



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**FERROSEN AKTİF BİRİMİ İÇEREN YENİ  
AZİN TÜREVLERİNİN DNA BAĞLANMA,  
DNA KESİM VE ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Nihan GÜRCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Yrd. Doç. Dr. Melek ÇOL AYVAZ (2. Danışman)

TRABZON-2014

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Sağlık Bilimleri Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nihan GÜRCAN'ın hazırladığı "Ferrosen Aktif Birimi İçeren Yeni Azin Türevlerinin Dna Bağlanma, Dna Kesim ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi" başlıklı tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL \_\_\_\_\_

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ahmet YAŞAR \_\_\_\_\_

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL \_\_\_\_\_

Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ \_\_\_\_\_

Tarih: .../.../2014

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

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **BEYAN**

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

09/05/2014

Nihan GÜRCAN

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi ve deneyimlerini aktaran, her konuda bana yardımcı olmaya çalışan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL'e, eř danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Melek OL AYVAZ'a özveriyle çalışmalarına katkıda bulunduğu için, jel dökme işleminde bana yardım eden yüksek lisans öğrencisi Şeyda AKKAYA'ya, tez çalışmam süresince beni evinde misafir eden yüksek lisans öğrencisi Seda ŞAHİN'e en içten dileklerim ile teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında bana destek olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan eşim Osman Talha GÜRÇAN'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu tez 114Z059 Nolu, Bazı Aril Substitüye Azin Ferrosen Bakır(II) Komplekslerinin Dna Bağlanma, Dna Kesim, Topoizomeraz I Aktivitelerinin ve Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi başlıklı proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Tübitak kurumuna katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ecz. Nihan GÜRÇAN

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
<b>BEYAN</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b>	
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>ix</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	<b>7</b>
4.1. Schiff Bazları ile İlgili Genel Bilgiler	7
4.1.1. Schiff Bazları ve Metal Komplekslerinin Biyolojik Aktiviteleri	8
4.1.1.1. Organometalik Bileşikler	13
4.1.1.2. Metalosenler ve Ferrosen	13
4.1.1.3. Ferrosenin Medisinal Uygulamaları	16
4.2. Nükleik Asitler	24
4.2.1. Nükleik Asitlerin Yapı Elemanları ve Özellikleri	24
4.2.1.1. DNA ve Yapıları	25
4.2.1.2. DNA'nın Farklı Sarmal Formları	27
4.2.1.3. Halkasal ve Süper Kıvrımlı DNA	28
4.2.2. Nükleik Asitlerin Spektroskopik ve Termal Özellikleri	29
4.2.2.1. UV Absorbsiyonu	29
4.2.2.2. DNA Saflığı	30
4.2.2.3. Termal Denatürasyon	30
4.2.3. DNA ile Küçük Moleküllerin Etkileşimi	32
4.2.3.1. Dış Elektrostatik Etkileşimler	33
4.2.3.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimleri	34
4.2.3.3. İnterkalasyon Etkileşimleri ve DNA Kesme	35
4.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	39
4.3.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	41

	vi
4.3.2. Antioksidanlar	43
4.3.3. Antioksidan Aktivite	46
<b>5. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>49</b>
5.1. Gereç	49
5.1.1. Kullanılan Cihazlar	49
5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	49
5.1.3. Çözeltiler	52
5.2. Yöntem	53
5.2.1. DNA Bağlanma Deneylei	53
5.2.1.1. UV-Vis absorpsiyon Titrasyonları	53
5.2.1.2. UV ile Yarışmalı Etidyum Bromür (EB) Bağlanması Çalışmaları	54
5.2.1.3. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi	55
5.2.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi	55
5.2.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi	56
5.2.2.2. pH'nın DNA Kesim Aktivitesine Etkisi	56
5.2.2.3. Konsantrasyonun DNA Kesim Aktivitesine Etkisi	56
5.2.3. İyonik Şiddetin DNA Kesim Aktivitesine Etkisi	56
5.2.3.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Oksidatif Kesimi	57
5.2.3.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi	57
5.3. Antioksidatif Aktivite Çalışmaları	57
5.3.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi	57
5.3.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	58
<b>6. BULGULAR</b>	<b>60</b>
6.1. DNA Bağlanma Çalışmaları	60
6.1.1. UV –Vis Absorpsiyon Titrasyonları	60
6.1.2. UV ile Yarışmalı Etidyum Bromür Bağlanması Çalışmaları	64
6.1.3. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi	70
6.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi	70
6.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi	71
6.2.1.1. pH'nın DNA Kesim Aktivitesine Etkisi	71
6.2.1.2. Kompleks Konsantrasyonunun DNA Kesim Aktivitesine Etkisi	73

6.2.1.3. İyonik Şiddetin DNA Kesim Aktivitesine Etkisi	vii 75
6.3.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Oksidatif Kesimi	77
6.3.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi	79
6.3.3. Antioksidan Aktivite	81
6.3.3.1 DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	81
6.3.3.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi	85
<b>7. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>90</b>
<b>8. KAYNAKLAR</b>	<b>100</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>125</b>

**TABLULAR DİZİNİ**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> DNA'nın farklı sarmal formlarına ait özellikler	29
<b>Tablo 2.</b> Çalışmada kullanılan cihazlar	49
<b>Tablo 3.</b> Çalışmada kullanılan ligand ve komplekslerin kısa kodları, molekül formülleri, molekül ağırlıkları ve kimyasal yapıları	50
<b>Tablo 4.</b> Ligand ve komplekslerin DNA ile etkileşimi ve gözlenen değişimler	64
<b>Tablo 5.</b> Ligand ve komplekslerin DNA erime sıcaklıkları	70
<b>Tablo 6.</b> Kompleks ve ligandların antioksidatif etkinlikleri	89



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Schiff tarafından sentezlenen Schiff bazı	7
Şekil 2. Schiff bazlarının oluşum mekanizmaları	8
Şekil 3. Transaminasyon tepkimesi	9
Şekil 4. Ferrosen bileşiğinin molekül yapısı	14
Şekil 5. Tamoksifen (R=H), Hidroksitamoksifen (R=OH); Ruthenosifen türevi	18
Şekil 6. İlludin M; İlludin M-ferrosenil türevi	19
Şekil 7. Ferrosenyum tetrafloraborat; Ferrosenyum tri-iyodür	19
Şekil 8. Azalakton ferrosen ve tiyo-morfolidaminometil ferrosen	20
Şekil 9. Radyum-ferrosen kompleksleri	20
Şekil 10. Akridin bağlı ferrosen ve benzil grubu bağlı ferrosen bileşikleri	21
Şekil 11. Platin-ferrosen kompleksleri	21
Şekil 12. Ruthenyum-ferrosen kompleksi ve ruthenyum bağlı nitrojen-ferrosen ligandı	23
Şekil 13. Kalay-ferrosen kompleksi	24
Şekil 14. Pürin ve pirimidin yapısı	25
Şekil 15. DNA molekül yapısı	26
Şekil 16. DNA'nın farklı sarmal formları: A-DNA, B-DNA, Z-DNA	28
Şekil 17. DNA'nın denaturasyonu	31
Şekil 18. DNA-interaktif ajanlarının türleri ve onların DNA ile moleküler etkileşimleri	33
Şekil 19. Etidyum bromürün interkalasyonu	35
Şekil 20. İnterkalasyon yapan ajanlar	36
Şekil 21. Diterkalinyum kompleksinin yapısı ve interkalasyonun gösterilmesi	36
Şekil 22. DAPI'nın kimyasal yapısı	37
Şekil 23. ROS miktarı ile antioksidan sistemler arasındaki denge	41
Şekil 24. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) sınıflandırılması	41
Şekil 25. Antioksidanların sınıflandırılması	45
Şekil 26. Kompleks ve ligandların DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	63

	x
<b>Şekil 27.</b> EB'ün DNA bağlanması ligand yokluğunda ve artan ligand konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu	69
<b>Şekil 28.</b> Komplekslerin pH'a bağlı kesim aktiviteleri	72
<b>Şekil 29.</b> Komplekslerin konsantrasyona bağlı kesim aktiviteleri	74
<b>Şekil 30.</b> Komplekslerin nükleaz etkinlikleri üzerinde tuz konsantrasyonunun etkisi	76
<b>Şekil 31.</b> Komplekslerin indükleyici ajan varlığında oksidatif kesimi	78
<b>Şekil 32.</b> Komplekslerin nükleaz etkinliklerinin UV ışığı altındaki değişimi	80
<b>Şekil 33.</b> Kompleks ve Ligandların (DPPH) % inhibisyon-konsantrasyon eğrileri	84
<b>Şekil 34.</b> Kompleks ve Ligandların (SOD) % inhibisyon-konsantrasyon eğrileri	88

## SİMGELER ve KISALTMAR DİZİNİ

### Kısaltmalar

<b>UV-vis</b>	Ultraviyole visible
<b>DMF</b>	N,N-dimetilformamit
<b>EDTA</b>	Etilen diamin tetraasetik asit
<b>TAE</b>	Tris-Asetik Asit-EDTA
<b>Tris</b>	(tris-hidroksimetil)-aminometan
<b>EB</b>	Etidyum Bromür
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>CT-DNA</b>	Calf Thymus – deoksiribonükleik asit
<b>TEAK</b>	Troloks eşitliği antioksidan kapasitesi
<b>FRAP</b>	Demir iyonlarını indirgeme antioksidan kapasitesi
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NO<sup>•</sup></b>	Nitrik oksit radikali
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen molekülü
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Süperoksit radikali
<b>OH<sup>•</sup></b>	Hidroksil radikali
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-pikrilhidrazin
<b>BHA</b>	Bütillenmiş hidroksianisol
<b>AA</b>	Askorbik asit
<b>ME</b>	β-merkatoetanol

### Simgeler

<b>T<sub>m</sub></b>	Ergime Sıcaklığı
<b>Δλ</b>	Dalga boyundaki değişim
<b>μL</b>	Mikrolitre
<b>Å</b>	Angstrom

<b>mM</b>	Milimolar
<b>nm</b>	Nanometre
<b><math>\pi \rightarrow \pi^*</math></b>	$\pi$ molekül orbitalinden $\pi^*$ antibağ molekül orbitaline geçiş

## 1.ÖZET

### **Ferrosen Aktif Birimi İçeren Yeni Azin Türevlerinin DNA Bağlanma, DNA Kesim ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi**

Yapay metallonükleazların, gen düzenlenmelerinde, DNA etkileşimlerinde, protein eşleştirmelerde ve kanser tedavilerinde kullanılması üzerine yapılan çalışmalar son zamanlarda oldukça ilgi çekmektedir. Antikanser ilaçların birçoğu farklı şekillerde DNA'ya bağlanarak antitümör etkisi gösterirler. Böylece kanserli hücrede DNA çoğalmasını bloke ederek, tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ederler. DNA bağlanmasının ve kesmesinin mekanizmasını anlamak, etkili antitümör ilaçlarının dizayn edilmesinin en önemli temelidir. Bu tür ilaçların başarısı, DNA'ya ilgilerine ve bağlanma modlarına bağlıdır. Bu çalışma kapsamında, farklı ferrosen ligandlarının bakır (II) komplekslerinin DNA'ya bağlanma kapasiteleri dana timus DNA'sı kullanılarak UV-Vis absorpsiyon titrasyonları, termal denatürasyon ve yarışmalı etidyum bromür bağlanması yöntemleri kullanılarak incelendi ve komplekslerin DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yoluyla yerleştiği belirlendi. Komplekslerin metalonükleaz olarak değerlendirilmeleri için agaroz jel elektroforezi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolitik kesim denemelerinde kesim etkinliğinin pH 5 ile pH 7 arasında değerlerde 50 mM Tris-HCl tamponu ile oluşturulan ortamda yüksek olduğu ve nükleaz aktivitesinin konsantrasyon ve iyonik güce bağımlı olduğu ortaya konuldu. K4 kompleksi dışında; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.4 M), askorbik asit (2.5 mM) ve merkaptoetanol (0.4 M) gibi çeşitli aktivatörlerin varlığında gerçekleştirilen kesim denemelerinde önemli ölçüde artmış aktivite belirlendi. K1, K2 ve K5 komplekslerin nükleaz aktivitesinin ışık etkisiyle uyarıldığı belirlendi. K4 ve K5 düşük 2,2-Difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi gösterirken, diğer bileşikler yüksek süpürme aktivitesi gösterdi. Bununla birlikte, özellikle K1'de belirgin olmak üzere (SC<sub>50</sub>= 3.1 µM), tüm bileşiklerde yüksek süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, yarışmalı bağlanma, DNA bağlanma, DNA kesim, ferrosen, ışık ile kesim

## 2. SUMMARY

### **Investigation of DNA Binding, DNA Cleavage, and Antioxidant Activities of New Azine Derivatives with Active Ferrocene Unit**

Studies about artificial metallonucleases have attract more attention because of their potential usage in gene regulation, mapping of protein and DNA interactions, probing of DNA specific structures, and for cancer therapy. Many anticancer drugs exert their antitumor effects through binding to DNA in various ways, thereby blocking the replication of DNA and inhibiting the growth of tumor cells. The understanding of DNA binding and cleavage is the basis for the design of new, efficient antitumor drugs, their effectiveness depending on the binding mode and affinity towards DNA. In this study, the DNA-binding capacities of the copper(II) complexes of different ferrocene ligands were investigated with the UV-Vis absorption titrations, thermal denaturation and competitive ethidium bromide binding methods using calf thymus DNA. Our results demonstrated that the compounds can intercalate into the stacked base pairs of DNA. For the evaluation of the complexes as metalonuclease, hydrolytic cleavage assays were performed by using agarose gel electrophoresis. It was introduced that the cleavage efficiencies were high in the medium with the 50 mM Tris-HCl buffer between pH 5 and pH 7, and nuclease activities were concentration and ionic strength dependent. Remarkably increased activity was determined in cleavage experiments performed in the presence of various activators such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.4 M), ascorbic acid (2.5 mM) and mercaptoethanol (0.4 M) except for K4. It was determined that nuclease activities of K1, K2 and K5 complexes did induce in the effect of light. K4 and K5 compounds showed low scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical while the other compounds showed high scavenging activity. Besides, high scavenging capabilities of superoxide dismutase (SOD) activity were determined in all compounds, especially K1 (SC<sub>50</sub>= 3.1μM).

**Key Words:** Antioxidant, competitive binding, DNA binding, DNA cleavage, ferrocene, photocleavage

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, işgalci nitelik kazanması ve metastaz yapması ile kendini gösteren ve halen gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan öldürücü bir hastalıktır (1). Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) 2008 yılında 12.4 milyon yeni kanser vakası, 7.6 milyon kanser nedenli ölüm ve 28 milyon ilk tanıdan bu yana 5 yıl ya da daha az süre geçmiş kanserli hasta olduğunu tahmin etmektedir (2, 3). Kanser oranlarıyla yaş arasındaki güçlü bağlantı göz önünde bulundurulduğunda, 2030 yılında büyük bir nüfusa etki edecek artan bir kanser yükünden söz edilebilir (2).

Günümüzde kanser tedavisi cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır. Kanser kemoterapisinde amaç, ilaç etkisiyle tümör büyümesini yavaşlatmak veya engellemek, hızlı gelişen tümörlerde hedeften farklı doku ve organlarda birincil tümörden kaynaklı yeni tümörlerin gelişimini yani metastazı engellemek, hatta cerrahi müdahaleye gerek kalmadan hedef tümörün tümüyle ortadan kaldırılmasını sağlamaktır (4). Antikanser ilaçların çoğu sitotoksik etkileri ile malign hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını önlerler ve onların ölümüne yol açarlar. Radikal bir tedavi vücutta tek bir malign hücre kalmaksızın tüm hücrelerin yok edilmesi ile mümkündür. Ancak böyle bir durum az sayıdaki istisnalar dışında halen varolan ilaçlarla sağlanamamaktadır. Antineoplastik ilacın terapötik etkinliğini kısıtlayan önemli bir faktör, tümör hücrelerinin ilaca azalmış hassasiyeti, bir başka deyişle ilaca karşı direnç gelişimidir. Bu durum bazı kanser türünde kendiliğinden olabildiği gibi (doğal veya primer rezistans), kemoterapiden sonra da gelişebilir (kazanılmış veya sekonder rezistans) (5). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tümör büyümesinin başlangıçtan sonraki dönemlerinde klonal homojenliğini sürdüremediği gösterilmiştir. Michael M. Gottesman (6), makalesinde bu durumu “normal hücrelerin hepsi ilaçlara benzer şekilde cevap verirler; oysa kanser hücrelerinin her biri kendilerine özgü şekilde cevap verirler” şeklinde yorumlamaktadır. Bu yaklaşımda da ifade edilmeye çalışıldığı gibi, görünüm olarak benzer olan, aynı malign hücreden gelişen kanser hücreleri biyokimyasal, morfolojik ve ilaca yanıt verme karakteristikleri bakımından farklılıklar gösterirler. Kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaca direnç gelişimi, azalmış ilaç

birikimi, artmış ilaç metabolizması ve ilaç etkinliğindeki değişiklikler gibi pek çok faktörle ilişkili olabilir.

DNA (Deoksiribonükleik asit), hücre canlılığının sürdürülmesinde çok büyük önem taşır. Dolayısıyla, antibiyotik, antiviral ve antitümöral ilaçlar için hedef olarak seçilmiştir. Küçük moleküllerin DNA'ya bağlanma çalışmaları ilaç-DNA etkileşimlerini anlamak, klinik uygulamalar için yeni ve etkili ilaçların geliştirilmesi ve nükleik asit yapılarının duyarlı kimyasal problemlerinin geliştirilmesi alanlarında çok kullanışlıdır. Çünkü antikanser ve antibiyotik ilaçlarının hücre içi hedeflerinin büyük bir çoğunluğu DNA'dır. Son yirmi yılda DNA ile interkalasyon (araya girme) moduyla etkileşebilen küçük moleküllere yönelik çalışmalar çok büyük ilgi çekmektedir (7). Klinik olarak kullanılan birçok antikanser ilacı DNA'ya interkalasyon prosesi ile bağlanmaktadır. Bu proses düzlemsel, aromatik ya da heteroaromatik halka sistemleri içeren bileşiklerin heliks eksenine dik ve Watson-Crick hidrojen bağının neden olduğu istiflenme düzeninin tümünü bozmadan bitişik baz çiftlerinin arasına yerleşmesidir. Cis-platin gibi metal esaslı kemoterapi ajanları, kanser tedavi protokollerinde geniş ölçüde yer almaktadır (8). Bu ilacın kullanım alanını kısıtlayıcı etkileri arasında doza bağımlı şiddetli toksisiteleri, düşük biyoyararlanımları, doğal veya edinilmiş ilaç dirençleri sayılabilir (9). DNA'nın büyük oluğunda yer alan adenin ve guanin bazlarının imidazol halkalarındaki N7 atomları, platinleyici ajanların DNA'ya bağlandıkları en ulaşılabilir ve reaktif nükleofilik bölgeyi oluşturmaktadır (10). Cis-platin antitümör etkisini, bu bölgelerden genomik DNA'ya zincirler arası ve zincir içi çapraz bağlarla bağlanarak, DNA'yı normal yapısı bozularak bükülmüş, DNA zinciri haline getirmek suretiyle oluşturur. Cis-platin'in DNA'daki pürin bazlarına bağlanması ile oluşan hasar transkripsiyonu ve/veya replikasyonu engelleyerek, kanser hücresinin ölümüne neden olan sitotoksik süreçleri etkilemektedir (11). Cis-platin'in modifiye ettiği DNA, yeterince yenilenemediğinden ortaya çıkan DNA hasarı onarılamayacak boyutta ise, hücre bunu tolere edemez ve hücre ölümü gerçekleşir (12). Son yıllarda küçük moleküllerin DNA'ya bağlanmalarının incelenmesi çok ilgi çeken bir çalışma alanı olmuştur. Spesifik DNA hedefli ilaçların sentezi için bu moleküllerin DNA'ya bağlanma türünün belirlenmesi son derece önemlidir. Moleküler DNA'ya interkalasyon, kovalent ve elektrostatik olarak bağlanabilirler. Cis-platinin DNA etkinliğinin



keşfedilmesinden sonra birçok platin kompleksi sentezlenmiş ve DNA etkileşimleri çalışılmıştır (13, 14).

Serbest radikaller, atomik orbitali üzerinde eşlenmemiş elektron ( $e^-$ ) taşıyan moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikal oluşumunun artması, oksidatif stresi tetiklemektedir. Temel olarak oksidatif stres biyolojik sistemde prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır. Hücreler hafif oksidatif stresi tek başlarına tolere edebilseler de genellikle antioksidan enzim sistemlerini aktive ederler. Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda, oksidatif stresin tanımında belirtildiği üzere, reaktif oksijen bileşikleri ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur, dolayısıyla oksidan hasara duyarlı DNA, protein, karbonhidratlar ve lipitler gibi hücresel makromoleküller zarar görür (15). Yapılan çalışmalarla, çeşitli kategorideki sitostatik ajanların hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak serbest radikal üretimine ve antioksidanlarda kayıba neden olduklarını göstermiştir (16, 17). *In vitro* araştırmalar ve hayvan çalışmalarında serbest radikal süpürücülerin, doksorubisin ve cisplatin gibi sitostatik ajanlarla birlikte uygulanmasının, antitümör etkiyi azaltmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, hayvan çalışmalarında, tek başına kemoterapi uygulananlara göre sitotoksik ajan ile birlikte antioksidan uygulananlarda hayatta kalma oranının daha yüksek olduğu pek çok kez gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda da antioksidanlar kemoterapinin antitümoral etkisini azaltmamış hatta arttırmıştır (18). Bu nedenle tasarlanan antitümoral ilaçların antioksidan katkısının, kemoterapiye bağlı toksisite şiddetini ve sıklığını azaltacağı düşünülmektedir.

Schiff bazlarında metal atomu, C=N bağının azotundan ve orto pozisyonundaki bağ yapmayan elektron çiftine sahip oksijen, azot veya sülfür atomlarından bağlanabilir. Schiff bazı kompleksleri, farmakolojik ve fizyolojik olarak spesifik aktivitelere sahiptir. Bu bileşiklerin biyoaktiviteleri bilinmesi ile birlikte Schiff bazı komplekslerinin antioksidan, DNA bağlanma ve kesme aktiviteleri ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Ferrosen, sandviç kompleks yapıları olarak nitelenen organometalik bileşiklerin ilk örneğidir. Bütün sandviç yapısındaki bileşiklerde aromatik bir halka bir geçiş metaline bağlanır (19). Ferrosen, sahip olduğu siklopentadienil halkaları sayesinde

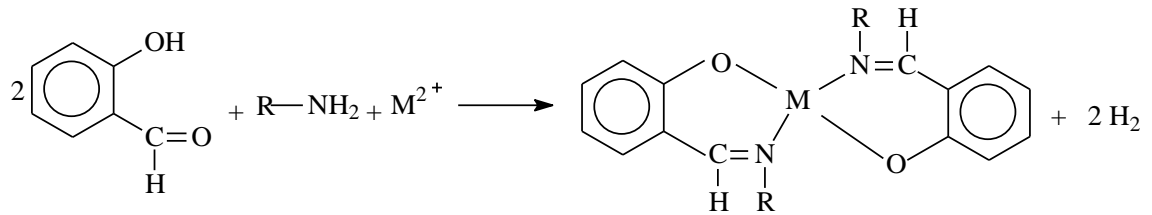
aromatik bir bileşiktir. Ayrıca kendisi Fe(II) iyonlarından aldığı elektron desteği ile benzen halkasına göre elektronca daha zengindir ve bu nedenle aromatik katılma tepkimelerine kolayca girebilmektedir. Literatürde çeşitli ferrosen türevlerinin antitümoral, antibakteriyel, anti-sıtma ve antioksidan özellikleri incelenmiş ve birçok ferrosen bileşiği sitotoksik (21), antitümöral (22, 23), antimalaryal (24), antifungal (25) ve DNA kesim aktivitesi (26) gösterdiği rapor edilmiştir. Ferrosen; nötral, kararlı ve toksik olmadığı için çok dikkat çekici bir moleküldür (20). Bu sonuçlar ferrosen molekülü esas alınarak tasarlanan yeni türevleri araştırmak konusunda araştırmacılara ilham vermektedir.

Bu tez kapsamında Prof. Dr. Kerim SERBEST ve onun çalışma grubu tarafından sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan bazı ferrosen türü ligandlar ve onların bakır(II) komplekslerinin literatürde ilgi çeken özellikleri açısından incelenmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla, bu ligandların ve komplekslerin DNA ile etkileşip etkileşmedikleri UV spektrofotometri tekniği ile incelenecektir. Ayrıca bağlanma modunun tam olarak ortaya konulabilmesi için termal denatürasyon çalışmaları yapılacaktır. Absorbsiyon spektrumlarından elde edilen sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile de desteklenerek nükleaz etkinlikleri tespit edilecektir. Bu amaçla, öncelikle hidrolitik kesim denemesi yapılacak ve çeşitli kimyasallar varlığında gerçekleştirilecek olan oksidatif DNA kesim ve ışıkla uyarılmış DNA kesim çalışmalarının sonuçlarıyla karşılaştırılacaktır. Bu bileşiklerin antioksidan aktivitelerini tespit etmek için süperoksit ve DPPH radikalleri süpürme aktiviteleri incelenecektir. Sentezi ve karakterizasyonu yapılan bu bileşiklerin sahip olduğu potansiyel özelliklerin ortaya konulması açısından bu çalışma disiplinlerarası çalışma olarak bir öneme sahiptir. Bu bileşiklerin önemli biyolojik aktivite göstermesi, ileride onların antikanser ilaç olarak değerlendirilmesine temel oluşturacaktır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Schiff Bazları ile İlgili Genel Bilgiler

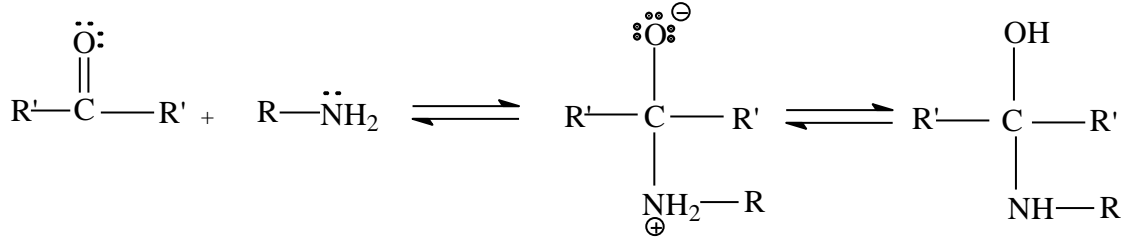
Koordinasyon bileşiklerinin yapısı konusundaki en önemli çalışmalar Danimarkalı Kimyager S.M. Jorgensen ve İsviçreli Alfred Werner (1893) tarafından 19. yüzyılın sonlarında gerçekleştirilmiştir. Koordinasyon teorisi konusundaki başarılı çalışmaları nedeniyle Werner 1913 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür (27). Bu gelişmelerden sonra koordinasyon kimyası alanında hızlı gelişmeler gerçekleşmiştir. Bunu izleyen yıllarda Linus Pauling (1930) , “Valans Bağ Teorisi”ni geliştirmiştir (28). Koordinasyon bileşiklerinin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan daha gerçekçi bir teori ise 1929 da H.Bethe tarafından ortaya atılan “Kristal Alan Teorisi”nin geliştirilmesi ile sağlanmıştır (29). Daha sonraları bu kuram, bilim adamları tarafından bileşiklerin yapısal ve fiziksel özelliklerini açıklayabilmek için kullanılmıştır. Bu teoriye göre metal-ligand arasındaki bağ iyonik karakterdedir. Koordinasyon bileşikleri ile ilgili gelişmelere paralel olarak en çok çalışılan ve geniş kullanım alanları bulan Bakır(II), nikel(II) ve kobalt(II) bileşikleri göze çarpmaktadır. Koordinasyon kimyasındaki bu gelişmeler metal çevresini oluşturan farklı ligandların sentezleri ile zenginleşmiştir. Bu alandaki çalışmalar yoğun bir şekilde artarken koordinasyon bileşiklerinin oluşumunda en çok göze çarpan ligand gruplarından birisini Schiff bazları sınıfının oluşturduğu görülmektedir.



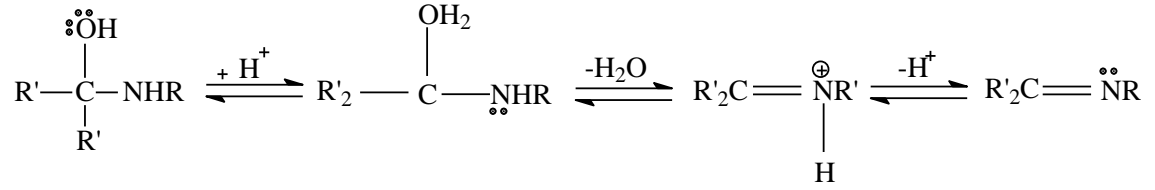
Şekil 1. Schiff tarafından sentezlenen Schiff bazı

İtalya’da iken anilinin bazı aldehitler (asetaldehit, valeraldehit, benzaldehit, sinnamaldehit) ile girdiği reaksiyonlar üzerine çalışan Hugo Schiff, daha sonra kendisine ithafen “Shiff Bazı” olarak adlandırılacak olan “imin” lerin oluşumunu keşfetmiştir (30). Bu buluşunu 1864 yılında yayımlanan “Yeni Bir Organik Baz Dizisi (Eine neue Reihe organischer Basen)” adlı makalesi ile bilim camiasına tanıtmış ve Schiff bazlarını literatüre kazandırmıştır (Şekil 1).

