden olabilir ve bu da ilaç stabiliteilerinin flora bakterileri üzerinde değerlendirilmesinin gerekliliğini göstermektedir (Sousa vd. 2008).

1.9 BAĞIRSAK FLORA BAKTERİLERİ

Bu çalışmada incelenilen gram negatif ve gram pozitif bağırsak flora bakterilerinin *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*'in özellikleri:

1.9.1 *Escherichia coli*

Doğumdan birkaç saat sonra bebeklerin gastrointestinal yoluna yerleşir. Bağırsak florasının en çok bulunan fakültatif anaerobudur (Kaper vd. 2004). Memeli ve insan florasında doğal olarak bulunan, spor oluşturmeyen gram negatif (-) bir bakteridir (Arısoy 2013). Hareketli gram-negatif basiller içeren *Escherichia* cinsinin türüdür. Aerobik koşullar altında 37 °C'de genel veya seçici ortam üzerindeki klinik örneklerden kolayca geri kazanılabilir. *E. coli* suşlarının % 90'ı laktoz pozitifdir (Nataro ve Kaper 1998). Basit besiyerlerinde yalnızca gliserol içeren besiyerlerinde bile kolaylıkla üreyebilirler. 7 - 49 °C sıcaklık derecelerinde ve pH 4,5 - 9 arasına uyum gösterirler ve çoğalabilirler. İdeal üreme sıcaklıkları 35 - 37 °C'dir. - 20 °C'de yıllarca stoklanabilirler (Bozatalı 2019). 1,1 - 1,5 µm çapında 2,0 - 6,0 µm boyundadırlar (Şekil 1.12). Spor oluşturmamalarına rağmen çevresel etkenlere oldukça dirençlidirler (Tekin 2018). Birçok hastalığa neden olacak virülans özelliği vardır (Kaper vd. 2004). Diyare hastalığı, idrar yolu enfeksiyonları (İYE) ve menenjit gibi hastalıklara neden olur. Farklı özelliklere sahip en az altı farklı patotipe (EPEC, ETEC, EHEC vb.) sahiptir ve patotip içindeki suşlar virülans özelliklerine göre ayırt edilirler (Harrington vd. 2006).



Şekil 1.12 *Escherichia Coli*'nin SEM görüntüsü (Tekin 2018)

E. coli besiyerinde oval hafif kabarık ve s tipi kolaniler olarak görülürler. *E. coli* virülans faktörlerini kodlayan genetik elementler edinmediği sürece, iyi huylu olarak bulunurlar (Evans

Jr ve Evans 1996). Sınıflandırılması yüzeylerindeki antijeni yapılaraya göre değişir. Patojenik türleri ise hastalığın türüne ve virülans özelliğine göre sınıflandırılır (Omerovic vd. 2018).

1.9.2 *Enterobacter cloacae*

Enterobacteriaceae ailesine ait spor oluşturmeyen gram negatif (-) bakteri türüdür (Şekil 1.13). 25° ve 37 °C’de üreyebilirler (Buckle 2014). İnsan bağırsağı mikrobiyotasından biri, fakültatif anaerobik bakteri suşudur (Lee vd. 2002). Flagellum, adipoz dokuyu etkileyerek obezite ve hepatik yağ içeriği ile ilişkili flagellin proteininden üretildi (Munukka vd. 2016). İnsanların ve hayvanların gastrointestinal kanallarında yaşayan komünite veya patojen kaynağı olmakla beraber hayvan ve insan patojenleri için önemli antimikrobiyal direnç genlerine sahip olduğu düşünülmektedir (Moreira vd. 2009). Ampisilin, amoksisilin vb. antibiyotiklere dirençlidir. Enterobacteriaceae ailesindeki *E.cloacae* en çok insan klinik örneklerinden temin edilebilir (Davin-Regli 2015).



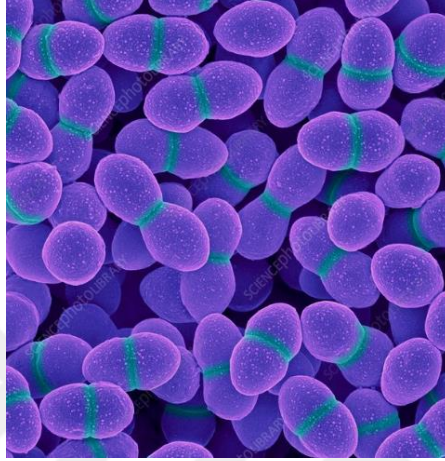
Şekil 1.13 *Enterobacter Cloacae* (URL-1)

1.9.3 *Enterococcus faecalis*

Gram pozitif (+) fakültatif aneorob bir bakteridir. Optimum büyüme koşulları 35 - 37 °C arasındadır (Şekil 1.14). Vajinal kanalda, bağırsaklarda bulunmakla birlikte düşük patojenik potansiyele sahiptir (Arısoy 2013). Hastahanedeyatan kişilerde % 80 - 90 oranında enfeksiyona neden olurlar. İdrar yolu enfeksiyonlarına, bakteriyemi ve bakteriyel endokarditlere neden olmalarına rağmen hayvanların ve insanların gastrointestinal florasına sahip olan saprofitik bir popülasyondur (Dutka-Malen vd. 1995, Toledo-Arana vd. 2001). Geniş

pH aralıklarına direnebilmeleri onların membran dayanıklılıklarına asit ve alkalilere karşı geçirimsiz olmalarından kaynaklanmaktadır (Vu ve Carvalho 2011).

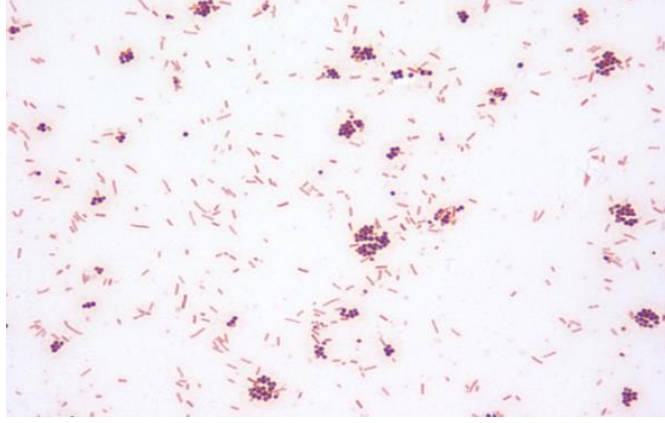
Bu bakteriler hastane kaynaklı bakteriyeminin en yaygın 3. nedeni olarak görülmektedir (Dutka-Malen vd. 1995). Enterekok enfeksiyonlarının % 80 - 90'ından *E. faecalis* sorumludur (Duprè vd. 2003).



Şekil 1.14 *Enterococcus faecalis* SEM görüntüsü (URL-2)

1.9.4 *Proteus mirabilis*

Enterobacteriaceae familyasına ait, gram negatif (-) spor oluşturmeyen kapsülsüz bakterilerdir (Şekil 1.15) (Kurtoğlu vd. 2008). Proteaceae ailesinde yer alan çok hareketli ve klasik besiyerinde üreyebilirler (Uslu vd. 2011). Bütün türleri inhibe edici olmayan katı besiyerinde dalga benzeri büzme hareketi gösterirler (Mordi ve Momoh 2009). Diyabetik olarak en baskın gram negatif izolatları olduğu bulunmuştur (Yah vd. 2007). İnsan bağırsak florasının olağan bir üyesidir ve burdan ayrıldıklarında enfeksiyona neden olabilirler (Mohammed vd. 2016). Sıklıkla idrar yolu enfeksiyonlarına (İYE), neden olabilirler ve böbrek taşı oluşumunda etkilidirler (Uslu vd. 2011). *Proteus mirabilis*, yerel ve sistemik enfeksiyonlar sırasında klinik laboratuvarlarda yaygın olarak izole edilen Enterobacteriaceae familyasının bir türüdür (Bonnet vd. 1999).



Şekil 1.15 *Proteus mirabilis* (URL-3)

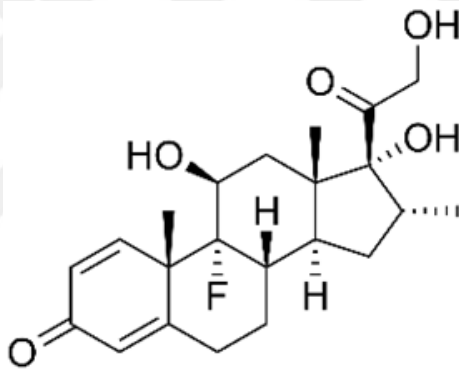




BÖLÜM 2

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmada *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Enterococcus faecalis* ATCC-29212 ve *Proteus mirabilis* ATCC 7002 suşları kullanılmıştır. Deksametazon (katalog No: 1042-1) BioVision'dan satın alındı ve test maddesi olarak kullanıldı. Deksametazon'un moleküler ağırlığı 392,46 idi ve kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterildiği gibiydi.



Şekil 2.1 Deksametazon'un kimyasal yapısı (Singh vd. 1994).

2.1 KULLANILAN CİHAZLAR

- İnkübatör (Thermo Scientific, 866-9-thermo)
- Çalkalamalı İnkübatör (Mipro)
- Mikropipet seti (Thermo Scientific- Finnpiquette)
- Mikrodalga Fırın (Altus ALMD 17B)
- UV-vis spektrofotometre (OptiSen, UV-1800)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo Scientific EC 300XL)
- Elektroforez Tankı (JUNYI®)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Bio-Print ST4)
- Derin Dondurucu (Altus)

- Otoklav (Nüve, steam art)
- Hassas Terazi (Rad-Wag)
- Laminer Akış Kabini (Nüve, LN 090)
- Su Banyosu (Nüve Bath nb 20)
- Santrifüj (Nüve NF 800R)
- Santrifüj (Elektro-mag)
- Vorteks (Nüve NM 110)

2.2 KULLANILAN KİMYASAL MADDELE

2.2.1 Jel Elektroforezinde Kullanılan Kimyasalla

- NucleoSpin Plasmid, Plasmid DNA Pürfikasyon Kiti (Macherey-Nagel) (kit içeriği bölüm 2.3’de verilmiştir)
- CaCl₂ 0,1 M
- Gliserol 84 mM
- LB Broth (Luria Broth), (Miller’ s LB Broth) (Conda)
- Amfisilin (10mg / ml)
- Agaroz (Biomax)
- 1X TAE Tamponu
- % 100’lük Etil Alkol
- Etidyum Bromür
- Askorbik Asit (40 µM - 60 µM)
- Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (6mM)
- FeSO₄ (0,03 - 0,3 - 1,5 - 30 mM)
- CuCl₂ (0,2 – 2 – 20 – 40 – 60 µM)
- PBS (pH 7 - 7,5)
- Distile Su (Ezcacıbaşı)

2.2.2 Antibakterial Effekt Analizinde Kullanılan Kimyasallar

- Mueller Hinton (Sigma Aldrich)
- Agar
- Distile Su

2.2.3 UV – Vis Spektrofotometre Analizinde Kullanılan Kimyasallar

- EDTA (0,5M)
- Tris (50mM) Sigma
- Tris – EDTA Tamponu (0,5 M EDTA 10 µl + 50mM 5 ml Tris)
- Calf Thymus DNA (3,3 mM)
- Sığır Serum Albümin (BSA) (0,025 g BSA + 5 ml 50 mM Tris)

2.3 PLAZMİD DNA HAZIRLANMASI

pUC19 plazmid DNA, daha önce plazmid ile transforme edilmiş *Escherichia coli*'nin NEB5a türünden saflaştırıldı. NEB5α bakterileri kompetent hücre haline getirildi. Kompetent NEB5α bakterileri pUC19 plazmid ile transformasyonu yapılır. Transformasyon sonrası amfisilin (10 mg / ml) içeren katı besiyerine ekildi ve bir gecelik 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Pipet ucu ile büyümüş kolonilerden birine temas edildi ve amfisilin içeren sıvı besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de gecelik kültür hazırlandı. pUC19'un transform olduğu NEB5α bakterilerini içeren sıvı besiyerinden plazmid DNA pürfikasyonu NucleoSpin Plasmid, Plasmid DNA Pürfikasyon Kiti (Macherey-Nage) kullanılarak yapıldı. Kompetent hücrenin hazırlanması ve transformasyon işlemleri aşağıda belirtilen aşamalar ile gerçekleştirildi.

Kompetent Hücre Stoğu

1. Stok halinde bulunan NEBα bakterileri katı besiyerinde ekim yaparak kültür yenilendi. Daha sonra yeni kolonilerden LB sıvı besiyerinde 37 °C'de gecelik kültür hazırlandı.
2. LB sıvı besiyeri gecelik kültür ile inoküle edilip absorbans değeri 0,35 - 0,4'e ulaşana kadar 37 °C ve 120 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kültürü içeren erlen buz içerisinde bekletilerek diğer işlemlere devam edildi.
3. Gecelik kültürden 5 steril cam tüpe 10 ml koyuldu.

4. 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 5 ml 0,1 M CaCl₂ koyuldu. 20 dk 0 °C'de bekletildi.
6. Ardından 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
7. Her bir pellet üzerine 84 mM gliserol içeren 500 µl CaCl₂ koyuldu.
8. Oluşturulan kompetent hücre stoğu - 80 °C'de depolandı.

Plazmid Transformasyonu

-80 °C'de depolanan kompetent hale getirilmiş NEB5α bakterilerine pUC19 plazmid transformasyonu aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. - 80 °C'den alınan 100 µl kompetent NEB5α bakterileri hafifçe karıştırıldı ve eridikten sonra üzerine 5 µl pUC19 plazmidi eklendi ve hafifçe karıştırıldı. Buz içerisinde gerçekleştirilen bu işlemde 30 dk 0 °C'de beklendi.
2. 1 dk 42 °C'de su banyosunda beklendi.
3. 2 dk 0 °C'de beklendi.
4. 900 µl taze LB eklendi.
5. 37 °C'de 125 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde 1 saat inkübasyona bırakıldı.
6. Ardından amfisilin (50µg / ml) içeren katı besiyerine 100 µl yayma ekimi yapıldı ve gece boyu inkübasyona bırakıldı. (NEB5α bakterilerinin amfisilin direnci yoktur. pUC19 plazmid aktarımı gerçekleştiren bakteriler katı besiyerinde üreyebilir). Büyümüş kolonilerden birine mikropipet ucu ile temas edildi ve amfisilin içeren sıvı besiyerine ekim yapıldı. 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bunlardan plazmid pürfikasyonu aşağıdaki aşamalar ile yapıldı.

Plazmid DNA Pürfikasyonu

Hazırlık aşaması

NucleoSpin Plasmid, Plasmid DNA Pürfikasyon Kiti (Macherey-Nagel) kiti kullanıldı. RNase A'ya 1 ml tampon A1 eklendi ve vortekslendi. Sonra çözeltiyi Tampon A1 şişesine geri aktarıldı ve iyice karıştırıldı. Tarih yazıldı ve + 4 °C'de saklandı. Tampon A4 ve AQ'a belirtilen oranda % 96 - 100 etanol eklendi (A4'e 6 ml'e 24 ml etanol eklendi. AQ'a 6ml'e 24 ml etanol eklendi). Tampon A3 ve AW guanidin hidroklorür (reaktif bileşikler oluşturur) içerdiğinden, eldiven takıldı. Aşağıdaki prosedüre göre pürfikasyon yapıldı.

1. pUC19'un transform olduğu NEB5α bakteri hücrelerini içeren gecelik sıvı besiyerinden 10 ml alındı. 30 sn 11.000 g'de santrifüj edildi. Sıvı kısım (Süpernatant) olabildiğince alınıp uzaklaştırıldı.

2. Pellet üzerine 250 µl tampon A1 eklendi. Vorteks yapılarak pellet iyice çözdürüldü. Hiçbir hücre kümesi kalmamasına dikkat edildi.
NOT: 250 µl tampon A2 eklenmeden önce A2'de beyaz bir çökelti varsa tamponu 30 - 40 °C'de birkaç dakika ısıtınız. İyice karıştırıp oda sıcaklığına (18 - 25 °C) kadar soğuduğunda kullanınız.
3. 250 µl tampon A2 eklenir ve 6 - 8 kez hafifçe alt - üst edildi. Oda sıcaklığında 5 dk beklendi.
4. 300 µl tampon A3 eklenir. Mavi örnekler tamamen belirsizleşinceye kadar hassas bir şekilde alt - üst edildi.
5. 11000 g'de 10 dk santrifüj edildi (süpernatant temiz değilse bu adım tekrar edilir).
6. 2 ml'lik tüpe kolon yerleştirildi. 5. Aşamadaki süpernatant en fazla 750 µl olarak sütuna koyuldu. 1 dk 11000 g'de santrifüj edildi. Kolon tüpe tekrar koyuldu ve kalan lizat yüklendi. 1 dk 11000 g'de santrifüj edildi.
7. Önceden 50 °C'de ısıtılmış 500 µl tampon AW kolonun içine eklendi. 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Dipte toplanan atıldı. Kolon tüpe geri koyuldu.
8. 600 µl tampon A4 eklendi. 1 dk 11000 g'de santrifüj edildi. Dipte toplanan atıldı.
9. 2 dk 11000 g'de santrifüj edildi. Dipte toplanan atıldı.
10. Kolonu 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 70 °C'de önceden ısıtılmış 50 µl AE kolonun tam ortasına eklendi. 70 °C'de 2 dk inkübe edildi. 1 dk 11000 g de santrifüj edildi.
11. Dipte toplanan DNA alikotlanarak - 20'de depolandı.

DNA'nın saflığı ve miktarı hem Beer-Lambert Yasası hem de agaroz jel (% 1) elektroforezi ile analiz edildi. Pürifikasyon ile elde edilen DNA konsantrasyonu OD 260: 0,008 için 8 µg / ml'dir.

2.4 İLAÇ SOLÜSYONUN HAZIRLANMASI

BioVision'dan püre olarak alınan Deksmetazon 1 g (catalog 1042-1) pudra kullanıldı. 2 mg Dex, 1 ml phosphate saline buffer (PBS) içerisinde molaritesi 5 mM olacak şekilde çözdürüldü ve ilaç yoğunluğu farklı konsantrasyonlara (1700 µM - 170 µM - 17 µM - 1,7 µM ve 0,42 µM) PBS ile seyreltilerek hazırlandı.

Flora bakterileri ile olan çalışmada Dex Mueller Hinton sıvı besiyerinde 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5µM konsantrasyonlarında çözdürüldü.

UV – Vis Spektrofotometre İlaç – DNA analizinde Dex, (4 mM) Tris - EDTA tamponunda çözdürüldü.

UV – Vis Spektrofotometre İlaç - BSA (Sığır Serum Albümin) analizinde Dex, (4 mM) Tris tamponunda çözdürüldü.

2.5 DEKSAMETAZON’UN DNA ÜZERİNDEKİ KIRMA AKTİVİTESİ

Dex’in DNA kırma aktivitesini incelemek amacıyla, 0,247 μM bp pUC19 plazmid DNA, farklı konsantrasyonlardaki Dex (1700 μM - 170 μM - 17 μM - 1,7 μM ve 0,42 μM) ile PBS ortamında muamele edilmiştir. 45 dk 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımı % 1’lik agaroz jel elektroforezinde 90 volt’ta 55 dk boyunca yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleri jel doc cihazında analiz edildi. Dex’in olmadığı aynı miktarlardaki pUC19 plazmid DNA, PBS (pH: 7,5) ortamında kontrol olarak kullanıldı (Valipour vd. baskıda).

2.6 DEKSAMETAZON’UN H₂O₂ VARLIĞINDA DNA ÜZERİNDEKİ KESME AKTİVİTESİ

0,247 μM bp pUC19 plazmid DNA, oksidatif ajan olarak 6 mM H₂O₂ varlığında Dex’in farklı konsantrasyonları (1700 μM - 170 μM - 17 μM - 1,7 μM ve 0,42 μM) ile 45 dk 37 °C’de muamele edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımı % 1’lik agaroz jel elektroforezinde 90 volt’ta 55 dk boyunca yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleri jel doc cihazında analiz edildi. Aynı miktarda pUC19 plazmid DNA ve yine aynı miktarda pUC19 plazmid DNA ile 6 mM H₂O₂ içeren kontroller kullanıldı. Kontrollerde Dex kullanılmadı (Valipour vd. baskıda). Çalışmada kullanılan H₂O₂’nin kontrolü katalaz testi ile yapılmıştır. Katalaz pozitif bir bakteri olan *E. coli* bakteri kolanileri üzerine birkaç mikrolitre H₂O₂ damlatıldı ve gözlem yapıldı.

2.7 DEKSAMETAZON’UN ASKORBİK ASİT VARLIĞINDA DNA ÜZERİNDEKİ KESME AKTİVİTESİ

0,247 μM bp pUC19 plazmid DNA, indirgeyici bir ajan 40 μM Asc (askorbik asit) varlığında Dex’in farklı konsantrasyonları (1700 μM - 170 μM - 17 μM - 1,7 μM ve 0,42 μM) ile 45 dk 37 °C’de muamele edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımı % 1’lik agaroz jel

elektroforezinde 90 volt'ta 55 dk boyunca yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleri jel doc cihazında analiz edildi. Dex'in bulunmadığı aynı miktarda pUC19 plazmid DNA ile 40 μ M Asc içeren kontrol ile sadece pUC19 plazmid DNA, kontrol olarak kullanıldı. (Valipour vd. baskıda).

2.8 DEMİR KAYNAKLI DNA HASARI ÜZERİNE DEKSAMETAZON'UN ETKİSİ

2.8.1 Dekametazon'un Farklı Konsantrasyonlarının FeSO₄ ile DNA Etkileşimi Üzerine Etkisi

Dex'in demire karşı DNA üzerindeki koruyucu ve / veya kırıcı etkisini incelemek amacıyla Ul-Haq ve arkadaşları (2012) tarafından kullanılan prosedür temel alındı. 1,5 mM FeSO₄ bulunan ortamda 0,247 μ M bp pUC19 plazmid DNA farklı konsantrasyonlardaki Dex (1700 μ M - 170 μ M - 17 μ M - 1,7 μ M ve 0,42 μ M) ile 1 saat 37 °C'de muamele edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımı % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 volt'ta 55 dk boyunca yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleri jel doc cihazında analiz edildi. Aynı miktarda pUC19 plazmid DNA kontrol olarak kullanıldı (Valipour vd. baskıda).

2.8.2 Dekametazon'un Farklı Konsantrasyonlarının FeSO₄ + H₂O₂ ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi

Dex'in FeSO₄ + H₂O₂ ile DNA arasındaki reaksiyondan kaynaklanan hidroksil radikaline karşı koruyucu etkisini incelemek amacıyla Ul-Haq ve arkadaşları (2012) tarafından kullanılan prosedür temel alındı. FeSO₄ + H₂O₂ bulunan ortamda 0,247 μ M bp pUC19 plazmid DNA farklı konsantrasyonlardaki Dex (1700 μ M – 170 μ M - 17 μ M - 1,7 μ M ve 0,42 μ M) ile 1 saat 37 °C'de muamele edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımı % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 volt'ta 55 dk boyunca yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleri jel doc cihazında analiz edildi. Aynı miktarda pUC19 plazmid DNA kontrol olarak kullanıldı. Aynı miktarda pUC19 plazmid DNA, 1,5 mM FeSO₄ + 6 mM H₂O₂ kontrol olarak kullanılmıştır (Valipour vd. baskıda).

2.8.3 Dekametazon'un FeSO₄ (30 mM – 0,3 mM – 0,03 mM) + H₂O₂ ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi

17 µM Dex'in FeSO₄ + H₂O₂ ile DNA arasındaki reaksiyondan kaynaklanan hidroksil radikaline karşı koruyucu etkisini incelemek amacıyla Ul-Haq ve arkadaşları (2012) tarafından kullanılan prosedür temel alındı. Reaksiyonda Dex'in plazma konsantrasyonları Çizelge 2'de yer alan veriler göz önünde bulundurularak, Dex plazma konsantrasyonu 17 µM olarak belirlendi. Demirin vücut konsantrasyonları (30 mM – 0,3 mM – 0,03 mM) FeSO₄ + 6 mM H₂O₂ bulunan ortamda 0,247 µM bp pUC19 plazmid DNA 17 µM Dex ile 1 saat 37 °C'de muamele edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımı % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 volt'ta 55 dk boyunca yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleri jel doc cihazında analiz edildi. Aynı miktarda pUC19 plazmid DNA kontrol olarak kullanıldı (Valipour vd. baskıda).

2.9 BAKIR KAYNAKLI DNA HASARI ÜZERİNE DEKSAMETAZON'UN ETKİSİ

2.9.1 Dekametazon'un Farklı Konsantrasyonlarının, CuCl₂ + Askorbik Asit ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi

Dex'in bakır varlığında DNA kırılması üzerindeki etkisini analiz etmek için 60 µM CuCl₂ + 60 µM Asc bulunan ortamda 0,247µM bp pUC19 plazmid DNA farklı konsantrasyonlardaki Dex (1700 µM – 170 µM - 17 µM - 1,7 µM ve 0,42 µM) ile 37 °C'de 45 dk muamele edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımı % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 volt'ta 55 dk boyunca yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleri jel doc cihazında analiz edildi. pUC19 plazmid DNA ile 60 µM CuCl₂ kontrol olarak kullanıldı. 1700 µM Dex, pUC19 plazmid DNA ile 60 µM CuCl₂ kontrol olarak kullanıldı. Yine pUC19 plazmid DNA kontrol olarak kullanılmıştır (Yokawa vd. 2011).

2.9.2 Dekametazon'un CuCl₂ (40 µM - 20 µM – 2 µM – 0,2 µM) + Askorbik Asit ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi

17 µM Dex'in bakır varlığında DNA kırılması üzerindeki etkisini analiz etmek için plazma konsantrasyonları Çizelge 1.2'de yer alan veriler göz önünde bulundurularak, Dex plazma konsantrasyonu 17 µM olarak belirlendi. Bakırın vücuttaki konsantrasyonlarına göre

belirlenmiş CuCl_2 (40 μM - 20 μM - 2 μM - 0,2 μM) + 40 μM Asc bulunan ortamda 0,247 μM bp pUC19 plazmid DNA, 17 μM Dex ile 37 °C'de 45 dk muamele edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımı % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 90 volt'ta 55 dk boyunca yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleri jel doc cihazında analiz edildi. Aynı miktarda pUC19 plazmid DNA, kontrol olarak kullanıldı (Yokawa vd. 2011).

2.10 DEKSAMETAZON'UN FLORA BAKTERİLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

2.10.1 Dekametazon'un *Enterobacter cloacae*'nin Büyümesi Üzerine Etkisi

Farklı Dex konsantrasyonlarını (2264 μM başlangıç konsantrasyonu ile iki katlı bir seyreltme oluşturarak yapılan seri dilüsyonlar) içeren Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlandı. McFarland 0,5 olacak şekilde *Enterobacter cloacae*'nin gecelik kültürü ile inoküle edildi ve 37 °C'de 48 saat 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bundan sonra kültürün üremesi UV - görünür spektrofotometre (Optizen 2120 UV) ve CFU (koloni oluşturan üniteler) sayımı kullanarak tayin edildi. Ek olarak, Mueller Hinton agar üzerinde 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM Dex içeren steril diskler kullanılarak deney tekrarlandı (Alataş 2011, Valipour vd. baskıda). Mueller Hinton agar üzerinde *Enterobacter cloacae* suşu yayma yöntemi ile ekildi. Ardından disk kullanılmadan 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM Dex konsantrasyonları 4 kontrol olacak şekilde 10 μl halinde aralıklarla damlatıldı. 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Mueller Hinton agar üzerinde *Enterobacter cloacae* suşu yayma yöntemi ile ekildi ve *Enterobacter cloacae* suşunun amfisilin direncine amfisilinli (amp⁺) disk yöntemi ile bakılmıştır.

2.10.2 Dekametazon'un *Escherichia coli*'nin Büyümesi Üzerine Etkisi

Farklı Dex konsantrasyonlarını (2264 μM başlangıç konsantrasyonu ile iki katlı bir seyreltme oluşturarak yapılan seri dilüsyonlar) içeren Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlandı. McFarland 0,5 olacak şekilde *Escherichia coli*'nin gecelik kültürü ile inoküle edildi ve 37 °C'de 48 saat 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bundan sonra kültürün üremesi UV-görünür spektrofotometre (Optizen 2120 UV) ve CFU (koloni oluşturan üniteler) sayımı kullanarak tayin edildi. Ek olarak, Mueller Hinton agar üzerinde 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM Dex içeren steril diskler kullanılarak deney tekrarlandı (Alataş 2011, Valipour vd.

baskıda). Mueller Hinton agar üzerinde *Escherichia coli* suşu yayma yöntemi ile ekildi. Ardından disk kullanılmadan 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex konsantrasyonları 4 kontrol olacak şekilde 10 µl halinde aralıklarla damlatıldı. 37 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Mueller Hinton agar üzerinde *Escherichia coli* suşu yayma yöntemi ile ekildi ve *Escherichia coli* suşunun amfisilin direncine amfisilinli (amp⁺) disk yöntemi ile bakılmıştır.

2.10.3 Dekametazon’un *Enterococcus faecalis*’in Büyümesi Üzerine Etkisi

Farklı Dex konsantrasyonlarını (2264 µM başlangıç konsantrasyonu ile iki katlı bir seyreltme oluşturarak yapılan seri dilüsyonlar) içeren Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlandı. McFarland 0,5 olacak şekilde *Enterococcus faecalis*’in gecelik kültürü ile inoküle edildi ve 37 °C’de 48 saat 150 rpm’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bundan sonra kültürün üremesi UV-görünür spektrofotometre (Optizen 2120 UV) ve CFU (koloni oluşturan üniteler) sayımı kullanarak tayin edildi. Ek olarak, Mueller Hinton agar üzerinde 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex içeren steril diskler kullanılarak deney tekrarlandı (Alataş 2011, Valipour vd. baskıda). Mueller Hinton agar üzerinde *Enterococcus faecalis* suşu yayma yöntemi ile ekildi. Ardından disk kullanılmadan 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex konsantrasyonları 4 kontrol olacak şekilde 10 µl halinde aralıklarla damlatıldı. 37 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Mueller Hinton agar üzerinde *Enterococcus faecalis* suşu yayma yöntemi ile ekildi ve *Enterococcus faecalis* suşunun amfisilin direncine amfisilinli (amp⁺) disk yöntemi ile bakılmıştır.

2.10.4 Dekametazon’un *Proteus mirabilis*’in Büyümesi Üzerine Etkisi

Farklı Dekametazon konsantrasyonlarını (2264 µM başlangıç konsantrasyonu ile iki katlı bir seyreltme oluşturarak yapılan seri dilüsyonlar) içeren Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlandı. McFarland 0,5 olacak şekilde *Proteus mirabilis*’in gecelik kültürü ile inoküle edildi ve 37 °C’de 48 saat 150 rpm’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bundan sonra kültürün üremesi UV-görünür spektrofotometre (Optizen 2120 UV) ve CFU (koloni oluşturan üniteler) sayımı kullanarak tayin edildi. Ek olarak, Mueller Hinton agar üzerinde 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5µM Dex içeren steril diskler kullanılarak deney tekrarlandı (Alataş 2011, Valipour vd. baskıda). Mueller Hinton agar üzerinde *Proteus mirabilis* suşu yayma yöntemi ile ekildi. Ardından disk kullanılmadan 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM Dex

konsantrasyonları 4 kontrol olacak şekilde 10 µl halinde aralıklarla damlatıldı. 37 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Mueller Hinton agar üzerinde *Proteus mirabilis* suşu yayma yöntemi ile ekildi ve *Proteus mirabilis* suşunun amfisilin direncine amfisilinli (amp⁺) disk yöntemi ile bakılmıştır.

2.11 DEKSAMETAZON’UN DNA’YA BAĞLANMASININ ANALİZİ

2.11.1 UV- Vis Tarama Yoluyla Deksametazon’un DNA’ya Etkisi

3,3 mM Calf Thymus DNA, Tris - EDTA tamponunda (0,5 molar EDTA’dan 10 µl alınır ve 50 mM Tris’den 5 ml alınıp karıştırılır) hazırlandı. Aynı tamponda 4 mM Dex çözdürüldü. 1 cm kuvars küvetler kullanıldı. 220 – 320 nm dalga boyunda DNA sabit tutularak, DNA üzerine 5 dk inkübasyon süresi ile 2 µl Dex titre edildi ve ölçüm alındı.

Kanakis ve arkadaşlarının (2009), Marty ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmalar göz önünde bulundurularak k bağlanma sabitini hesaplamak için veriler aşağıdaki denkleme (2.1) göre ele alınır:

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

A₀ DNA’nın ilk absorbans değeridir. A_∞ DNA-Dex doymuş halinin absorbans değeridir. A farklı Dex konsantrasyonlarında kaydedilen absorbanstır. C ligand = Dex.

2.11.2 İn-siliko Yoluyla Deksametazon - DNA Etkileşimi

In siliko analizi için, UCSF Chimera programı (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>), AutoGrid4 ve AutoDock4’e giriş yapılarını hazırlamak için kullanıldı.

DNA dizisi (PDB ID: 1BNA) Protein Veri Bankasından (<https://www.rcsb.org/>) 3D formu alınmış ve yerleştirme hesaplamaları için daha da değiştirilmiştir. Ligand = Dex, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri bankasından alınmış ve yerleştirme hesaplamaları için daha da değiştirilmiştir. Makromolekül = DNA ve ligand = Dex, 3D yapıları PDB formatında kaydedilir. DNA ve Dex dosyaları AutoDock programı kullanılarak hazırlandı. Yazılım

kullanılarak, su molekülleri silinmiştir. DNA'ya polar hidrojen atomları eklendi ve polar olmayan hidrojen atomları birleştirildi. Makromolekül – ligand hazırlanması, Grid, Docking, Analysis ve Discovery basamakları program üzerinde gerçekleştirildi. DNA, x * y * z yönlerinde (50, 50, 100) grid noktalarının sayısı bulunan bir kutu içine alındı. Auto Dock'da uygulanan Lamarckian genetik algoritmaları, yerleştirme hesaplamalarını yapmak için kullanılmıştır. Analysis basamağının ardından Discovery basamağında DNA ile ilaç etkileşimi analiz edilmiştir (Silva vd. 2016).

2.12 DEKSAMETAZON'UN PROTEİN İLE ETKİLEŞİMİNİN ANALİZİ

2.12.1 UV – Vis Tarama Yoluyla Dekametazon'un Sığır Serum Albumin (BSA) ile Etkileşimi

2,9 mM BSA Tris tamponunda (0,025 g BSA 5 ml Tris (50 mM) tamponunda çözdürüldü) hazırlandı. Aynı tamponda 4 mM Dex çözdürüldü. 1 cm kuvars küvetler kullanıldı. 210 – 350 nm dalga boyunda BSA sabit tutularak, BSA üzerine 5 dk inkübasyon süresi ile 2 µl Dex titre edildi ve ölçüm alındı.

Kanakis ve arkadaşlarının (2009), Marty ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmalar göz önünde bulundurularak k bağlanma sabitini hesaplamak için veriler aşağıdaki denkleme (2.1) göre ele alınır:

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

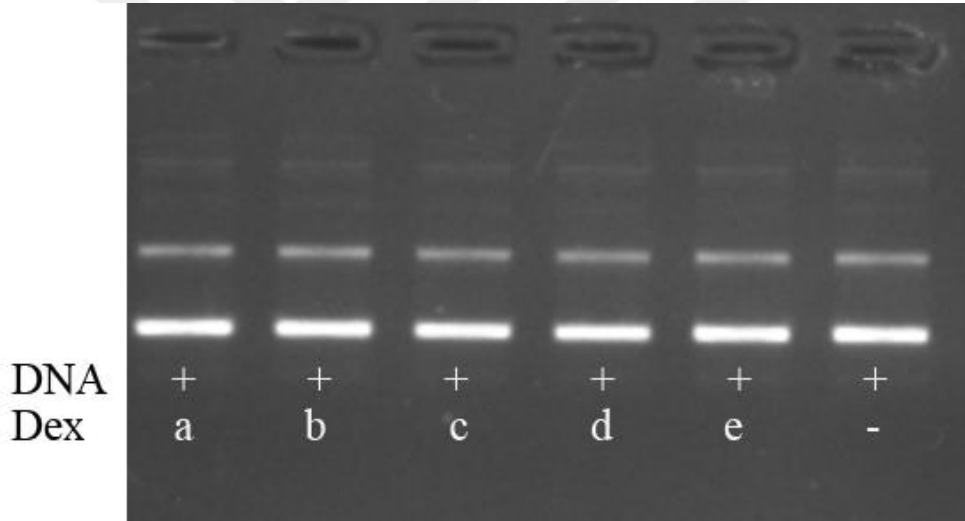
A_0 BSA'nın ilk absorbans değeridir. A_∞ BSA-Dex doymuş halinin absorbans değeridir. A farklı Dex konsantrasyonlarında kaydedilen absorbanstır. C ligand = Dex

BÖLÜM 3

BULGULAR

3.1 DEKSAMETAZON'UN DNA ÜZERİNDEKİ KIRMA AKTİVİTESİ

Farklı konsantrasyonlarda Dex (1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μM) ile muamele edilmiş süpersarmal plazmid DNA, muamele edilmemiş DNA'ya kıyasla agaroz jel elektroforezinde değişiklik göstermediği şekil 3.1'de gösterilmektedir.