### 1. Basamak: Katılma



### 2. Basamak: Ayrılma

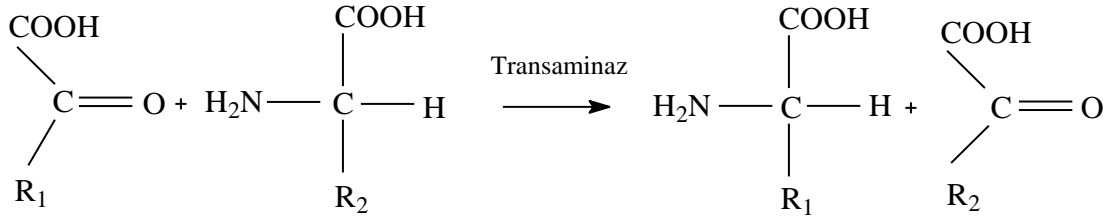


**Şekil 2.** Schiff bazlarının oluşum mekanizmaları

Karbonil bileşikleri ile primer aminlerin reaksiyonuyla oluşan Schiff bazlarının oluşum mekanizması iki basamaklıdır. İlk basamakta, primer aminle karbonil grubunun kondenzasyonundan bir karbinolamin ara bileşiği meydana gelir. Ayrılma basamağı olan ikinci basamakta ise oluşan ara ürünün dehidratasyonu sonucunda Schiff bazı oluşur (Şekil 2).

#### 4.1.1. Schiff Bazları ve Metal Komplekslerinin Biyolojik Aktiviteleri

Schiff bazları biyokimyasal reaksiyonlarda önemli rol oynamaktadırlar. Schiff bazlarının en ilgi çekici biyolojik aktivitelerinden biri aminoasit biyosentezinde oynadıkları roldür.  $\alpha$ -Aminoasitlerin ( $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ) biyosentezinde önemli ara bileşiklerdir.  $\alpha$ -Aminoasitler, organizmada proteinlerin sentezinde kullanılır. Yiyeceklerin yeterli miktarda aminoasit içermemesi halinde organizma ihtiyaç fazlası bir aminoasidi transaminasyon tepkimesiyle gereksinim duyduğu aminoaside dönüştürür (Şekil 3). Bu işlemde ihtiyaç fazlası aminoasidin amino grubu bir keto-aside taşınır.



**Şekil 3.** Transaminasyon tepkimesi

Organizma için çok önemli olan bu transaminasyon tepkimesinin bir dizi Schiff bazı ara ürünü üzerinden yürüdüğü düşünülür.

Schiff bazlarının koordinasyon kimyasında ligand olarak kullanımı Pfeiffer'ın 1933 yılındaki çalışmalarına dayanmaktadır. Pfeiffer çalışmasında orto hidroksi aromatik aldehytlerle çeşitli primer aminleri alkol ortamında reaksiyona sokarak Schiff bazı ligandlarını elde etmiş ve ligandları metal iyonları ile etkileştirerek pek çok geçiş metalinin Schiff bazı komplekslerini hazırlamıştır (31). Büyük moleküllerin bu şekilde ligand olarak kullanılması özellikle kimya alanında önemli bir yer tutmuş ve çalışmaların yaygınlaşmasına öncülük etmiştir.

Schiff bazları gerek organizma için önemli  $\alpha$ -aminoasitlerin elde edilmesi sırasındaki rolü, gerekse bazı Schiff bazlarının ve bunların bazı metal komplekslerinin sahip olduğu antitümör, antikanser ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle oldukça büyük bir öneme sahiptirler. Metal şelatlarının kansere karşı gösterdikleri iyileştirici etkileri 1963 yılında Furst tarafından belirlendiğinden bu yana, bu bileşikler kanser tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Günümüzde halen kanser ilacı olarak kullanılan platin bileşiklerinin, 1969 yılında Rosenberg tarafından antitümör aktivite gösterdiklerinin belirlenmesiyle, metal komplekslerinin biyolojik aktiviteleri üzerine çalışmalar büyük hız ve önem kazanmıştır. Rosenberg sarkomlu bir farede intraperitoneal Cis-platin uygulaması sonucunda tümör boyutunda belirgin bir gerileme olduğu gözlemlenmiştir (32). 1990-1997 yılları arasında Avrupa Bilim Kurulu tarafından 'Biyolojik Sistemlerde Metal Kimyası' başlıklı bir programın başlatılması ve 'biyolojik inorganikler' çalışmalarının desteklenmesiyle bu alandaki çalışmalar özellikle kompleks bileşikler ve bunların biyolojik aktifliklerinin çalışılmasına kaymıştır.

Schiff bazı kompleksleri biyolojik aktivasyonlar konusunda da önemli kullanım alanlarına sahiptir. Bakır komplekslerinin anti bakteriyel aktivitelerinin yüksekliği,

platin komplekslerinin anti-tümör özellik göstermesi, demir komplekslerinin katodik oksijen indirgenmesinde katalizör olarak kullanılması, mangan ve rutenyum komplekslerinin suyun fotolizini hızlandırması, kobalt komplekslerinin oksijen ayrılması ve taşınması reaksiyonları için model oluşturması, çinko ve krom komplekslerinin polistiren reçinelerin boyanmasında ısı ve ışığa dayanıklı boyar madde olması, nikel komplekslerinin termoplastik reçineler için ışık stabilizatörü olarak kullanılması bu uygulama alanlarının önemini arttıran özelliklerinden bazılarıdır.

Birçok Schiff bazı metal kompleksinin mikroorganizmalar üzerindeki tesirleri bilinmektedir. Bunlardan; 2-klorobenzaldehit ve glisinden türeyen  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  komplekslerinin antifungal aktivitelerini ölçen testlerin sonucunda bu bileşiklerin *gypseum*, *floccosum*, *canis* ve *rubrum* mantarlarına antifungal aktivite gösterilmiştir. Özellikle *o*-vanilinin çeşitli alkil ve aromatik aminlerle oluşturduğu Schiff bazlarının ve Rutenyum komplekslerinin, K. Natarajan ve arkadaşları tarafından *Aspergillus Flavus*, *Rhizoctonia Solani* gibi mantarlara karşı antifungal aktiviteleri incelenmiş ve çalışmalar sonucunda hem ligandın hem de komplekslerin bu tür mantarların büyümesini ve üremesini engelleyici yönde aktivite gösterdiği bulunmuştur (33, 34).

2-Salisilhidrazonbenzotiazol Schiff bazı Germanyum metali ile 2:1 oranında birleşerek oluşturduğu kompleksin antifungal ve antibakteriyel özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu ligandların ve metal komplekslerinin Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*), Gram negatif (*Escherichia coli*) bakterilerine ve *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulense*, *Candida albicans* türü mantarlarına karşı etkili olduğu belirlenmiştir (35).

Kanser tedavileri arasında kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemleri bulunmaktadır. Kemoterapi ilaçlarla yapılan tedavi şekli olup, cerrahi operasyon öncesi, sonrası ya da malignite gerçekleşmiş hastalarda uygulanan bir yöntem olduğundan kanser tedavisi için büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle birçok bilim insanı için kemoterapi önemli bir araştırma alanıdır (36).

Kemoterapide kullanılan ilaçların etkinliği sınırlayan birçok etmen vardır. Bunların başında ilaç direnci, toksisite, tümör ilaç etkileşmesi ile ilgili faktörler, ilaç farmakokinetiği ve farmakolojisi ile ilgili faktörler ve hasta ile ilgili faktörler yer almaktadır (37).

Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılacak ve yan etkileri en aza indirilmiş olan yeni ajan arayışları devam etmektedir. C=N bağıyla karakterize edilen ve aminotiyoller, aminofenoller,  $\alpha$ -aminoasitler, aminoalkollere asetil aseton veya salisilaldehit katılmasından türetilen Schiff bazları son zamanlarda bir çok antikanser araştırmada incelenmekte ve sitotoksik etkilerin olduğu görülmektedir. Özellikle metal kompleksli Schiff bazların etkinliğinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (38).

Yeni sentezlenen hidrokسيسemikarbezid Schiff bazlarının melenoma, over kanseri ve lösemi tedavisinde kullanılan hidrosilüre antikanser ilacından daha etkili olduğu ve kemotarasit ajan olarak ümit vaat ettiği bildirilmiştir (39).

Schiff bazı türevlerinin DNA ve RNA sentezini durdurucu etkilerinin olduğu ve bu etkilerini ribonükleotit redüktaz enzimini inhibe ederek gerçekleştirdikleri görülmüştür (40).

Etanolü ortamda 2-fenil-4-[(3-amino-4-metoksi)fenil]tiyazol hidroklorürün 4-[N,N-bis(2-kloroetil)amino]süstitüe benzaldehitlerle ısıtılması sonucunda elde edilen Schiff bazlarında antitümöral etki tespit edilmiştir (41).

Başka bir çalışmada, bir seri 3-süstitüe-4-[5-(4-metoksi-2-nitrofenil)-2-furfuriliden]amino-5-merkapt-1-2-4-triazoller sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin çeşitli sekonder aminler ve formaldehit ile aminometilasyonu yeni Mannich bazlarını vermiştir. Sentezlenen bileşiklerin yedi kanser türüne (akciğer, kolon, melanom, renal, yumurtalık, CNS ve kan kanseri) karşı aktiviteleri araştırılmıştır. Bazı bileşiklerin düşük düzeyde antikanser aktivitelerinin olduğu saptanmıştır (42).

Shabani ve arkadaşları 2008'de yaptıkları bir çalışmada (43) azot ihtiva eden bazı Schiff bazlarının K562 (insan kronik myeloid lösemi) hücreleri ve Jurkat (insan T lenfosit karsinoma) hücrelerine karşı antitümör aktivite gösterdiği tespit edilmiş ve metal kompleksli Schiff bazları ve CDP (6-(sikloheksilamino)-1, 3-dimetil-5(2-piridil)furo[2,3-d]pirimidin-2, 4(1H,3H)-dion) ligandı kullanımı ile kemoterapi için umut ışığı olabilecek yeni bulgular ortaya çıkarmışlardır.

Guo ve arkadaşları 2010' da yaptıkları bir çalışmada üçlü bakır kompleksli salisilaldehit-amino Schiff bazı bileşiklerinin BGC823 (insan gastrit kanser hücre serisi) hücrelerinin proliferasyonu üzerinde etkili olduğu, apoptozisi uyardığı ve hücre

siklusunda değişikliklere sebep olduğu ortaya konulmuştur. Araştırmacılar çalışmanın çeşitli deney hayvanları üzerinde *in vivo* şartlarda sürdürülmesi gerektiğini bildirmişlerdir (44).

Vanillin semikarbazon' un EAC (ehrlich asit tümör)' lı Swiss albino fareleri (5-7 haftalık) üzerinde dikkate değer antikanser etkilerinin olduğu bildirilmiştir (45).

Bir çalışmada, yeni sentezlenen  $[CuII(5-Cl-pap)(OAc)(H_2O)]_2H_2O$  schiff bazının HeLa hücre serisinde apoptoza yol açtığı ve bölünmeyi S fazında durdurduğu tespit edilmiştir (46).

Yeni sentezlenen pirano tiyazol schiff bazlarının MCF7 (İnsan göğüs kanseri hücre serisi)hattı üzerinde doksorubisinin daha etkili sitotoksik etki gösterdiği ve yeni sentezlenen bu bileşiklerden birçoğunun  $SC_{50}$  değerinin doksorubisinden daha düşük olduğu görülmüştür (47).

Osovole ve arkadaşları, 2012'de bazı metal kompleksli nitrofenol Schiff bazlarının antikanser ve antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır (48). *In vitro* şartlarda gerçekleştirilen bu araştırmada Pd (II) kompleksi'nin MCF-7 hücre serisi üzerinde (insan göğüs adenokarsinoma) güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yapılan diğer bir çalışmada bazı metal kompleksli Schiff bazlarının in vitro ortamda antikanser ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış ve Pd (II) ve Cu (II) komplekslerinin MCF-7 (insan göğüs adenokarsinoma) hücrelerine karşı, Pd (II) kompleksinin de HT-29 (kolon karsinoma) hücrelerine karşı önemli ölçüde etki gösterdiği bildirilmiştir.

Nükleik asitlerle etkileşime girebilen yeni moleküllerin araştırılması ve tasarlanması, kemoterapide DNA' ya bağlanabilen yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi günümüzde araştırmacıların üzerinde çok çalıştığı konulardan biridir. Schiff bazları, önemli antibakteriyel ve kemoterapötik potansiyelleriyle medikal kimyada önemli bir bileşik sınıfını temsil etmektedir. Biyolojik özellikleri dikkate alındığında, hastalıklarla mücadelede yeni ilaçların geliştirilebilmesi için potansiyel ajanlar olmaları nedeniyle Schiff bazları ve komplekslerinin DNA ile etkileşimlerinin araştırılması oldukça önemlidir.



Sonuç olarak, yukarıda bazı özellikleri ve kullanım alanları verilen Schiff bazları ile kompleksleri oldukça ilginç bileşiklerdir. Bunların tamamı dikkate alındığında elde edilecek yeni tür Schiff bazı ve komplekslerinin daha ilginç özelliklere ve kullanım alanlarına sahip olabilecekleri düşüncesi çalışmamızın ana unsurunu oluşturmuştur.

#### **4.1.1.1. Organometalik Bileşikler**

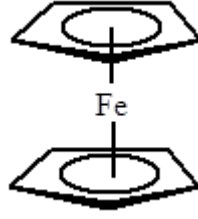
En az bir metal-karbon kovalent bağı içeren bileşiklerin kimyası olarak tanımlanan organometalik kimya, yirminci yüzyılın ikinci yarısında disiplinler arası yeni bir bilim dalı olarak ortaya çıkmış ve yüzyılın sonuna doğru çok hızlı bir gelişme göstermiştir. Organometalik kimya, metal karbon bağı oluşumu ve bu bağı tepkenliğini inceleyen bir disiplindir (49).

Organometalik bileşik, organik molekül veya grubun bir ya da daha fazla karbon atomu ile metal atomu arasındaki bağı etkileşimi (iyonik veya kovalent, lokalize veya lokalize olmayan) ile oluşan bileşik olarak tanımlanır.

Kimya, yaşamın kimyasal temeline ait anlayışımızdaki gelişmelerin sonucu olarak biyoloji tarafından da etkilenmiştir. Bu yüzden, organometalik kimya biyokimya ile bağlantı kurmaya başlamıştır. Biyolojide de yer alan çok sayıda organometalik tür vardır. Uzun yıllardır organometalik kimyanın, biyoloji için gerekli olan suya ve oksijene duyarlı olacağı sanılmıştır. Bundan dolayı organometalik kimya ve biyoloji iki ayrı araştırma alanı olarak değerlendirilmiştir. Ancak, araştırmacılar organometalik kimyanın derinlerine indiklerinde; bu alanın büyük bir kısmının biyoloji ile bağdaştığını farketmeye başlamışlardır. Cis-platin gibi özel inorganik komplekslerin testis kanserine karşı etkili olduğunun keşfedilmesi, ilaç amaçlı metal kompleksler ile ilgili araştırmalarda artışa neden olmuştur (50).

#### **4.1.1.2. Metalosenler ve Ferrosen**

Metalosenler, düzlemsel iki polihapto halkası arasında bir metal içeren organometalik bileşikler içerisinde ilgi alanı oluşturmuştur. Bu bileşikler ‘‘Sandviç bileşikler’’ diye adlandırılır. Polihapto halkalarındaki tamamlayıcı ligandlardan biri siklopentadienildir. Siklopentadienil ligandı ( $C_5H_5$ ) organometalik kimyanın gelişmesinde önemli bir rol oynamıştır ve bugün çok sayıda metal siklopentadienil bileşiği bilinmektedir.



**Şekil 4.** Ferrosen bileşiğinin molekül yapısı

1951 yılında Peter L. Pauson ve Tom Kealy (19), siklopentadieni susuz dietiler içerisinde etilmagnezyum bromür ile etkileştirip, ardından indirgeme ajanı olarak  $\text{FeCl}_2$ 'ü kullanarak fulvalen bileşiğini sentezlemeyi planlamışlardır. Ancak ekstraksiyon işleminden sonra çözücünün buharlaştırılması ile geride turuncu renkli, erime noktası  $174^\circ\text{C}$ , bozunma sıcaklığı  $400^\circ\text{C}$ 'nin üzerinde olan, su kuvvetli asit ve bazlardan etkilenmediğini saptadıkları katı bir madde elde etmişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmalar ile yeni bileşiğin diamagnetik yapıda ve molekül formülünün  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$  olduğunu tespit etmişlerdir.

Pauson ve Kealy'nin keşfettiği  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$  formülüne sahip bileşiğin özelliklerini merak eden Fischer ve Jira isimli (51) iki bilim adamının aklına, atmosferik ve kimyasal koşullarda oldukça yüksek kararlılığa sahip olan bu bileşik için, aromatik iki siklopentadienil anyon halkasının sahip olduğu  $6\pi$  elektron çiftinin, merkezdeki demir atomu ile bağ yapabileceği gelmiştir. Elde ettikleri bileşiğin sandviç yapıda bir organometalik bileşik olan ferrosen olduğu tespit edilmiştir (Şekil4) (52).

1951 yılında ferrosenin yapısının aydınlatılması, organometalik kimya alanında inanılmaz bir gelişmenin başlangıcı olmuştur. Wilkinson ve Fischer, metalosenlerin sentez yöntemleri ve yapıları üzerine yaptıkları çalışmalarla 1973 yılında Nobel ödülünü paylaşmışlardır (53).

Ferrosendeki demir atomu (+2) yükseltgenme basamağındadır. Her siklopentadienil halkası da (-1) yüklüdür. Bu, her halkada  $6\pi$  elektronu olduğunu gösterir ve yapıya aromatiklik kazandırır. Her halkadaki  $6\pi$  elektronunu kovalent bağlarla metalle paylaşır ve  $\text{Fe}^{+2}$ 'deki  $6\pi$  d elektronuyla birleşerek 18 elektron kuralına uyan kararlı bir yapı oluşturur (54).

Ferrosenlerin diğer metalosenlerden ayıran en büyük fark güvenli olmasıdır. Birçok memeli hayvan deneklerinde test edilmiş ve herhangi bir toksik etkisine rastlanmamıştır (55, 56).

Ferrosen türevleri, biyoorganometalik kimyanın yükselişiyile birlikte biyolojik aktiviteye sahip moleküllerin yeni kaynağı olarak dikkat çekmektedir. Özellikle meme kanseri hücrelerine karşı etkisi görülen ferrosen süstitue tamoksifen analoglarının (ferrosifenlerin) (57) ve anti-sıtma ajanları olarak (58) bilinen ferrosen-klorokinin türevlerinin sentezi bu alandaki çalışmalarını artırmıştır (19, 32).

Ferrosen içeren metal şelatlarının kansere karşı olan iyileştirici etkisi belirlendiğinden beri bu bileşikler kanser tedavisinde önemli rol oynar. Bununla birlikte halen kanser ilacı olarak kullanılan platin bileşiklerinin antitümör aktivitesiyle ilgili çalışmalar yapıldığından beri bakır kompleksleri de dahil olmak üzere pek çok metal kompleksinin antitümör aktivitesiyle ilgili denemeler yapılmıştır. Özellikle son yıllarda bu konuyla ilgili sistemli çalışmalar artmaktadır.

Ferrosenil birimlerine sahip komplekslerin pek çok örnekleri, kimyanın çok sayıda ve değışik alanlarındaki potansiyel uygulamaları için araştırılmaktadır. Kimyasal sensörlerde, membranlardan katyon taşıyıcısı olarak, moleküler elektronik biliminde, tümör önleyici özelliklere sahip maddeler olarak, dendrite (dallanmış yapı formu) ve polimerik maddelerde, sıvı kristalleri olarak ve asimetric kataliz proseslerinde organik sentezlerde kullanılmaktadır (59). Metal iyonu (Lewis asidi) ve çoklu ferrosen birimlerinin (redoks-aktif merkezleri) oluşturduğu sistemlerde Lewis asit, katalitik aktivasyonunun bileşimi vasıtası ile substrat üzerindeki redoks reaksiyonlarının oluşmasına yardımcı olmak sureti ile redoks katalitik sistemleri olarak görev yapmaktadırlar. Değışik iletkenlik ve manyetik özelliklere sahip çok çeşitli donör-akseptör elektron transfer tuzlarını hazırlamak için, çoklu redoks-aktif merkezlerinin varlığından faydalanılabilir (60).

Çok sayıda kanser önleyici maddenin biyolojik aktivitelerini serbest metabolitler sayesinde gösterdikleri bilinmektedir. Serbest metabolitler, serbest radikal proseslerde tümörlerin biyokimyasında çok önemlidir. Ferrosenyum katyonu,  $Cp_2Fe^+$  ( $Cp = \eta^5$  siklopentadienil), ki bu fark edilebilir ölçüde kararlılığa sahip bir iyon radikal türüdür, diğer nükleofillerin yanısıra serbest radikal öncülleri ve çeşitli biyolojik öneme sahip

elektron vericisi bileşiklerle de kolaylıkla etkileşime girebilmektedir. Bu davranış ferrosenyum iyonunun parçalıyıcı özelliklere sahip olabileceğini göstermiştir ve bazı hidrofilik ferrosenyum tuzlarının *Ehrlich ascites murine* tümörüne karşı neoplastik (patolojik yeni doku oluşumu) olmayan aktivite gösterdiği bulunmuştur (22, 66).

Bununla birlikte vücut içersinde biyolojik aktivite gösteren ve ilaç aktif maddesi olarak görev yapan bazı ferrosenli bileşikler ligand olarak kullanılmakta ve bunların metal kompleksleri sentezlenebilmektedir. Bu şekilde elde edilen bazı komplekslerin ligand yapısına göre daha güçlü biyolojik aktivite gösterdiği göülmüştür. Örneğin sülfa ilaçlarının aktif maddesi olan sülfoksidler önce çeşitli aldehitlerle reaksiyona sokularak Schiff bazları elde edilip, daha sonra elde edilen Schiff bazlarının organokalay (IV) kompleksleri sentezlenmiştir. Sentezlenen komplekslerin biyolojik aktiviteleri çıkış maddeleriyle karşılaştırılmış ve pozitif sonuçlar alınmıştır. Aminoasitlerden elde edilmiş pek çok schiff bazı kalay kompleksi antitümör ve antibakteriyal aktivite göstermiştir (62).

#### **4.1.1.3. Ferrosenin Medisinal Uygulamaları**

Organometalik kimya ve biyokimya son yirmi yıldır biyoorganometalik kimya adı ile disiplinler arası ara disiplin olarak ortaya çıkmıştır. Bu yeni araştırma alanı; yeni organometalik bileşikleri sentez etmek, kanser ve sıtma gibi hastalıklara karşı biyolojik ve medikal etkileri araştırmak üzere ayrılmıştır (51).

Cis-platin, karboplatin gibi farklı platin tüevleri klinik olarak kanser tedavisinde kullanılmaktadır (63, 64). Cis-platin bu sınıfın öne çıkan üyesidir (65). Bu ilaç, yüksek toksisitesine ve dar spektrumuna rağmen, halen testis ve over kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır.

Medikal alandaki mevcut araştırmalar, birçok kanser türüne karşı daha az yan etki gösteren, yeni bileşikler sentezlemeyi hedeflemektedir. Metolosenlerin çok çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında ferrosen; nötral, stabil olduğu ve toksik olmadığı için çok dikkat çekici bir moleküldür. Birçok ferrosen bileşiği sitotoksik (21), antitümör (66), antimalarial (25), antifungal (24) ve DNA kesim aktivitesi (26) ie beraber sitotoksik aktivite göstermektedir.

Dyson ve çalışma grubu; organometalik bileşiklerin etkili farmakolojik uygulamaları konusuna odaklanmıştır (67).

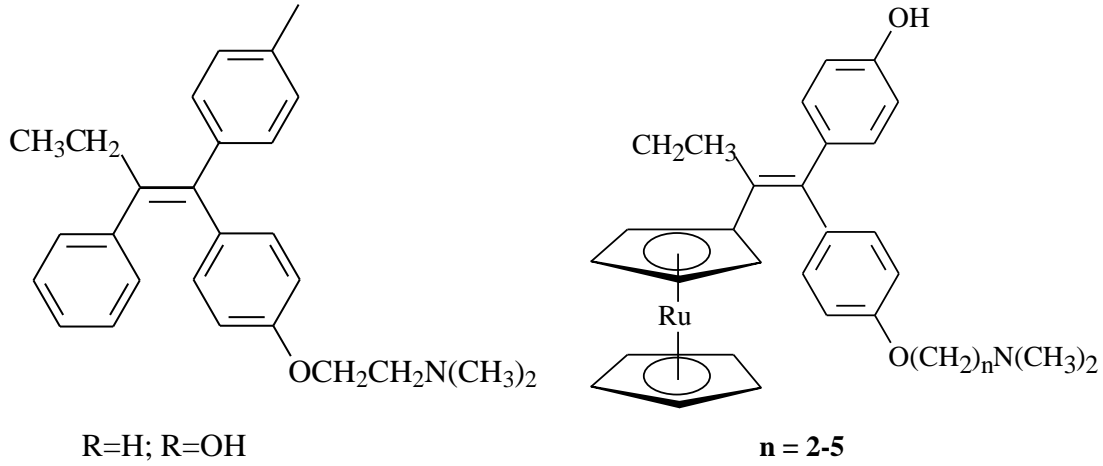
Neuse; ferrosen içeren platin kompleksleri ve makro moleküllerinin kanser üzerine araştırmalarını yapmıştır (61, 68). Metzler-Nolte (69), Fish ve çalışma grubu (70) ferrosenin biyoorganometalik kimyasına yönelik incelemelerde bulunmuştur. Bu nedenle ferrosenin medisinai uygulamaları aktif bir araştırma alanıdır.

Kanser, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ve diğer dokulara saldırması olarak karakterize edilen bir hastalık sınıfıdır. Kanser tedavisinin başlıca silahı kemoterapidir. Kemoterapi antikanser ilaçlarla kanser hücrelerini imha etmektedir. Son onbeş yılda kanser tedavisindeki devrim organometalik kimya ile harekete geçmiştir. Birçok ferrosen türevleri antitümoral ilaç olarak iyi sonuçlar göstermekte ve halen klinikte kullanılmaktadır (72).

Meme kanseri, kadınlar arasındaki en yaygın kanser türüdür. Bu hastalığın tedavisinde kullanılan başlıca ilaçlar tamoksifen ve hidroksitamoksifendir. Tamoksifenin uzun dönem kanser tedavisinde istenmeyen yan etkiler, akciğerde artan kan pıhtılaşma riski ve hormon-bağımlı olmayan tümörlere karşı etkili olmaması nedeni ile kullanımı sınırlıdır (73).

Jaouen ve çalışma grubu, tamoksifen ve hidroksitamoksifeni baz alarak bir çok ferrosenil türevleri hazırlamışlardır (Şekil 5). Bu ferrosenil türevlerinin *in vitro* ve *in vivo* biyolojik aktiviteleri incelenmiş ve umut edici sonuçlar rapor edilmiştir (74). Birçok hidroksil süstitüe ferrosenil türevinin meme kanseri hücrelerinin iki kanser hücre hattına karşı etkileri çalışılmıştır. Ferrosifenler iki hücre hattına da antiproliferatif etki göstermiştir. Bu çalışmaların sonuçları, ferrosifenlerin, hem hormon bağımlı hem hormon bağımsız meme kanseri hücrelerine karşı etki gösteren ilk moleküller olduğunu ortaya koymuştur. Tamoksifen iskeletine ferrosenil birimi eklemek tamoksifen ve hidroksi tamoksifenin sitotoksik etkisini azaltmak gibi birçok avantaj sağlamıştır (75). Ayrıca ferrosenin antitümör etkisi ferrosenyum iyonlarının metabolik düzenlemesi ile ilgili olduğu rapor edilmiştir.

Ruthenosifen ve bazı türevlerinin antitümoral etkileri mevcuttur (71, 76, 77). Bunun nedeninin ferrosen ve ruthenosifenin benzer yapısal ve redoks özellikleri olduğu düşünülmektedir (Şekil 5).



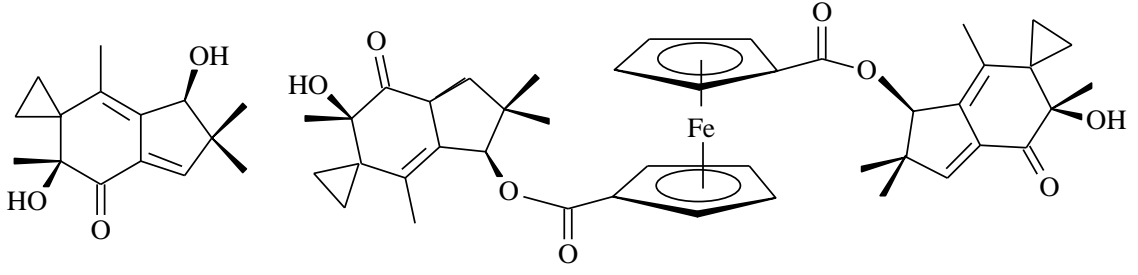
**Şekil 5.** Tamoksifen (R=H), Hidroksitamoksifen (R=OH); Ruthenosifen türevi

Stilbenler, flavonoidler proantosiyandinler ve bunların türevleri gibi polifenolik bileşikler, radikallere potansiyel antioksidan özellikleri nedeni ile önemli bir çalışma alanına sahip olan fitokimyasallardır (78).

Jaouen ve çalışma grubu ferrosen birimi içeren polifenolik bileşikler sentezlemiş ve bu bileşikleri standart kanser meme hücre hattında antikanser ajan olarak test etmiştir. Sonuçlar difenolik bileşiğin hem hormon bağımlı hem hormon bağımsız meme kanser hücreleri üzerine güçlü antiproliferatif etkisini göstermiştir (79).