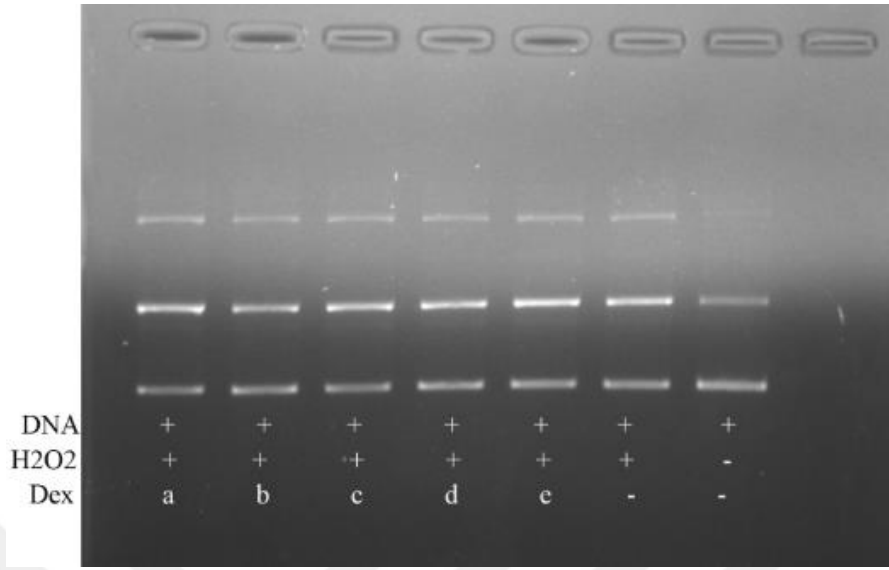


Şekil 3.1 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μM bp) Dex ile muamele edilmesi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analiz. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μM Dex'i temsil eder.

3.2 DEKSAMETAZON'UN H_2O_2 VARLIĞINDA DNA ÜZERİNDEKİ KIRMA AKTİVİTESİ

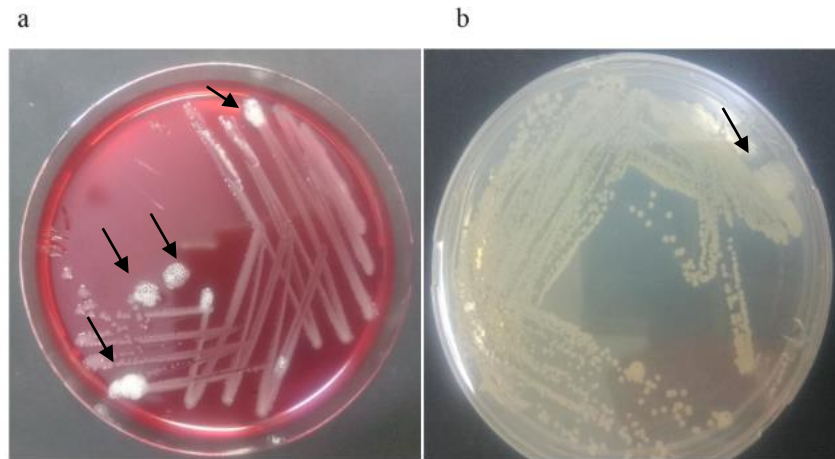
Farklı konsantrasyonlarda Dex konsantrasyonları ile muamele edilmiş süpersarmal plazmid DNA, muamele edilmemiş DNA'ya kıyasla H_2O_2 varlığında agaroz jel elektroforezinde değişiklik göstermedi (Şekil 3.2). Jelde meydana gelen kırılma H_2O_2 'nin ortamda tepkimeye

girip hidroksil radikali oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Dex'in bu kırma üzerinde etkisi yoktur.



Şekil 3.2 pUC19 plazmid DNA' sının (0,247 μ M bp) Dex ve sabit 6 mM H₂O₂ ile muamele edilmesi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μ M Dex'i temsil eder.

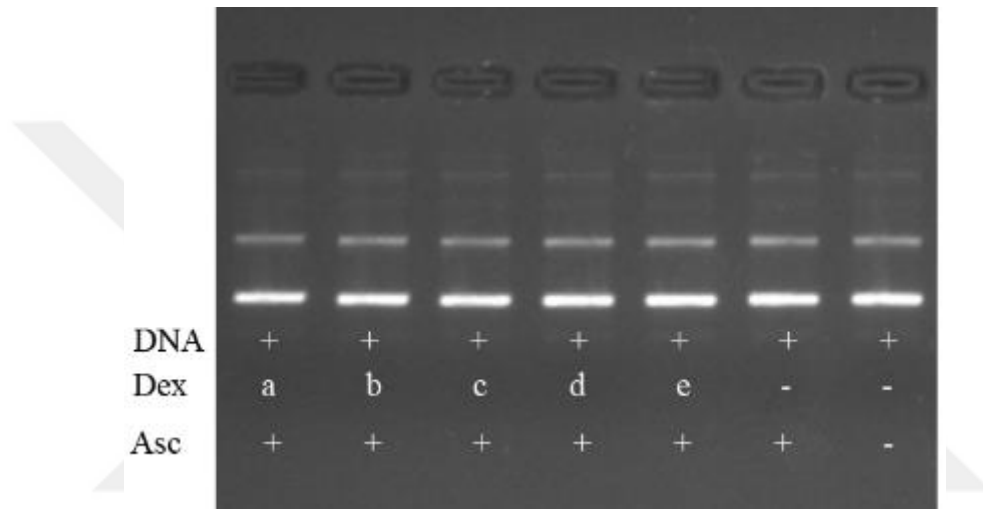
Çalışmada kullanılan H₂O₂'nin kontrolü katalaz testi ile yapılmıştır. *E. coli* katalaz pozitif bir bakteridir ve koloniler üzerine H₂O₂ damlatılınca katalaz enzimi H₂O₂'i parçalar ve hava kabarcıkları oluşur (Şekil 3.3). Oksijen ıkışı olur. Oluşan hava kabarcıkları H₂O₂'nin güvenilirliğini gösterir



Şekil 3.3 H₂O₂'nin kontrolü katalaz testi. (a) Kanlı agardaki *E. coli* bakteri kolonisinde okla gösterilen yerlere H₂O₂ damlatılmıştır. (b) *E. coli* bakteri kolonisinde okla gösterilen yerlere H₂O₂ damlatılmıştır. Oluşan hava kabarcıkları gözlenmektedir.

3.3 DEKSAMETAZON'UN ASKORBİK ASİT VARLIĞINDA DNA ÜZERİNDEKİ KIRMA AKTİVİTESİ

Farklı konsantrasyonlarda Dex (1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μ M) ile muamele edilmiş süper sarmal plazmid DNA, muamele edilmemiş DNA'ya kıyasla agaroz jel elektroforezinde değişiklik göstermedi (Şekil 3.4). DNA'nın sadece Asc ile muamele edilmesi DNA'ya zarar vermedi. Dex konsantrasyonlarının hiçbiri, süpersarmal DNA üzerinde, indirgeyici bir madde olarak Asc varlığında kırılma yaratmadı.

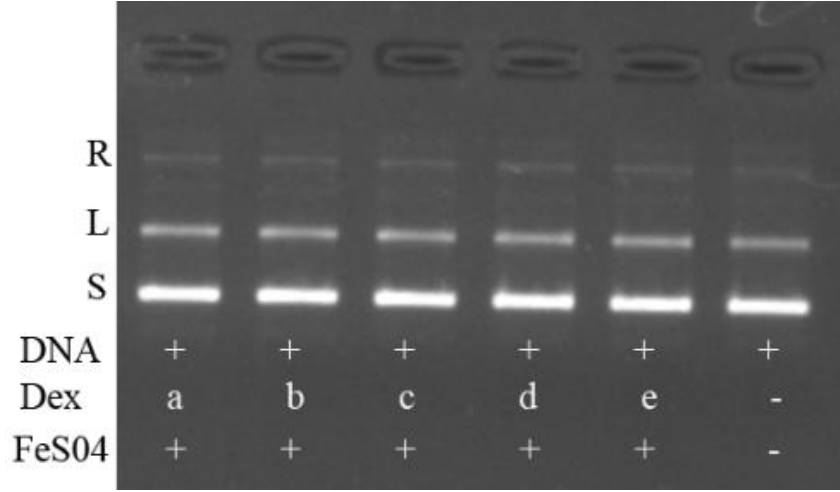


Şekil 3.4 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μ M bp) Dex ve sabit 40 μ M Asc ile muamele edilmesi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μ M Dex'i temsil eder.

3.4 DEMİR KAYNAKLI DNA HASARI ÜZERİNE DEKSAMETAZON'UN ETKİSİ

3.4.1 Dekametazon'un Farklı Konsantrasyonlarının FeSO₄ ile DNA Etkileşimi Üzerine Etkisi

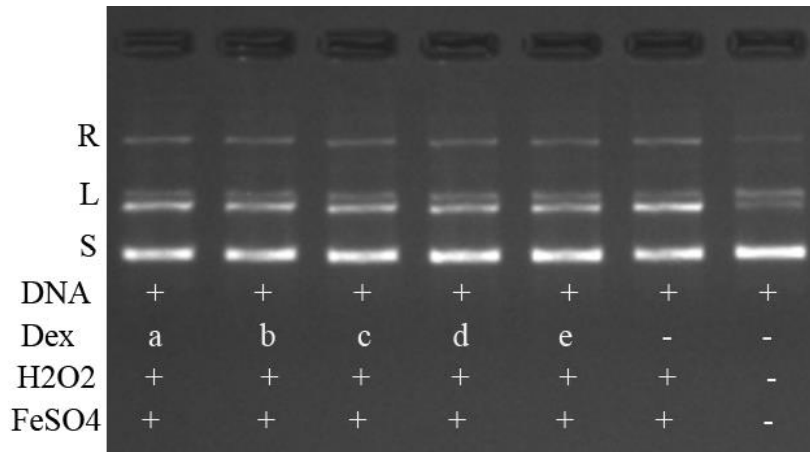
pUC19 plazmid DNA'sı, 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μ M Dex ve 1,5 mM FeSO₄ ile muamele edilip inkübe edildiğinde, hiçbir DNA kırılması meydana gelmedi (Şekil 3.5). Dex FeSO₄ ile reaksiyona girip DNA'yı kıran hidroksil radikalleri oluşturmadı.



Şekil 3.5 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μ M bp) Dex ve sabit 1,5 mM FeSO₄ ile muamele edilmesi ve % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μ M Dex'i temsil eder. R, L ve S bağları sırasıyla relax (sirküler), linear (doğrusal) ve süpercoil (süpersarmal) plazmid DNA'dır.

3.4.2 Dekametazon'un Farklı Konsantrasyonlarının FeSO₄ + H₂O₂ ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi

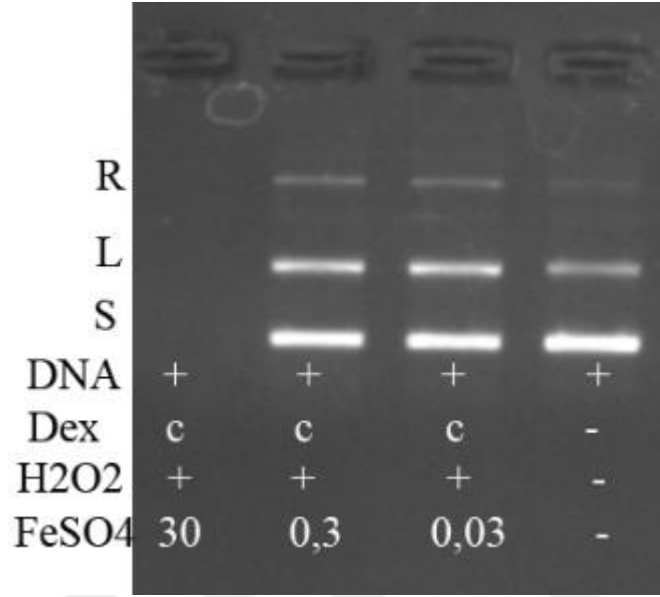
Süpersarmal pUC19 plazmid DNA'sının sabit bir FeSO₄ (1,5 mM) + 6 mM H₂O₂ konsantrasyonu ile muamele edilmesi, DNA'nın süpersarmal (süpercoil) formunu, kırılmalar nedeniyle sirküler (relax) forma ve doğrusal (linear) forma dönüştürdü (Şekil 3.6). Dex konsantrasyonlarının hiçbiri, DNA'yı, H₂O₂ ile FeSO₄ arasındaki etkileşimden kaynaklanan DNA'ya zarar veren hidroksil radikallerine karşı korumadı.



Şekil 3.6 PUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μ M bp), Dex, sabit 1,5 mM FeSO₄ ve sabit 6 mM H₂O₂ ile muamele edilmesi ve % 1 lik agaroz jel elektroforezinde analizi. a, b, c, d ve e sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μ M Dex'i temsil eder. R, L ve S bağları sırasıyla relax (sirküler), linear (doğrusal) ve süpercoil (süpersarmal) plazmid DNA'dır.

3.4.3 Dekametazon'un FeSO₄ (30 mM – 0,3 mM – 0,03 mM) + H₂O₂ ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi

DNA'nın, artan konsantrasyonlarda (30 - 0,3 – 0,03 mM) FeSO₄ ile muamele edilmesi, 30 mM FeSO₄'ün DNA'nın tamamen kaybolmasına neden olduğunu ve Dex'in bu tahribata karşı koruyucu bir etkisinin olmadığını göstermiştir (Şekil 3.7).

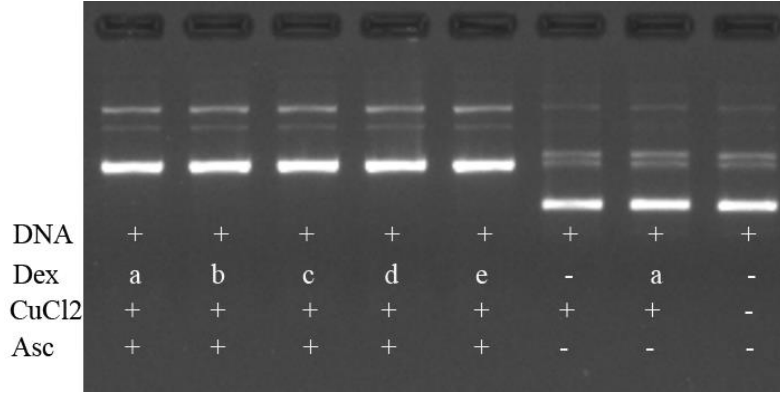


Şekil 3.7 Dex'in demir varlığında DNA kırılması üzerindeki etkisi. DNA, pUC19 plazmid DNA (0,247 µM bp) idi. H₂O₂ konsantrasyonu 6 mM idi. FeSO₄ konsantrasyonları, 30, 0,3 ve 0,03 mM idi. Dex c: 17 µM'dır. R, L ve S bağları sırasıyla relax (sirküler), linear (doğrusal) ve süpercoil (süpersarmal) plazmid DNA'dır.

3.5 BAKIR KAYNAKLI DNA HASARI ÜZERİNE DEKSAMETAZON'UN ETKİSİ

3.5.1 Dekametazon' un Farklı Konsantrasyonlarının, CuCl₂ + Askorbik Asit ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi

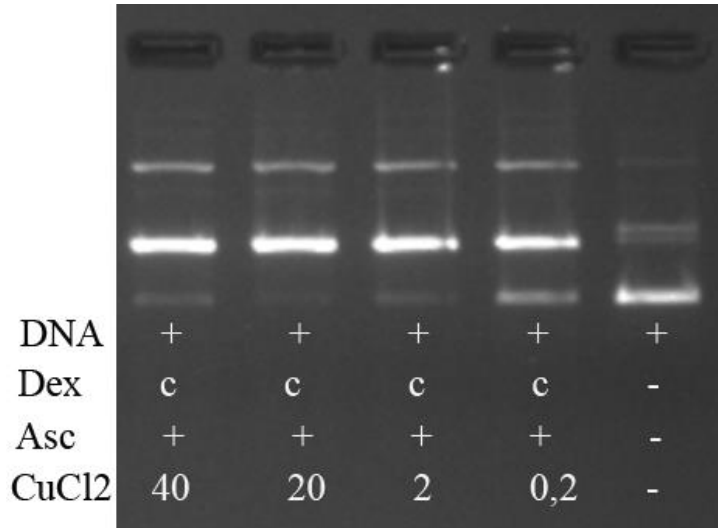
CuCl₂ askorbik asit ile DNA üzerinde kırılmalara neden olmuştur. DNA hem relax (sirküler) hem de linear (doğrusal) forma dönüştürmüştür (Şekil 3.8). 6. Kuyucukta görüldüğü gibi CuCl₂ tek başına DNA üzerinde kırılmaya neden olmamıştır. 7. Kuyucukta görüldüğü gibi Dex, CuCl₂ ile askorbik asit gibi tepkimeye girmemiş ve hidroksil radikali oluşturmamıştır.



Şekil 3.8. pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μ M bp) sabit 60 μ M CuCl₂, sabit 60 μ M askorbik asit ve Dex ile muamele edilmesinin % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. Dex konsantrasyonları sırasıyla 1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 μ M'yi temsil eden a, b, c, d ve e olarak gösterilmiştir.

3.5.2 Deksametazon'un CuCl₂ (40 μ M - 20 μ M – 2 μ M – 0,2 μ M) + Askorbik Asit ile DNA Arasındaki Etkileşimi Üzerine Etkisi

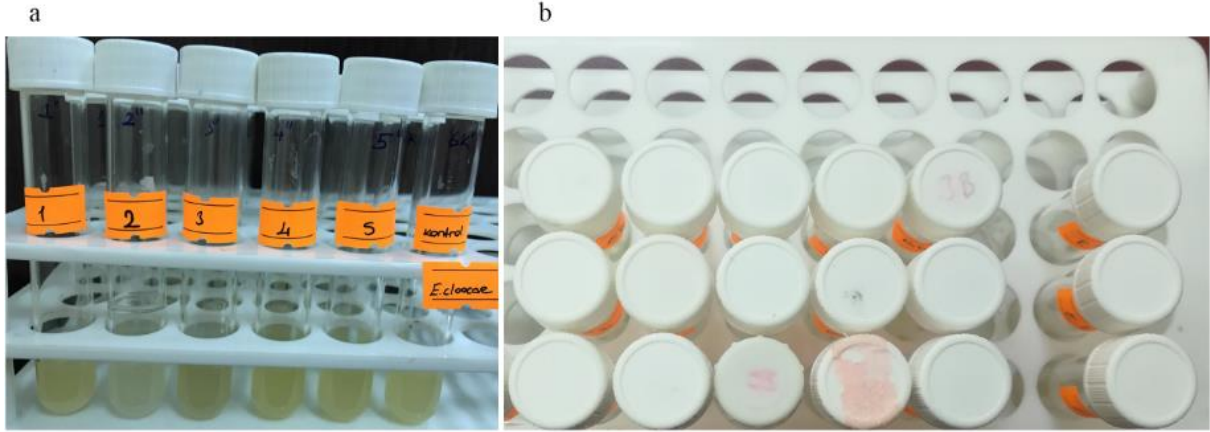
DNA'nın süpersarmal yapısı indirgeyici bir madde olan askorbik asit ve CuCl₂ vücut konsantrasyonları varlığında hem relax (sirküler) hem de linear (doğrusal) forma dönüştürmüştür (Şekil 3.9). Dex, DNA'yı kıran CuCl₂ ve Asc kaynaklı hidroksil radikallerine karşı korumadı.