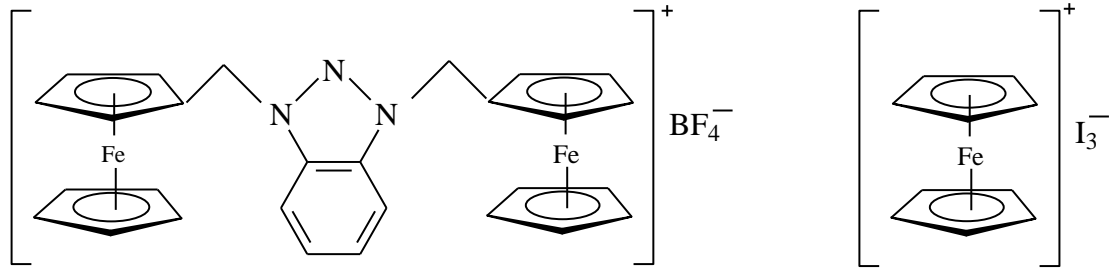
İlludin M seskiterpen sınıfı bir bileşik olup bazı mantar türleri tarafından üretilir (Şekil 6). Doğal formu ile hayvanlar için zehirli bir bileşiktir. Antimikrobiyal olarak kullanılır. İlludin çeşitli tümörlere karşı çok etkili olmasına karşı, aşırı toksisitesi medikal uygulamalarını kısıtlamaktadır (80). Bazı yarı sentetik illudin türevlerinin prostat, over, pankreas, böbrek, göğüs ve akciğer kanserlerinde faz II klinik denemelerinde düşük toksisite gösterdiği rapor edilmiştir (81).

Schobert ve çalışma grubu tarafından illudin molekülünün terapötik indeksini genişletmek niyeti ile bu molekülün esterleri sentezlenmiştir. Bu yeni molekülün maling olmayan fibroblast hücre serisine daha seçici, daha az toksik ve etkili olduğu belirlenmiştir (82).



**Şekil 6.** İlludin M; İlludin M-ferrosenil türevi

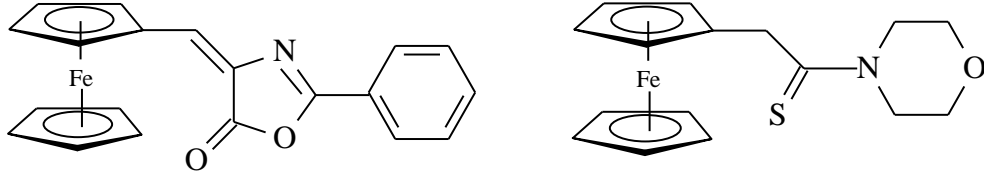
Suda çözünen ferrosenil türevlerinin antikanser ajan olarak aktivite göstermesi oldukça ilgi çekicidir (83). Bazı sonuçlar suda çözünen bu bileşiklerin antikanser ajan olarak suda çözünmeyene göre daha etkili olduğunu ortaya koymuştur (66). Bu farklılığın bileşiklerin farklı çözünebilirlik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çözünürlüğün aktivite üzerindeki etkileri konusunda önemli bir noktaya değinen Koepf-Maier bu alanda öncülük etmiştir. 1980 yılında, çok çeşitli biyolojik aktivite gösteren ferrosen türevleri sentezlemiştir (84). Bu bileşikler, Dyson ve grubu tarafından incelenmiştir (67). Bu çok önemli bileşiklerden bazıları ferrosenyum tetraflorborat tuzu ve ferrosenyum tri-iyodürdür (Şekil 7).



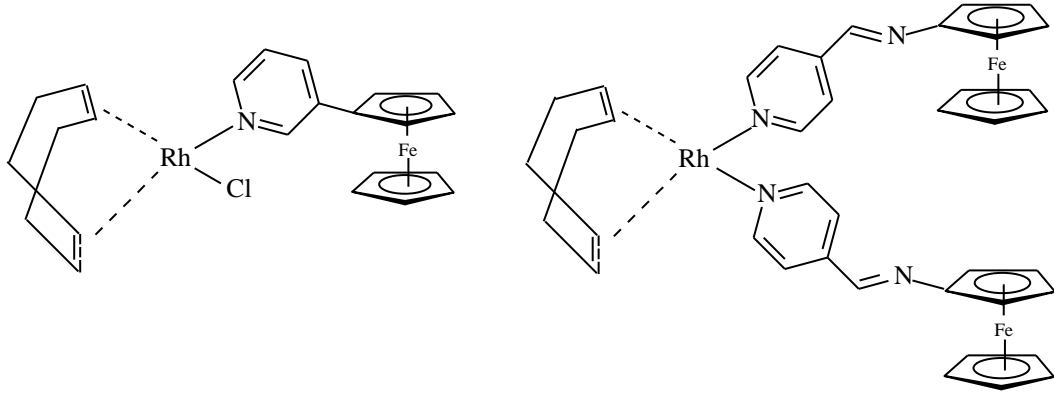
**Şekil 7.** Ferrosenyum tetraflorborat; Ferrosenyum tri-iyodür

Neuse ve çalışma grubu (85-87) araştırmalarında, polimer biyomedikal tanımlamalara uygun olarak, poliaspartamit'e kovalent bağlı biyoaktif ferrosen birimi içeren ferrosen konjugeleri sentezlemeye odaklanmıştır. Bu konjugelerin, karşılaştırmalı olarak Colo (insan kolon kanser hücre hattı) ve HeLa (serviks hücre hattı) serileri üzerinde antiproliferatif etkileri test edilmiştir. Sonuç olarak konjugeler, her iki hücre hattı serileri üzerinde de yüksek etki göstermiştir.

Topoizomerazlar, topoizomeraz I ve topoizomeraz II olarak sınıflandırılmış, DNA'nın topolojisini korumakla sorumlu olan enzimlerdir. Birçok antitümör ilaçların aktivitesinin mekanizması inhibisyon etkili veya zehir etkili topoizomerazlar ile ilişkilidir (88, 89). Bu nedenle antitümör aktivitenin başarısı için, topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonu önemli bir hedef haline gelmiştir (90). Kondapi ve çalışma grubu bu amaçla, azalakton ferrosen ve tiyo-morfolidaminometil ferrosen bileşiklerini sentezlemişlerdir (Şekil 8) (91). Bu bileşikler, Topoizomeraz II inhibisyon mekanizması ile birçok kanser hücre serisine özellikle de Colo 205 kolon adenokarsinomasına karşı antiproliferatif etkisi göstermiştir.



**Şekil 8.** Azalakton ferrosen ve tiyo-morfolidaminometil ferrosen

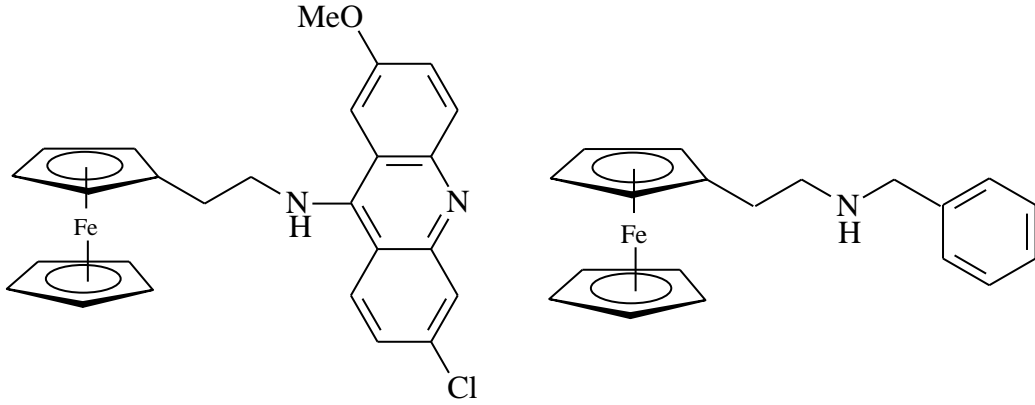


**Şekil 9.** Radium-ferrosen kompleksleri

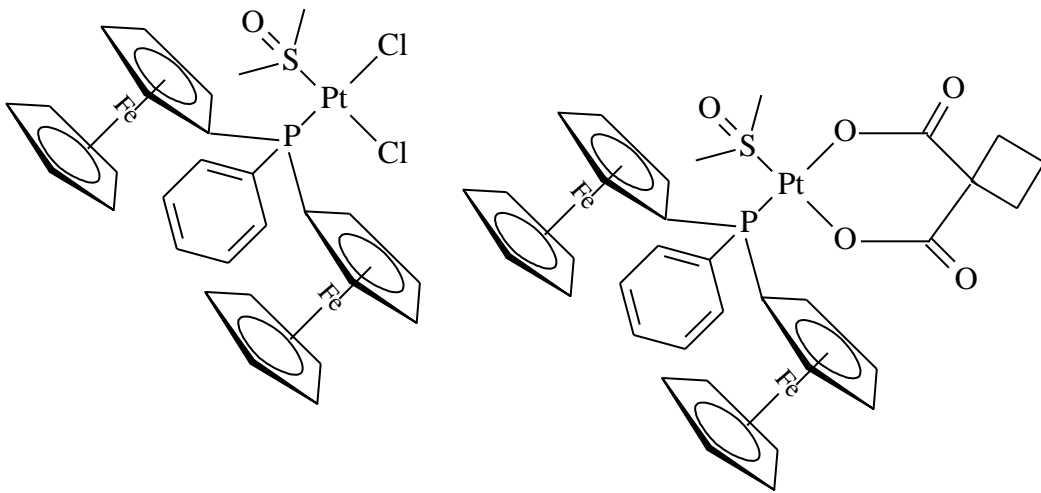
Rajput ve çalışma grubu tarafından, piridin ligandları içeren ferrosenil bileşikleri ve bunların platin, paladyum, radyum ve iridyum içeren kompleksleri hazırlanmıştır. Yeni komplekslerin Cis-platin ile karşılaştırmalı olarak sitotoksik aktiviteleri test edilmiştir. Birçok kompleksin dikkate değer sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Özellikle radyum bileşiklerinin (Şekil 9) kanser hücrelerinde Cis-platin'e benzer yüksek inhibisyon etkisi gözlenmiştir (64). DNA interkalatörleri ile ferrosen kombinasyonları hazırlamak, programlanmış hücre ölümü ve DNA hasarı oluşturma olasılığını arttırmak için umut verici bir stratejidir.



Ong ve çalışma grubu bu amaçla, karşılaştırmalı olarak analiz etmek için akridin (DNA interkalatörü) grubu bağlı ferrosen ve benzil grubu bağlı ferrosen bileşikleri (Şekil 10) sentezlemiştir (92). Yapılan *in vivo* çalışmalar akridin içeren bileşiğin dört kanser hücre hattında etkili olduğunu, akridin içermeyen bileşiğin ise aktif olmadığını göstermiştir. Sonuçlar, ferrosen ile DNA interkalatörlerinin oluşturduğu kombinasyonların, ferrosenin sitotoksik etkisini arttırdığını düşünen hipotez ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Antikanser ajan olarak kullanılan Cis-platin (33) molekülünün başarısı platin ve diğer geçiş metal elementlerine odaklanarak, daha az yan etki gösteren sitotoksik moleküllerin arayışını tetiklemiştir (93). Diğer geçiş metalleri ile ferrosenil grubu içeren kombinasyonların araştırılması 1980'li yıllarda başlamıştır (61) ve günümüzde de halen araştırmacıların ilgisini çekmektedir.



Şekil 10. Akridin bağlı ferrosen ve benzil grubu bağlı ferrosen bileşikleri



Şekil 11. Platin-ferrosen kompleksleri

Rosenberg'in platinin antitümoral etkisini keşettikten sonraki süreçte birçok amino-platin kompleksi hazırlanmıştır ve değerlendirilmiştir (62). Bunların arasında bulunan ferrosenil grup içeren kompleksler de incelenmiştir (94). Al-Allaf ve çalışma grubu, ferrosen Pt (II) kompleksleri (Şekil 11) sentezlemiş, bu moleküllerin lösemi kanser hücreleri üzerinde *in vivo* deneyler neticesinde antikanser aktivite gösterdiğini sonucuna ulaşmıştır. Kompleksler 5-florourasil ve Cis-platin'e yakın SC<sub>50</sub> değerleri göstermiştir (95).

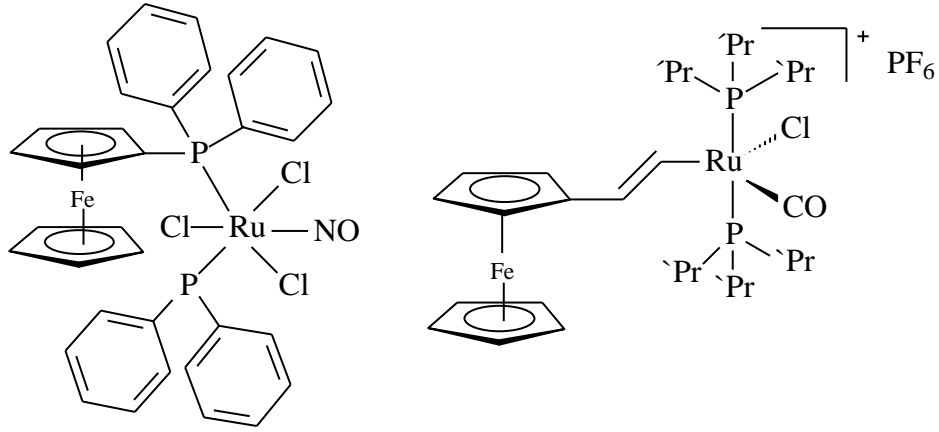
Spencer ve çalışma grubu tarafından yapılan çalışmalarda, paladyum içeren ferrosen kompleksleri sentezlenmiş ve *in vivo* çalışmalarında diğer analoglarına göre bu kompleksler yüksek sitotoksik etki göstermiştir (96).

Ferrosenil bileşiklerinin antikanser özelliklerini artırmak için altın ve difenilfosfin türevlerinin ferrosen ile kombinasyonları sentezlenmiş, fakat bu bileşiklerin yapılan *in vivo* çalışmalarda Cis-platin'e göre daha az sitotoksik etki göstermiştir (97).

Raubenheimer ve çalışma grubu tarafından başarılı bir şekilde kombine edilen ferrosen birimi içeren altın karben bileşikleri serviks epiteloid karsinoma, kolon adenokarsinoma ve Kronik Myeloid Lösemi hücre serilerine karşı test edilmiştir. Komplekslerin üç hücre serisine karşı Cis-platinden daha düşük dozlarda çok daha fazla etkin olduğu belirlenmiştir (98).

Ruthenyum kompleksleri; oksidasyon basamak aralıkları, ulaşılabilir fizyolojik durumu, düşük toksisite nedeniyle ile platin analoglarına alternatif olarak çalışılmıştır (99).

Von Poelhsitz ve çalışma grubu ferrosen içeren nitrosil ruthenyum kompleksleri kombine etmiş (Şekil 12) ve bunları meme kanseri hücre serileri üzerinde test etmiştir. Deneyler bu kombinasyonun cis-platinden altı kat daha sitotoksik olduğunu göstermiştir (100).



**Şekil 12.** Ruthenyum-ferrosen kompleksi ve ruthenyum bağlı nitrojen-ferrosen ligandı

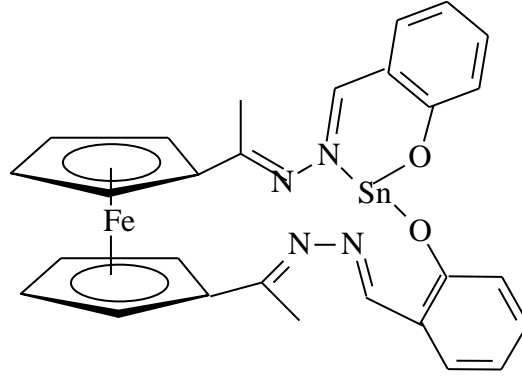
Dyson ve çalışma grubu, nitrojen-ferrosen ligandları içeren aromatik hidrokarbon-ruthenyum kompleksleri dizayn etmişlerdir (Şekil 12). Bu kompleksler over karsinoma hücreleri üzerinde test edilmiş fakat bütün kompleksler cis-platinden daha düşük antikanser aktivite sergilemiştir (101).

Ott ve çalışma grubu bu kompleksler için ruthenyumu etilen bağlayıcı ile ferrosen molekülüne bağlayıp dizayn ettiklerinde, kolon ve meme kanser hücre serileri üzerinde, Cis-platine yakın antikanser aktivite tespit etmişlerdir. Dyson ve Ott'un çalışmaları karşılaştırıldığında; monometalik ruthenyum kompleksleri ve ferrosen türevlerinin artırılmış elektron delokalizasyonun artan biyoaktivite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (102).

Kraatz ve çalışma grubu, kobalt nikel ve demir kompleksleri ile pirazol ligandlarını modifiye ederek oluşturulan redoks-aktif ferrosen komplekslerinin potansiyel antikanser özelliklerini test etmiştir. Bu kompleks ve ligandların insan meme adenokarsinoması üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sonuçlar metal bağlı komplekslerin ligandlardan çok daha aktif olduğunu göstermiştir (103).

Abd-Elzaher ve çalışma grubu, salisilik asit birimi içeren ferrosen ligandları ve bunların kobalt, bakır, nikel, kalay komplekslerini sentezlemiş (Şekil 13) ve bunları insan meme kanseri hücre serileri üzerinde test etmiştir. Bu hücre serisinin tedavisinde kompleks dozunun artırılmasına bağlı olarak, kontrol grubu ile kıyaslandığında süperoksiddismutaz ve hidrojenperoksit seviyesi önemli ölçüde artmış iken, katalaz ve glutasyon peroksidaz seviyesi önemli ölçüde düşmüştür. Sonuç olarak incelenen metal

komplekslerinin önemli ölçüde antikanser etkisinin olduğu, bunların içinde kalay kompleksinin cis-platin ile karşılaştırılabilir derecede oldukça etkili antikanser aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. Bu antitümör etkiye azalan intrasellüler katalaz, glutasyon peroksidaz ve artan hidrojen peroksit yapımının neden olabileceği düşünülmektedir (104).



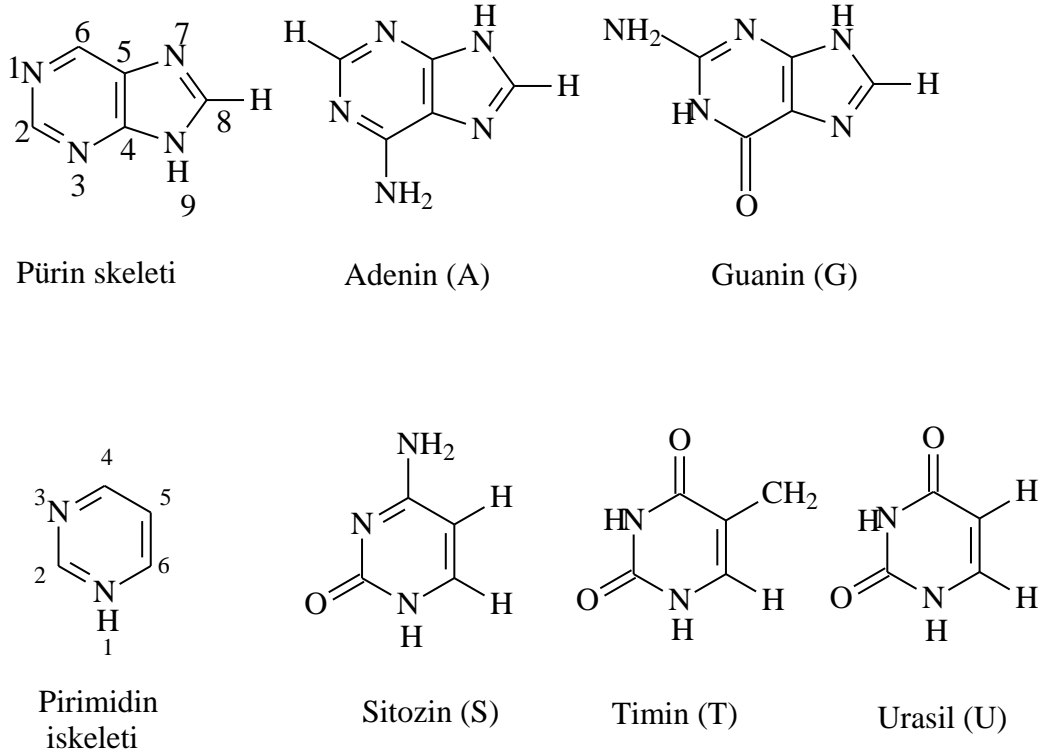
**Şekil 13.** Kalay-ferrosen kompleksi

Ferrosen türevlerinin birçok kanser türüne sitotoksik etkili olduğu yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile rapor edilmiştir. Bu sonuçlar ferrosen esas alınarak tasarlanan yeni türevleri araştırmak konusunda araştırmacılara ilham vermektedir.

## 4.2. Nükleik Asitler

### 4.2.1. Nükleik Asitlerin Yapı Elemanları ve Özellikleri

Nükleik asitler ilk defa Fried Miescher tarafından 19. yüzyılın ikinci yarısında izole edilmiş ve çalışılmışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarla beraber purin ve pirimidin adı verilen organik molekülleri de içerdiği belirlenmiştir. Ancak nükleik asitlerin gerçek biyolojik önemi 20. yüzyılın ortalarına doğru anlaşılmıştır. Bu bileşenleri ile birlikte nükleik asitler nükleotid olarak adlandırılan monomerlerin birer polimeri olarak değerlendirilebilirler. Nükleotidlerden oluşturulan ve nükleik asit olarak bilinen polinükleotidler, fizyolojik pH değerlerinde fosfat grubu üzerindeki zayıf asidik gruplar iyonlaşmış olduğundan, bir polianyon karakteri taşırlar (105).



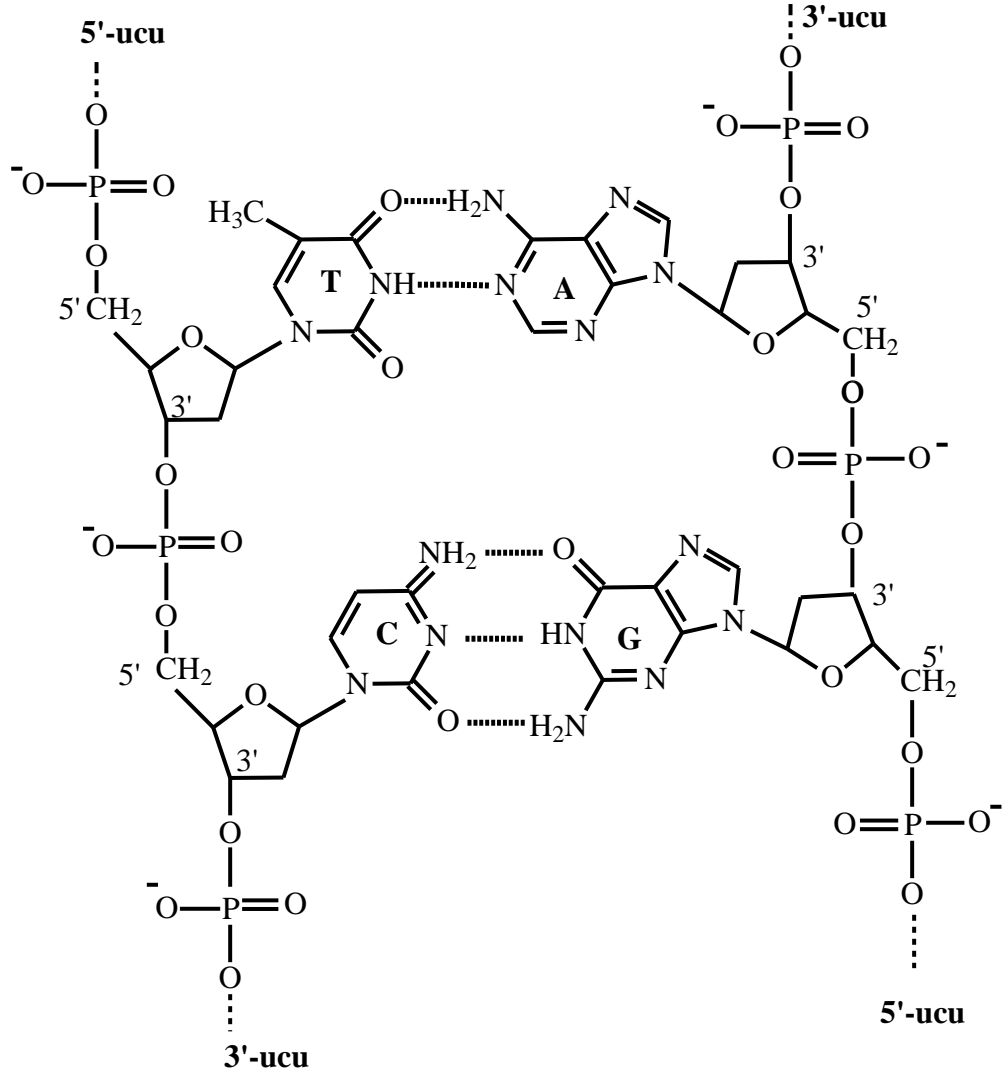
**Şekil 14.** Pürin ve pirimidin yapısı

Bir nükleotid molekülü, bir pürin veya bir pirimidin gibi azot içeren bir baz ile birlikte bir şeker ve bir veya birden fazla fosfat grubu içeren maddelerdir. Azot içeren purinler adenin (A) ve guanin (G) şeklinde bilinir, pirimidinler ise sitozin (C), timin (T) ve urasil (U)'dir (Şekil 14). DNA molekülü adenin ile guanin purinlerini ve timin ile sitozin pirimidinlerini içerir. Nükleotidler D-riboz ve D-2-deoksiriboz adı verilen iki tür şekerden oluşur. DNA, deoksiriboz moleküllerinden oluşturulur ve D-2-deoksiriboz molekülünün 2 numaralı karbon atomunda ribozun aynı konumunda bulunan hidroksil grubu yerine bir hidrojen atomu mevcuttur (105).

#### 4.2.1.1. DNA ve Yapıları

DNA molekülünün yapısı ilk defa 1950'li yıllarda Watson ve Crick adlı araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. Bu yapıya göre, bir DNA molekülünde temel iskeleti şeker-fosfat birimleri oluşturur ve bu moleküller birbirlerine fosfodiester bağları ile bağlıdır. DNA zincirlerinde şeker-fosfat iskeletinin sadece yapı görevi vardır ve herhangi bir genetik bilgi içermez. DNA zincirindeki bazlar ise genetik bilginin

depolanmasından sorumludur. Bazların sırası ise nükleik asidin birincil (primer) yapısı olarak adlandırılır (105).



**Şekil 15.** DNA molekül yapısı

Bütün yapılan çalışmalar sonucu DNA molekülünün bir sarmal olacağı sonucuna varılmış ve purinlerin pirimidinlerle eşleştiği dikkate alınarak bu sarmalın muhtemel yapısı önerilmiştir. Bu yapıda DNA molekülü bir çift sarmal halinde iki oldukça uzun deoksiribonükleotit zincirinden oluşmaktadır (Şekil 15). Bu iki zincirin fosfat–deoksiriboz iskeleti hidrofilik olduğundan sulu ortam ile etkileşecek şekilde çift sarmalın dışında yer alır.

Birbirleri ile hidrojen bağları ile eşleşmiş purin/pirimidin bazıları ise sarmalın iç kısmında, sarmalın uzun eksenine dik bir düzlem üzerinde ve her bir eşleşmiş baz çifti

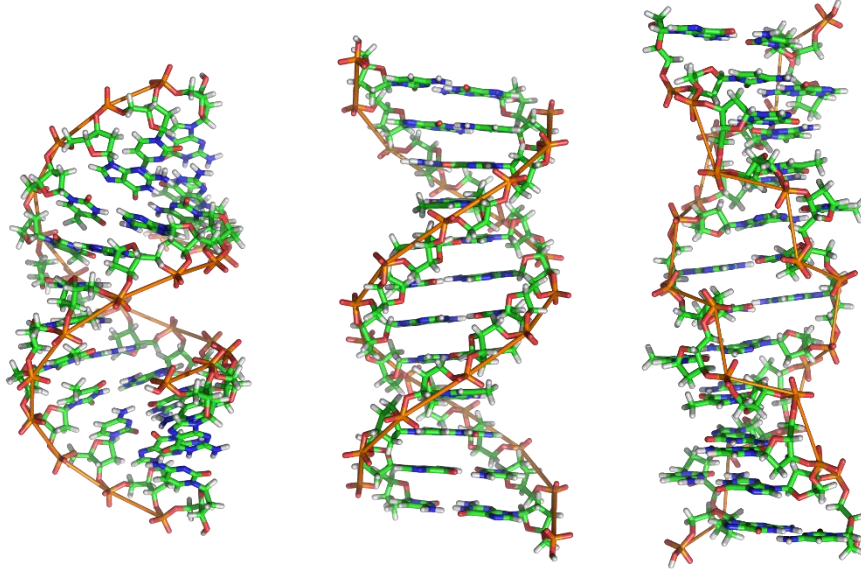
birbiri üzerine istiflenmiş gibi yer alır. Böyle bir istiflenme ise eşleşmiş bazların kuvvetli van der Waals etkileşimleri yapmalarını sağlar. Ayrıca, sarmalda yer alan iki zincir birbirine göre antiparalel olarak yönelmişlerdir. Böyle bir konumda her iki zincir çok sayıda purin/pirimidin bazları arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Bütün bu gözlemler ayrıca, lifler halindeki DNA moleküllerinin düzenli bir 3-boyutlu yapıya sahip olması gerektiğini göstermiştir. Polinükleotitlerdeki baz dizisinin oluşturduğu birincil yapı ile belirlenmiş bu düzenli katlanmalar ikincil yapı olarak tanımlanır ve bu ikincil yapı bir sarmal olarak ortaya çıkar.

#### 4.2.1.2. DNA'nın Farklı Sarmal Formları

DNA oldukça esnek bir molekül olup, şeker fosfat omurgası içindeki çok sayıda bağ etrafında dönüşler yapması mümkündür. Sıcaklık dalgalanmaları yapıda baz eşleşmesinin önemli derecede bozulmasına, bükülme ve gerilmelere sebep olabilir. Hücresel DNA'da Watson-Crick DNA yapısından önemli sapmalar görülebilir ve bunlardan bazıları DNA metabolizmasında önemli görevlerde rol oynayabilir. Bu yapısal değişiklikler genellikle Watson-Crick tarafından tanımlanan (iplik komplementerliği, antiparalel iplikler ve A=T ile G≡C baz eşleşmesi gibi) DNA'nın önemli kilit özelliklerini etkilemektedir (106).

İki zincirli polinükleotid sarmallarının üç farklı konformasyona sahip olabileceği gözlenmiş ve DNA çift sarmalı için bu konformasyonlar; A-DNA, B-DNA ve Z-DNA olarak adlandırılmıştır (Şekil 16). Bu konformasyonlar değişik geometrik özellikleri ile farklılıklar gösterirler ve her üç konformasyondaki sarmalın yüzeyleri de farklıdır. B sarmalında iki farklı oluk (yiv) bulunur ki bunlar büyük oluk ve küçük oluk şeklinde tanımlanırlar. A sarmalında ise bu oluklar derinlik açısından birbirine oldukça benzer. B-DNA formu DNA'nın fizyolojik koşullar altında en kararlı halde bulunduğu formdur. Bu nedenle, DNA özelliklerinin çalışılması esnasında bu form standart başlangıç noktası olarak kabul edilir. A formu sudan yoksun çözeltilerde, sağ-el durumundaki çift sarmal yapısında düzenlenmiştir (107). Su ortamında B-DNA formu daha baskın olup su molekülleri, bu küçük oluklara yerleşerek hidrojen bağları ile B formunun daha kararlı olmasını sağlar. Su molekülleri uzaklaştırıldığında ise A-formu daha baskın olur. Belirli bir molekülde A formu, B formuna göre daha kısa ve daha geniş çaplıdır. A formunda geniş oluk, daha derin olması ve fosfat gruplarının uçta asılı olması sebebiyle

daha az ulaşılabilir. Sonuç olarak bireysel bazlar bu olukta daha derine gömülüdür. Ancak dar oluk tam belli değildir (108).



**Şekil 16.** DNA'nın farklı sarmal formları: A-DNA, B-DNA, Z-DNA

Bu konformasyonlardan farklı olarak Z-DNA sarmalında deoksiriboz halkalarına göre bazların oryantasyonunda farklılıklar vardır. A-DNA ve B-DNA'da bazlar deoksiriboz halkasına göre anti-oryantasyonunda iken Z-DNA'da pirimidinler daima anti- ve purinler ise syn- konumuna sahiptir. Z form birbirini sıra ile izleyen purin ve pirimidin dizilimlerine sahip polimerlerde meydana gelir. Örneğin, bu tipte DNA formu meydana getiren iki sarmal incelendiğinde GC ve AC ikili tekrarlarının bulunduğu gösterilmiştir. Z-DNA in vitro koşullarda, Z-DNA çift sarmalının daha ince olan yapısı içinde sıkışan nükleotitler arasındaki artan elektrostatik itmeye karşı koymak için yüksek tuz konsantrasyonunun kullanıldığı alışılmamış koşullarda keşfedilmiştir. Z-DNA'nın in vivo koşullardaki varlığı hakkında bilgiler sınırlıdır. Z-form diğer formlar ile karşılaştırıldığında daha ince yapıdadır ve sol el durumunda çift sarmala sahiptir (Tablo 1) (106).

#### 4.2.1.3. Halkasal ve Süper Kıvrımlı DNA

Hüresel DNA hücre içinde yerleşmek için çok sıkı olarak yoğun bir yapı içinde olmalıdır. Bu yoğun yapılanma, fazla miktarda yapısal bir organizasyonu ifade



etmektedir. Ancak, DNA'nın küçük bir alan içine yerleşebilmesi için sadece katlanması yeterli değildir (107).

**Tablo 1.** DNA'nın farklı sarmal formlarına ait özellikler

Sarmal Tipi	Dönüş Başına Baz Çifti	Baz Çifti Başına	Dönüş Sarmal Çapı
A	11	+34,7°	23 A°
B	10	+34,0°	19 A°
Z	12	-30,0°	18 A°

+ sağ el durumundaki sarmalı, - sol el durumundaki sarmalı belirtmektedir.

Bu paketlenme işlemi, replikasyon ve transkripsiyon gibi olayların gerçekleşmesi için DNA'da bulunan bilginin ulaşılmasına da olanak sağlamalıdır. DNA çift zincirinin uzayda kendi ekseninde dönmesi veya eğilmesi DNA'nın süper kıvrım özelliği olarak tanımlanır. Bunun tersine, eğer DNA'nın ekseninde eğilmesi söz konusu değilse istirahat halindedir. DNA yoğunlaşmasının bazı süper kıvrımlı formları içerdiği muhtemeldir. Muhtemelen replikasyona veya transkripsiyona uğrayan DNA da süper kıvrılmayı teşvik etmektedir. Hücresel DNA'nın süper kıvrım oluşturmasının olağanlığı, çoğu halkasal DNA molekülünün, protein ve diğer hücresel bileşenlerden ayrı olarak saflaştırılsalar bile, oldukça süper kıvrımlı durumda kalması ile açıklanabilir. Süper kıvrım, DNA'nın üçüncül yapısının önemli ve esas olan yönünü oluşturup, hücresel DNA'da hali hazırda bulunmakla birlikte her hücre tarafından fazla miktarda düzenlenmektedir.

## 4.2.2. Nükleik Asitlerin Spektroskopik ve Termal Özellikleri

### 4.2.2.1. UV Absorpsiyonu

Nükleik asitler, UV ışığını bazlarının konjuge aromatik tabiatlarına bağlı olarak soğurmaktadır; şeker-fosfat omurgası bu soğurmaya önemli bir katkı sağlamaz. DNA'nın ışığın maksimum absorpsiyon olduğu dalga boyu 260 nm'dir ( $\lambda_{\max}=260$  nm). Nükleik asitlerin absorpsiyon özellikleri teşhiste, miktar tayininde ve saflığın değerlendirilmesinde kullanılabilir.

DNA bazlarının  $\lambda_{\max}$ 'ı sabit olsa da, bazlarının ekstinsiyon katsayısı ( $\mathcal{E}$ =absorpsiyon katsayısı) ortama bağlıdır. 260 nm'deki ( $A_{260}$ ) absorpsiyon, izole edilmiş

nükleotitler için en büyük, tek iplikli DNA (ssDNA) için orta, çift iplikli DNA (dsDNA) için ise en küçüktür. Bu etki hidrofobik bir çevrede bazların yığılması ile fikse edilmesinden kaynaklanmaktadır. Absorbansı bu değişikliği için kullanılan klasik terim hipokromisitedir, yani dsDNA, ssDNA'ya göre hipokromiktir. Alternatif olarak ssDNA, dsDNA ile karşılaştırıldığında hiperkromiktir denilebilir (108).

#### **4.2.2.2. DNA Saflığı**

Tek iplikli DNA preparasyonlarının yaklaşık saflığı 260 ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile ( $A_{260}/A_{280}$ ) belirlemek mümkündür. Absorbsiyon spektrumunun şekli aynı zamanda ekstinsiyon katsayısı, bazların doğası ile değişiklik arz eder. Şöyle ki, saf dsDNA için  $A_{260}/A_{280}=1,8$  dir. DNA örneğinde bu değer 1,8'den büyük ise, RNA kontaminasyonunu ve 1,8 den küçük ise protein kontaminasyonunu işaret eder (108).

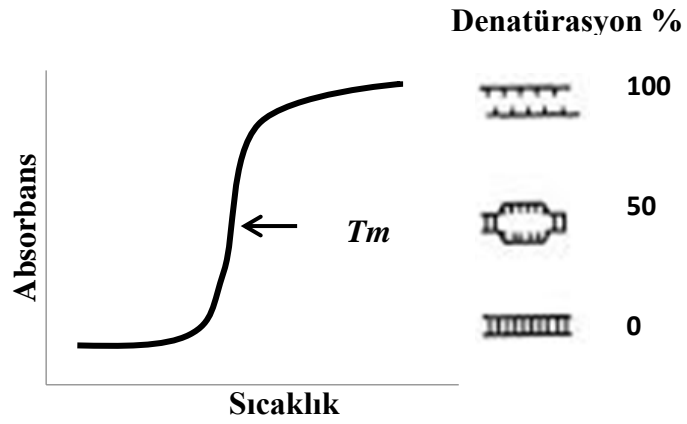
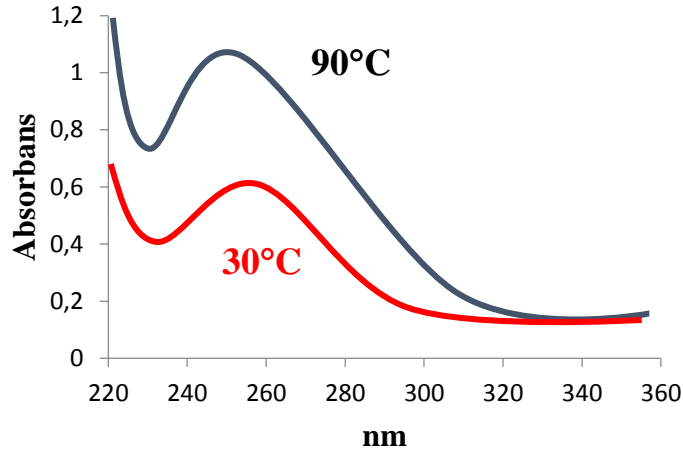
#### **4.2.2.3. Termal Denatürasyon**

Birçok kimyasal madde nükleik asitleri denatürasyon durumuna getirebilir. Isıtma da DNA'nın hidrojen bağlarının bulunduğu ikili sarmal yapının bozulmasına neden olur. Denatürasyon işlemi çift iplikli yapının tek iplikli yapıya dönüşümündeki absorbans artışı ile rahatlıkla görülebilir (Şekil 17). Bir DNA çözeltisinin ısıtılması esnasında değişen sıcaklıklarda DNA'nın 260 nm dalga boyunda absorbe ettiği ultraviyole ışık ölçülürse şekil 17'de gösterilen erime eğrisi elde edilir. Erime eğrisinin bazı özellikleri tespit edilmiştir. Bunlar;

i. 260 nm dalga boyundaki absorbans, doğada canlı hücrelerin karşı karşıya kaldığı sıcaklığın çok üstündeki sıcaklıklara kadar değişmemektedir. Bu şekilde normal fizyolojik koşullarda bulunan canlı sistemlerde DNA oldukça kararlı durumda bulunmaktadır.

ii. 260 nm'deki absorbans artışı 6-8 °C arasındaki dar bir aralıkta meydana gelmektedir.

iii. 260 nm'deki maksimum absorbans, başlangıç değerinden yaklaşık %37 oranında fazladır



**Şekil 17.** DNA'nın denaturasyonu

Şekil 17'de ayrıca erime eğrisinin farklı bölgelerinde DNA molekülünün durumu gösterilmektedir. Artış başlamadan önce, molekül tümü ile çift sarmaldır. Artış bölgesinde, molekülün çeşitli kısımlarındaki baz çiftleri ayrılmaktadır. Ayrılan baz çifti sayısı, sıcaklık artışı ile artmaktadır. Erime geçişini tanımlamak için kullanılan uygun bir parametre, 260 nm'deki absorbans artışının yarısının tamamlandığı sıcaklıktır. Bu sıcaklık, erime sıcaklığı ( $T_m$ ) olarak adlandırılmaktadır.  $T_m$ , sarmalın kararlılığı konusunda önemli bir ölçüm parametresi sağlar. Çünkü,  $T_m$  Guanin-Sitozin (G, C) baz çifti oranına bağlıdır. DNA molekülü ne kadar çok GC baz çiftine sahipse iki ipliğin ayrılması için gereken enerji de o denli fazla olmaktadır.  $T_m$ , GC içeriğinin her %1'lik artışında yaklaşık olarak  $0,4^\circ\text{C}$  artmaktadır. Fizyolojik koşullar altında çözeltilerde bulunan DNA'da  $T_m$  değeri genellikle  $85-95^\circ\text{C}$  arasındadır (106).

### 4.2.3. DNA ile Küçük Moleküllerin Etkileşimi

Genetik bilginin taşıyıcısı olan DNA, hücre büyümesi ve bölünmesinde ana basamak olan DNA replikasyonu ve transkripsiyonuna engel olabilmeye yeteneklerinden dolayı ilaç etkileşimlerinin ana hedefidir (109).

Bazı kanser, viral ve paraziter hastalıklara karşı kemoterapinin ve ilaç geliştirmenin en önemli yollarından biri de nükleik asitlerle geri dönüşümlü olarak etkileşen maddeler bulmayı gerektirir (110). Çeşitli düşük moleküler ağırlıklı maddelerin DNA ile olan etkileşimleri hücresel döngüde doğal olarak uygun mekanizmalardır ve bu yüzden tıbbi tedavide de kullanılırlar (111).

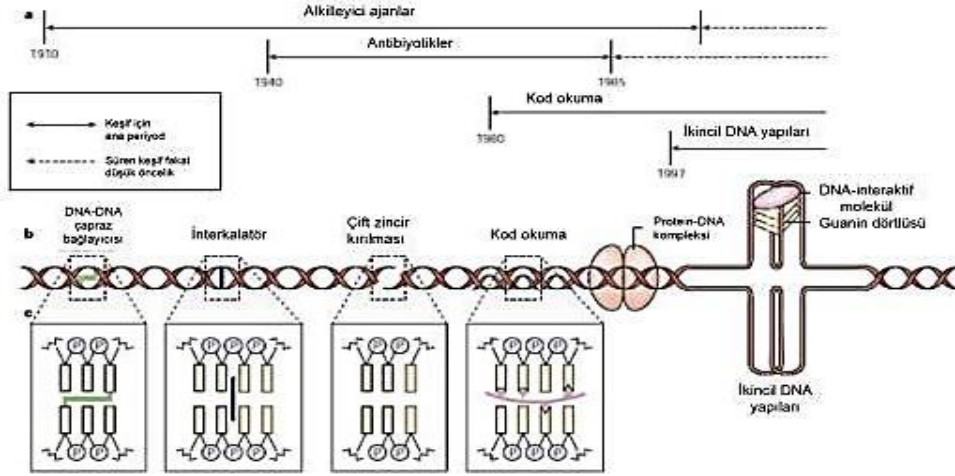
Nükleik asitlerle etkileşebilen adrinamisin gibi doğal ve amsakrin gibi yapay antibiyotikler, neoplastik hastalık türlerinin klinik tedavisinde büyük ölçüde kullanılmıştır.

Sentetik oligopeptitler ve nükleotitler, yüksek sıra özgünlüğüne sahip potansiyel nükleazlar ve nükleik asit tanıyan ilaçlar gibi yeni olanaklar sunar. Nükleik asitlerle küçük moleküllerin arasındaki ilişki, nükleik asit bağlanma özgünlüğü, ligand indüklü konformasyonel değişimler, bağlanmadaki kooperativitenin moleküler temelleri, aminoasit yan zincirlerinin nükleik asitlerle olan etkileşimleri ve diğer nükleik asit etkileşimlerinin ve kimyasının kritik özellikleri hakkında bilgi sağlamıştır (110).

Moleküller ve iyonlar, çift zincirli DNA ile birbirinden oldukça farklı başlıca 3 yolla etkileşirler (109)

- i. Genel olarak non–spesifik ve esasen elektrostatik etkileşimler aracılığı ile sarmalın dış yüzeyi boyunca bağlanma.
- ii. Nükleik asitlerin oluklarının herhangi birinde baz çiftlerinin köşeleri ile bağlanan molekülün spesifik oluğa bağlanma etkileşimleri.
- iii. Baz çiftleri ile düzlemsel veya yaklaşık olarak düzlemsel aromatik halka sistemleri arasındaki interkalasyon etkileşimleri.

Hem molekülün hem de DNA'nın yapısal özelliklerine bağlı olarak pek çok molekül DNA ile birden fazla türde etkileşim gösterir. Çeşitli bağlanma şekilleri olmasına rağmen DNA boşluklarında esas olarak interkalasyon ve spesifik bağlanma etkileşimleri olmak üzere iki çeşit bağlanma türü vardır (116). DNA ile etkileşim yapan çeşitli ajanlar ve bu ajanların DNA ile ne tür etkileşim yaptıkları şekil 18'de gösterilmektedir (131).



**Şekil 18.** DNA-İnteraktif ajanlarının türleri ve onların DNA ile moleküler etkileşimleri  
a) DNA-İnteraktif ajanlarının şu ana kadarki keşif ve gelişmeleri için bir zaman çizelgesi b) DNA üzerinde oluşabilen modifikasyonlar c) DNA modifikasyonunun farklı türlerinin ayrıntılı modelleri

#### 4.2.3.1. Dış Elektrostatik Etkileşimler

Nükleik asitler, her fosfatta bir negatif yükün bulunduğu yüksek derecede yüklü polielektrolitlerdir. Bu nedenle hücre içi ortamda iyonlarla özellikle de katyonlarla kuvvetlice etkileşebilirler (110). Her ne kadar metal iyonlarının DNA'ya bağlanması uzun yıllardır araştırma konusu olmuşsa da bağlanma mekanizması hala bilinmemektedir. Pozitif yüklü metal iyonları yüksek elektron yoğunluğu veya DNA'nın negatif yüklü kalıntıları olarak karakterize edilmiş bölgeleri ile doğrudan ya da dolaylı olarak etkileşirler. Her iki zincirin omurgasının fosfatları ve bazların N ve O gibi elektron verici atomları gibi bölgeler negatif yükü yüklenmiş olabilir. Baskın metal bağlanma modu guaninin N7 ve O6 ve adeninin N7 ve N1 ve de pirimidinlerin N3 atomları üzerinden gerçekleşir. Metal iyonları ya kısmi dehidratize ya da tamamen hidratize olmuş olarak DNA'ya sıkıca bağlanabilirler ve bu bağlanma doğrudan ya da dolaylı olabilir. Metal iyonları vücutta ya bağlı ya da serbest halde bulunurlar (112).

Geçiş metalleri kısmi olarak dolu d-orbitallerine sahiptir. Böylece serbest radikal oluşturabilirler. Geçiş metalleri ikiden daha fazla bölgeyle DNA ile etkileşebilirler ve bu etkileşimler çok karmaşıktır. Geçiş metalleri, su moleküllerini kolaylıkla verebilir ve iç küre koordine kompleksler oluşturabilir. Geçiş metalleri genellikle bazlarla doğrudan etkileşirken fosfat gruplarına dolaylı olarak bağlanır. Geçiş metallerinin çoğu, pürin bazlarının N7 ile veya pirimidin bazlarının N3 atomu ile kimyasal olarak reaksiyona girerler ve çift sarmalı bozarlar. Geçiş metallerinin G-C bölgelerine bağlanmaları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı oksidasyonun sebep olduğu radikal oluşumu üzerinden DNA'da hasara sebep olur (112).

Su molekülleri de nükleik asitlerin dış yüzeyi boyunca bağlanır. Su moleküllerinin yüklü fosfat grupları ile spesifik etkileşimleri kadar, bazlardaki polar gruplarla ve şekerlerle spesifik etkileşimleri de nükleik asit konformasyonlarının kararlılığı için gereklidir. Nükleik asidin spesifik bir bölgesine bir ligandın güçlüce bağlanması ile suyun saliverilmesi, bağlanma serbest enerjisine hem uygun hem de uygun olmayan katkılarda bulunur. Bu katkıların bağıl büyüklüğü, saliverilen su moleküllerinin sayısına ve kompleks oluşumu boyunca kırılan etkileşimlerin türüne bağlıdır.

#### **4.2.3.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimleri**

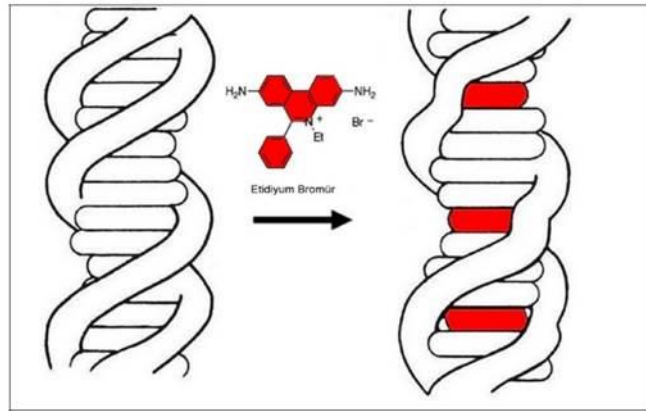
Oluğa bağlanma etkileşimleri, nükleik asitlerin büyük veya küçük oluklarının birinde yer alan baz çiftlerinin oluğa bakan yüzeydeki fonksiyonel grupları ile diğer moleküllerin doğrudan etkileşimi şeklinde gerçekleşir (110). Oluğa bağlanma hayli güçlü bir bağlanma çeşididir ve bu bağlanma, bir molekül, DNA'nın oluklarının birine uygun büyüklük ve şekilde ise gerçekleşir (113). Oluğa bağlanma, interkalasyonun aksine DNA'da büyük konformasyonel değişimlere yol açmaz ve ligand-makromoleküler bağlanma için standart kilit-anahtar modeline benzer bir model göz önünde tutulabilir. Oluğa bağlanan moleküller genellikle DNA'nın küçük oluğuna bağlanan hilal şeklindeki moleküllerdir. Molekül içi etkileşimlerle tipik olarak kararlı kılımlar (114). Belirgin bir biçimde, küçük oluğa bağlanan moleküller dönebilme özelliğine sahip bağlarla bağlanmış pirol, furan veya benzen gibi çeşitli aromatik halkalara sahiptirler. Bu durum uygun bir bükülme ile bileşiklerin, suyun oluktan çıkarılmasının ardından küçük oluğun kavisine girebilmesini sağlar. DNA'nın küçük oluğu genel olarak Adenin-Timin (A-T) zengin bölgelerinde, G-C bölgelerine nazaran

daha dardır. Oluğa bağlanan moleküllerin interkalatörlerde olmayan bir yeteneği, bu moleküllerin oluk boyunca baz çiftlerine uyabilmek için genişlediği ve nükleik asitleri çok yüksek derecede sıra spesifik tanıyabilme özelliğine sahip olduğudur (110).

#### 4.2.3.3. İnterkalasyon Etkileşimleri ve DNA Kesme

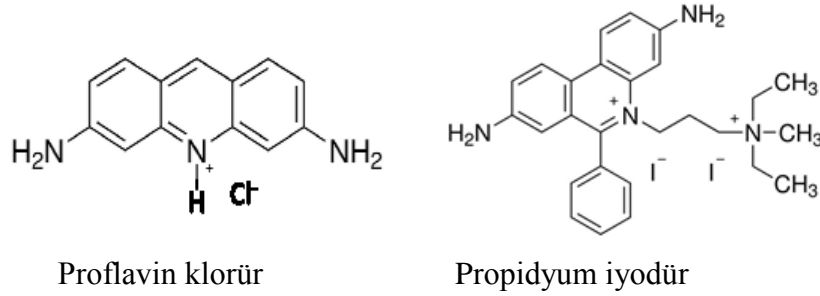
1960'ların başlarında Lerman, düzlemsel aromatik katyonlarla DNA'nın etkileşimleri üzerine bir takım çalışmalara rehberlik etti ve kendisinin "interkalasyon" olarak adlandırdığı bir süreçle düzlemsel aromatik moleküllerin DNA'ya dik bir şekilde (Şekil 19) girerek kovalent bağlar oluşturmaksızın bağlanabileceğini açıkladı (109, 115). İnterkalasyon sürecinde, aromatik bileşiği bazlar arası boşluğa uydurmak için şeker-fosfat bağlarına ait bükülme açılarında değişiklikler meydana gelir. DNA omurgasındaki bükülme, bağların rotasyonunun bir sonucu olarak interkalasyon bölgesinin oluşumu, interkalasyon bölgesindeki helikal dönmenin azalması ve çift sarmalın uzaması ile baz çiftlerinin ayrılmasına neden olur (109).

Klasik interkalatörler, yan zincirlerinde ve/veya halka sistemlerinin kendisinde pozitif yükü yüklenmiş yapışık halkalı aromatik moleküllerdir. Tipik örnekleri proflavin klorür (Şekil 20) içeren akridinylum tuzları ve fenantridinylum tuzları, etidyum bromür ve propidyum iyodürdür. İnterkalasyonun, baz çiftlerinin hidrojen bağlarına engel olmaksızın gerçekleştiği bilinir. DNA, interkalatörlerle doyurulduğu zaman, heliks üzerindeki her bir ikinci interkalasyon bölgesi boş kalır. "En yakın komşuyu hariç tutma" prensibi, çift zincir DNA ile diterkaliniyum kompleksinin interkalasyonu örnek verilerek Şekil 21'de gösterilmiştir (116).

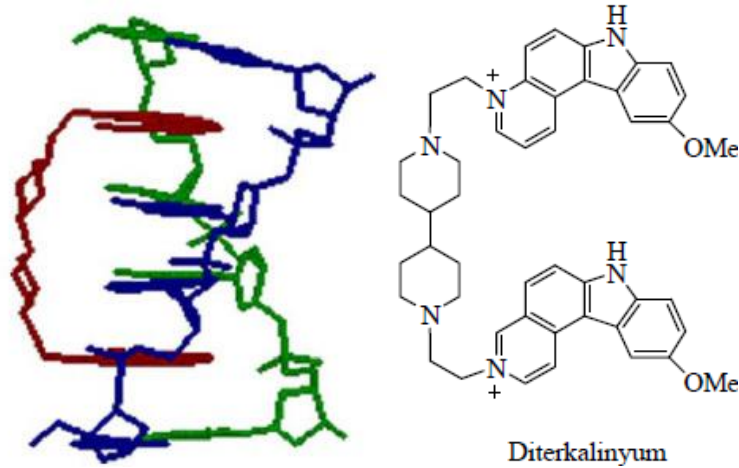


Şekil 19. Etidyum bromürün interkalasyonu

Proflavin klorür ve propidyum iyodürün interkalasyonu küçük olukta gerçekleşirken, diterkalinyum kompleksinin interkalasyonu büyük olukta gerçekleşir. (İnterkalasyonun meydana gelmesi için, baz çiftleri arasına giren düzlemsel ligand için bir kavite oluşturmak üzere DNA baz çifti 3.4 Å ayrılır. B-form DNA'nın normal bir dönüşü 36°'dir (10 baz çiftinde 1 tam dönüş sağlar, 360°'nin bir dönüşüne 10 baz çifti). Ligandı oluğa sığdırmak için bu dönemde bir azalma meydana gelir (116).



**Şekil 20.** İnterkalasyon yapan ajanlar

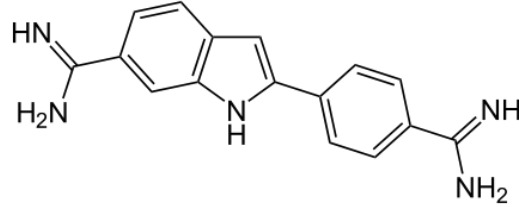


**Şekil 21.** Diterkalinyum kompleksinin yapısı ve interkalasyonun gösterilmesi

İnterkalasyon yapan kompleksler için bilinen yapısal verilerin zenginliğine rağmen interkalasyon güçlerinin orijini tam olarak anlayamamıştır. İnterkalasyonda genel olarak, hidrofobik bir molekülün –interkalatörün–, içinde bulunduğu hidrofilik ortamdan, baz çiftlerinin hidrofobik çevresine –interkalatörün– çekilmesi sonucu gerçekleştiği göz önünde tutulmaktadır. Aromatik interkalatör, bir katyon olduğunda kompleks kararlılığında bir artış gözlenir (116). Klasik olmayan interkalasyonda interkalatörler, belirgin bir biçimde protonlanmış N atomları içeren veya halka sistemine bağlı protonlanmış yan zincirlere sahip olan bitişik poliaromatik sistemlerdir.



DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) bileşiği bu sınıf bir örnektir (Şekil 22). DAPI'nın bağlanma şeklinin DNA sıra bağımlı olduğu bulunmuştur. DAPI, küçük oluk bölgesinde üç ya da daha fazla ardışık AT baz çiftlerine çok kuvvetlice bağlanır. Bununla birlikte daha az ardışık AT baz çifti varsa veya özellikle saf GC bölgeleri mevcutsa bu defa, DAPI interkalasyon yolu ile DNA'ya bağlanır (116).



**Şekil 22.** DAPI'nın kimyasal yapısı

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

Biyoteknoloji ve ilaç sanayinde yapay kimyasal nükleazların geliştirilmesi son derece önemlidir. Seçici DNA kesme nükleazların dizayn edilmesi kemoteropik ajanların ve antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesine öncülük edecektir (133, 134). Bunun yanı sıra yapay nükleazlar biyologlar için DNA manipülasyonu için önemli ve yeni araçlar sunacaktır. Bu amaçla geçiş metal kompleksleri yapısal zenginliği ve reaktivitesi nedeniyle son yıllarda dikkat çekici bir rol almaktadır. Örneğin 1,10-fenantrolinin bir bakır kompleksi DNA-protein etkileşimlerinin detaylı bir şekilde çalışılması için gerekli olan DNA-parmak izi deneyleri için kullanılmaktadır (132). Geçiş metal kompleksleri çok çeşitli yapısal özellikleri ve kontrol edilebilir redoks potansiyelleri nedeniyle yapay nükleaz uygulamaları için çok uygundur. Ayrıca ligandlar metalloproteinlerdeki aktif gruplara benzer şekilde biyolojik gruplar ve metal iyonları olacak şekilde tasarlanabilir. DNA kesmenin etkinliği, metal komplekslerini DNA'ya ilgisini arttırarak genişletilebilir. Bu iş için uygun olan koordinasyon

bileşiklerinin DNA'ya bağlanabilen bir gruba sahip olması gerekir. Böylelikle metal kompleksin DNA'ya odaklanma yeteneği artırılabilir (117).