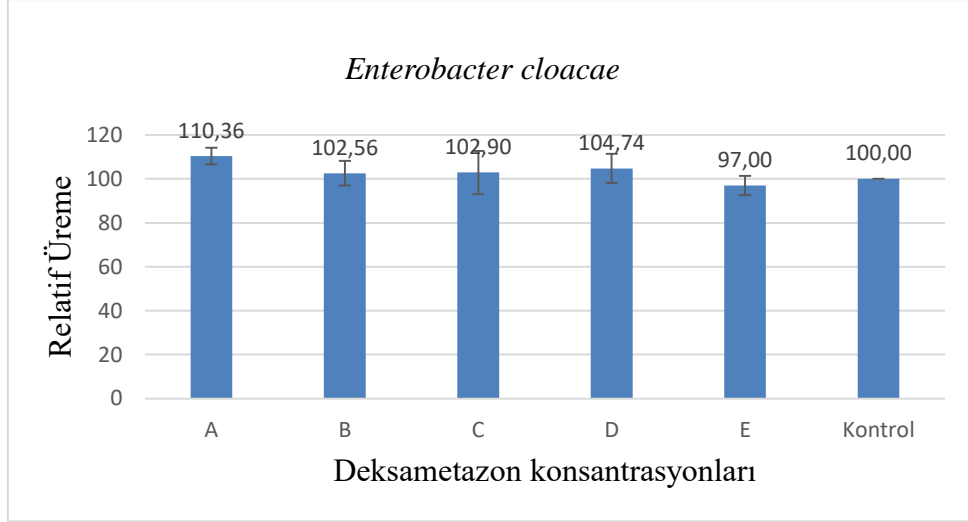
Şekil 3.9 pUC19 plazmid DNA'sının (0,247 μ M bp) sabit 40 μ M Asc, Dex ve CuCl₂ (40 μ M - 20 μ M – 2 μ M – 0,2 μ M) konsantrasyonları ile muamele edilmesinin % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analizi. Dex c: 17 μ M plazma konsantrasyonunda idi.

3.6 DEKSAMETAZON'UN *ENTEROBACTER CLOACAE*'NİN BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

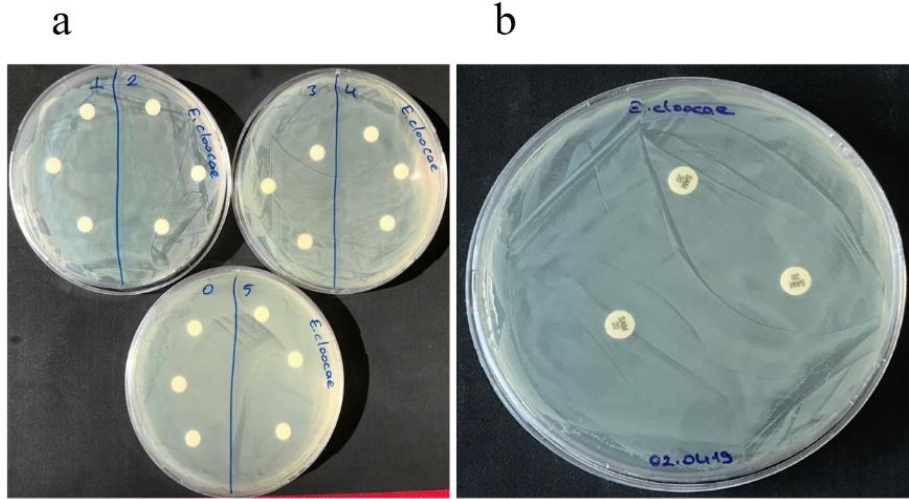
Dex'in konsantrasyonlarının hiçbiri (2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μ M), *Enterobacter cloacae* üremesi üzerinde herhangi bir inhibitör etki göstermedi, aksine *Enterobacter cloacae*'nin üremesi üzerinde küçük bir uyarıcı etki gösterdi (Şekil 3.10). Yüksek konsantrasyonlu (2264 μ M) ilaçla muamele edilen kültür, hücre yoğunluğunu % 10 arttırdı (Şekil 3.11). Dex konsantrasyonları içeren disklerin çevresinde herhangi bir zon gözlenmedi (Şekil 3.12 a). Disk yöntemine alternatif olarak yapılan Dex konsantrasyonlarını içeren halkalarda da üremenin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.13). Amfisilinli disk yöntemi (amp⁺) ile diskler etrafında da üremenin olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 3.12 b). *Enterobacter cloacae*'nin standart üreme grafiği şekil 3.14'de gösterilmektedir.



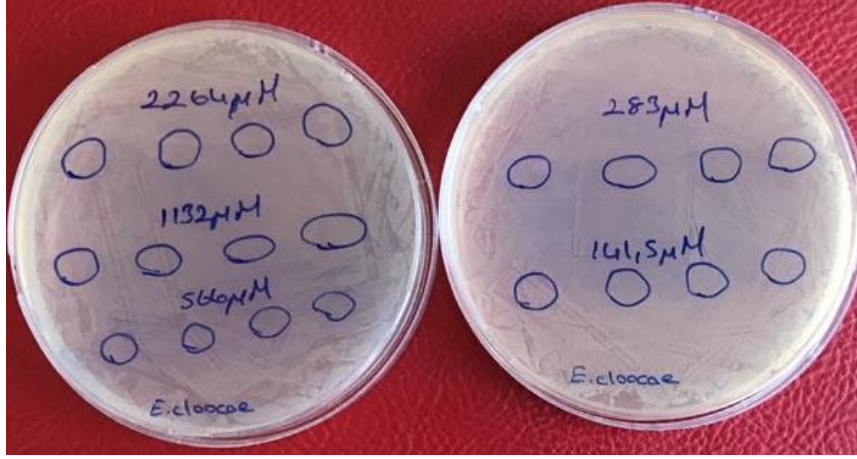
Şekil 3.10 (a) Mueller Hinton sıvı besiyerinde farklı konsantrasyonlardaki Dex'in *Enterobacter cloacae* ile muamele edilmesi. 1-2-3-4-5 sırayla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μ M Dex konsantrasyonları idi. (b) üçlü tekrarı göstermektedir.



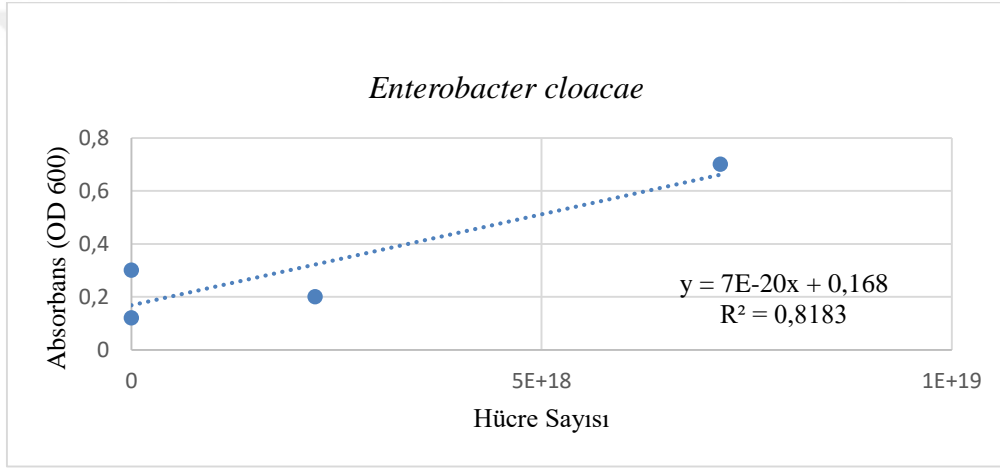
Şekil 3.11 *Enterobacter cloacae*'nin farklı konsantrasyonlarda Dex içeren sıvı besiyerinde göreceli büyümesi. A-B-C-D-E sırasıyla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM Dex temsil etmektedir. Grafikte % 100 olarak gösterilen üreme $2.71\text{E}+19$ hücre sayısını göstermektedir.



Şekil 3.12 (a) Steril diskler kullanarak *Enterobacter cloacae* Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan plaka yarılarında bulunan disklerin Dex konsantrasyonları sırasıyla 0, 141,5, 283,08, 566, 1132, 2264 μM 'dır. (b) *Enterobacter cloacae*'nin amfisilinli disk yöntemi (amp^+).



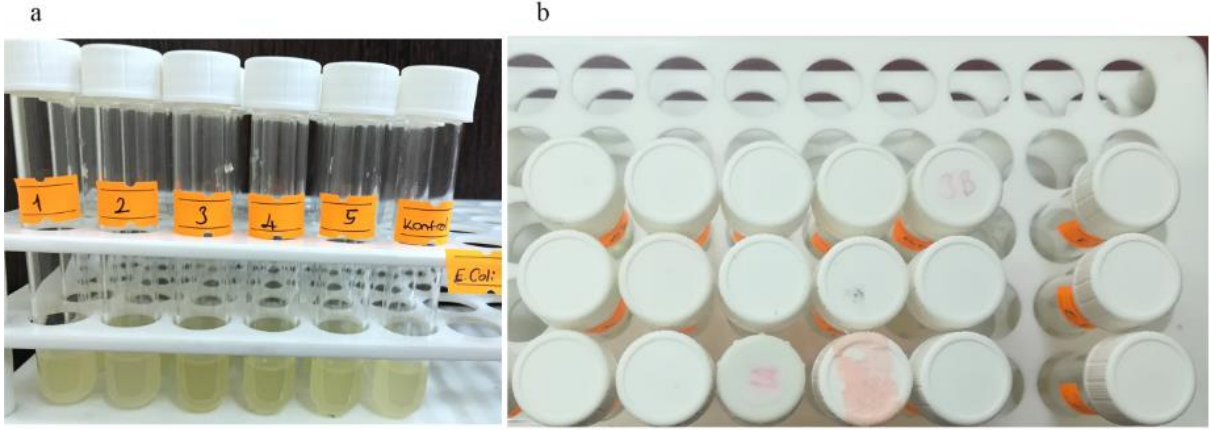
Şekil 3.13 *Enterobacter cloacae* Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. Dex konsantrasyonları 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM idi.



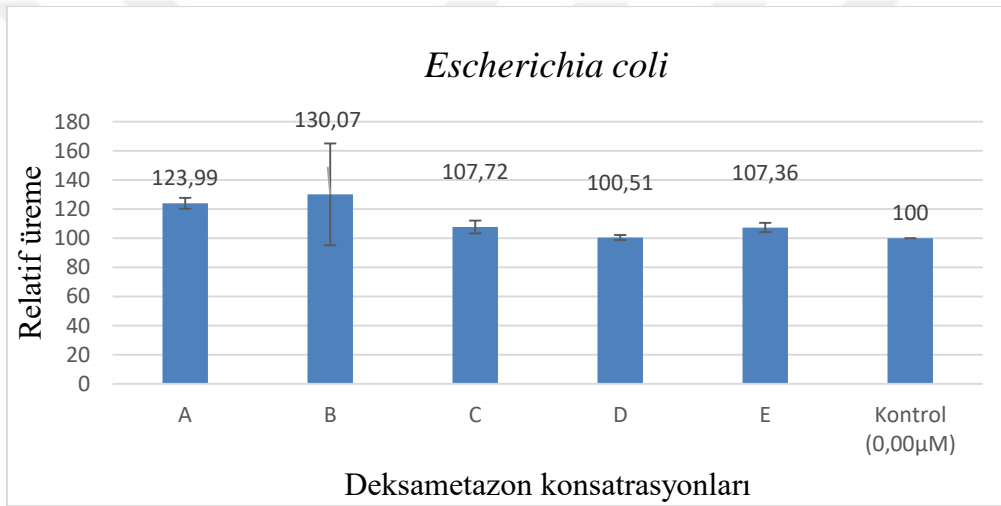
Şekil 3.14 *Enterobacter cloacae* suşunun standart üreme grafiği.

3.7 DEKSAMETAZON'UN *ESCHERİCHIA COLI*'NİN BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

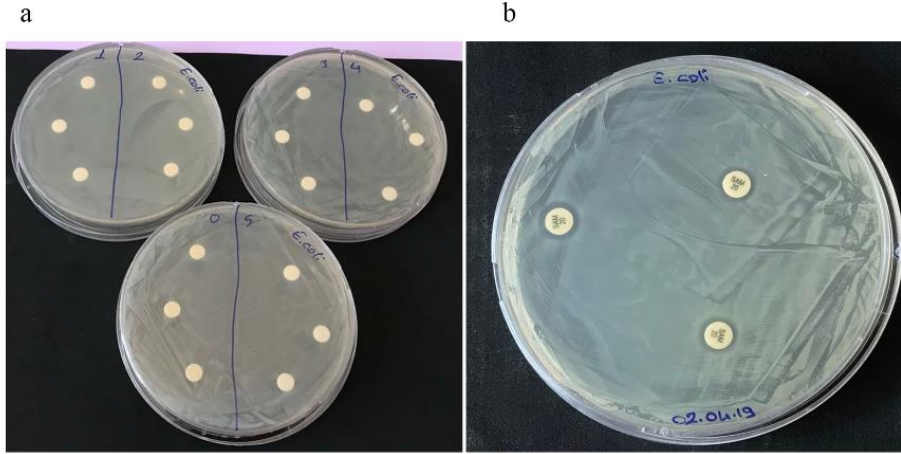
Dex konsantrasyonlarının hiçbirisi (2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM), *Escherichia coli* üremesi üzerinde herhangi bir inhibitör etki göstermedi, aksine *Escherichia coli*'nin üremesi üzerinde küçük bir uyarıcı etki gösterdi (Şekil 3.15). Yüksek konsantrasyonlu (2264 µM) ilaçla muamele edilen kültür, hücre yoğunluğunu % 23, (1132 µM) ilaçla muamele edilen kültürde ise hücre yoğunluğu % 30, oranında arttı (Şekil 3.16). Dex konsantrasyonlarını içeren disklerin çevresinde herhangi bir zon gözlenmedi (Şekil 3.17 a). Disk yöntemine alternatif olarak yapılan Dex konsantrasyonlarını içeren halkalarda da üremenin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.18). Amfisilinli disk yöntemi (amp⁺) ile diskler etrafında üremenin olmadığı halkalar görülmektedir (3.17 b). *Escherichia coli*'nin standart üreme grafiği şekil 3.19'da gösterilmektedir.



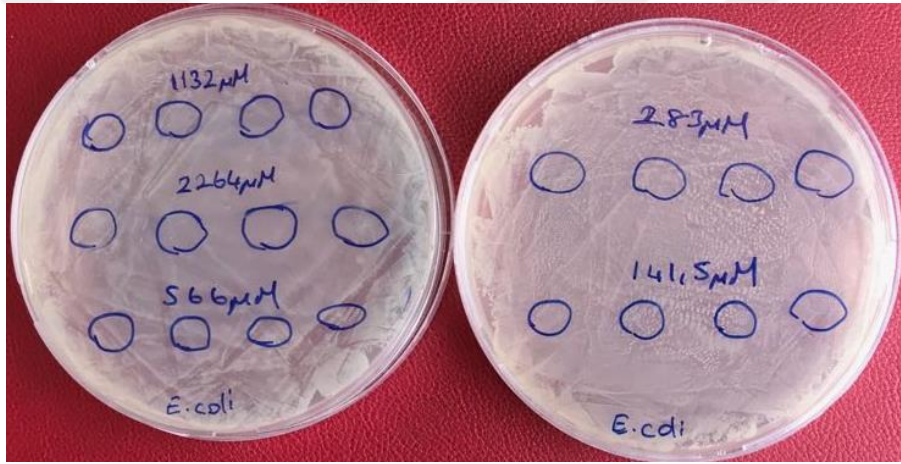
Şekil 3.15 (a) Mueller Hilton sıvı besiyerinde farklı konsantrasyonlardaki Dex'in *Escherichia coli* ile muamele edilmesi. 1-2-3-4-5 sırayla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM Dex konsantrasyonları idi. (b) üçlü tekrarı göstermektedir.



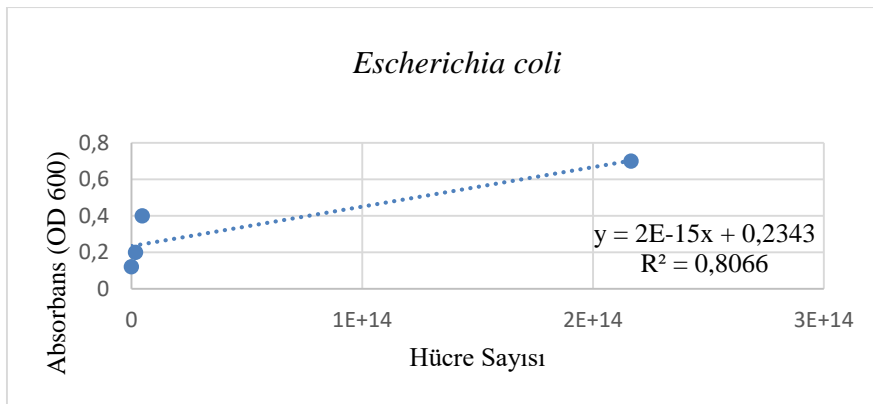
Şekil 3.16 *Escherichia coli*'nin farklı konsantrasyonlarda Dex içeren sıvı besiyerinde göreceli büyümesi. A-B-C-D-E sırasıyla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM Dex temsil etmektedir. Grafikte % 100 olarak gösterilen üreme $7,6735\text{E}+14$ hücre sayısını göstermektedir.



Şekil 3.17 (a) Steril diskler kullanarak *Escherichia coli* Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan plaka yarılarında bulunan disklerin Dex konsantrasyonları sırasıyla 0, 141,5, 283,08, 566, 1132 ve 2264 μM idi. (b) *Escherichia coli*'nin amfifilimli disk yöntemi (amp^+).



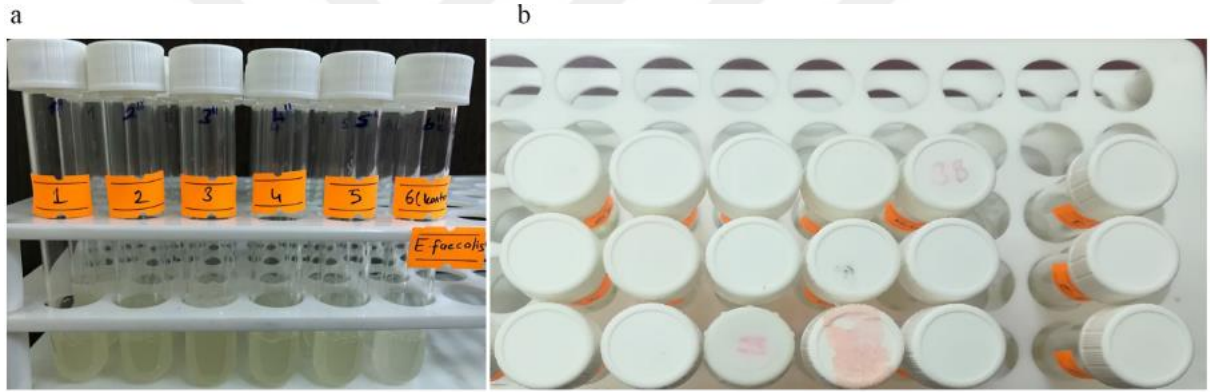
Şekil 3.18 *Escherichia coli*'nin Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. Dex konsantrasyonları 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM idi.