DNA kesme mekanizması oksidatif ya da hidrolitik olabilir. Oksidatif kesme şeker veya nükleobazlarda meydana gelir. Buna karşılık hidrolitik kesme DNA'nın fosfodiester bağından meydana gelir.  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]_2^-$  veya  $[\text{Cu}(\text{Phen})\text{CHL}_2]$  gibi redoks aktif metal kompleksleri ile tekli veya çift sarmal oksidatif DNA kesmesi hidroksil radikali veya singlet oksijen türleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla başlar ve Fenton tipi mekanizma ile yürür. Bu serbest radikallerin şeker hidrojenlerini ayırarak DNA kesmesini başlatır ve DNA kesme ürünleri oluşur. Gerçekte DNA şekerinden çıkarılan hidrojenin yeri kullanılan aktif metallonükleaza bağlıdır. Bu tip metallonükleazlar, DNA'nın seçici olarak tanınması ve DNA parmak izi ajanları gibi uygulamalarda kullanılabilir (118).

DNA'nın omurgası biyolojik sistemlerde sık rastlanan bir kimyasal bağ olan fosfodiester zincirleriyle oluşmuştur. Bu yüzden DNA'nın hidrolizi çok önemli bir enzimatik reaksiyondur. Ancak DNA'nın hidrolize olan olağanüstü kararlılığı nedeniyle bu reaksiyon oldukça zordur. Fosfodiester bağlarını hidroliz eden enzimler çoğunlukla aktif bölgelerinden  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Fe}^{+2}$  gibi katalitik metal iyonlarını içerirler. Bu yüzden metal kompleksleri fosfodiester bağının kesilmesi için çok uygun bir araçtır (119).

Çift sarmallı (double stranded) DNA'nın fosfodiester bağının hidrolizi ile yürüyen hidrolitik kesmesi, deoksiriboz şeker kısmından veya guanin bazından meydana gelen oksidatif DNA kesmesi ile karşılaştırıldığında hücre açısından çok daha fazla avantajlıdır. Oksidatif kesme singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), süperoksit ( $\text{O}^{-2}$ ) veya hidroksil radikali ( $\text{HO}\cdot$ ) gibi aktif türler meydana getirir. Bu türler şeker ve/veya baza zarar vererek parçalanmış türler oluşmasına neden olurlar. Buna karşılık başka maddeler ilave edilmediği zaman meydana gelen hidrolitik kesmenin bu tip olumsuz yan etkileri yoktur. Çünkü kesme ürünleri enzimatik prosesle bertaraf edilebilir.

DNA'nın kovalent modifikasyon mekanizmaları iki kategoride sınıflandırılır:

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

Elektrofiller, DNA yapısındaki farklı nükleofilik kısımlarla etkileşebilir. Kimyasal yapılarına bağlı olarak DNA'nın belli nükleofilik kısımlarına seçicilik gösterirler. DNA da guaninin N7, N3 ve ekzosiklik N2 amino grubu ile adeninin N7 ve N3 kısımları doğal ürünlerle en çok modifikasyona uğrayan kısımlardır (120, 121). Pürin kalıntılarının N7 ya da N3 pozisyonundan elektrofilik modifikasyonu glikozidik bağın zayıflamasıyla sonuçlanır. Bunun sonucunda abazik bölge oluşur ve nötral şartlarda bu bölgeler hidrolizlenerek DNA kesimi gerçekleşir (122, 123). DNA bazlarındaki ekzosiklik azot ve karbonil oksijenleri ya da DNA omurgasındaki fosfat oksijenleri ile elektrofilik türlerin reaksiyonu genellikle kararlı ürünler oluşturur Bazı radikal türleri DNA ile değişik pozisyonlarda etkileşirler. DNA'nın radikaller tarafından hasara uğratılmasında en önemli yol deoksiribozdan hidrojen atomu kopartılmasıdır (124). Deoksiriboz şekerinden hidrojen atomu koparılması şeker fosfat omurgasının kırılmasına sebep olur (125). Şeker fosfat omurgasına etkimeye ek olarak bazı radikaller de DNA bazları ile etkileşirler (126). Bu reaksiyonlar şeker fosfat omurgasının kırılmasına sebep olmazlar fakat DNA yapısındaki modifikasyonlar biyolojik olarak önemlidirler. Spesifik bir bağlanma olmadığı zaman DNA kesimi genelde küçük dizilerle ya da baz özgünlüğüyle meydana gelir (127). Bunun aksine alkilleyici ajanlarla DNA kesimi bir veya daha fazla DNA bazı için selektivite gösterir. Ayrıca, çift zincirli DNA matriksi içine nükleobazlar dahil edildiğinde metal iyonlarına karşı affinite değiştirilmiş olur.  $Hg^{2+}$ 'nin AT' nin zengin bölgelerini tercih ederken birçok iki değerlikli  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Pt^{2+}$  gibi metal iyonlarının G-C'nin zengin bölgelerini tercih ettiği görülmektedir. (128, 129). Daha ayrıntılı bir şekilde açıklanırsa baz kalıntılarına bağlanan metal sıra bağımlıdır, yani, belirli bir dizideki tüm guaninler aynı tip bir metal iyonuna karşı aynı affiniteyi göstermezler (129, 130). Bunun bir sonucu olarak DNA'nın belirli bir dizisine seçici olarak bağlanabilen metal kompleks tasarımı öngörülmektedir.

### **4.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres**

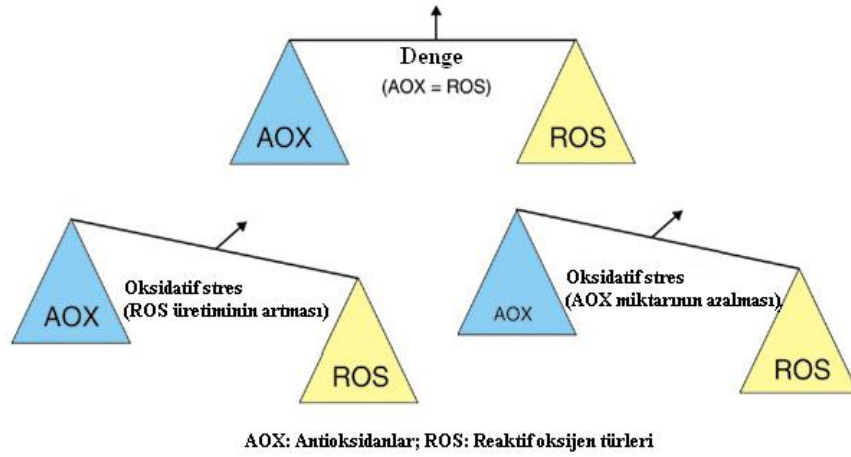
Bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olan oksijen; hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapı taşlarını oluşturur. Ancak aerobik canlıların tüm hücrelerinde gerçekleşen metabolik reaksiyonlar için gerekli olan oksijen, aynı zamanda çok tehlikeli formlar olan serbest radikallere dönüşmektedir (135).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşmaktadır. Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Eşleşmemiş elektron bulunması kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Hücrenin tüm bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir (136, 137).

Vücutta birçok reaksiyonda rol oynayan moleküler oksijen, insanın da yer aldığı aerobik organizmalar için önemli bir moleküldür ve yaşam için mutlak gereklidir (138). Vücut sürekli bir şekilde enerji üretim işlemlerinin bir parçası olarak oksijenle reaksiyona girer. Bu kimyasal reaksiyonlar moleküllerin oksidasyonunu ve indirgenmesini içerir. Reaksiyonun sonucunda üretilen serbest radikallerin, organizmada var olan ve/veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenememesi durumunda oluşan '*oksidatif stres*', DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olan radikalik zincir reaksiyonlarını başlatır.

Bunun sonucunda başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklara yol açar. Serbest radikallerin giderilmesi dokuların hasarını önlemek için önemlidir (136, 139).

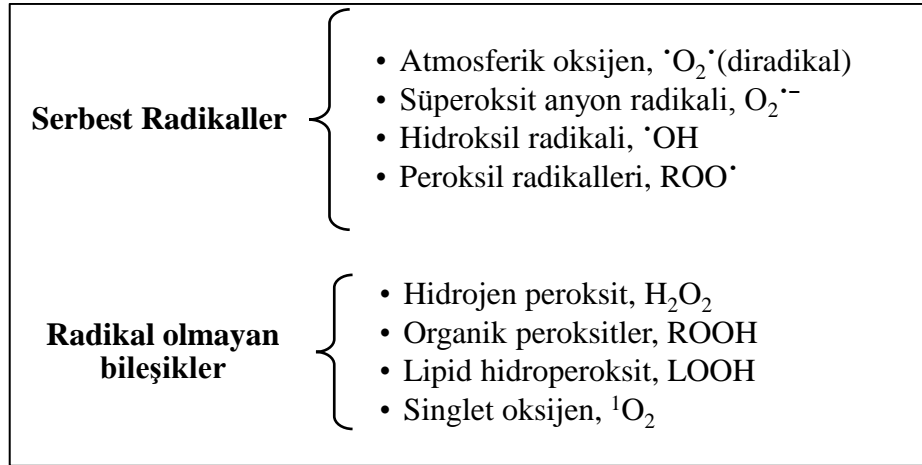
Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur. Hücrede normal şartlar altında prooksidan ve antioksidanlar dengede bulunmaktadır. Ancak bu denge reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması veya antioksidan miktarındaki azalma nedeniyle prooksidanlar yönüne kaymaktadır (140) (Şekil 23).



Şekil 23. ROS miktarı ile antioksidan sistemler arasındaki denge

#### 4.3.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

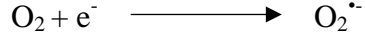
Birçok radikal türü olmasına rağmen biyolojik sistemlerde en çok görülen oksijenden oluşan ve genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan radikallerdir. Oksijenden üretilen radikaller canlı sistemlerde meydana gelen radikallerin en önemli sınıfını temsil ederler. ROS tanımına giren reaktif türleri Şekil 24’de gösterilmiştir (140).



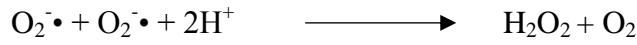
Şekil 24. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) sınıflandırılması

Oksijen kaynaklı radikaller normal aerobik yaşamın bir parçası olarak devamlı üretilmektedirler. Reaktif oksijen türleri mitokondride oksijenin elektron taşıma zinciri boyunca indirgenmesi veya çeşitli enzimatik reaksiyonlar ile oluşmaktadır. Nispeten radikalik bir tür olmasına rağmen moleküler oksijenin ( $\text{O}_2$ ) ardışık olarak

indirgenmesiyle reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bir  $e^-$  kazanarak *süperoksit* ( $O_2^{\bullet-}$ ) radikaline, 2  $e^-$  alarak *hidrojen peroksit* ( $H_2O_2$ ), 3  $e^-$  alarak *hidroksil* ( $OH^{\bullet}$ ) radikaline dönüşür (141-143).



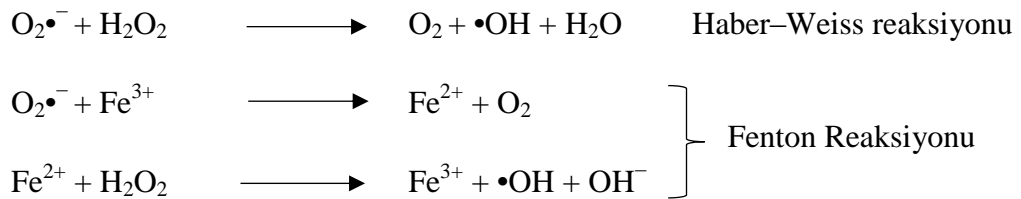
Oluşan süperoksit anyonu "birincil" ROS olarak kabul edilir ve "ikincil" ROS oluşturmak için diğer moleküller ile etkileşime girebilir (143). Süperoksitlerin hidrojen peroksit'e çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından gerçekleştirilir.



SOD enzimleri biyolojik sistemlerde bu reaksiyonu hızlandırır. SOD tarafından katalizlenen bu tepkime *dismutasyon tepkimesi* olarak adlandırılır. SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperoksitde özgü tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksit radikali, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınına neden olabilir. Demir (III)'ün demir (II)'ye indirgenmesi Fenton reaksiyonunu hızlandırmaktadır (143, 145).

$H_2O_2$  zayıf bir oksidan ve geçiş metali iyonları yokluğunda nispeten kararlı olan zayıf bir indirgen maddedir (146). Hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir; fakat ROS olarak kabul edilir. Yüksek konsantrasyonlarda güçlü oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına yol açarak zararlı etki gösterebilir.  $H_2O_2$  serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir ve çok kolay bozular. Özellikle geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ) üretilir (147).

Hidroksil radikali kaynağı büyük olasılıkla Haber-Weiss reaksiyonudur.  $O_2^{\bullet-}$  radikali hücrede  $Fe^{3+}$  ü  $Fe^{2+}$ 'ye indirger. Bu şekilde  $Fe^{2+}$  ve hidrojen peroksit arasında Fenton reaksiyonunu başlatır (148).



Canlı sistemlerde ROS'un hem yararlı hem de zararlı etkileri vardır. ROS'un yararlı etkileri düşük ve orta konsantrasyonlarda meydana gelir. Örneğin; enfeksiyonlu maddelere karşı savunma etkisi görülür (144). ROS ayrıca enerji üretimi, fagositoz, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve hücre içi sinyalizasyonda olumlu bir rol oynar. Diğer taraftan ROS proteinler, DNA ve lipidler gibi temel biyomoleküllere zarar verme yeteneğine sahiptir (149). Serbest radikallerin yararlı ve zararlı etkileri arasındaki hassas bir denge canlı organizmaların çok önemli bir yanıdır ve "*redoks düzenleme*" olarak adlandırılan mekanizmalar ile elde edilir. Redoks düzenlemesi yaşayan organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korur (144). Şekil 24'de ROS'un önde gelen radikal ve radikal olmayan (non-radikal) örnekleri yer almaktadır.

#### **4.3.2 Antioksidanlar**

Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğunda, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir (150). Organizmada oluşan anabolik ve katabolik olayları ve tüm metabolizmayı etkileyen ve bir kısmı enzimlerin aktif gruplarında yer alan, yokluğu ve yetersizliği fizyolojik fonksiyonların durmasına ya da önemli ölçüde azalmasına neden olan antioksidan maddelere karşı ilgi artmış ve bilimsel araştırmalara konu olmuştur (136).

Antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olarak incelenirler (Şekil 25). Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) birinci derece enzimatlere, glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz 6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) ikinci derece enzimatlere örnek gösterilmektedir (151, 152). Non-enzimatik olanlar ise; Mineral (Se, Zn), vitamin (A, C, K ve E), karotenoidler ( $\beta$ -karoten, likopen, lutein, zeaksantin), organosülfür bileşikleri (allium, allil sülfid, indoller), düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (GSH-Px, ürik asit), antioksidan ko-faktörler (ko-enzim Q10) ve polifenoller şeklinde incelenmektedir (153).

Antioksidan aktivitesi olan doğal gıdaların tüketimi hastalıklarla mücadelede etkili silahlardan biri olarak kabul edilir. Antioksidan etki gücünü ölçmek gıda kalitesini değerlendirmek ve hastalıkların teşhis ve tedavisi için önemli bir basamaktır (154).

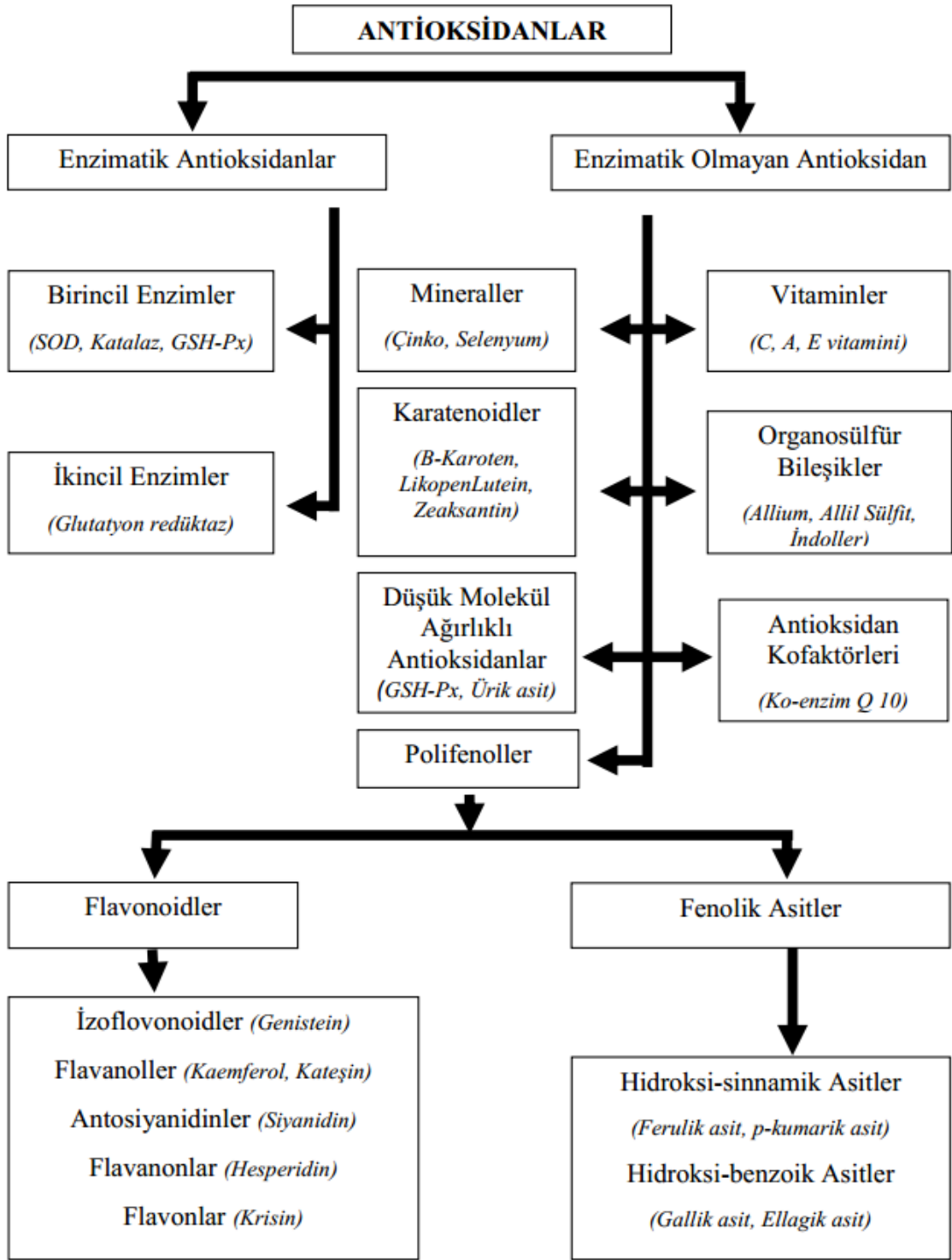
Singlet oksijenin eliminasyonunda (süpürülerek temizlenmesinde)  $\beta$ -karoten ve öteki karotenoidler kadar vitamin A ve diğer retinoidler etkili olurlarken, hidrojen

peroksit Se içeren GSH-Px enzimi tarafından, süperoksit anyon radikali ise bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren sitoplazmik enzimler ya da mangenez (Mn) içeren mitokondriyal SOD tarafından etkili biçimde elimine edilmektedir (155). Oksidatif strese bağlı olarak lipidler, proteinler, enzimler, karbonhidratlar, ve DNA zarar görebilmekte, membranlardaki hasarın neticesinde DNA zincirlerinde rastgele kırılmalar ve bağlanmalar meydana gelebilmekte, enzim ve yapısal proteinlerin zarar görmesi hücrenin ölmesiyle sonlanabileceği gibi bu olgular kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar ile diyabet ve otoimmün bozuklukların gelişiminde moleküler temeli oluşturmaktadır. Bazı nörodejeneratif hastalıklarda önemli oranda kan-beyin engelini aşabilen antioksidanlara ihtiyaç vardır (156).

SOR (serbest oksijen radikalleri) eliminasyonunda, endojen antioksidan enzimler (GSH-Px, SOD, CAT) ve bazı vitaminler (vitamin A, C ve E) işlevsel olabildikleri gibi eksojen antioksidanlar (likopen, resveretrol) ile antioksidan özelliğe sahip ön maddelere (benzoik, gallik, vanilik asit) de gerek duyulmaktadır. Vitamin B hücre metabolizmasında önemli rolleri olan, kimyasal olarak ayrı bir vitamin grubunu oluşturmaktadır. Sigara, alkol ve yaşlanmanın zararlı etkilerine karşı antioksidan gibi bir görevi üstlenen tiamin (Vit. B1) bir B grubu vitaminiyken, benzeri vitaminler gibi antioksidanlar arasında sınıflandırılmamakta, ancak bunların rollerine besinsel faktörler olarak vurgu yapılmaktadır. Bu bağlamda, folik asit (Vit B9), kobalamin (Vit B12) ve çinko (Zn) hücrelerde DNA'nın tamirinde ve metabolizmasında önem arz eden diğer besin öğeleridir. Folik asit, özellikle purin ve primidin nükleotidlerinden timidinin sentezinde rolü olduğu gibi, SOR veya genotoksik bileşiklerin DNA'ya erişiminin engellenmesi ve DNA'nın stabilitesinin sağlanmasında da önem arz etmektedir (158, 159).

Kanser başlangıcında; radyasyon, tetraklorodibenzodioksin (TCDD), benzen türevleri, poliaromatikhidrokarbonlar (PAH) ve aroklor gibi bazı kimyasallar ve yetersiz antioksidan tüketimi önem arz etmektedir. Yeterli düzeyde ve devamlı bitkisel antioksidan (karotenoid, vitamin C, folik asit, retinol) tüketimi oksidatif stresin DNA hasarını engellerken, gelişmiş hasarlı hücrelerin büyümelerini, tümoral yapı kazanmalarını ve metastazını da engellemektedirler (158, 160).





**Şekil 25.** Antioksidanların sınıflandırılması

Bazı gıda antioksidanlarının oksidasyonu engelleyerek, arteroskleroz, malarya, romatoid artrit ve diyabette faydalı olabileceği (161), antitümoral, antimutajenik, antimetastatik, antitrombik, antiülser, antikarsinojenik ve antihipertansif (162) ayrıca

antibakteriyel, antifungal (163), antiviral, antiaging etkileri de olduğu yapılan in-vivo çalışmalarla belirlenmiştir (161).

### 4.3.3. Antioksidan Aktivite

Antioksidanlar etkilerini; serbest radikal oluşumunu engellenmesi (başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki, oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyon azaltıcı etki, katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki) ve oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi (toplayıcı etki, bastırıcı etki, onarıcı etki, zincir kırıcı etki) olmak üzere iki şekilde gösterirler. Antioksidanların vücuttaki aktivitesi, ortamdaki oksijen miktarı, sıcaklık, konsantrasyon miktarı ve substrat çeşidi gibi özelliklere bağlı olarak değişkenlik gösterir (165).

Antioksidanlar mekanizmalarına göre genel olarak iki sınıfa ayrılırlar. Bunlardan birinci sınıf olan ‘Birincil Antioksidanlar’; radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmesini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir (örn; katalaz, peroksidaz, transferin). İkinci grup olan ‘İkincil Antioksidanlar’ ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran bileşiklerdir (örn; askorbik asit, E vitamini, polifenoller) (164).

Antioksidan aktivitesini hesaplama yöntemleri iki temel prensibe dayanır. Bunlardan birincisi, ‘Hidrojen Atom Transferini’ (HAT) temel alan analizler, ikincisi ise ‘Tek Elektron Transferini’ (SET) temel alan analizlerdir. HAT reaksiyon mekanizmasına dayalı başlıca analizler oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC) ve radikal-tutuklama antioksidan parametresi (TRAP)’ dir. SET reaksiyon mekanizmasına dayalı başlıca analizler ise, Troloks eşitliği antioksidan kapasitesi yöntemi (TEAC), demir iyonlarını indirgeme antioksidan kapasitesi (FRAP) ve DPPH (% serbest radikal yakalama aktivitesi) yöntemi ve toplam fenolik madde miktarı analizi için Folin-Ciocalteu yöntemidir (165).

Antioksidan aktivitesi hesaplamada tercih edilen yöntemlerinin başında DPPH serbest radikal yakalama yöntemi gelmektedir. Yöntemde DPPH, antioksidan molekülleriyle etkileşerek hidrojen vererek indirgenir ve böylece absorbanın düşmesine neden olur. Absorbanstaki azalma ne kadar yüksek olursa radikal yakalama aktivitesi o kadar yüksektir (165).

Antioksidan aktivitesi hesaplamada sıklıkla tercih edilen diğler bir yöntem olan ABTS metoduyla antioksidan aktivitesi yöntemi, ABTS (2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)' nin potasyum persulfatla reaksiyonu sonucu oluşan mavi/yesil renkli ABTS<sup>+</sup>'nin Troloks eşitliğine dayanarak hesaplanmasına dayanır. Metodun en önemli avantajı hem hidrofilik hem lipofilik bileşiklere uygulanabilir oluşudur (165).

Ayrıca, ortamda bulunan serbest radikalleri yakalama aktivitesine dayanan yöntemlerde, son zamanlarda antioksidan kapasitesini belirlemede yaygın kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan süperoksit anyon yakalama aktivitesi, fenazinmetosulfat-NADH sisteminde NADH'ın oksidasyonu ve NBT'deki indirgenme sonucu enzimatik olmayan bir şekilde süperoksit radikallerinin oluşması, ortama fenozin metasulfat (PMS) ilavesiyle başlayan reaksiyonla absorbanstaki azalmanın hesaplanması esasına dayanır. Burada düşük absorbans yüksek yakalama aktivitesine işarettir. Süper oksitin biyolojik olarak önemi, ortamdaki yüksek oksidatif türleri (hidroksil radikalleri vb.) ayrıştırabilmesidir (165).

Serbest radikalleri yakalama aktivitesi esasına dayanan diğler yöntemlerden biri olan indirgeme potansiyeli metodunda yüksek absorbans, yüksek indirgeme potansiyelini gösterir (166).

Bir diğler metot olan metal şelatlama aktivitesi, ortamda bulunan Fe<sup>+2</sup> iyonlarının inhibisyonuna dayanır. Aktivite kendini şelat ajanlarının demir iyonlarını şelatlaması sonucu kırmızı renkteki azalmayla gösterir. Metal selatlama aktivitesi lipit peroksidasyonundaki katalize olmuş geçiş metallerini indirgediği için önem taşımaktadır. şelatlama ajanları redoks potansiyelini indirgeyerek metal iyonlarının oksidasyonunu stabilize edebilirler. Bu nedenle şelatlama ajanları ikincil antioksidanlardır (166).

Ortamda bulunan lipit peroksidasyonunun inhibisyonuna dayanan ve tiyosiyanat metodu olarak da bilinen linoleik asit emülsiyon sisteminde antioksidan aktivitesi metodunda gözlenen düşük absorbans değeri yüksek lipit peroksit inhibisyonunun göstergesidir.

Bir diğer yöntem olan hidroksil radikal yakalama aktivitesinin ölçümü deoksiriboz metoduyla yapılmaktadır. Bu yöntemle göre; düşük absorpsiyon değeri yüksek deoksiriboz parçalanmasının inhibisyonu anlamındadır. Yüksek oranda reaktif hidroksil, DNA, yağlar ve proteinler üzerinde oksidatif zararlara neden olabilmektedir. Hidroksil yakalama aktivitesi yüksek olan ürünler, -OH grubunu nötralize edip hidrojen atomuna dönüştürerek inaktif hale getirdikleri için önemlidir (166).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Gereç

#### 5.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

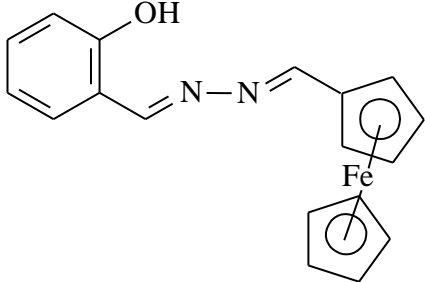
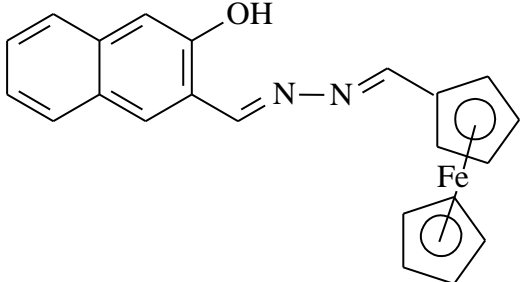
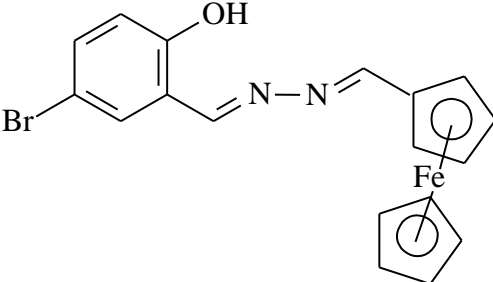
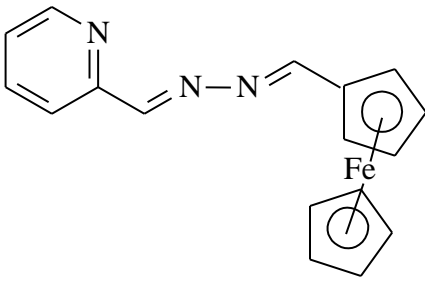
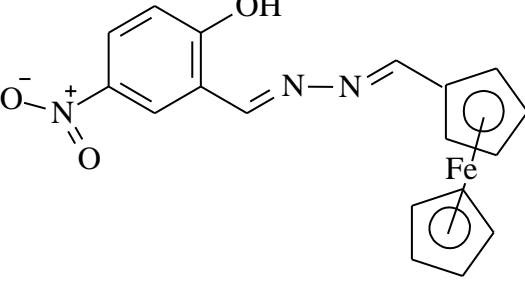
**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan cihazlar

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

#### 5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

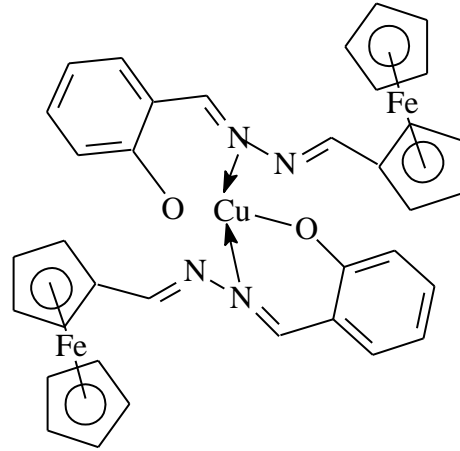
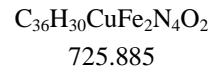
Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Sigma’dan temin edildi. DNA bağlanma çalışmalarında kullanılan dana timusundan elde edilmiş DNA (CT-DNA) ticari olarak satın (Sigma) alındı. DNA kesim aktivitesi denemelerinde de ticari olarak satın alınan (Thermo Scientific) %90’dan fazlası süpersarmal formda olduğu bilinen, 4361 baz çifti içeren, 2,83x106 Da moleküler ağırlığında olan çift sarmal kapalı halkalı pBR322 plazmid DNA’sı kullanıldı. Bu çalışmada incelenen ligand ve kompleksler Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Kerim Serbest ve grubu tarafından sentezlendi. İncelenen ligand ve komplekslerin, isimleri, kimyasal yapıları, moleküler ağırlıkları ve kısa kodları tablo 3’de verilmiştir.