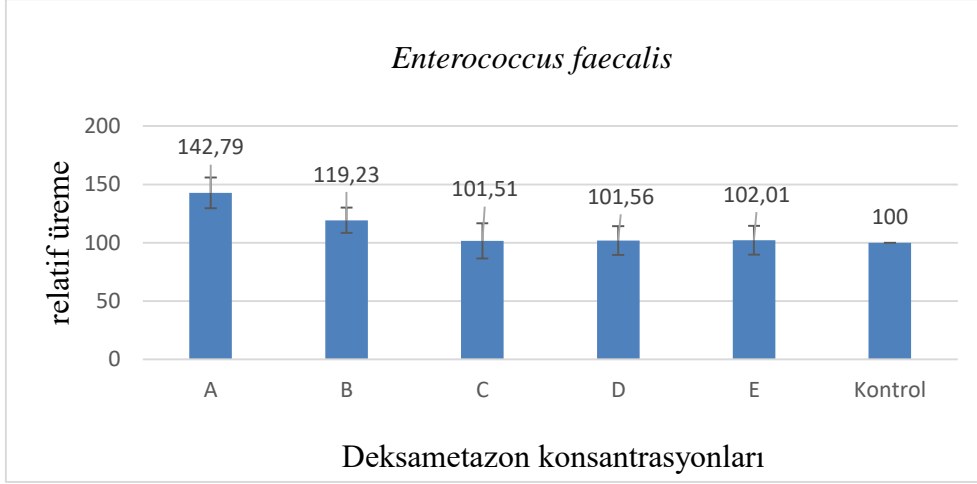
Şekil 3.19 *Escherichia coli* suşunun standart üreme grafiği

3.8 DEKSAMETAZON'UN *ENTEROCOCCUS FAECALIS*'NİN BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

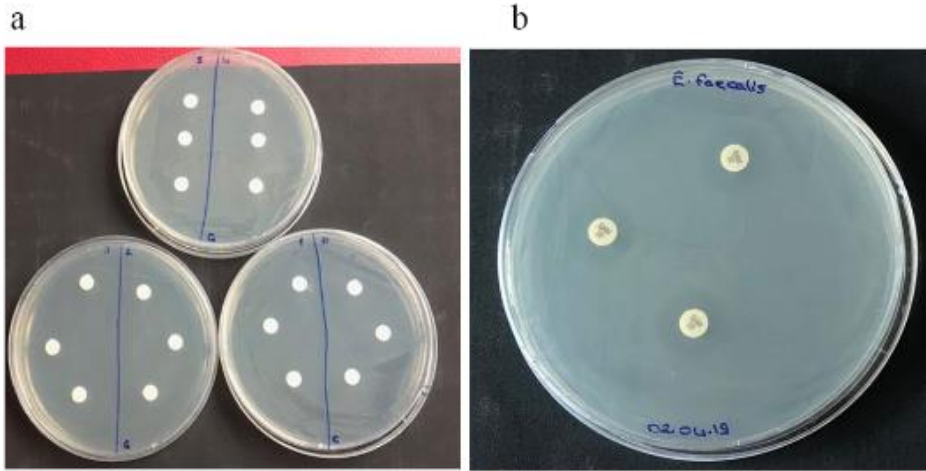
Dex'in konsantrasyonlarının hiçbirisi (2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μ M), *Enterococcus faecalis* üremesi üzerinde herhangi bir inhibitör etki göstermedi, aksine *Enterococcus faecalis*'nin üremesi üzerinde küçük bir uyarıcı etki gösterdi (Şekil 3.20). Yüksek konsantrasyonlu (2264 μ M) ilaçla muamele edilen kültür, hücre yoğunluğunu % 42, (1132 μ M) ilaçla muamele edilen kültürde hücre yoğunluğu % 19, oranında arttı (Şekil 3.21). Dex konsantrasyonları içeren disklerin çevresinde herhangi bir zon gözlenmedi (Şekil 3.22 a). Disk yöntemine alternatif olarak yapılan Dex konsantrasyonlarını içeren halkalarda da üremenin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.23). Amfisilinli disk yöntemi (amp⁺) ile diskler etrafında üremenin olmadığı halkalar görülmektedir (Şekil 3.22 b). *Enterococcus faecalis*'in standart üreme grafiği şekil 3.24'de gösterilmektedir.



Şekil 3.20 (a) Mueller Hilton besiyerinde farklı konsantrasyonlardaki Dex'in *Enterococcus faecalis* ile muamele edilmesi. 1-2-3-4-5 sırayla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μ M Dex konsantrasyonları idi. (b) üçlü tekrarı göstermektedir.



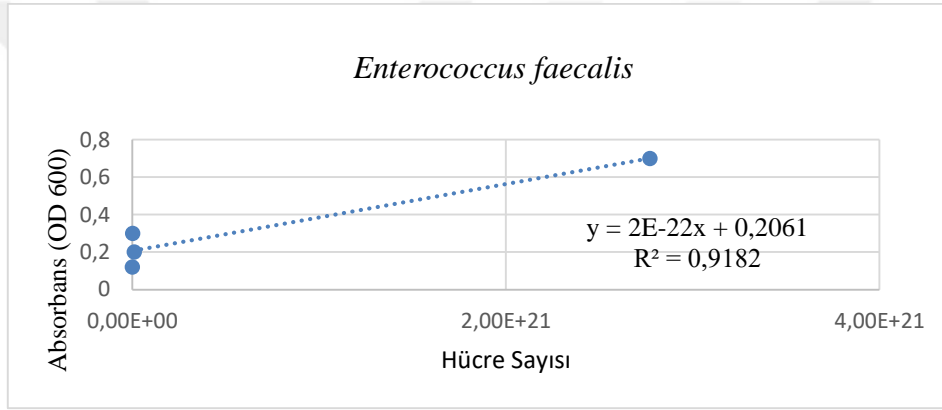
Şekil 3.21 *Enterococcus faecalis*'in farklı konsantrasyonlarda Dex içeren sıvı besiyerinde göreceli büyümesi. A-B-C-D-E sırasıyla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM Dex temsil etmektedir. Grafikte % 100 olarak gösterilen üreme $5,5745\text{E}+21$ hücre sayısını göstermektedir.



Şekil 3.22 (a) Steril diskler kullanarak *Enterococcus faecalis* Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan plaka yarılarında bulunan disklerin Dex konsantrasyonları sırasıyla 0, 141,5, 283,08, 566, 1132 ve 2264 μM idi. (b) *Enterococcus faecalis*'in amfisilinli disk yöntemi (amp^+).



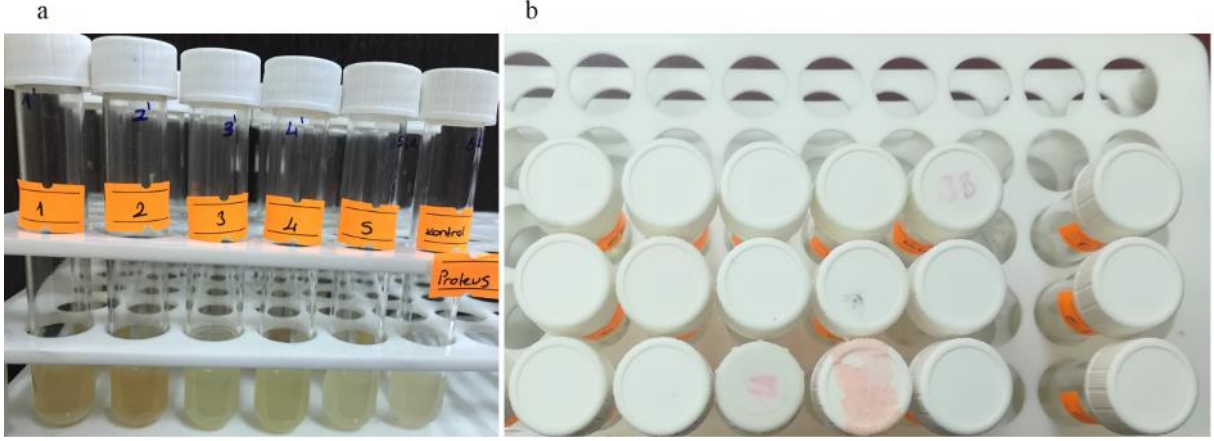
Şekil 3.23 *Enterococcus faecalis* Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. Dex konsantrasyonları 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM idi.



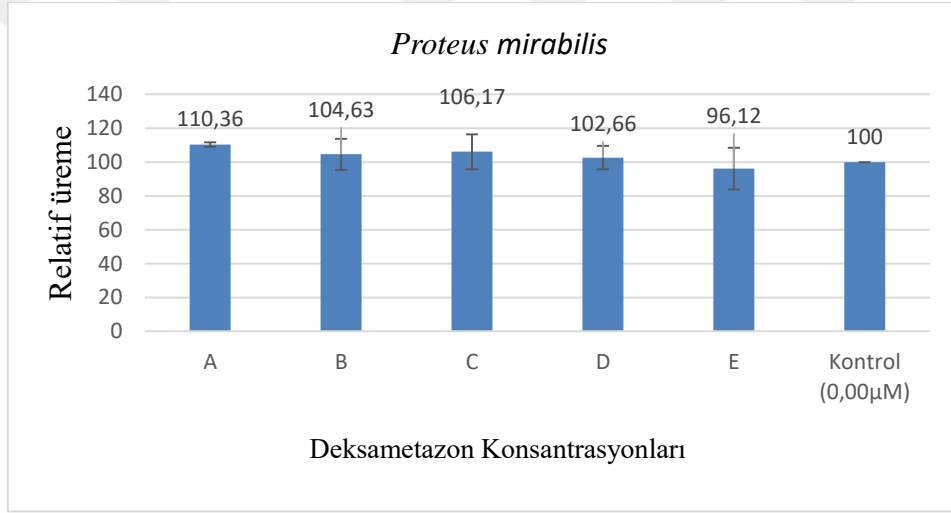
Şekil 3.24 *Enterococcus faecalis* suşunun standart üreme grafiği.

3.9 DEKSAMETAZON'UN *PROTEUS MİRABİLİS*'İN BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

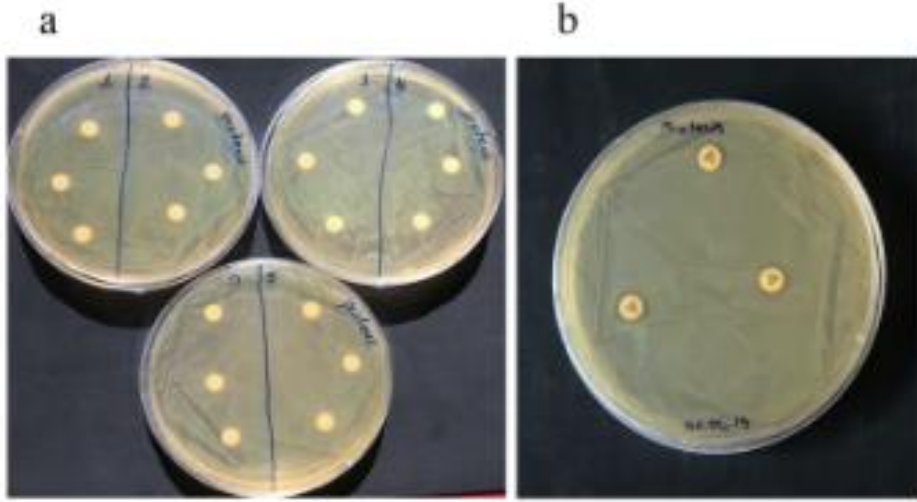
Dex'in konsantrasyonlarının hiçbiri (2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 µM), *Proteus mirabilis* üremesi üzerinde herhangi bir inhibitör etki göstermedi, aksine *Proteus mirabilis*'in üremesi üzerinde küçük bir uyarıcı etki gösterdi (Şekil 3.25). Yüksek konsantrasyonlu (2264 µM) ilaçla muamele edilen kültür hücre yoğunluğunu % 10 arttırdı (Şekil 3.26). Dex konsantrasyonları içeren disklerin çevresinde herhangi bir zon gözlenmedi (Şekil 3.27 a). Disk yöntemine alternatif olarak yapılan Dex konsantrasyonlarını içeren halkalarda da üremenin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.28). Amfisilinli disk yöntemi (amp⁺) ile diskler etrafında üremenin olmadığı halkalar görülmektedir (Şekil 3.27 b). *Proteus mirabilis* standart üreme grafiği şekil 3.29'da gösterilmektedir.



Şekil 3.25 (a) Mueller Hilton sıvı besiyerinde farklı konsantrasyonlardaki Dex'in *Proteus mirabilis* ile muamele edilmesi. 1-2-3-4-5 sırayla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM Dex konsantrasyonları idi. (b) üçlü tekrarı gösterir.



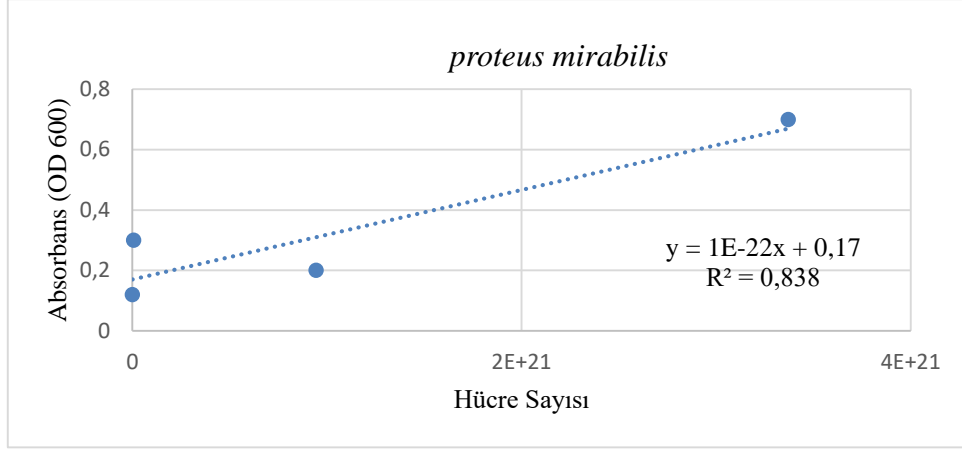
Şekil 3.26 *P.mirabilis* 'in çeşitli konsantrasyonlarda Dex içeren besiyerinde göreceli büyümesi. A-B-C-D-E sırasıyla 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM Dex temsil etmektedir. Grafikte % 100 olarak gösterilen üreme $1,84\text{E}+22$ hücre sayısını göstermektedir.



Şekil 3.27 (a) Steril diskler kullanarak *P.mirabilis* Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 ile etiketlenmiş olan plaka yarılarında bulunan disklerin Dex konsantrasyonları sırasıyla 0, 141,5, 283,08, 566, 1132 ve 2264 μM idi. (b) *P.mirabilis*'in amfisilinli disk yöntemi (amp^+).



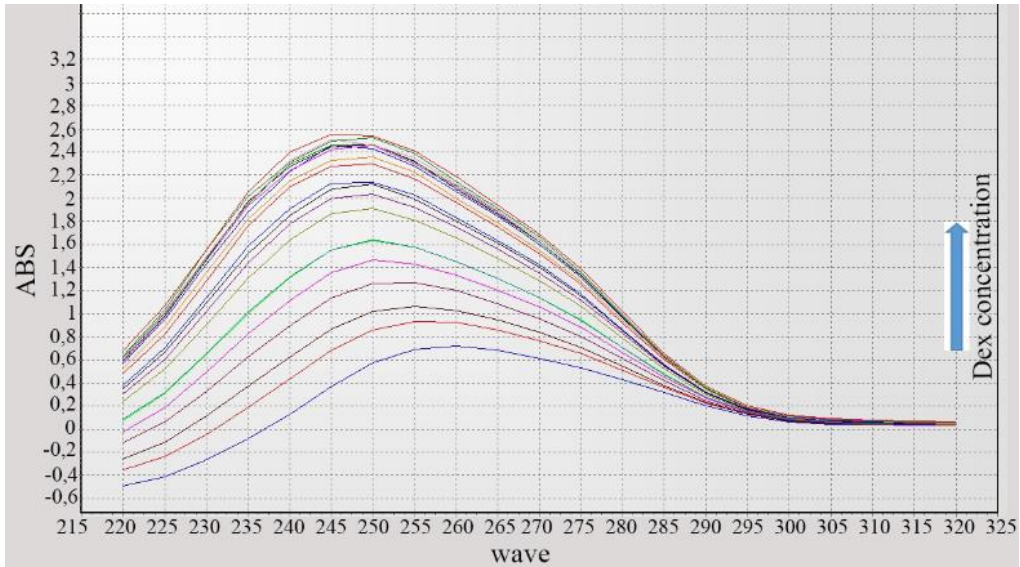
Şekil 3.28 *P.mirabilis* Mueller Hinton katı besiyerinde göreceli büyümesi. Dex konsantrasyonları 2264, 1132, 566, 283,08 ve 141,5 μM idi.



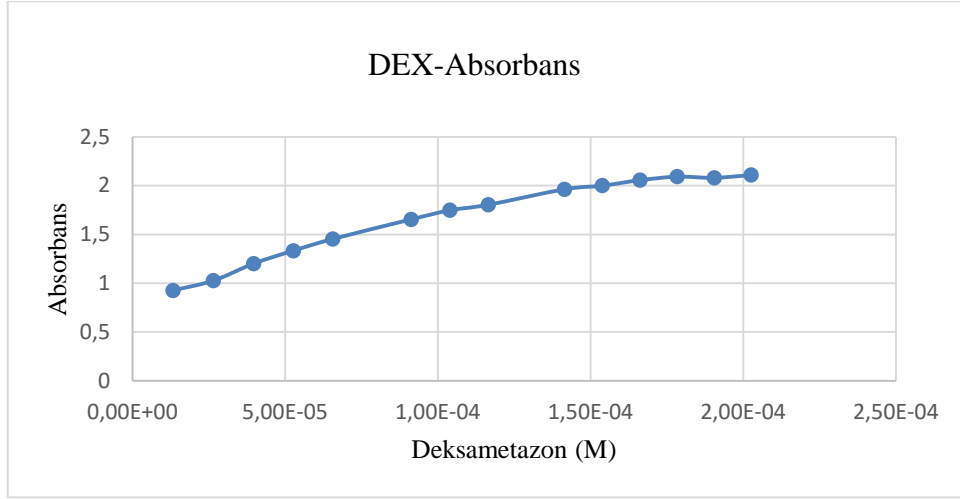
Şekil 3.29 *P.mirabilis* suşunun standart üreme grafiği.

3.10 UV- VİS TARAMA YOLUYLA DEKSAMETAZON'UN DNA'YA ETKİSİ

UV spektrofotometrede DNA üzerine Dex titrasyonu ile yapılan ölçümde Deksametazon-Absorbans grafiği elde edilen verilere göre bilgisayar çizimi ile gösterilmiştir (Şekil 3.30). UV spektrofotometrede yapılan çalışmada Dex, DNA'ya tutunmuştur. Kb 7256 1/M olarak bulunur. Kb değerine göre absorbans artışı Dex ile DNA etkileşimini gösterir. Bir süre sonra doymuş duruma geldiği Deksametazon-Absorbans grafiğinden gözlemlenmiştir (Şekil 3.31).



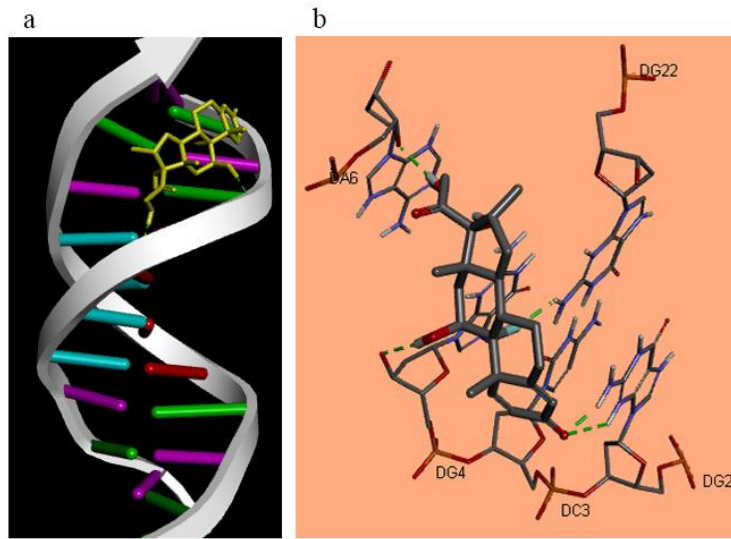
Şekil 3.30 Absorbans - Dalga boyu grafiği. DNA üzerine Dex'in titre edilmesi.



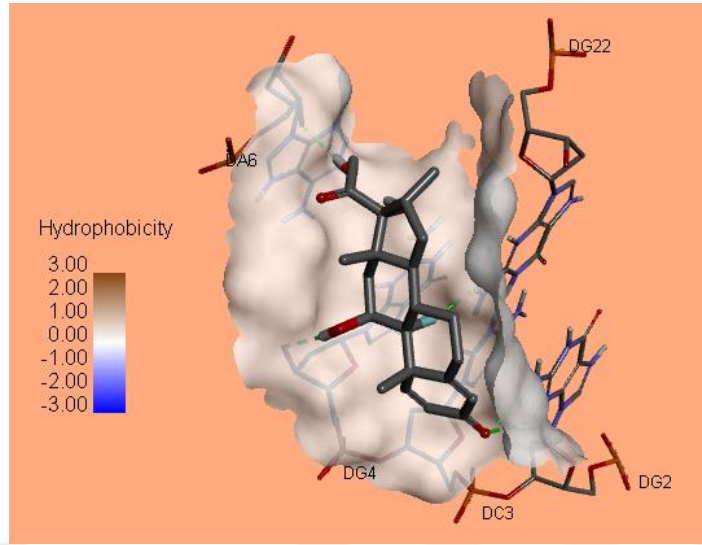
Şekil 3.31 Absorbans-Deksametazon grafiği. DNA üzerine Dex'in titre edilmesi.

3.11 İN-SİLİKO YOLUYLA DEKSAMETAZON'UN DNA' YA ETKİSİ

Dex - DNA etkileşiminin in siliko analizinde 3 hidrojen bağı oluştuğu görülmektedir. DG2, DG22, DA5, DC3, DG4 nükleotidleri ile bağ kurmuştur (Şekil 3.32). Dex'in DNA ile hem hidrojen hem de ilaçtaki aromatik halkalar DNA'daki aromatik halkalarla hidrofobik bağ yaptığı görülmektedir (Şekil 3.33). DNA'nın küçük oluk (minör) tarafı ile birlikte Dex moleküler yerleştirme perspektifi görülmektedir. İlaç minör oluğa tam olarak oturmuştur. Ayrıca programdan cLRMS = 0,0 olduğu yani hata payı olmadığı, bağlanma enerjisi $-7,73$ ve elektrostatik Enerji $-5,84$ olarak elde edilmektedir.



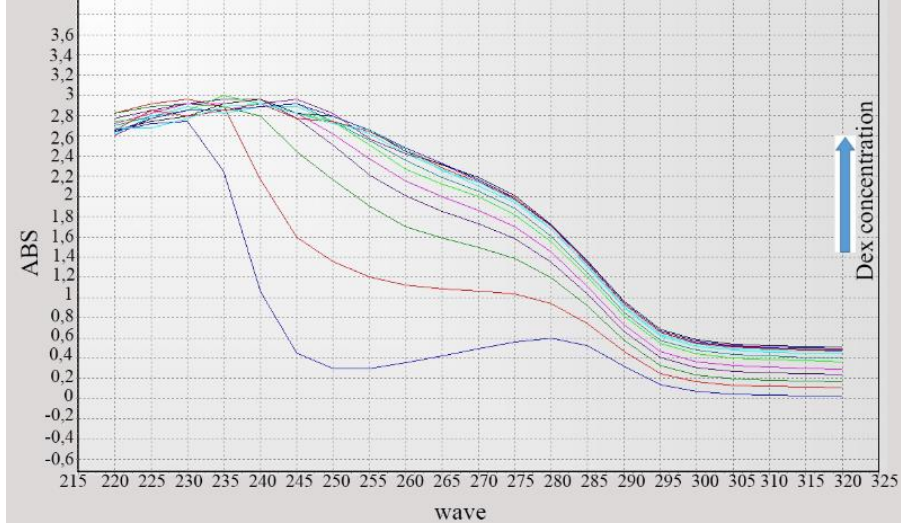
Şekil 3.32 (a) DNA'nın küçük oluk (minör) tarafı ile birlikte Dex'in moleküler yerleştirme perspektifi. (b) Dex ile DNA arasındaki hidrojen bağları etkileşiminin ve nükleotid bağlarının moleküler modellenmesi.



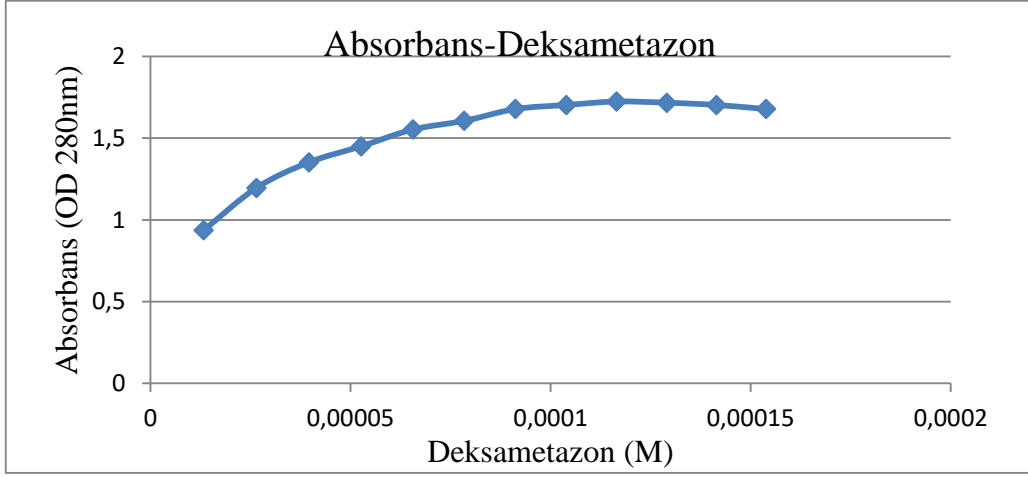
Şekil 3.33 Dex ile DNA arasındaki hidrofobik bağların modellenmesi.

3.12 UV- VİS TARAMA YOLUYLA DEKSAMETAZON'UN SIĞIR SERUM ALBUMİN (BSA) İLE ETKİLEŞİMİ

UV spektrofotometre de 210 - 350nm da BSA üzerine Dex titrasyonu ile yapılan ölçümde Deksametazon - Absorbans grafiği elde edilen verilere göre bilgisayar çizimi ile gösterilmiştir (Şekil 3.34). UV spektrofotometrede yapılan çalışmada Dex BSA'ya tutunmuştur. Kb 20960 l/M denklemden bulunur. Bağlanma sabitine göre absorbans artışı Dex ile BSA etkileşimini gösterir. Bir süre sonra doymuş duruma geldiği Deksametazon-Absorbans grafiğinden gözlemlenmiştir (Şekil 3.35).



Şekil 3.34 Absorbans-Dalga boyu grafiği. BSA üzerine Dex'in titre edilmesi.



Şekil 3.35 Absorbans-Deksametazon grafiği. BSA üzerine Dex'in titre edilmesi.

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Hücresel DNA'daki hasar, mutajenez ve kanserin gelişiminde rol oynar. Bir insan hücresindeki DNA, hem harici (eksojen) hem de iç metabolik (endojen) süreçler tarafından üretilen, günde birkaç milyon zararlı olaya maruz kalır (Valipour vd. baskıda). Kimyasalların neden olduğu DNA hasarını araştırmak için ucuz, hızlı ve değerli yöntemlerden biri, bir süpersarmal plazmid DNA'nın seçilen kimyasal madde ile inkübasyonu ve ardından agaroz jel elektroforez analizidir (De Mattos vd. 2004). pUC19 plazmid DNA'sının doğal yapısı süpersarmaldır. İki sarmalın herhangi birindeki herhangi bir kırılma, süpersarmal formu sirküler (relax) forma dönüştürürken, her iki sarmalda aynı pozisyonda kırılma doğrusal (linear) plazmid DNA'yı oluşturur. Linear (doğrusal) formun agaroz jeli yoluyla göçü süpersarmal (süpercoil) formdan daha yavaş ve sirküler (relax) formdan daha hızlıdır (Moreno vd. 2007). Dex'in H₂O₂ varlığında DNA üzerindeki kesme aktivitesine bakıldığında farklı konsantrasyonlarda Dex (1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 µM) ile muamele edilmiş süpersarmal plazmid DNA, muamele edilmemiş DNA'ya kıyasla agaroz jel elektroforezinde değişiklik göstermedi. DNA'nın sadece H₂O₂ ile muamele edilmesi DNA'ya zarar vermedi. Dex konsantrasyonlarının hiçbiri, süpersarmal DNA üzerinde, oksidatif bir madde olarak H₂O₂ varlığında kırılma yaratmadı. Bu araştırmada süpersarmal pUC19 plazmid DNA, Dex ile etkilenmedi. İnsan plazmasındaki Dex konsantrasyonlarının aralığı Çizelge 1.2'den yararlanılarak, (Klintip vd. 2016) ve (Song vd. 2004) sırasıyla 5,12 – 21,03 nmol / L ve 2,5 – 509,6 nmol / L olarak belirlenmiştir. Bu araştırmada Dex, süpersarmal DNA'yı insan plazmasında bulunanlardan birkaç kez daha yüksek konsantrasyonlarda bile (1700, 170, 17, 1,7 ve 0,42 µM) kırmadı. Plazma konsantrasyonlarına göre derişimleri belirlenen Dex, çözücü olarak Çizelge 1.3'deki kaynaklardan yararlanılarak PBS kullanıldı. Zayıf mutajenik ve mutajenik olmayan kanserojenlerin çoğunluğunun, metal kaynaklı oksidatif DNA hasarı yoluyla kanserojenliği uyardığı görülmektedir. Bakır ve demirin (endojen metal iyonları) hidrojen peroksit ile reaksiyonu nedeniyle hidroksil serbest radikal üretildi. Serbest hidroksil radikali, oksidatif DNA hasarına neden olan oldukça reaktiftir (Valipour vd. baskıda). Dex'in plazmid DNA'ya karşı davranışı ne indirgeyici bir ajan (askorbik asit) varlığında ne de

bir oksidatif ajan (H_2O_2) varlığında değişmedi. Bu, Dex'in DNA'ya zarar veren hidroksil radikalini üretmek için bakır ve demir gibi davranamayacağı anlamına gelir. Erkekler için normal serum ferritin aralığı 15 - 320 mg / ml ve kadınlar için 6 – 155 mg / ml'dir (Brewer 2009). İnsan fizyolojik plazma demir ve bakır toplam konsantrasyonları (serbest ve bağlı) sırasıyla (11 - 31 μM) ve (14 - 19 μM) arasında değişmektedir (Letelier vd. 2010). Resveratrol (Subramaniam vd. 2015), bleomisin (Kobayashi vd. 1998), kloramfenikol (Ohnishi vd. 2015), N-asetilsistein (Oikawa vd. 1999) ve prokarbazin (Ogawa vd. 2003) gibi ilaçların aksine, Dex, yüksek konsantrasyonlarda bile, demir ya da bakır varlığında süpersarmal plazmidde herhangi bir kırılmaya neden olmamıştır. Ek olarak, Dex, DNA'yı Fenton reaksiyonlarının oluşturduğu zararlı hidroksil radikallerine karşı koruyamadı. Bir in vivo çalışmada, Dex, kromozom sapması, kardeş kromatid değişimi ve fare kemik iliğinde mikronükleus insidansını arttırmıştır (Singh vd. 1994, De Oliveira vd. 2017), Dex'in, Allium cepa meristematik kök hücrelerinde kromozom sapmaları endeksini doza bağlı bir şekilde anlamlı olarak arttırdığını göstermiştir. Ek olarak, Queiroz ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bulgu, hidrokortizonun farelerin kemik iliğinde genotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, metabolize edilmemiş Dex'in DNA iplikçiklerine zarar verememesine atfedilebilecek bulgular ile uyumlu değildir (Singh vd. 1994). Ayrıca, muhtemelen Dex'in mikrotübüller üzerine bağlanması ve etkisine bağlı olabilir (Banduhn ve Obe 1985). Bu nedenle, bize göre Dex metabolitlerinin DNA ve mikrotübül proteinleri üzerindeki etkilerini analiz etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Dex'in 10 - 0,75 mg oral dozu ince bağırsaktaki ortalama sıvı hacmi (105 ± 72 ml ve 54 ± 41 ml, $P < 0.01$) (Schiller vd. 2005) göz önünde bulundurularak 10 mg / 54 ml de $471,8 \mu M$, 105 ml de çözündüğünde $242,6 \mu M$ bağırsaktaki molaritesi olur. Antibakteriyel efekt çalışmamızda bağırsak hacmi ve ilaç oral dozu göz önünde bulundurularak 2264 - 1132 - 566 - 283,08 - 141,5 μM olarak 5 doz çalışılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda insan bağırsağındaki *E. cloacae*'nin yoğunluğundaki artışın obezite ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Keskitalo vd. 2018), (Fei ve Zhao 2013). Çalışmamızda $2264 \mu M$ Dex, *E. cloacae* hücre sayılarını % 10 oranında arttırdığından, Dex'in *E. cloacae* yoğunluğundaki artışı obezite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu konu hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda eklem Tutulumlu Ülseratif Kolit hastalarının bağırsak florasında azalmış miktarda *E. coli*, Bifidobakteri, Laktobasillus bakterileri bulunduğu gözlemlenmiştir (Koca 2015). $2264 \mu M$ Dex *E. coli* hücre yoğunluğunu % 23, $1132 \mu M$ Dex ise *E. coli* hücre yoğunluğu % 30, oranında arttırdığı verilerimizde görülmektedir. Bağırsak mikrobiyotasındaki

dengeinin bozulması durumunda birçok hastalığın meydana gelebileceği vurgulanmaktadır. Bu nedenle Dex'in *E.coli* yoğunluğu üzerindeki küçük bir uyarıcı etkisinin neden olabileceği durumlar daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır. Allameh ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada Javanese Sazan'ın besinine *E. faecalis* takviyesinin proteaz ve lipaz aktivitelerini arttırdığını, *E. faecalis* ile beslenen balıklarda kontrol balıklarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek propiyonik ve bütirik asit üretimi görülmüştür. Javanese sazanında *A. hydrophila* enfeksiyonunun ortaya çıktığı ancak *E. faecalis* ile beslenen balıklarda hastalık direncinin arttığı görülmüştür. *E. faecalis* uygulamasının serum antikor titrasyonu (humoral immün yanıt) üzerinde olumlu etkisi olduğunu ortaya koydu. Elde ettiğimiz verilere göre 2264 µM Dex, *E. faecalis* hücre yoğunluğunu % 42, 1132µM Dex, hücre yoğunluğu % 19, oranında arttırmıştır. Bağırsak mikrobiyotasındaki Dex kaynaklı *E. faecalis* yoğunluğundaki artış Allameh ve arkadaşlarının (2017) yaptıkları çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda probiyotik bir potansiyele sahip olabilir ve *E. faecalis* yoğunluğu lipaz enziminin aktivitesini arttırması yağların sindirimini artmasına sebep olabilir. Bu nedenle *E. faecalis* yoğunluğunun artmasının bağırsak mikrobiyotası ve immünolojik olarak daha fazla değerlendirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. 2264 µM Dex *P. mirabilis* hücre yoğunluğunu % 10 oranında arttırdığı verilerimizde görülmektedir. Bağırsak mikrobiyotasındaki dengeinin bozulması durumunda birçok hastalığın meydana gelebileceği vurgulanmaktadır. Bu nedenle Dex'in *P. mirabilis* yoğunluğu üzerindeki küçük bir uyarıcı etkisinin neden olabileceği durumlar daha fazla araştırma ile aydınlatılmalıdır. Yapılan çalışmada elde edilen veriler Dex'in *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ve *Proteus mirabilis*'in suşları üzerinde küçük oranlarda arttırıcı etki göstermiştir. Bu durum Dex'in yüksek konsantrasyonlarında gözlemlenmiştir. Buna kontrol olarak 2264 µM konsantrasyonundaki Dex absorpsiyon değeri spektrofotometrede 0 (sıfır) olarak ölçülmüştür.

İlaç DNA etkileşimleri, DNA hedefli ilaç tasarımı ve bunların in vitro analizi bilim dünyasında güncel bir konudur. İlaç DNA etkileşimleri ilacın toksisitesi ve organizmadaki dağılımının belirlenmesinde önemlidir. Dex'in UV - Vis spektrofotometrisi ile DNA ile etkileşimine bakılmıştır. UV - Vis spektrofotometrisi küçük moleküller ile nükleik asitler arasındaki etkileşimin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Küçük moleküller DNA'nın çift sarmal yapısı ile etkileşime girebilir ve bu etkileşim reaksiyon öncesi ve sonrasında absorpsiyon spektrumundaki değişikliklere göre araştırılabilir. Hiperkromik ve hipokromik etki, çift sarmal yapı nedeniyle ilaç - DNA etkileşimlerinin spektrum özellikleridir. Genellikle, etkileşimin güçlü olması durumunda hipokromik etki açıktır (İnterkalasyon yapan ETBR gibi) (Hajian vd.