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan ligand ve komplekslerin kısa kodları, molekül formülleri, molekül ağırlıkları ve kimyasal yapıları

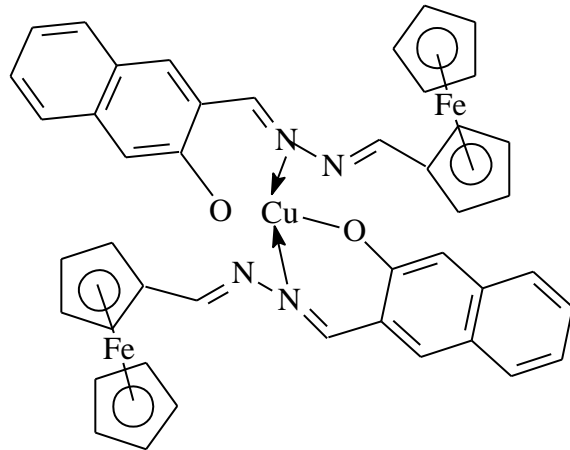
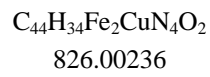
Kısa Kod	Molekül formülü ve Ağırlığı (gr/mol)	Kimyasal Yapı
L1	$C_{22}H_{18}FeN_2O$ 382.23612	
L2	$C_{18}H_{16}FeN_2O$ 332.17744	
L3	$C_{18}H_{15}BrFeN_2O$ 411.0735	
L4	$C_{17}H_{15}FeN_3$ 317.1661	
L5	$C_{18}H_{15}FeN_3O_3$ 332.17744	

Tablo 3'ün devamı

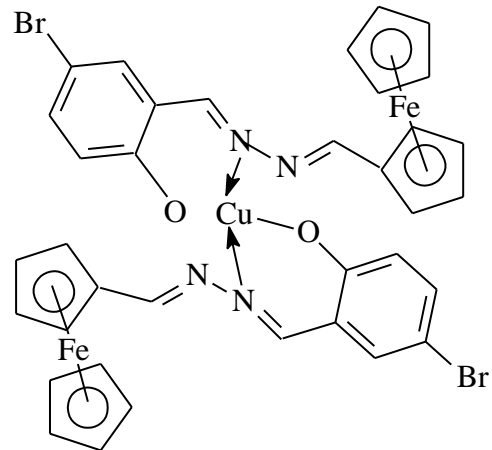
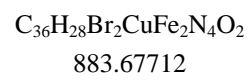
K1



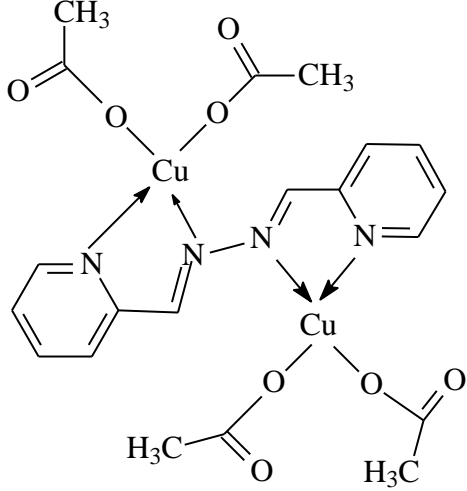
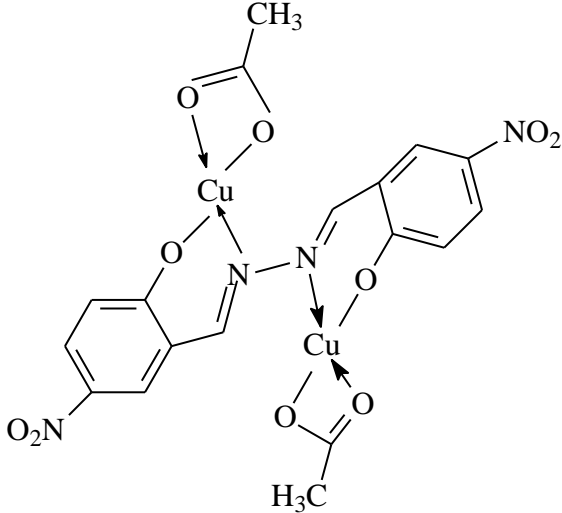
K2



K3



Tablo 3'ün devamı

K4	$C_{20}H_{22}Cu_2N_4O_8$ 573.50268	
K5	$C_{18}H_{14}Cu_2N_4O_{10}$ 573.41656	

### 5.1.3. Çözeltiler

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



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

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

*Jel Hazırlama ve Yürütme Tamponu (10X TAE):* 48.4 g Tris, 11.2 mL asetik asit, 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8) son hacim 1 L olacak şekilde su içerisinde çözüldü. Agaroz 0.8 g tartılarak 100 ml seyreltilmiş TAE içinde, 7µl EB (5mg/mL) ilavesi ile hazırlandı.

## **5.2. Yöntem**

### **5.2.1. DNA Bağlanma Deneyleri**

#### **5.2.1.1 UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonları**

DNA ile metal komplekslerinin etkileşimini incelemek için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bunlar UV-spektrofotometri, floresans ve sirküler dikromizm spektroskopileri gibi moleküler spektroskopi teknikleri ve X-ray difraksiyonu, dinamik viskozite ölçümleri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi diğer tekniklerdir. Çok sayıdaki bu araçların arasından UV-spektrofotometri, floresans metodu, dinamik viskozite ölçümleri ve termal denatürasyon çalışmaları, küçük moleküllerin DNA ile etkileşimlerinin spektroskopik pik cevaplarındaki yoğunluk ve pozisyon değişiklikleriyle veya dinamik viskozite ve DNA'nın erime sıcaklığındaki değişimlerin deneysel olarak takip edilebilmesinden dolayı tercih edilmektedir.

Çoğu durumda DNA kesimi için DNA bağlanması kritik adımdır. Bu yüzden öncelikle komplekslerin CT-DNA'ya bağlanması UV/Vis absorpsiyonu kullanılarak çalışıldı.

DNA bağlanma deneylerinin yapılabilmesi için uygun metod UV-absorpsiyon metodu olarak belirlenmiştir. Bu metod, DNA-ligand/kompleks etkileşimlerinin belirlenmesinde en etkili yollardan birisidir. Optimum koşulları belirlemek, çözeltileri ve yöntemin uygulanabilirliğini test etmek açısından, bazı ligand ve komplekslerle ön

denemeler yapılmıştır. Bu ön denemeler sonucunda deneylerin tris-HCl tamponu pH 7.2’de yapılmasına karar verilmiştir.

Komplekslerin CT-DNA ile etkileşimini içeren tüm çalışmalar 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) içinde, DMF içerisinde hazırlanan stok ligand ve kompleks çözeltileri DMF nihai konsantrasyonu %10’u geçmeyecek şekilde sabit konsantrasyonda (25 µM) tutularak ve CT-DNA konsantrasyonu değiştirilerek (2.5-15 µM) gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak 25 µM konsantrasyonda olacak şekilde, alınan ligand yada kompleks çözeltisinin 200-600 nm aralığında UV spektrumu 0,5 nm’de bir değer ölçülebilecek şekilde kaydedilmiştir. Ardından ilk CT-DNA ilavesi yapılmış (nihai 2.5 µM olacak şekilde), oda sıcaklığında 10 dakikalık inkübasyonun ardından, belirtilen dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumu kaydedilmiştir. Bu işlem yapılırken referans çözelti üzerine de eşit miktarda CT-DNA ilave edilerek CT-DNA’nın absorbanı elimine edilmiştir. Bu işleme DNA konsantrasyonu aşamalı olarak artırılarak son konsantrasyon 15 µM oluncaya kadar (daha fazla değişiklik olmayıncaya kadar) devam edilmiştir.

Absorbans şiddetindeki değişim (%H) ise yüzde oranlarıyla verilmiş ve Denklem 5.1.’deki eşitlik kullanılmıştır. Bu eşitlikte ise  $A_i$ , DNA eklenmeden önce bileşiğin absorban şiddetini ifade ederken,  $A_s$  ise maksimum konsantrasyonda DNA ilave edildikten sonra bileşiğin absorban şiddetini gösterir.

$$\%H = [(A_i - A_s) / (A_i)] \times 100 \quad (5.1)$$

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

Komplekslerin DNA ile etkileşimini daha ileri düzeyde ortaya koymak amacıyla iyi bilinen bir interkalatör olan etidyum bromür (EB) kullanılarak yarışmalı bağlanma denemesi gerçekleştirildi. 480 nm civarında absorpsiyon maksimumuna sahip olan serbest EB’nin DNA ile etkileşmesi sonucu absorbanstaki düşmeyle beraber absorbanı daha yüksek dalga boyuna kaymaktadır. Bu durum EB’nin DNA baz yığınları arasına interkalasyonunun bir delilidir.

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan çalışmada konsantrasyonu sabit tutulan EB’nin (40 µM) maksimum absorban gösterdiği dalga boyunun ve absorbanının önce DNA ilavesiyle (40 µM) daha sonra DNA ve kompleksin (5-30 µM aralığında) aynı anda

ilavesiyle ne yönde değişeceği incelenmiştir. Bu çalışma 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir.

### **5.2.1.3. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi**

DNA erime çalışmaları komplekslerin DNA sarmalına interkalasyonunun ileri düzeyde bir kanıtıdır. DNA erime denemeleri farklı bağlanma modlarını (interkalasyon yada harici bağlanma) ayırt etmek için uygulanır. Küçük moleküllerin DNA çift sarmalına interkalasyonun sonucunda çift sarmalın tek zincirli DNA'ya denatüre olmasıyla erime sıcaklığının yükseldiği bilinmektedir. Sarmalın erimesi 260 nm'de DNA bazlarının molar absorblama katsayısının çift sarmal formda tek zincirli forma göre daha düşük olması sebebiyle 260 nm'de absorpsiyonun artışına yol açar. Böylece, DNA sarmalının bobine dönüşme sıcaklığı 260 nm'de DNA bazlarının absorpsiyonunun sıcaklığın bir fonksiyonu olarak izlenmesiyle belirlenebilir.

Bu bilgiler ışığında planlanan termal denatürasyon çalışmaları Varian Cary Temperature Controller ünitesine sahip Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer cihazı kullanılarak ve [DNA]/[ligand/kompleks] oranı farklı olacak şekilde çeşitli denemeler yapılarak gerçekleştirildi. Denemeler, 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) tamponu içerisinde yapıldı.

Termal erime programı kullanılarak küveti içeren hücrenin sıcaklığı dakikada 1 °C arttırılarak 50-100 °C aralığında her 0.5 °C'de 260 nm'de absorpsiyon ölçüldü. CT-DNA'nın ligand/kompleks varlığında ve yokluğunda 260 nm'deki absorpsiyonuna bağlı olarak çizilen t(°C)-Absorpsiyon eğrisinden Tm değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

### **5.2.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi**

Yukarıdaki metodların yanında komplekslerin DNA ile etkileşimleri süpersarmal pBR322 plazmid DNA'sının kesim denemesiyle de incelendi. Kesim reaksiyonu jel elektroforezi tekniğiyle izlendi. Dairesel pBR322 plazmid DNA'sı elektroforeze maruz bırakıldığında, bozulmamış süpersarmal form (Form I)'un kısmen hızlı göç ettiği gözlenmektedir. Çeşitli maddelerle etkileşimi sonrasında tek bir zincirde kesim gerçekleşirse (kırılma), süpersarmal form daha yavaş hareket eden kırık form (Form II)'u oluşturmak üzere gevşemektedir. Her iki zincirin de kesildiği durumlarda Form I

ve Form II'nin arasında göç eden lineer form (Form III) oluşmaktadır. Komplekslerin DNA zincir kesimi için nükleaz aktivitelerini değerlendirmek amacıyla pBR322 plazmid DNA'sı belirlenen uygun reaksiyon koşullarında komplekslerle inkübe edildi.

#### **5.2.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi**

Plazmid (pBR322) DNA'sının kesim aktivitesinin çeşitli koşullara bağlılığını değerlendirmek üzere herhangi ilave bir ajan olmaksızın hidrolitik koşullarda şu denemeler gerçekleştirildi.

#### **5.2.2.2. pH'nın DNA Kesim Aktivitesine Etkisi**

Plazmid DNA'nın kompleksler tarafından kesimi için optimum şartları belirlemek için pH 5-9 aralığında ise Tris-HCl (50 mM) tamponları kullanılarak her bir kompleks için kesimin en etkin olduğu pH değeri belirlendi. 250 ng pBR322 kullanılarak DMF içerisinde hazırlanmış komplekslerin uygun konsantrasyonlarının (100 µM olacak şekilde) ilavesiyle 1 saat süreyle 37 °C'de gerçekleştirilen kesim reaksiyonu sonrasında reaksiyonlar jel yükleme boyası ilave edilerek durduruldu. Karışım % 0.8'lik agaroz jele (0.25 µg/mL EB içeren) yüklendi ve 90 dakika süreyle 100 voltluk akım uygulanarak yürütme tamponu (1X TAE) içerisinde elektroforeze maruz bırakıldı. Elektroforez işleminin bitiminde jel UV ışığı altında görüntülendi ve fotoğrafı kaydedildi.

#### **5.2.2.3. Konsantrasyonun DNA Kesim Aktivitesine Etkisi**

DNA kesiminin kompleks konsantrasyonuna bağlılığının ortaya konulabilmesi amacıyla her bir kompleks için belirlenen optimum pH değerlerinde, farklı kompleks konsantrasyonları kullanılarak (0-100 µM) kesim denemeleri gerçekleştirildi. Reaksiyonların gerçekleştirilmesinde, pH denemesinde ayrıntılı bir şekilde izah edilen yöntem takip edildi.

#### **5.2.3. İyonik Şiddetin DNA Kesim Aktivitesine Etkisi**

DNA kesimine elektrostatik katkısı belirlemek amacıyla, reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda NaCl (0-100 µM) ilave edilmesiyle iyonik şiddet artırılarak kesim üzerindeki etkinlik incelendi. Reaksiyonların gerçekleştirilmesinde, pH denemesinde ayrıntılı bir şekilde izah edilen yöntem takip edildi.

### **5.2.3.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Oksidatif Kesimi**

Komplekslerin hidrolitik kesim aktivitelerinin ortaya koyulmasını takiben çeşitli yardımcı reaktiflerin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AA, merkaptoetanol (ME)) nihai konsantrasyonları sırası ile 0.4 M, 2.5 mM ve 0.4 M olacak şekilde ortama ilave edilmesiyle 50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu içerisinde 250 ng pBR322 plazmid DNA'sı varlığında 1 saat süreyle 37 °C'de gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrasında oksidatif kesim etkinlikleri incelendi.

### **5.2.3.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıklı İndüklenmiş Kesimi**

İncelenen komplekslerin fotodinamik terapide kullanılabilme potansiyellerini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada pBR322 plazmid DNA'sının komplekslerle kesimine UV ışığının etkisini gözlemleyebilmek amacıyla 50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu içerisinde 250 ng DNA ve 100 µM kompleks konsantrasyonunun sağlanmasıyla oluşturulan karışım 30 dakika süreyle 366 nm'de UV ışığına maruz bırakıldı.

Bu sürenin sonunda karışımlar 1 saat süreyle 37 °C'de karanlıkta inkübe edildikten sonra yukarıda izlenen yöntemlerle reaksiyonlar durduruldu ve kesim ürünleri agaroz jel üzerinde UV ışığı altında incelendi.

## **5.3. Antioksidatif Aktivite Çalışmaları**

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

### **5.3.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Yapıları tamamıyla doğal enzimden farklı olsa bile özellikle Mn, Cu veya Zn gibi çeşitli geçiş metallerinin karışık ligandlı kompleksleri metal merkezinin etrafındaki esnek geometrik dönüşümleri ile SOD aktivitesi sergilemektedirler. Bu bilgiden hareketle ligand ve komplekslerin süperoksit radikallerini süpürme yetenekleri sıgır eritrositlerinden elde edilmiş olan ticari olarak temin edilen SOD enzimi ile kıyaslanarak incelendi.

SOD aktivitesinin belirlenmesi amacıyla tarafından nitro mavisi tetrazolyum (NBT) indirgeme metodu kullanıldı. O<sub>2</sub>'nin miktarı ve baskılanma oranı 560 nm'deki absorban ölçülerek belirlendi. Süperoksit radikalleri, 0.1 mM EDTA, 2 µM riboflavin, 13 mM L-metiyonin ve 75 µM NBT içeren 50 mM fosfat tamponundan (pH 7.8) oluşan sistem ile üretildi. Komplekslerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış çözeltileri radikal üreten bu çözelti sistemlerine ilave edilerek her bir reaksiyon karışımı 5 dakika floresan ışığında inkübe edildikten sonra örneklerin absorbanı 560 nm'de ölçüldü. Test edilen kompleksi içermeyen karışımın absorbanı kör olarak kullanılarak NBT indirgenmesinin yüzde süpürme kapasitesi (% SC) aşağıdaki denklemden hesaplandı,

$$\%SC = ((A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}})100 / A_{\text{kör}}) \quad (5.2)$$

Çalışılan her bir konsantrasyon için radikal süpürme kapasite değerleri elde edilerek (Ligand/Kompleks) Konsantrasyon / %SC eğrileri çizildi. Bu eğriler sayesinde SC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Aynı denemeler doğal SOD enzimi ile de yapılarak elde edilen SC<sub>50</sub> değeri incelen örnekler için elde edilen değerle karşılaştırılarak kompleksin SOD eşdeğeri olup olamayacağı değerlendirildi.

### 5.3.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

2,2-Difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi'nin tespiti bileşiklerin antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan basit, hızlı ve uygun bir metoddur. DPPH bir elektron ya da hidrojen radikali kabul edebilen ve böylece kararlı diyamagnetik bir moleküle dönüşebilen kararlı bir serbest radikaldir. DPPH tek bir elektrona sahiptir bu yüzden 517 nm'de güçlü bir absorpsiyon bandına sahiptir. Bu elektron serbest radikal süpürücünün varlığında eşleşir, bu absorpsiyon kaybolur ve alınan elektronların sayısının stokiyometrisine göre renk açılmasıyla sonuçlanır. Absorbanstaki böyle bir değişiklik SR (Serbest Radikal) süpürücü olarak rol oynayan çeşitli moleküllerin kapasitelerini test etmek için yaygın olarak kullanılabilir. Absorbansın hızlı düşmesi, bileşiğin antioksidan aktivitesinin fazla olduğunu gösterir.

Bu çalışmada incelenen ligand ve komplekslerin DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesini test etmek için 0.4 mM DPPH çözeltisi kararlı radikal olarak kullanıldı ve 1mL DPPH çözeltisinin 517 nm'deki absorbanı ölçüldü (Akör). DPPH çözeltisi

üzerine değişik konsantrasyonlardaki kompleks çözeltilerinden son hacim aynı olacak şekilde (0.2 mL) ilave edilerek karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonun ardından 517 nm'de absorbans ölçüldü (Aörnek). DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi, DPPH radikallerinin süpürme kapasitesi (%SC) şeklinde farklı kompleks konsantrasyonları için aşığıdaki denklemden hesaplandı.

$$\%SC = (A_{k\ddot{o}r} - A_{\ddot{o}rnek})100/A_{k\ddot{o}r} \quad (5.3)$$

SC<sub>50</sub> değerleri, kompleks konsantrasyonuna karşı radikal süpürme kapasite değerleri grafiğe geçirilerek hesaplandı. Ayrıca bilinen antioksidanlardan AA ve BHA ile de aynı testler gerçekleştirilerek bunlara ait SC<sub>50</sub> değerleri de hesaplandı ve bu değerler komplekslerin etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanıldı.

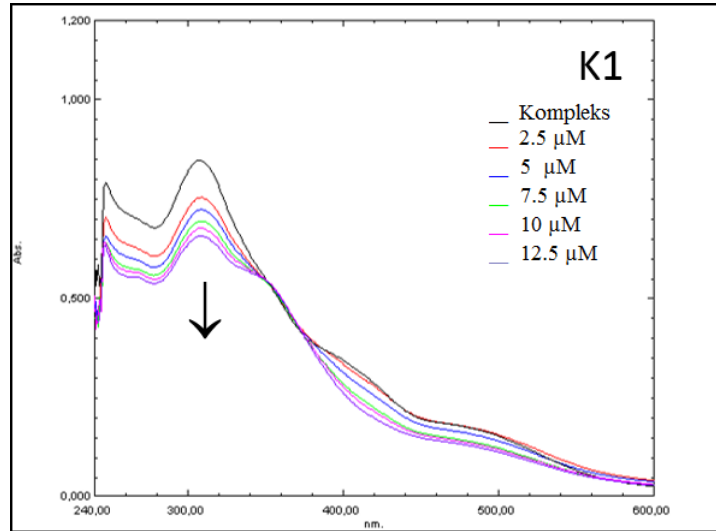
## 6. BULGULAR

### 6.1. DNA Bağlanma alışmaları

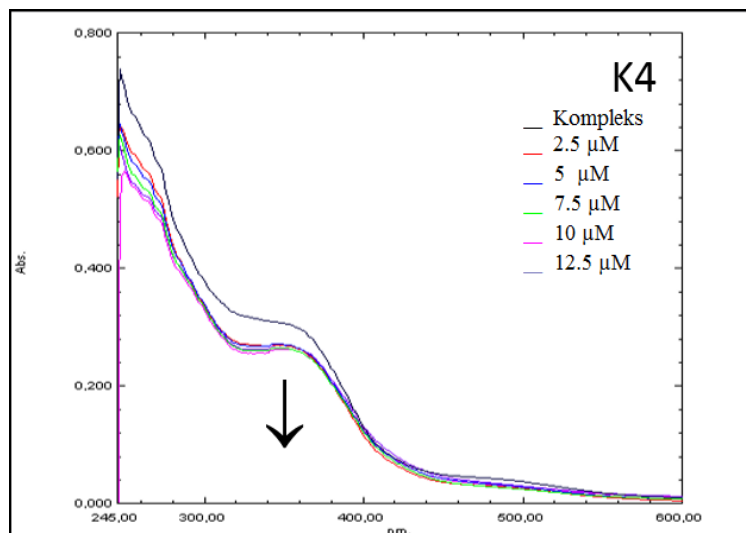
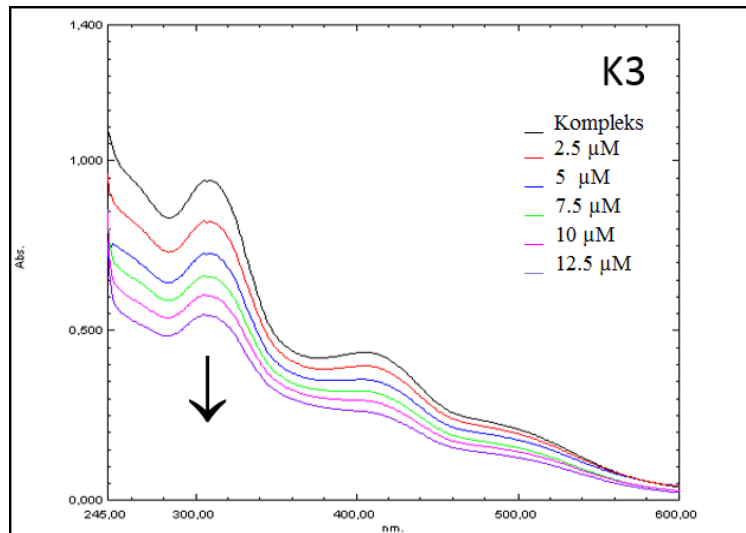
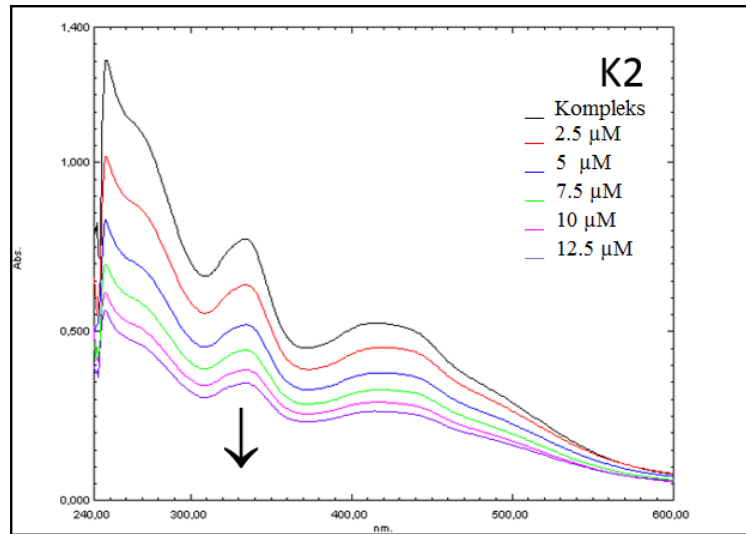
#### 6.1.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonları

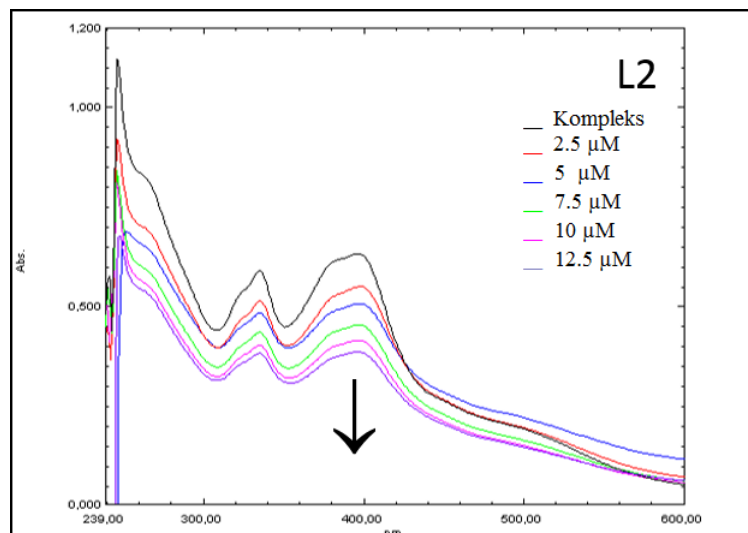
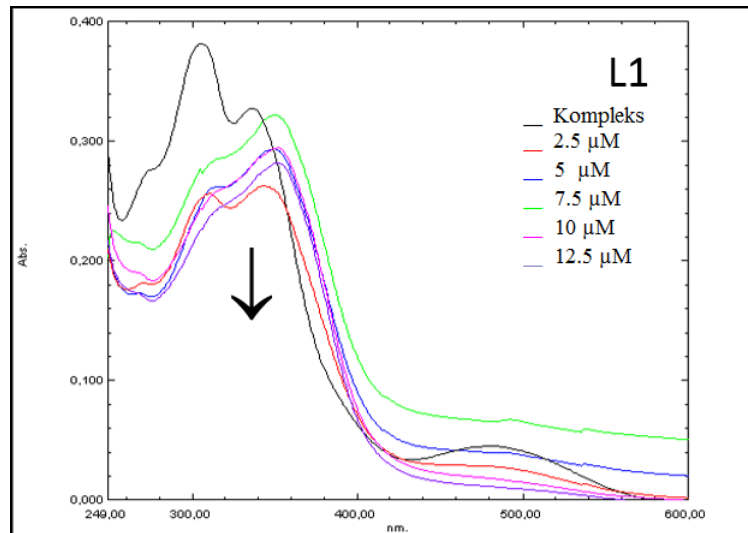
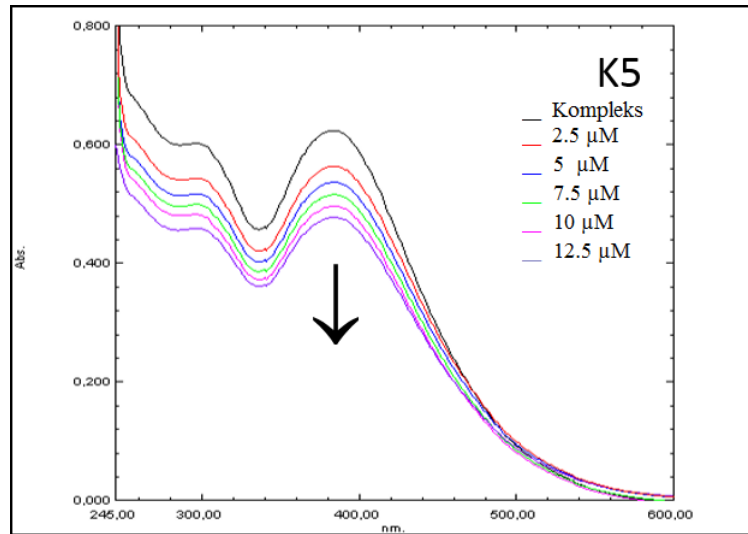
Tez kapsamında incelenen ligand ve komplekslerin CT-DNA'ya bağlanması UV/Vis absorpsiyonu kullanılarak çalışıldı. Sabit konsantrasyonda tutulan ligand/kompleks çözeltisi üzerine aşamalı olarak artırılarak CT-DNA özeltisi ilave edildi ve absorpsiyon spektrumlarındaki değişiklikler kaydedildi (Şekil 26) (Tablo 4).