2012). Hipokromik etki DNA üzerindeki konformasyon değişikliğinden kaynaklanırken hiperkromik etki, DNA çift sarmal yapısına verilen zarardan kaynaklanmaktadır ve DNA absorbansında artışa neden olur (Zhou vd. 2007). Hajian ve arkadaşlarının (2017) yaptıkları çalışmada bir antikanser ilacı ve balık sperm DNA'sı olan Valrubisin ile moleküler etkileşimler, UV - Vis spektrofotometrisi yöntemi ile çalışılmış, Valrubisin - DNA'nın bağlanma sabiti (kb), spektrofotometrik titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ahmadi ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları çalışmada Quercetin-Palladium ile Calf Thymus DNA bağlanma etkileşimi absorpsiyon spektroskopisi ile araştırılmıştır. Dorraji ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada antidepresan ilaç Sertralin ile Calf Thymus DNA'nın etkileşimi, UV - Vis spektrofotometrisi ile araştırılmıştır. Yukarıda da bahsedildiği gibi yapılan literatür taramalarındaki ilaç - DNA etkileşim çalışmaları göz önünde bulundurularak Dex - DNA etkileşimi UV - Vis spektrofotometrisi ile analiz edilmiştir. UV - Vis absorpsiyon spektrumları ölçülmüştür. Şekil 3.30'da gözlemlendiği gibi max absorpsiyon dalga boyunda kayma gözlenir ki bu DNA - Dex arasındaki etkileşimi göstermektedir. Bağlanma sabitine göre absorbans artışı Dex ile DNA etkileşimini gösterir. Bir süre sonra doymuş duruma geldiği Dekametazon - Absorbans grafiğinden gözlemlenmiştir. R^2 0,9816 olarak bulunmuştur. Kb 7256 1/M olarak hesaplanmıştır. Etidyum Bromür'ün DNA'ya bağlanma sabiti 10^6 1 / M'e eşittir ve güçlü hipokromik etki gösterir (Doglia vd. 1983). Bir başka çalışmada Etidyum Bromür'ün (ETBR) DNA ile bağlanma sabiti 1300000 1 / M olarak belirlenmiştir (Vardevanyan vd. 2003). ETBR ile karşılaştırıldığında Dex - DNA etkileşimdeki kb değeri çok daha düşüktür ve Dex - DNA zayıf interkalatör olarak bağlandığı düşünülmektedir. DNA'nın ilk 260 da pick vermesi daha sonra ilaç titrasyonu ile max tepe konumu (pick) 250 dalga boyuna doğru kaymıştır. Sonuç olarak Dex - DNA etkileşiminde absorbans değerinin yükselmesi hiperkromik etki olduğunu göstermektedir. Agaroz jel elektroforezinde Dex - DNA etkisi incelenmiş ancak hiçbir etki gözlenmemiştir. Ancak UV spektrofotometrede yapılan çalışmada Dex - DNA'ya tutunmuştur. In siliko analizi için, programlardan elde edilen sonuçlara göre Dex'in DNA ile hem hidrojen hem de hidrofobik bağ yaptığı görülmektedir. DNA'nın küçük oluk (minör) tarafı ile birlikte Dex moleküler yerleştirme perspektifi görülmektedir. UV spektrofotometrede DNA - Dex etkileşiminde elde edilen veriler in siliko analiz ile doğrulanmaktadır. İlaçların DNA ile bağlanma çalışmaları, reaksiyon mekanizmasının anlaşılması ve DNA'yı hedef alan yeni ve daha az yan etkilere sahip etkili ilaçların uygulanması, tasarımı için rehberlik sağlamak için faydalıdır (Ahmadi vd. 2011).

İlaçların dağılımının, serbest konsantrasyonunun ve metabolizmasının, kan akışındaki ilaç - protein etkileşimlerinden güçlü bir şekilde etkilendiği bilinmektedir ve bu tip bir etkileşim kemoterapötik işlem sırasında ilacın stabilitesini ve toksisitesini de etkileyebilir (Hu vd. 2005). Serum albüminler plazmada en bol bulunan proteinlerdendir ve birçok fizyolojik fonsiyona sahiptirler. En önemli fonksiyonlarından biri de ilaçların yerleştirilmesi ve ilaç etkinliğinde önemli görevleri vardır (He ve Carter 1992). BSA ilaç kullanımında aktif bir rol oynar. İlaçların çoğu albümin ve diğer serum bileşenlerine bağlanırlar. Serum albümini bu ilaçların plazmadaki çözünürlüğünü artırır ve ilaçların hücrelere verilmesini düzenler. Serum albümininin bağlanma verileri farmakolojik çalışmalar için çok önemli bilgiler sunar (Guo vd. 2004). İlaçların serum albümini ile etkileşimlerinin araştırılması ilaçların vücutta taşınması, dağılımı, etki mekanizması ve ilacın farmasötik dinamikleri hakkında bilgi sahibi olmak için önemlidir (Gong vd. 2007). Huang ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları çalışmada Streptomisin Sülfat'ın Sığır Serum Albüm (BSA) bağlanması farklı teknikler kullanılarak analiz edilmiş ve ilacın tek bir bağlanma yeri olduğu belirlenmiştir. Kandagal ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları çalışmada Gemsitabin Hidroklorür adlı bir anti kanser ilaç ile Sığır Serum Albümini (BSA) arasındaki etkileşimler, spektroskopik tekniklerle incelenmiştir. Kamat ve arkadaşları tarafından (2005) yapılan çalışmada sığır serum albümini ile norfloksasin ve siprofloksasin arasındaki etkileşimin mekanizması incelenmiştir. Yapılan çalışmalara bakıldığında BSA ile ilaç etkileşimleri çalışmaları ilaçlar hakkında bilgi sahibi olmamız açısından önemlidir. Bu nedenle Dex ile BSA arasındaki etkileşimini UV - Vis spektrofotometre ile analiz ettik. R^2 0,9911'dir. Kb 20960 1/M olarak hesaplanmıştır. Kb değerine göre absorbans artışı Deksametazon'un BSA'ya bağlandığını göstermiştir. Dex ilavesiyle BSA absorbansının arttığı gözlemlenmiştir. Dex - BSA'nın max tepe konumu (pick) düşük dalga boyu bölgesine doğru hafifçe kaymıştır. Dex'in protein molekülüne bağlanması protein konformasyonunda değişime neden olabilir. Naik ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları çalışmaya baktığımızda Floresans spektrumları, UV - absorpsiyon spektrumları ve FT - IR spektrumları sonucu, Sığır Serum Albümininin (BSA) konformasyonunun Dex varlığında değiştiğini göstermişlerdir. Bizim sonuçlarımız bu sonuçlar ile örtüşmektedir. İlaç firmaları, yeni ilaç tasarımı BSA gibi serum albüminlerin bağlanması için standart verilere gereksinim duyduklarından, BSA ile Dex etkileşiminin bu tür bir çalışması klinik tıpta, tıbbi kimyada ve farmasötik endüstrisinde yararlı olacaktır.



BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir anti - inflamatuvar ilaç olan Dekametazon ilacının antibakteriyel efekti ve DNA'ya bağlanmasının in vitro ve in siliko modellenmesini içeren bu çalışmada, Dex tek başına veya FeSO₄, CuCl₂, indirgeyici bir ajan Asc ve oksidatif bir ajan H₂O₂ varlığında süpersarmal DNA üzerinde herhangi bir kırılma etkisi göstermedi. Uv - vis spektrofotometre analizinde bu ilacın DNA'ya bağlanma sabiti 7256 l / M olarak hesaplanmıştır ve bu ilacın DNA ile hiperkromik etki gösterdiği görülmektedir. İn siliko analizinden elde ettiğimiz bilgilere göre Dex DNA ile hem hidrojen hem de hidrofobik bağ yapmaktadır. DG2, DG22, DA5, DC3, DG4 nükleotidleri ile hidrojen bağı kurmuştur ve minör oluğa yerleştiği gözlemlenmektedir. İn siliko analizinden elde ettiğimiz sonuçlar UV - vis spektrofotometre analizindeki sonuçları desteklemektedir. Dex ile BSA arasındaki etkileşimde Kb 20960 l / M olarak hesaplanmıştır. 2264 µM Dex, *E. cloacae* hücre yoğunluğunu % 10 oranında arttırdı. 2264 µM Dex *E. coli* hücre yoğunluğunu % 23, 1132µM Dex ise *E. coli* hücre yoğunluğu % 30 oranında arttırdı. 2264 µM Dex, *E. faecalis* hücre yoğunluğunu % 42, 1132 µM Dex, *E. faecalis* hücre yoğunluğu % 19, oranında arttırdı. 2264 µM Dex *P. mirabilis* hücre yoğunluğunu % 10 oranında arttırmıştır. Daha önceki çalışmalara baktığımızda bu ilacın in vivo koşulunda DNA üzerinde kırma etkisi olduğu görülmesine rağmen bizim in vitro çalışmamızda herhangi bir etki gözlemlenmemiştir. Bizim çalışmamız DNA ve protein etkileşimindeki yüksek bağlanmadan kaynaklı bir kırma olduğunu göstermektedir. Ayrıca ilacın kendisinin değil metabolitlerinin bu etkiyi yaptığını düşünmekteyiz. Bu nedenle Dex metabolitlerinin DNA ve kromozomun yapısındaki proteinler üzerindeki etkilerini analiz etmek için ve Dex'in flora bakterileri üzerindeki uyarıcı etkisinin, insan sağlığı için tehdit oluşturabilecek olası hastalıklarla ilişkisinin, daha fazla çalışma ile araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. İlaçların DNA ile etkileşim çalışmaları, reaksiyon mekanizmasının anlaşılması ve DNA'yı hedef alan yeni ve daha az yan etkilere sahip etkili ilaçların uygulanması, tasarımı için rehberlik sağlamak açısından faydalıdır. Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan bir anti - inflamatur ilaç olan Dex ile yapılan bu

Çalışmalarda doktorların yazdığı ve insan sağlığı için önemli olan bu ilaç hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.



KAYNAKLAR

- Ahmadi S M, Dehghan G, Feizi MAH and Dolatabadi JEN**, (Ed.) (2011) In Vitro Studies on Calf Thymus DNA interaction with Quercetin-Palladium (II) Complex. *International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, İnan, 110-113.
- Alataş Z** (2011) Bupleurum Lancifolium Hornem Türünün Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Konya, 65.
- Aleksić M M and Kapetanović V** (2014) An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for Detection of DNA–Drug Interactions. *Acta Chimica Slovenica*, 61(3): 555-573.
- Alexander D D, Weed D L, Cushing C A and Lowe K A** (2011) Meta-analysis of Prospective Studies of Red Meat Consumption and Colorectal Cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 20(4): 293-307.
- Alipázaga M V, Cerchiaro G, Moya H D and Coichev N** (2009) Oxidative DNA Damage Induced by S (IV) in the Presence of Cu (II) and Cu (I) complexes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(7): 1302-1312.
- Allameh S, Ringø E, Yusoff F, Daud H and Ideris A** (2017) Dietary Supplement of Enterococcus Faecalis on Digestive Enzyme Activities, Short-Chain Fatty Acid Production, Immune System Response And Disease Resistance Of Javanese Carp (Puntius Gonionotus, Bleeker 1850). *Aquaculture Nutrition*, 23(2): 331-338.
- Arisoy M** (2013) Yeni 2,5-Disübstitüebenzoksazol Türevlerinin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması, Antimikrobiyal Etkileri Ve Moleküler Modelleme Çalışmaları. *Doktora Tezi*. Ankara Üniversitesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 245.
- Banduhn N and Obe G** (1985) Mutagenicity Of Methyl 2-Benzimidazolecarbamate, Diethylstilbestrol and Estradiol: Structural Chromosomal Aberrations, Sister-Chromatid Exchanges, C-Mitoses, Polyploidies and Micronuclei. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 156(3): 199-218.
- Barko P, McMichael M, Swanson K and Williams D** (2018) The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*, 32(1): 9-25.
- Barnes P J** (1999) Therapeutic Strategies For Allergic Diseases. *Nature*, 402(6760supp): 31.
- Bertoncini C, Meneghini R, Galembeck F, Calió M and Carbonel A** (2016) Preferential Localization Of Iron In The Chromatin of Fe-Enriched Cells Is Linked To DNA Cleavage Sites And Control Of Carcinogenesis. *J Cancer Sci Ther*, 8213-215.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Bonnet R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Labia R and Sirot J** (1999) Diversity Of TEM Mutants In Proteus Mirabilis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 43(11): 2671-2677.
- Bozathl S B** (2019) Shigatoksin Üreten Escherichia Coli'lerin Sosislerde Canlılığının Ve Asit Dayanımının İncelenmesi. *Doktora Tezi*, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Manisa, 104.
- Brewer G J** (2009) Risks Of Copper And Iron Toxicity During Aging In Humans. *Chemical Research In Toxicology*, 23(2): 319-326.
- Brewer G J, Askari F, Dick R B, Sitterly J, Fink J K and Carlson M** (2009) Treatment Of Wilson's Disease With Tetrathiomolybdate: V. Control Of Free Copper By Tetrathiomolybdate And A Comparison With Trientine. *Translational Research*, 154(2): 70-77.
- Brieger K, Schiavone S, Miller F J and Krause K H** (2012) Reactive Oxygen Species: From Health to Disease. *Swiss Medical Weekly*, 142w13659.
- Canny G O and McCormick B A** (2008) Bacteria In The Intestine, Helpful Residents Or Enemies From Within? *Infection And Immunity*, 76(8): 3360-3373.
- Cervantes-Cervantes, M P, Calderón-Salinas J V, Albores A and Muñoz-Sánchez J L** (2005) Copper Increases The Damage To DNA And Proteins Caused By Reactive Oxygen Species. *Biological Trace Element Research*, 103(3): 229-248.
- Chen Y X, Wang Y, Fu C C, Diao F, Song L N and Li Z B** (2010) Dexamethasone Enhances Cell Resistance To Chemotherapy By Increasing Adhesion To Extracellular Matrix In Human Ovarian Cancer Cells. *Endocrine-Related Cancer*, 17(1): 39.
- Chow J, Lee S M, Shen Y, Khosravi A and Mazmanian SK.** (2010) Host-Bacterial Symbiosis In Health And Disease. *Advances In Immunology*. ISSN: 0065-2776, DOI: 10.1016/S0065-2776(10)07001-X, California, 107: 243-274.
- Chu C C, Hsing C H, Shieh J P, Chien C C, Ho C M and Wang J J** (2014) The Cellular Mechanisms Of The Antiemetic Action Of Dexamethasone And Related Glucocorticoids Against Vomiting. *European Journal Of Pharmacology*, 72248-54.
- Çakmak H** (2013) Fiziksel Ve Kimyasal Çapraz Bağlı DNA Hidrojellerinin Sentezi Ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, 45.
- Çetinbaş S, Kemeriz F, Göker G, Biçer İ and Velioglu Y S** (2017) İnsan Mikrobiyomu: Beslenme Ve Sağlık Üzerindeki Etkileri. *Akademik Gıda*, 15(4): 409-415.
- Davin-Regli A** (2015) Enterobacter Aerogenes And Enterobacter Cloacae; Versatile Bacterial Pathogens Confronting Antibiotic Treatment. *Frontiers In Microbiology*, 6392.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Davis J D and Lin S Y** (2011) DNA Damage And Breast Cancer. *World Journal Of Clinical Oncology*, 2(9): 329.
- De Mattos J, Dantas F, Caldeira-De-Araújo A and Moraes M** (2004) Agarose Gel Electrophoresis System In The Classroom: Detection Of DNA Strand Breaks Through The Alteration Of Plasmid Topology. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, 32(4): 254-257.
- De Oliveira V P C, De Sousa G R, De Araujo M P T, Carneiro L C, De Andrade D M L and Porto H K P** (2017) Evaluation Of The Mutagenic Potential Of Glucocorticoids By Allium Cepa. *Mutagenesis*, 7(1): 1-7.
- Doglia S, Graslund A and Ehrenberg A** (1983) Binding Of Ethidium Bromide To Self-Complementary Deoxydinucleotides. *European Journal Of Biochemistry*, 133(1): 179-184.
- Doğantekin E, Doğantekin A and Aşçı Toraman Z** (2013) Tigesiklinin E. Coli Ve Klebsiella Spp. Suşlarına Karşı İn vitro Etkinliğinin Araştırılması. *Van Tıp Dergisi*, 20(3): 145-149.
- Dorraji P S and F Jalali** (2013) Investigation Of The Interaction Of Sertraline With Calf Thymus DNA By Spectroscopic Methods. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 24(6): 939-945.
- Duprè I, Zanetti S, Schito A M, G Fadda and Sechi L A** (2003) Incidence Of Virulence Determinants In Clinical Enterococcus Faecium And Enterococcus Faecalis Isolates Collected In Sardinia (Italy). *Journal Of Medical Microbiology*, 52(6): 491-498.
- Dursun Ö** (2009) An Application Of Information Theory For Dna Structure. *Master Thesis*, Dokuz Eylül Üniversty Graduate School, Natural And Applied Sciences, İzmir, 49.
- Dutka-Malen S, Evers S and Courvalin P** (1995) Detection Of Glycopeptide Resistance Genotypes And Identification To The Species Level Of Clinically Relevant Enterococci By Pcr. *Journal Of Clinical Microbiology*, 33(1): 24-27.
- Esen B** (2013) Demir Eksikliği Anemisi Ve Tedavisinde Dna Hasarı: 8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin Düzeyi. *Uzmanlık Tezi*, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ, 2013.
- Evans Jr D J and Evans D G.** (1996) *Escherichia Coli In Diarrheal Disease*. Medical Microbiology 4th Edition: University Of Texas Medical Branch At Galveston, Abd, 96.
- Evrensel A and Ceylan M E** (2015) Bağırsak Beyin Ekseni: Psikiyatrik Bozukluklarda Bağırsak Mikrobiyotasının Rolü. *Current Approaches In Psychiatry/Psikiyatride Guncel Yaklasimler*, 7(4).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Fan Zr, Ma J, Ma X L, Wang Y, Sun L and Wang Y** (2018) The Efficacy Of Dexamethasone On Pain And Recovery After Total Hip Arthroplasty: A Systematic Review And Meta-Analysis Of Randomized Controlled Trials. *Medicine*, 97(13).
- Fei N and L Zhao** (2013) An Opportunistic Pathogen Isolated From The Gut Of An Obese Human Causes Obesity In Germfree Mice. *The ISME Journal*, 7(4): 880.
- Gong A, Zhu X, Hu Y and Yu S** (2007) A Fluorescence Spectroscopic Study Of The Interaction Between Epristeride And Bovin Serum Albumine And Its Analytical Application. *Talanta*, 73(4): 668-673.
- Graziani F, D'aiuto F, Arduino P G, Tonelli M and Gabriele M** (2006) Perioperative Dexamethasone Reduces Post-Surgical Sequelae Of Wisdom Tooth Removal. A Split-Mouth Randomized Double-Masked Clinical Trial. *International Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery*, 35(3): 241-246.
- Guo J, Wei W and Zhan L** (2015) Red And Processed Meat Intake And Risk Of Breast Cancer: A Meta-Analysis Of Prospective Studies. *Breast Cancer Research And Treatment*, 151(1): 191-198.
- Guo M, Zou J W, Yi P G, Shang Z C, Hu G X and Yu Q S** (2004) Binding Interaction Of Gatifloxacin With Bovine Serum Albumin. *Analytical Sciences*, 20(3): 465-470.
- Gürtekin E and Şekerdağ N** (2008) Bir İleri Oksidasyon Prosesi: Fenton Prosesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 14(3): 229-236.
- Hajian R, E Ekhlasi and R Daneshvar** (2012) Spectroscopic And Electrochemical Studies On The Interaction Of Epirubicin With Fish Sperm DNA. *Journal Of Chemistry*, 9(3): 1587-1598.
- Hajian R, Hossaini P, Mehrayin Z, Woi P M and Shams N** (2017) DNA-Binding Studies Of Valrubicin As A Chemotherapy Drug Using Spectroscopy And Electrochemical Techniques. *Journal Of Pharmaceutical Analysis*, 7(3): 176-180.
- Hanttash A** (2016) Deksametazon 21-Fosfat Disodyumun Alt Gömülü Yirmi Yaş Dişi Cerrahisinde, Postoperatif Ödem, Ağrı Ve Trismus Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 95.
- Harrington S M, Dudley E G and Nataro J P** (2006) Pathogenesis Of Enteroaggregative Escherichia Coli Infection. *FEMS Microbiology Letters*, 254(1): 12-18.
- He X M and D C Carter** (1992) Atomic Structure And Chemistry Of Human Serum Albumin. *Nature*, 358(6383): 209.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Hu Y J, Liu Y, Shen X S, Fang X Y and Qu S S** (2005) Studies On The Interaction Between 1-Hexylcarbamoyl-5-Fluorouracil And Bovine Serum Albumin. *Journal Of Molecular Structure*, 738(1-3): 143-147.
- Huang Y, Zhang Z, Zhang D and Lv J** (2001) Flow-Injection Analysis Chemiluminescence Detection Combined With Microdialysis Sampling For Studying Protein Binding Of Drug. *Talanta*, 53(4): 835-841.
- Kamat B P** (2005) Study Of The Interaction Between Fluoroquinolones And Bovine Serum Albumin. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 39(5): 1046-1050.
- Kanakis C, Nafisi S, Rajabi M, Shadaloi A, Tarantilis P and Polissiou M** (2009) Structural Analysis Of DNA And RNA Interactions With Antioxidant Flavonoids. *Journal Of Spectroscopy*, 23(1): 29-43.
- Kandagal P, Ashoka S, Seetharamappa J, Shaikh S, Jadegoud Y and Ijare O** (2006) Study Of The Interaction Of An Anticancer Drug With Human And Bovine Serum Albumin: Spectroscopic Approach. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 41(2): 393-399.
- Kaper J B, Nataro J P and Mobley H L** (2004) Pathogenic Escherichia Coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2): 123.
- Kasuya Y, Althaus J R, Freeman J P, Mitchum R K and Skelly J P** (1984) Quantitative Determination Of Dexamethasone In Human Plasma By Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 73(4): 446-451.
- Kaya E, Yilmaz S, Çeribaşı A O and Telo S** (2019) Protective Effect Of Lycopene On Diethylnitrosamine-Induced Oxidative Stress And Catalase Expression In Rats. *Liver*, 317.
- Kelly M C** (2008) Analysis Of Oxidative Damage To DNA Mediated By Transition Metal-Fenton Reactions. *Doctor Of Philosophy Thesis*, Dublin City University, İrlanda, 221.
- Keskitalo A, Munukka E, Toivonen R, Hollmén M, Kainulainen H and Huovinen P** (2018) Enterobacter Cloacae Administration Induces Hepatic Damage And Subcutaneous Fat Accumulation In High-Fat Diet Fed Mice. *Plos One*, 13(5): E0198262.
- Kim K, Brar P, Jakubowski J, Kaltman S and Lopez E** (2009) The Use Of Corticosteroids And Nonsteroidal Antiinflammatory Medication For The Management Of Pain And Inflammation After Third Molar Surgery: A Review Of The Literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, And Endodontology*, 107(5): 630-640.
- Klintipr, Boonprasert R and Kolladarungkri T** (2016) Development Of A Method For Determination Of Dexamethasone (DEX) Concentrations In Human Plasma By Ultra Performance Liquid Chromato-Graphy/Photo Diode Array Detector (UPLC/PDA). *Siriraj Medical Journal*, 67(3): 116-122.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kobayashi T, Guo L L and Nishida Y** (1998) Mechanism Of Double-Strand Dna Cleavage Effected By Iron-Bleomycin. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 53(9-10): 867-870.
- Koca N and Karadeniz F** (2003) Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları Ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 1632-37.
- Koca T T** (2015) Bağırsak Mikroflorasının İnflamatuvar Hastalık Patogenezindeki Yeri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24(1): 78-91.
- Kumar M, Kumar S and Kaur S** (2011) Investigations On Dna Protective And Antioxidant Potential Of Chloroform And Ethyl Acetate Fractions Of *Koelreuteria Paniculata* Laxm. *African Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, 5(3): 421-427.
- Kurtoğlu M G, Bozkurt H, Güdücüoğlu H, Bayram Y and Berktaş M** (2008) Klinik Örneklerden İzole Edilen *Proteus Mirabilis* Suşlarının Antimikrobial Ajanlara Duyarlılıkları. *Genel Tıp Dergisi*, 18(1).
- Lee M H, Cha H J, Choi E O, Han M H, Kim S O and Kim G Y** (2017) Antioxidant And Cytoprotective Effects Of Morin Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress Are Associated With The Induction Of Nrf-2-Mediated Ho-1 Expression In V79-4 Chinese Hamster Lung Fibroblasts. *International Journal Of Molecular Medicine*, 39(3): 672-680.
- Lee S O, Kim Y, Kim B, Kim M N, Woo J H and Ryu J** (2002) Impact Of Previous Use Of Antibiotics On Development Of Resistance To Extended-Spectrum Cephalosporins In Patients With *Enterobacter* Bacteremia. *European Journal Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases*, 21(8): 577-581.
- Letelier M E, Sánchez-Jofré S, Peredo-Silva L, Cortés-Troncoso J and Aracena-Parks P** (2010) Mechanisms Underlying Iron And Copper Ions Toxicity In Biological Systems: Pro-Oxidant Activity And Protein-Binding Effects. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1): 220-227.
- Li Y and Trush M A** (1994) Reactive Oxygen-Dependent DNA Damage Resulting From The Oxidation Of Phenolic Compounds By A Copper-Redox Cycle Mechanism. *Cancer Research*, 54(7 Supplement): 1895s-1898s.
- Marty R, N'soukpoe-Kossi C N, Charbonneau D M, Kreplak L and Tajmir-Riahi H A** (2009) Structural Characterization Of Cationic Lipid-Trna Complexes. *Nucleic Acids Research*, 37(15): 5197-5207.
- Mohammed G J, Kadhim M J and Hameed I H** (2016) *Proteus* Species: Characterization And Herbal Antibacterial: A Review. *International Journal Of Pharmacognosy And Phytochemical Research*, 8(11): 1844-1854.
- Mordi R and Momoh M** (2009) Incidence Of *Proteus* Species In Wound Infections And Their Sensitivity Pattern In The University Of Benin Teaching Hospital. *African Journal Of Biotechnology*, 8(5).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Moreira M A S, Rodrigues P P, Tomaz R S and Moraes C A** (2009) Multidrug Efflux Systems In Escherichia Coli And Enterobacter Cloacae Obtained From Wholesome Broiler Carcasses. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 40(2): 241-247.
- Moreno R G, Alipázaga M V, Gomes O F, Linares E, Medeiros M H and Coichev N** (2007) Dna Damage And 2'-Deoxyguanosine Oxidation Induced By S (Iv) Autoxidation Catalyzed By Copper (Ii) Tetraglycine Complexes: Synergistic Effect Of A Second Metal Ion. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, 101(5): 866-875.
- Munukka E, Wiklund P, Partanen T, Välimäki S, Laakkonen E K and Lehti M** (2016) Adipocytes As A Link Between Gut Microbiota-Derived Flagellin And Hepatocyte Fat Accumulation. *Plos One*, 11(4): E0152786.
- Naik P, Chimatadar S and Nandibewoor S** (2010) Interaction Between A Potent Corticosteroid Drug–Dexamethasone With Bovine Serum Albumin And Human Serum Albumin: A Fluorescence Quenching And Fourier Transformation Infrared Spectroscopy Study. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology*, 100(3): 147-159.
- Nataro J P and Kaper J B** (1998) Diarrheagenic Escherichia Coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1): 142-201.
- Newton R** (2000) Molecular Mechanisms Of Glucocorticoid Action: What Is Important? *Thorax*, 55(7): 603-613.
- Ogawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Sugimura Y and Kawamura J** (2003) Molecular Mechanisms Of Dna Damage Induced By Procarbazine In The Presence Of Cu (Ii). *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 539(1-2): 145-155.
- Ohnishi S, Murata M, Ida N, Oikawa S And Kawanishi S** (2015) Oxidative DNA Damage Induced By Metabolites Of Chloramphenicol, An Antibiotic Drug. *Free Radical Research*, 49(9): 1165-1172.
- Oikawa S, Yamada K, Yamashita N, Tada-Oikawa S And Kawanishi S** (1999) N-Acetylcysteine, A Cancer Chemopreventive Agent, Causes Oxidative Damage To Cellular And Isolated DNA. *Carcinogenesis*, 20(8): 1485-1490.
- Omerovic M, Müştak H K And Kaya İ B** (2018) Escherichia Coli Patotiplerinin Virülens Faktörleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1): 1-6.
- Önder M O K** (2016) Tonsillektomi Yapılan Hastalarda Peritonsiller İnfiltrasyon İle Yapılan Deksametazon Ve İntravenöz Yapılan Deksametazon Uygulamasının Sonuçlarının Ağrı Açısından Karşılaştırılması. *Uzmanlık Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, 38.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 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): 331-316.
- Palancioğlu A, Kırılı İ, Can T, Selvi F, Çakarer S ve Yaltırık M** (2012) *Oral Cerrahide Postoperatif Ağrı Ve Ödem Kontrolünde Kortikosteroidlerin Rolü, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 6: 84-91
- Park S And Imlay J A** (2003) High Levels Of Intracellular Cysteine Promote Oxidative DNA Damage By Driving The Fenton Reaction. *Journal Of Bacteriology*, 185(6): 1942-1950.
- Queiroz F M D, Matias K W D O, Cunha M M F D and Schwarz A** (2013) Evaluation Of (Anti) Genotoxic Activities Of Phyllanthus Niruri L. In Rat Bone Marrow Using The Micronucleus Test. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 49(1): 135-148.
- 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 and Hosten N** (2005) Intestinal Fluid Volumes And Transit Of Dosage Forms As Assessed By Magnetic Resonance Imaging. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22(10): 971-979.
- Sharpe C, Collet J, Belzile E, Hanley J and Boivin J** (2002) The Effects Of Tricyclic Antidepressants On Breast Cancer Risk. *British Journal Of Cancer*, 86(1): 92.
- Silva M M, Savariz F C, Silva-Júnior E F, Aquino T M D, Sarragiotto M H and Santos J C** (2016) Interaction Of B-Carbolines With DNA: Spectroscopic Studies, Correlation With Biological Activity And Molecular Docking. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 27(9): 1558-1568.
- Singh H, Singh J R, Dhillon V S, Bali D and Paul H** (1994) In Vitro And In Vivo Genotoxicity Evaluation Of Hormonal Drugs. II. Dexamethasone. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 308(1): 89-97.
- Sirajuddin M, Ali S and Badshah A** (2013) Drug–DNA Interactions And Their Study By UV–Visible, Fluorescence Spectroscopies And Cyclic Voltametry. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology*, 1241-19.
- Song Y K, Park J S, Kim J K and Kim C K** (2004) HPLC Determination Of Dexamethasone In Human Plasma. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27(14): 2293-2306.
- 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.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Söylemez Y** (2018) Folik Asit Düzeyi Bağırsak Floara 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.
- 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.
- Sun C, Wang X, Zheng Z, Chen D, Wang X and Shi F** (2015) A Single Dose Of Dexamethasone Encapsulated In Polyethylene Glycol-Coated Polylactic Acid Nanoparticles Attenuates Cisplatin-Induced Hearing Loss Following Round Window Membrane Administration. *International Journal Of Nanomedicine*, 103567.
- Süzük M** (2015). Helicobacter Pylori Tedavisinin Mikrobiyota Üzerine Etkisi. *Doktora Tezi*, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 128
- Takatsuka M, Osada-Oka M, Satoh E F, Kitadokoro K, Nishiuchi Y and Niki M** (2011) A Histone-Like Protein Of Mycobacteria Possesses Ferritin Superfamily Protein-Like Activity And Protects Against DNA Damage By Fenton Reaction. *Plos One*, 6(6): E20985.
- Tekin Ö İ** (2018) Su Örneklerindeki *Escherichia Coli*'nin Ses Dalgalarıyla Etkisiz Hale Getirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 97.
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta M A J, Cucarella C and Lamata M** (2001) The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved In Enterococcus Faecalis Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol*, 67(10): 4538-4545.
- Toptancı B Ç, Kızıl G and Kızıl M** (2016) DNA Damage Mechanisms Of Anti-Cancer Drugs. *Middle East Journal Of Science*, 2(1): 33-49.
- Ul-Haq I, Ullah N, Bibi G, Kanwal S, Ahmad M S and Mirza B** (2012) Antioxidant And Cytotoxic Activities And Phytochemical Analysis Of Euphorbia Wallichii Root Extract And Its Fractions. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 11(1): 241.
- Uslu H, Şengül G ve Aktaş O** (2011) Proteus Vulgaris' In Neden Olduğu Nadir Bir Kraniyal Osteomyelit Olgusu. *Balkan Medical Journal*, 2011(1): 113-115.
- 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*.
- Van Staa T, Leufkens H, Abenhaim L, Zhang B and Cooper C** (2000) Use Of Oral Corticosteroids And Risk Of Fractures. *Journal Of Bone And Mineral Research*, 15(6): 993-1000.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Vardevanyan P, Antonyan A P, Parsadanyan M, Davtyan H and Karapetyan A** (2003) The Binding Of Ethidium Bromide With DNA: Interaction With Single-And Double-Stranded Structures. *Experimental & Molecular Medicine*, 35(6): 527.
- Vu J and Carvalho J** (2011) Enterococcus: Review Of Its Physiology, Pathogenesis, Diseases And The Challenges It Poses For Clinical Microbiology. *Frontiers In Biology*, 6(5): 357.
- Wong J, Tran L T, Lynch K A and Wood L J** (2018) Dexamethasone Exacerbates Cytotoxic Chemotherapy Induced Lethargy And Weight Loss In Female Tumor Free Mice. *Cancer Biology & Therapy*, 19(1): 87-96.
- Xue X J, Gao Q, Qiao J H, Zhang J, Xu C P and Liu J** (2014) Red And Processed Meat Consumption And The Risk Of Lung Cancer: A Dose-Response Meta-Analysis Of 33 Published Studies. *International Journal Of Clinical And Experimental Medicine*, 7(6): 1542.
- Yah S, Eghafona N, Oranusi S and Abouo A** (2007) Widespread Plasmid Resistance Genes Among Proteus Species In Diabetic Wounds Of Patients In The Ahmadu Bello University Teaching Hospital (ABUTH) Zaria. *African Journal Of Biotechnology*, 6(15).
- Yavaşer R** (2011) Doğal Ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 104.
- Yeung C K, Chan K P, Chan C K, Pang C P and Lam D S** (2004) Cytotoxicity Of Triamcinolone On Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells: Comparison With Dexamethasone And Hydrocortisone. *Japanese Journal Of Ophthalmology*, 48(3): 236-242.
- 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.
- 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.
- Yıldıoğan Beker B** (2011) Flavonoidler Varlığında Askorbik Asidin Bakır (II) Katalizli Oksidasyonu Ve Bakır (II) / Askorbik Asit Nedenli Lipit Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Doktoratezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Fizikokimya Programı, İstanbul, 167
- Yılmaz K And Altındış M** (2017) Sindirim Sistemi Mikrobiyotası Ve Fekal Transplantasyon. *Nobel Medicus Journal*, 13(1).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

Yokawa K, Kagenishi T and Kawano T (2011) Prevention Of Oxidative DNA Degradation By Copper-Binding Peptides. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, 1106082534-1106082534.

Yu X, Zhao P, Zhang W, Zhang L and Zhang Y (2007) Screening Of Phage Displayed Human Liver Cdna Library Against Dexamethasone. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 45(5): 701-705.

Yüksel Altuntaş D ve Batman A (2017) Mikrobiyota Ve Metabolik Sendrom. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 45(3): 286-296.

Zacharski L R, Ornstein D L, Woloshin S and Schwartz L M (2000) Association Of Age, Sex, And Race With Body Iron Stores In Adults: Analysis Of Nhanes III Data. *American Heart Journal*, 140(1): 98-104.

Zhang X and Yang Q (2018) Association Between Serum Copper Levels And Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Journal Of International Medical Research*, 46(12): 4863-4873.

Zhou C Y, Xi X L and Yang P (2007) Studies On DNA Binding To Metal Complexes Of Sal 2 Trien. *Biochemistry (Moscow)*, 72(1): 37-43.

Zhu H C, Yang X, Xu L P, Zhao L J, Tao G Z and Zhang C (2014) Meat Consumption Is Associated With Esophageal Cancer Risk In A Meat-And Cancer-Histological-Type Dependent Manner. *Digestive Diseases And Sciences*, 59(3): 664-673.

URL-1 <<https://pixels.com/featured/enterobacter-cloacae-bacteria-juergen-berger.html>>, Ziyaret tarihi: 10.02.2019.

URL-2 <<https://www.sciencephoto.com/media/798892/view>>, Ziyaret tarihi: 20.02.2019.

URL-3 <http://resizeme.club/picresize-128_1010128.html>, Ziyaret tarihi: 25.03.2019.



ÖZGEÇMİŞ

Çağla ASLAN 1995’de Ankara’nın Şereflikoçhisar ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğrenimini Gölbaşı ilçesinde tamamladı. Ahmet Alper Dinçer Anadolu Lisesi’ nden mezun olduktan sonra 2013 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi (ZKÜ) 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 : Seğmenler Mahallesi Cumhuriyet Caddesi,
No: 70-72/14 Şimşek Apt. Gölbaşı / Ankara

Tel : (0507) 3306570

E-posta : cagla.aslan.95@gmail.com