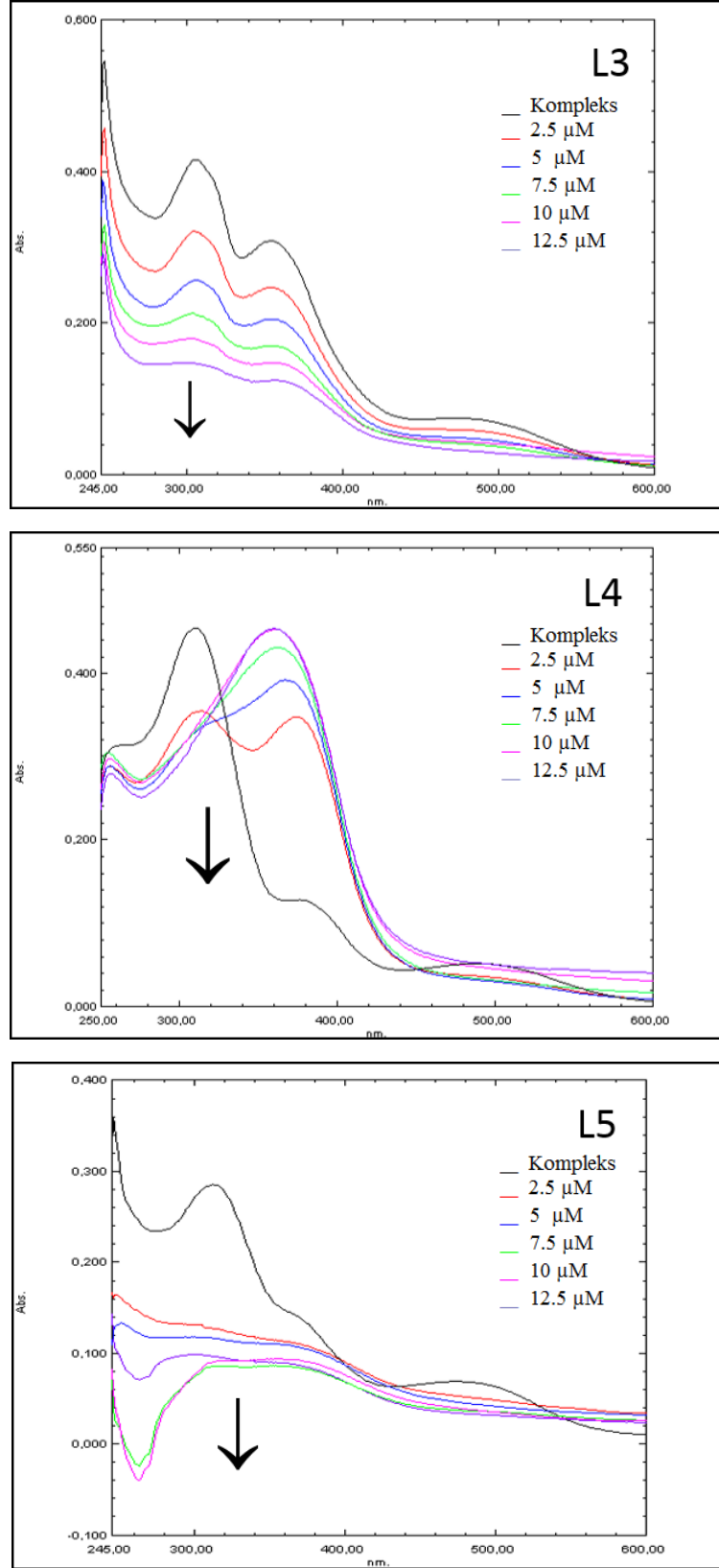
Bu işlem yapılırken referans çözelti üzerine de eşit miktarda CT-DNA ilave edilerek CT-DNA'nın absorpsansı bertaraf edilmiştir. Bu işleme DNA konsantrasyonu aşamalı olarak artırılarak daha fazla değişiklik olmayıncaya kadar devam edilmiştir. Absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir.











Şekil 26. Kompleks ve ligandların DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları. (↓) Artan kompleks konsantrasyonunu gösterir.

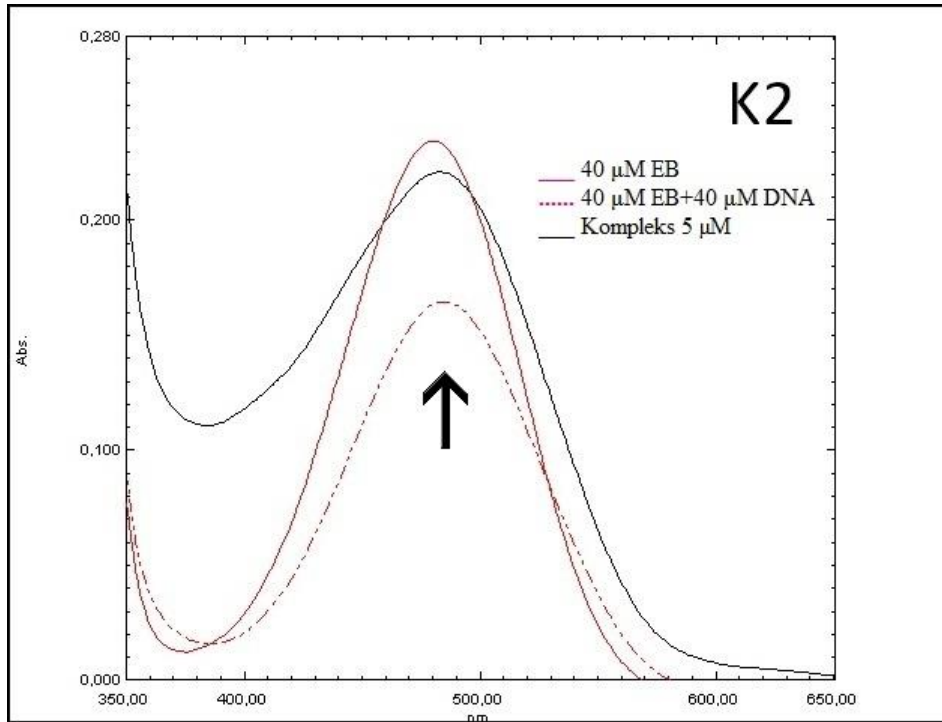
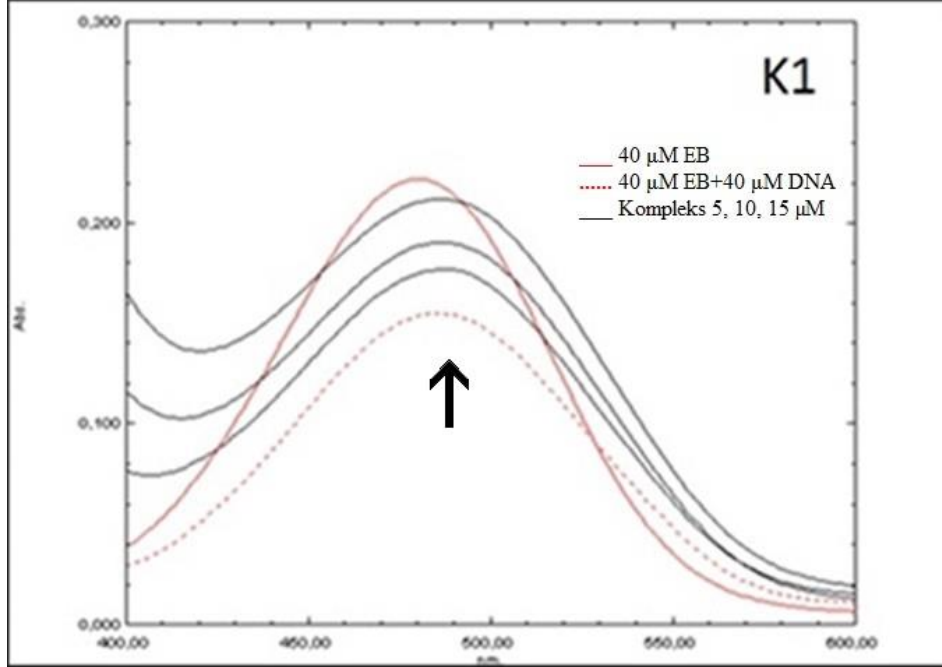
**Tablo 4.** Ligand ve komplekslerin DNA ile etkileşimi ve gözlenen değişimler

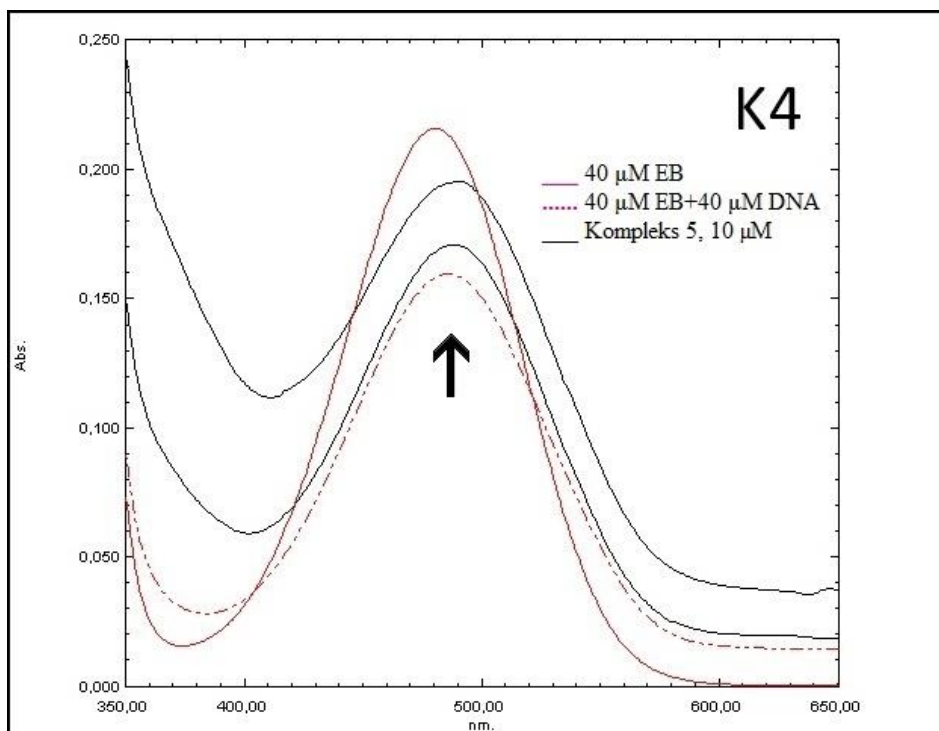
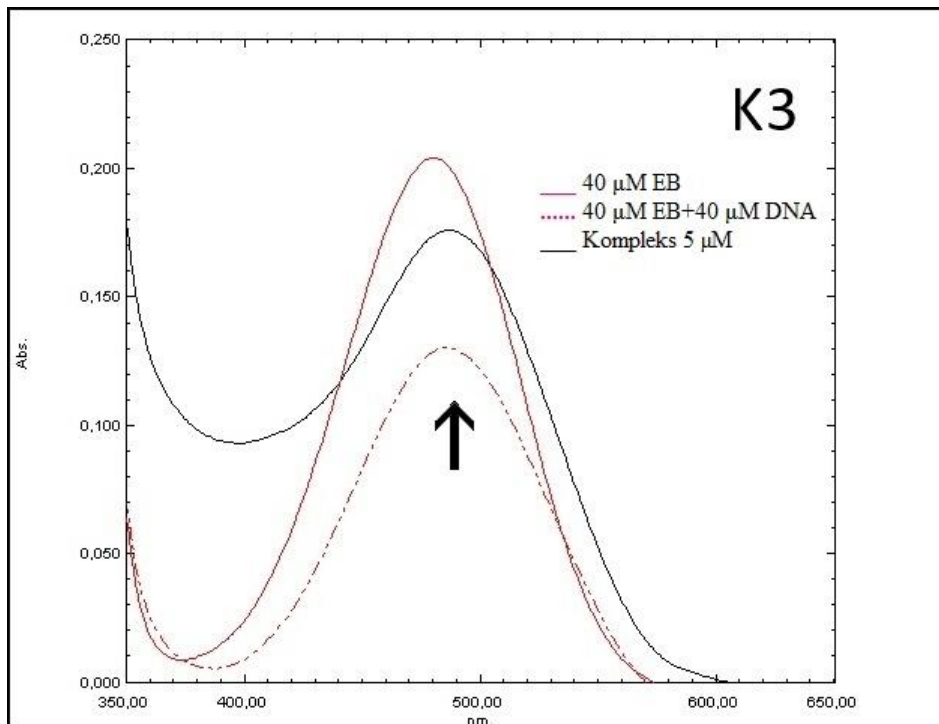
Kısa Kod.	$\Delta\lambda$ (nm)	Dalga boyundaki değişim	Kaymanın yönü	%H
<b>K1</b>	0	247	—	20
	1	307-308	Kırmızı	22
<b>K2</b>	1	335-334	Mavi	55
	1	415-414	Mavi	49
<b>K3</b>	0	305	—	42
	1	405-403	Mavi	18
<b>K4</b>	3	342-345	Kırmızı	12
<b>K5</b>	1	297-296	Mavi	23
	1	383-384	Kırmızı	23
<b>L1</b>	17	335-352	Kırmızı	13
<b>L2</b>	0	335	—	35
	0	396	—	39
<b>L3</b>	7	306-299	Mavi	64
	2	353-355	Kırmızı	59
<b>L4</b>	50	310-360	Kırmızı	0
<b>L5</b>	10	312-302	Mavi	65

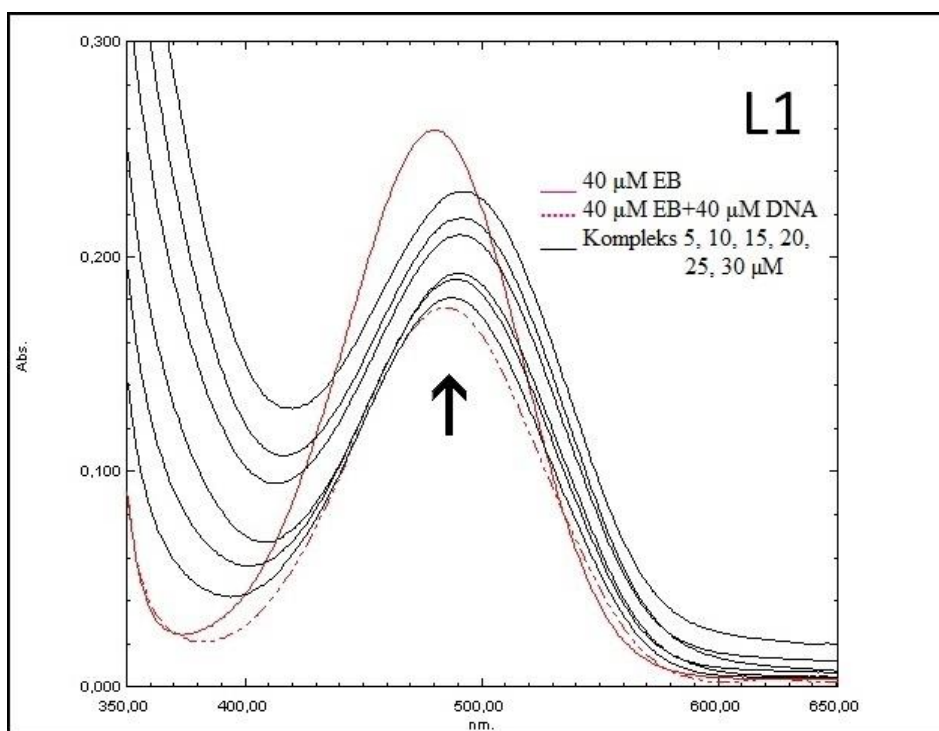
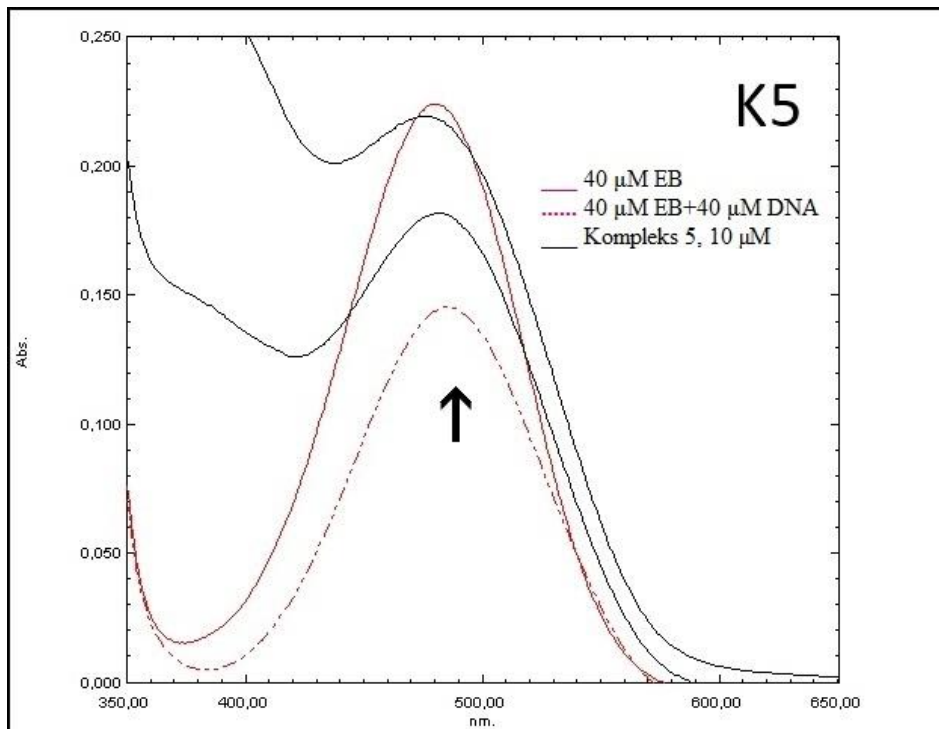
### 6.1.2. UV ile Yarışmalı Etidyum Bromür Bağlanması Çalışmaları

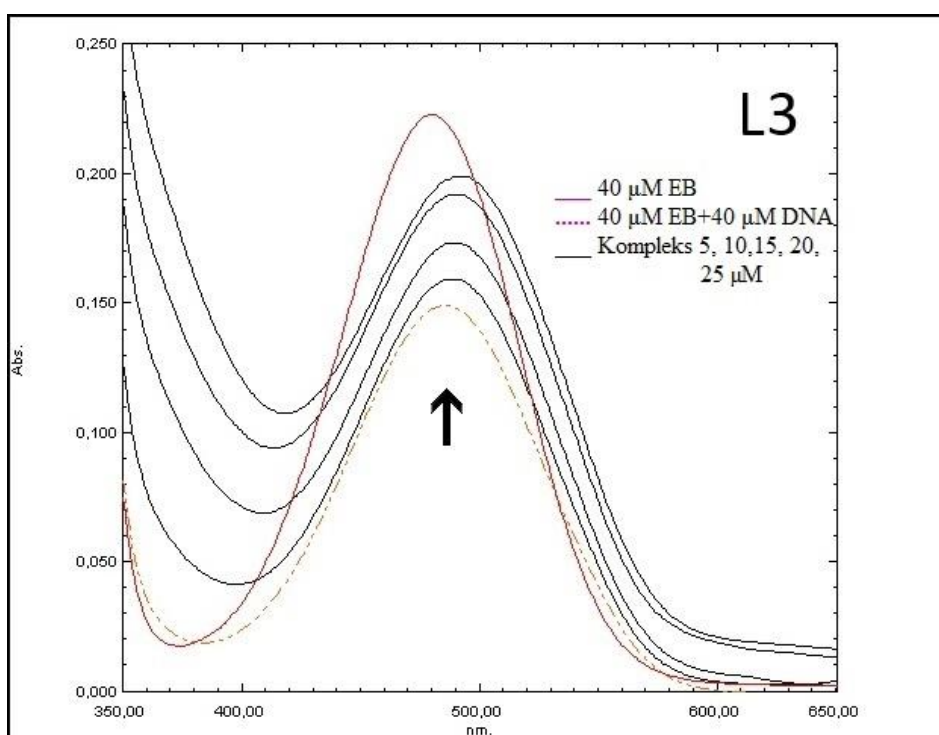
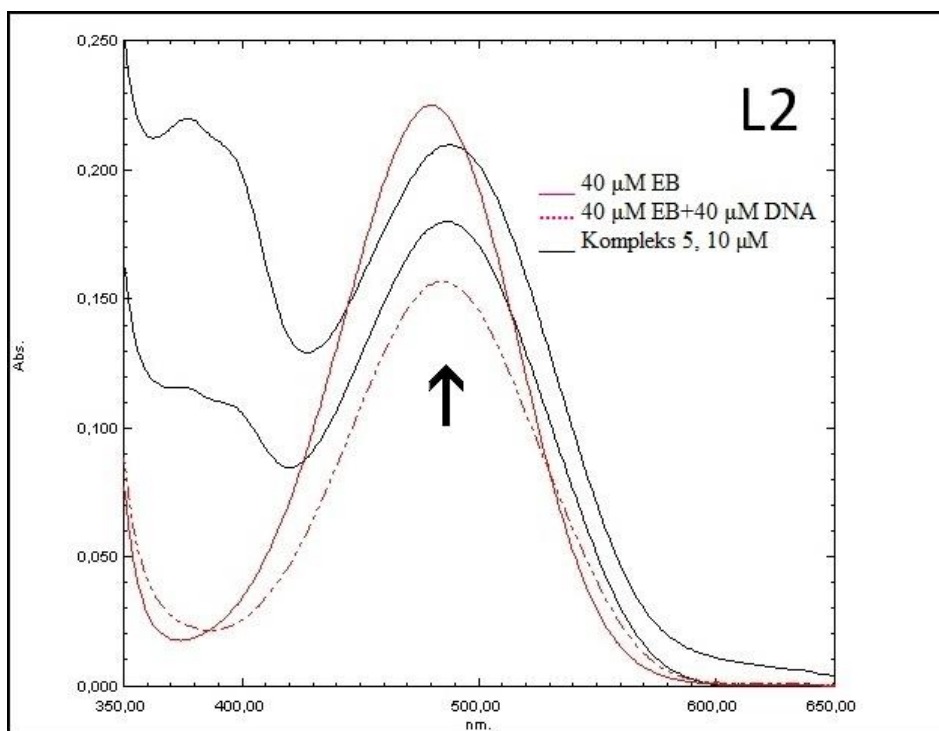
UV-Vis absorpsiyon titrasyonları sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda ligand ve komplekslerin DNA ile interkalasyon yoluyla etkileştikleri, iyi bilinen bir interkalator olan EB'ün kullanılmasıyla gerçekleştirilen yarışmalı bağlanma çalışmaları ile desteklendi. Gerçekleştirilen deneme sonucu literatürden elde edilen bilgilerle aynı doğrultuda olacak şekilde, serbest EB'ün 480 nm'deki absorpsiyon maksimumunun CT-DNA ile etkileşimi sonucu absorbanstaki düşmeyle birlikte daha yüksek dalga boyuna (482 nm) kaydığı gözlemlendi (Şekil 27).

Ligand ve komplekslerin ilavesi sonucunda ise bu maddelerin DNA ile bağlanmak için EB ile yarıştığını gösterecek şekilde absorpsiyon yoğunluğunda farklı oranlarda artış gözlemlendi (Şekil 27).

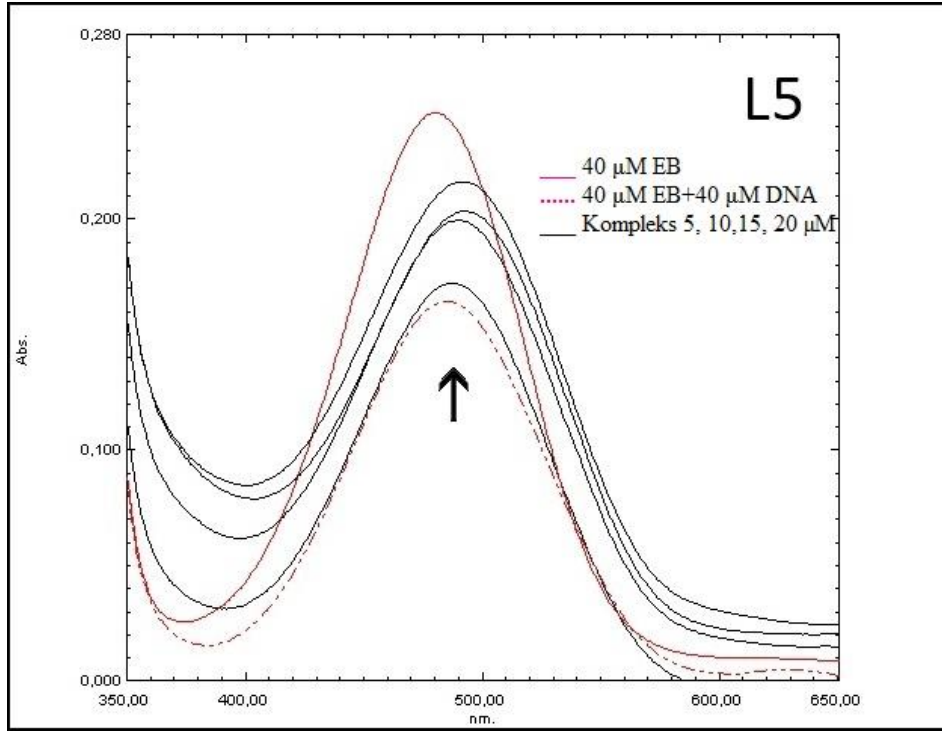
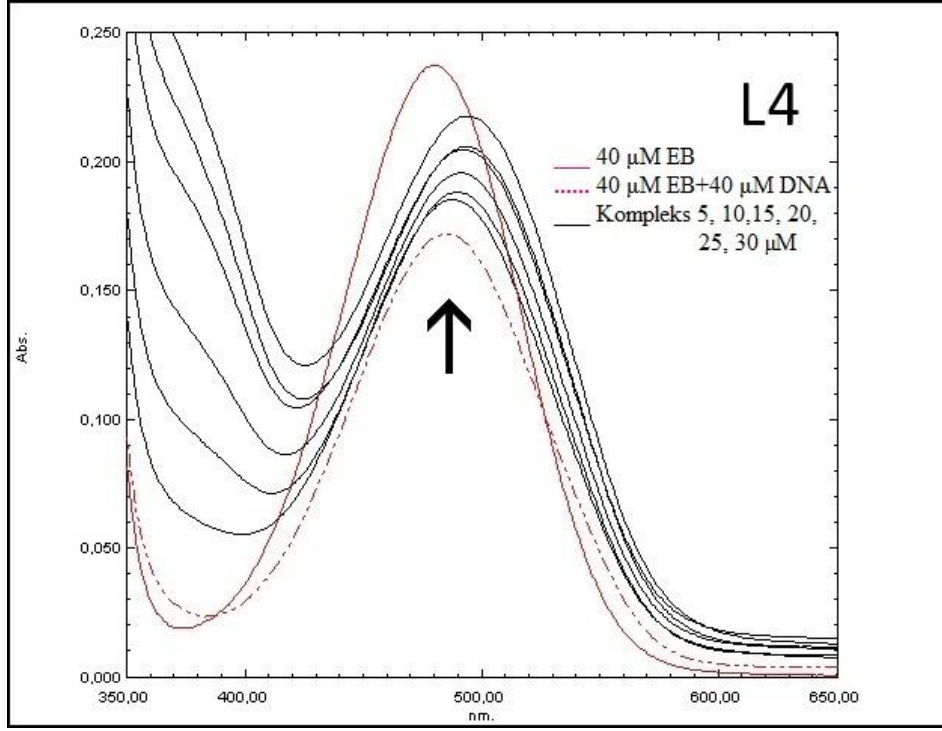












**Şekil 27.** EB'ün DNA bağlanmasının ligand yokluğunda ve artan ligand konsantrasyonunda absorpsiyon spektrumu. (↑): Ligand konsantrasyonunun artış yönünü göstermektedir.

### 6.1.3. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi

DNA erime sıcaklığı ( $T_m$ )'nın belirlenmesi denemeleri bağlanma modunu (interkalasyon ya da harici olarak) ve kısmi bağlanma gücünü anlamak için kullanılır.  $T_m$ , çift sarmalın kararlılığı ile son derece ilişkilidir ve kimyasalların DNA ile etkileşimi  $T_m$ 'yi değiştirebilir.

Bu bilgiler ışığında planlanan termal denatürasyon çalışmaları sırasında termal erime programı kullanılarak küveti içeren hücrenin sıcaklığı dakikada 1 °C artırılarak 50-100 °C aralığında her 0.5°C'de 260 nm'de absorbans ölçüldü. CT-DNA'nın ligand/kompleks varlığında ve yokluğunda 260 nm'deki absorbansına bağlı olarak çizilen t(°C)-Absorbans eğrisinden  $T_m$  değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Hesaplanan  $T_m$  değerleri Tablo 5'de verilmiştir. Bu denemede kompleks ve DNA farklı oranlarda (1:1, 1:2 ve 2:1) kullanılarak deneme birkaç kez tekrar edildi.

**Tablo 5.** Komplekslerin ve Ligandların  $T_m$  değerleri

Kompleks Kısa Kod	$T_m$	Ligand Kısa Kod	$T_m$
CT-DNA	75.57	CT-DNA	75.57
CT-DNA+K1	82.82	CT-DNA+L1	77.12
CT-DNA+K2	79.62	CT-DNA+L2	76.77
CT-DNA+K3	76.47	CT-DNA+L3	73.67
CT-DNA+K4	77.12	CT-DNA+L4	76.35
CT-DNA+K5	85.77	CT-DNA+L5	86.52

### 6.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi

Çalışmanın bu aşamasına kadar yapılan incelemeler neticesinde incelenen komplekslerin CT-DNA ile bağlanma eğilimlerinin ortaya konulmasının üzerine metalonükleaz olarak etki etme yeteneklerini değerlendirmek için çalışmalar yapılarak komplekslerin DNA kesim etkinliği DNA-bağlanma yetenekleri ile kıyaslandı. Bu amaçla agaroz jel elektroforezi tekniği kullanıldı. Uygun şartların sağlanmasıyla gerçekleştirilen kesim reaksiyonları sonrasında elde edilen kesim ürünleri jel üzerinde elektroforetik ayırmaya maruz bırakıldı ve jeller EB boyamasından sonra UV ışığı altında analiz edildi. Metalonükleaz aktivitesinin varlığı DNA'nın Form I (süpersarmal

form)'den Form II (kırık dairesel form) veya Form III (lineer form)'e dönüşümüyle tespit edildi. Nükleaz etkinliğinin bağlı olduğu faktörleri belirlemek için farklı koşullarda (hidrolitik, oksidatif, foto indüklenmiş) denemeler gerçekleştirildi.

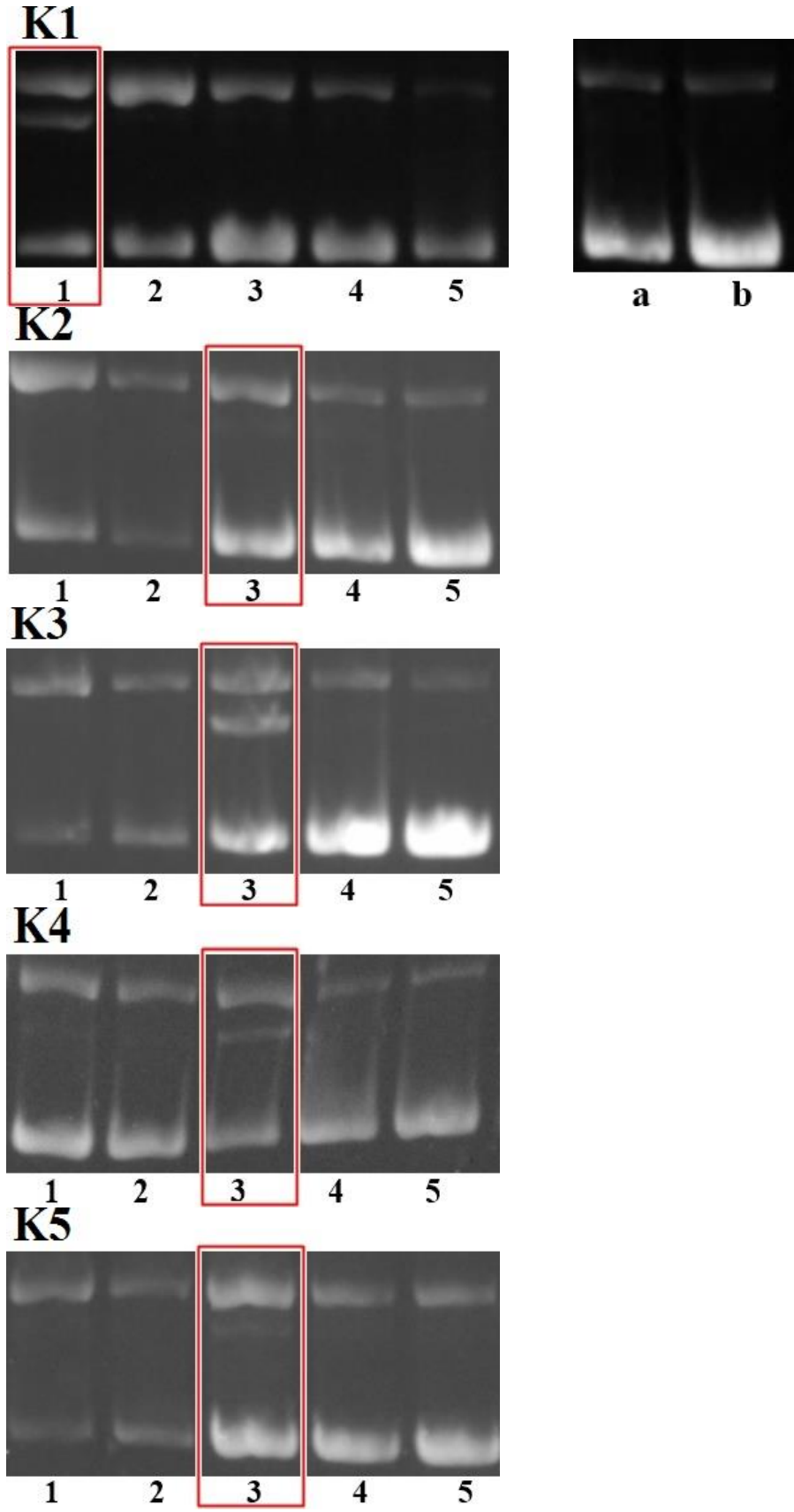
### **6.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi**

Herhangi bir ilave ajan ve ışık gerektirmediği için DNA'nın hidrolitik kesimi biyolojik olarak öneme sahiptir. Bu amaçla komplekslerin DNA'yı fosfodiester bağlarının hidrolizi yoluyla kesebilme etkinliğini değerlendirmek için denemeler yapıldı.

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

#### **6.2.1.1 pH'nın DNA Kesim Aktivitesine Etkisi**

Plazmid DNA'nın kompleks tarafından kesiminin optimal şartlarını belirlemek için kesim reaksiyonlarının pH bağımlılığı incelendi. Bu amaçla her bir kompleks için pH 5-9 aralığında Tris-HCl (50 mM) tamponları kullanılarak ve diğer bütün parametreler aynı tutularak kesimin en etkin olduğu pH değeri belirlendi. Bu çalışma sırasında kompleks konsantrasyonları 100 µM; DNA konsantrasyonu ise 250 ng olarak belirlendi. Kompleksler için bütün çalışmalarda standart şartlar da (37 °C'de bir saat inkübasyonun ardından 100 volt altında 90 dakika) elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Kesim ürünlerinin UV ışığı altında elde edilen görüntüleri Şekil 28'de gösterilmektedir. Komplekslerin pH bağımlı nükleaz denemesinde K2, K3, K4 ve K5 için optimum pH 7, K1 için pH 5 olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda belirlenen pH daki tamponlar kullanılmıştır.



Şekil 28. Komplekslerin pH'a bağlı kesim aktiviteleri

Kuyu içerikleri:

a: DNA kontrol: 9.5  $\mu$ L Tris-HCl +0.5  $\mu$ L DNA.

b: DNA kontrol: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl (pH 7) +2  $\mu$ L DMF +0.5  $\mu$ L DNA.

1: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl (pH 5)+ 2  $\mu$ L kompleks (100  $\mu$ M) +0.5  $\mu$ L DNA.

2: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl (pH 6)+ 2  $\mu$ L kompleks (100  $\mu$ M)+0.5  $\mu$ L DNA.

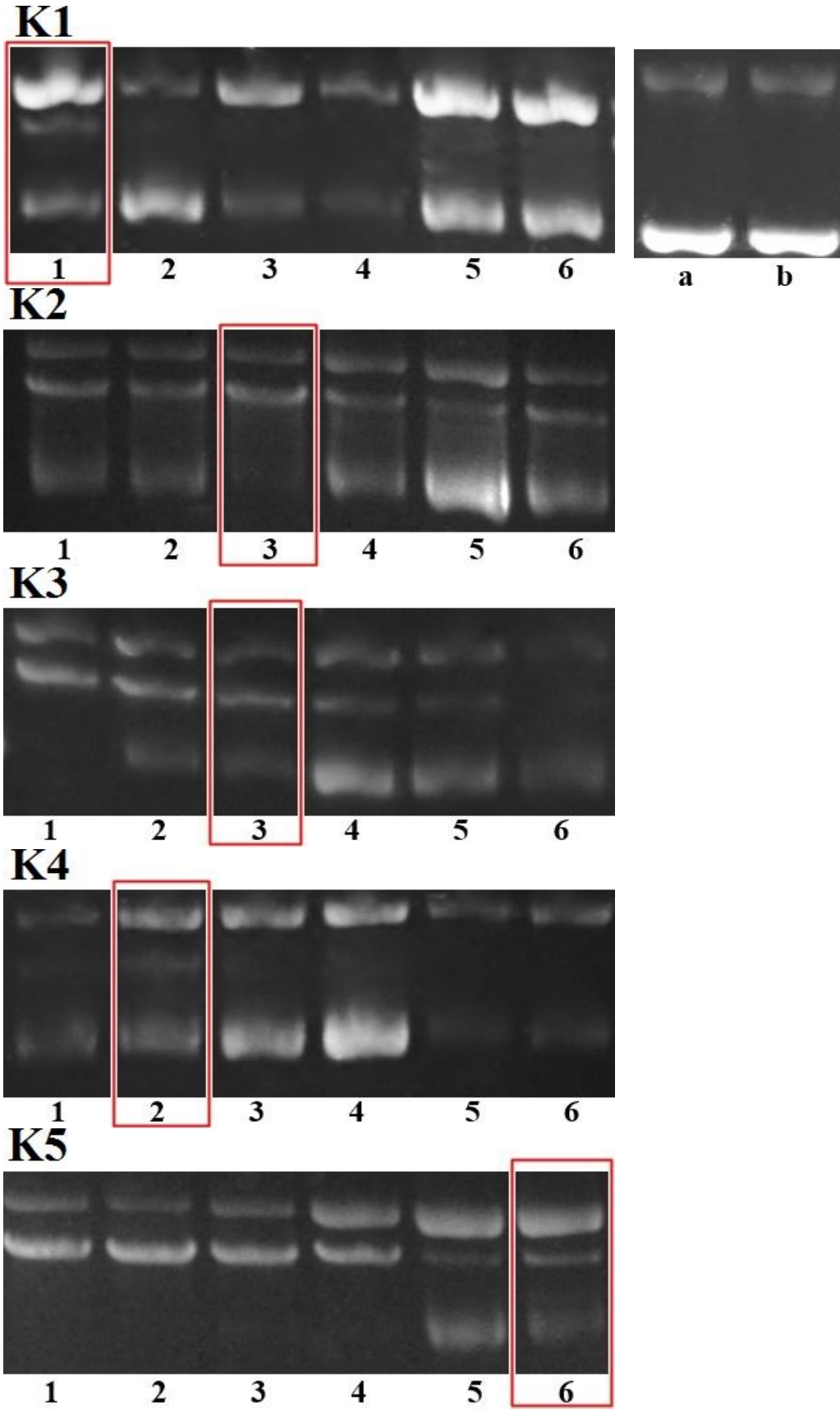
3: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl (pH 7)+ 2  $\mu$ L kompleks (100  $\mu$ M) +0.5  $\mu$ L DNA.

4: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl (pH 8)+ 2  $\mu$ L kompleks (100  $\mu$ M)+0.5  $\mu$ L DNA.

5: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl (pH 9)+ 2  $\mu$ L kompleks (100  $\mu$ M)+0.5  $\mu$ L DNA.

### **6.2.1.2. Kompleks Konsantrasyonunun DNA Kesim Aktivitesine Etkisi**

Kompleks konsantrasyonunun nükleaz etkinliği üzerine etkisi, çalışmada bir önceki aşamada her bir kompleks için bulunmuş olan etkin pH'yı sağlayan tampon sistemlerinin içinde pBR322 plazmid DNA'sını ve farklı konsantrasyonlarda kompleks bileşenlerini içerecek şekilde oluşturulan reaksiyon karışımlarının 37 °C'de 1 saatlik süre sonunda kesim ürünlerinin incelenmesiyle değerlendirildi. Yapılan ön çalışmalar incelenen maddelerin hangi konsantrasyon aralığında etkin olduğu sonucuna ulaşılmasını sağladığı için bu denemede komplekslerin her biri için 1, 10, 25, 50, 100, 250  $\mu$ M konsantrasyonlarını içeren örnekler çalışıldı. Kesim ürünlerinin UV ışığı altında elde edilen görüntüleri Şekil 29'da gösterilmektedir. Görüntülerin detaylı incelenmesi sonucu; K1 düşük konsantrasyonlarda yüksek nükleaz aktivitesi göstermiş; K2 denenen her konsantrasyon değerinde lineer form oluşturmuş, bunların içinden en az süpersarmal formun kaldığı görüntü seçilmiştir. K3 her konsantrasyon aralığında yüksek kesim aktivitesi göstermiş, kullanılan plazmid DNA'nın bileşimi dikkate alınarak makul oranda süpersarmal form kalmış olan görüntü seçilmiştir. K4'de en belirgin lineer form görüntü oluşturmuş konsantrasyon seçilmiştir. K5 ise yüksek konsantrasyonda lineer form oluşturmuştur. Bu bilgiler ışığında kompleksler için seçilen optimum konsantrasyonlar sırası ile 1, 25, 25, 10, 250  $\mu$ M ' dir.



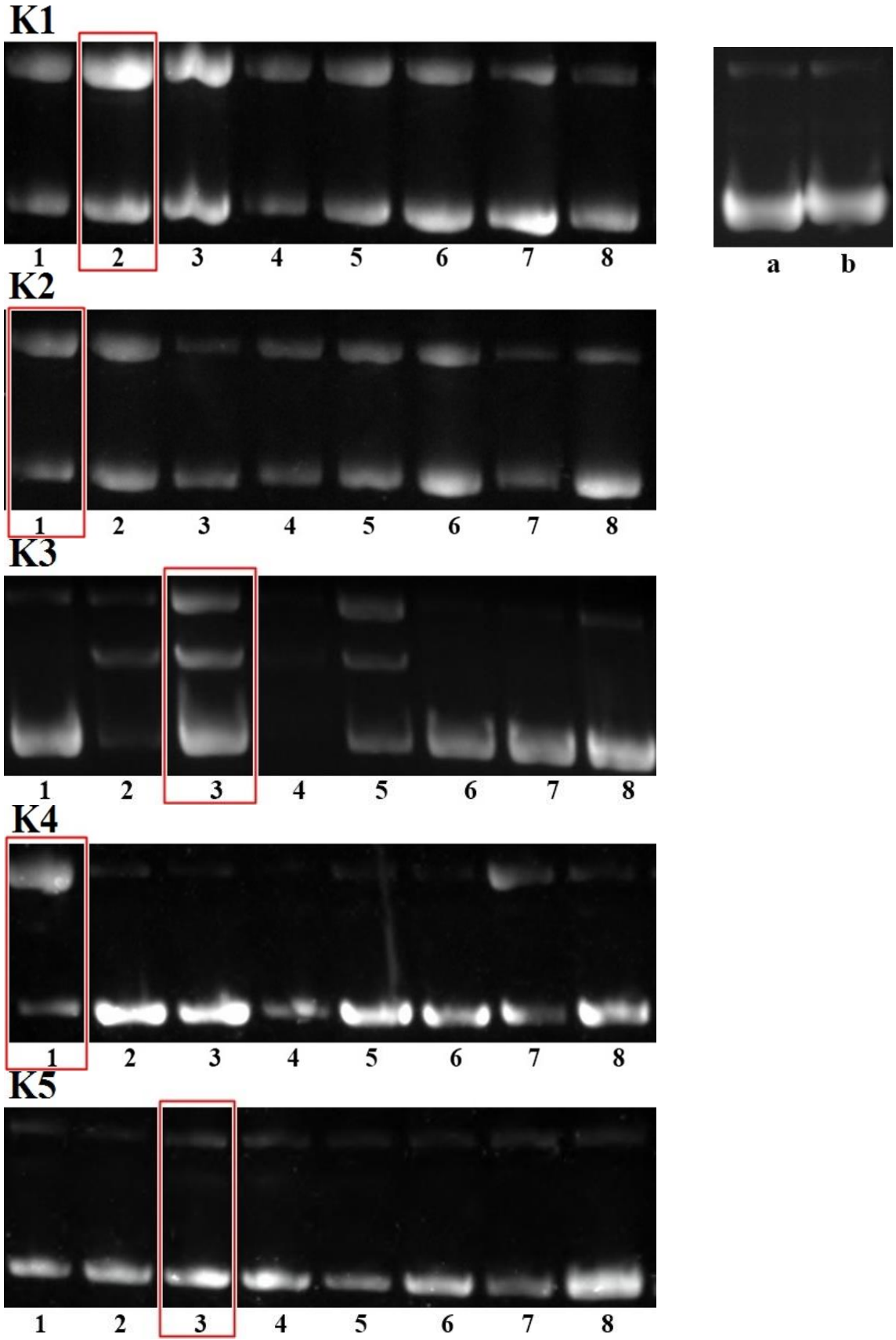
Şekil 29. Komplekslerin konsantrasyona bağlı kesim aktiviteleri

Kuyu içerikleri:

- a: DNA kontrol: 9.5  $\mu$ L Tris-HCl +0.5  $\mu$ L DNA
- b: DNA kontrol: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl +2  $\mu$ L DMF +0.5  $\mu$ L DNA
- 1: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L kompleks (1  $\mu$ M) +0.5  $\mu$ L DNA
- 2: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L kompleks (10  $\mu$ M)+ 0.5  $\mu$ L DNA
- 3: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L kompleks (25  $\mu$ M)+ 0.5  $\mu$ L DNA
- 4: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L kompleks (50  $\mu$ M)+ 0.5  $\mu$ L DNA
- 5: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L kompleks (100  $\mu$ M)+ 0.5  $\mu$ L DNA
- 6: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L kompleks (250  $\mu$ M)+ 0.5  $\mu$ L DNA

### **6.2.1.3. İyonik Şiddetin DNA Kesim Aktivitesine Etkisi**

DNA kesimine elektrostatik katkı iyonik güç çalışmasıyla incelenmiştir. Bu aşamaya kadar gerçekleştirilen denemelerde elde edilen optimum pH ve etkin konsantrasyon değerleri kullanılarak her bir ligand ve kompleks için reaksiyon ortamına ilave edilen tuz (NaCl) konsantrasyonu değiştirilerek (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 100  $\mu$ M), sabit pBR322 konsantrasyonu ile oluşturulan reaksiyon karışımları 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda elde edilen kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesiyle elde edilen sonuçlar Şekil 30'da verilmektedir. Görüntülerin ayrıntılı incelenmesi sonucunda; komplekslerin düşük tuz konsantrasyonlarında sınırlı aktivite gösterdiği, K3' ün en yüksek NaCl' ye bağlı nükleaz aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi. Görüntülerin ayrıntılı incelenmesi sonucunda; komplekslerin düşük tuz konsantrasyonlarında sınırlı aktivite gösterdiği, K3' ün en yüksek NaCl' ye bağlı nükleaz aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi.



Şekil 30. Komplekslerin nükleaz etkinlikleri üzerinde tuz konsantrasyonunun etkisi.



Kuyu içerikleri;

a: DNA kontrol: 9.5 µL Tris-HCl+ 0.5 µL DNA

b: DNA kontrol: 7.5 µL Tris-HCl+ 2 µL DMF+ 0.5 µL DNA

1: 5.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 0.5 µL DNA

2: 5.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 2 µL NaCl (2,5 µM)+ 0.5 µL DNA

3: 5.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 2 µL NaCl (5 µM)+ 0.5 µL DNA

4: 5.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 2 µL NaCl (10 µM)+ 0.5 µL DNA

5: 5.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 2 µL NaCl (20 µM)+ 0.5 µL DNA

6: 5.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 2 µL NaCl (40 µM)+ 0.5 µL DNA

7: 5.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 2 µL NaCl (80 µM)+ 0.5 µL DNA

8: 5.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 2 µL NaCl (100 µM)+ 0.5 µL DNA

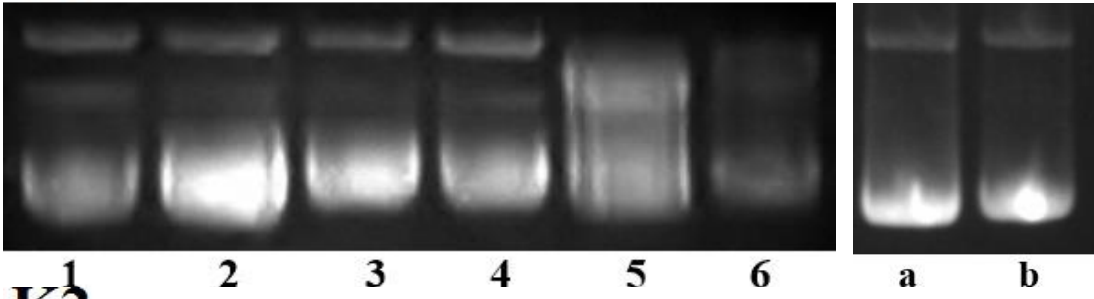
### 6.3.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Oksidatif Kesimi

Komplekslerin hidrolitik kesim aktivitelerinin belirlenmesinin ardından oksidatif kesim kabiliyetlerinin araştırılması amacıyla kesim reaksiyonları hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (0.4 M), askorbik asit (AA) (2.5 mM), merkaptolanol (ME) (0.4 M) ilave ajanların varlığında 50 mM Tris-HCl (Optimum pH) tamponu içerisinde 250 ng DNA varlığında optimum konsantrasyonlarda kompleks ilavesiyle 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyonun ardından gerçekleştirildi ve bu ilave ajanların kesime aktivatör niteliğinde etkisi olup olmadığı Şekil 30'de gösterilen jel görüntülerinin incelenmesiyle ortaya konuldu.

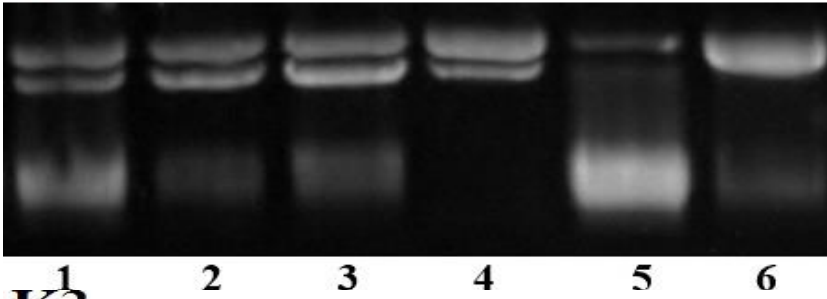
Bu çalışma sırasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ME, AA' in yalnız başına olduğu durumlarda DNA'ya etki edip etmediğinin incelenmesi sebebiyle sadece DNA üzerine bu bileşenlerin ilave edilmesiyle aynı şartlarda gerçekleştirilen kontrol denemesi sonucunda elde edilen görüntü de Şekil 31'de verilmiştir. Kontrol denemesi ile ortamda kompleksler olmadığında bu bileşenlerin DNA kesimini indükleyici bir etkilerinin olmadığı belirlendi.

Komplekslerin görüntüleri incelendiğinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in indükleyici etkisinin en fazla K3 ve K5 de olduğu, K4'ün kesim aktivitesi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Merkaptolanol'ün indükleyici etkisinin K2 ve K5 de eşdeğer ölçüde etkili, K1, K3 ve K4 de etkili olmadığı gözlenmiştir. Askorbik asit, K4 hariç bütün komplekslerde indükleyici etki göstermiştir. İndükleyici ajanlar arasında sıralama yapıldığında ME'ün az etkili aktivatör ajan olduğu söylenebilir.

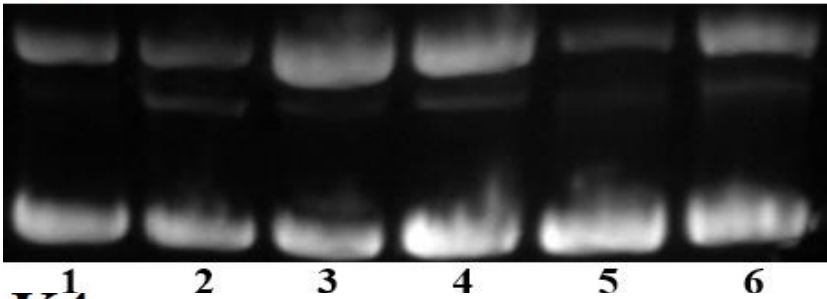
**K1**



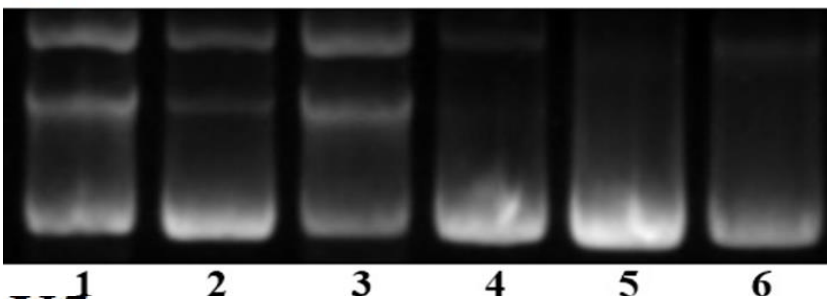
**K2**



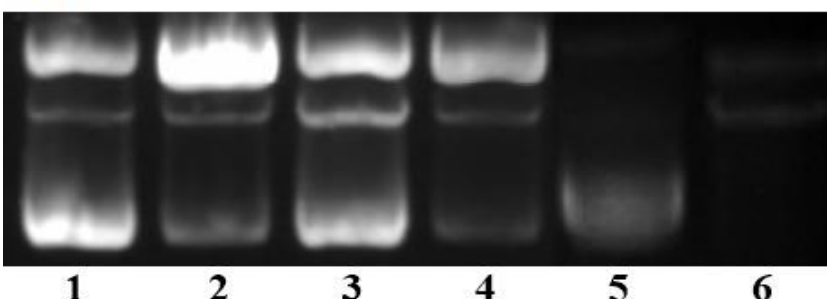
**K3**



**K4**



**K5**



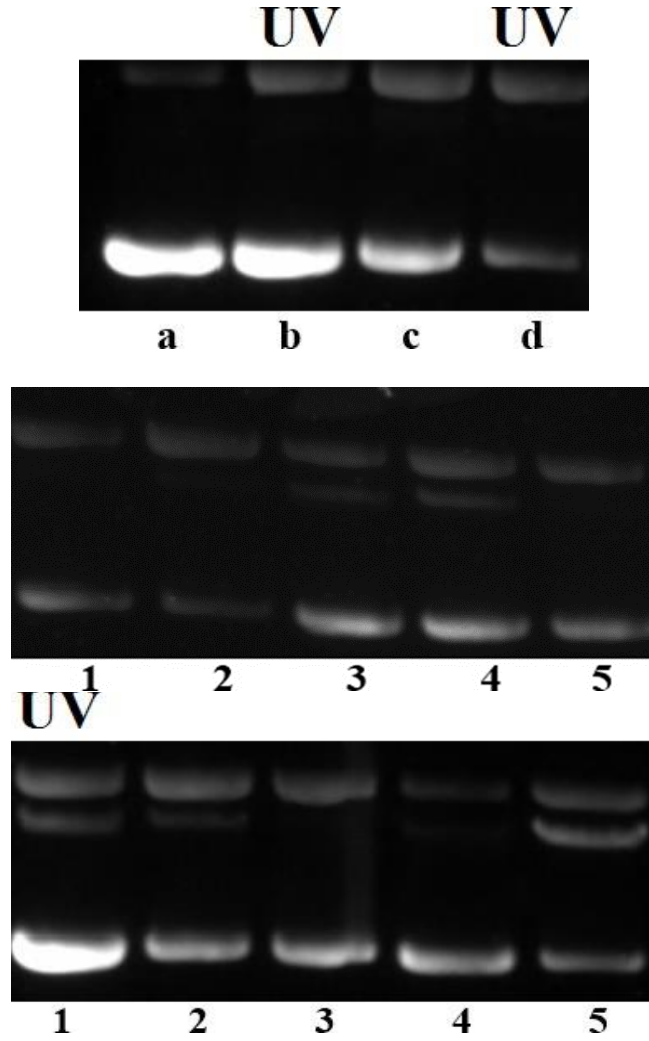
Şekil 31. Komplekslerin indükleyici ajan varlığında oksidatif kesimi

Kuyu içerikleri:

- a: DNA kontrol: 9.5 µL Tris-HCl+ 0.5 µL DNA
- b: DNA kontrol: 7.5 µL Tris-HCl+ 2 µL DMF+ 0.5 µL DNA
- 1: 6.5 µL Tris-HCl+ 2 µL DMF+ 1 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 0.5 µL DNA
- 2: 6.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 1 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 0.5 µL DNA
- 3: 6.5 µL Tris-HCl+ 2 µL DMF+ 1 µL ME+ 0.5 µL DNA
- 4: 6.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 1 µL ME+ 0.5 µL DNA
- 5: 6.5 µL Tris-HCl+ 2 µL DMF+ 1 µL AA+ 0.5 µL DNA
- 6: 6.5 µL Tris-HCl+ 2 µL kompleks+ 1 µL AA+ 0.5 µL DNA

### **6.3.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıklı İndüklenmiş Kesimi**

Plazmid DNA'nın kompleksler tarafından kesim etkinliğine çeşitli kimyasalların aktivatör niteliğindeki etkilerinin ortaya konulduğu çalışmanın ardından ışıkla indüklemenin de katkısının olup olmayacağı incelendi. Bu amaçla 50 mM Tris-HCl (pH 7) içerisinde hazırlanan komplekslerin 100µM kompleks konsantrasyonu ile DNA'nın bulunduğu karışım başka hiçbir ilave ajan olmaksızın UV ışığı altında inkübe edildikten sonra standartize edilen yol takip edildi ve reaksiyon ürünlerinin incelenmesi neticesinde UV ışığının K1, K2 ve K5 de kesimi indüklediği belirlendi (Şekil 32). Yapılan denemelerde pBR322 plazmid DNA'sının kompleksler tarafından kesim aktivitelerine K3 ve K4 de UV ışığının etkisinin, DNA'nın yalnız başına kullanıldığı kontrol denemelerinde oluşturduğu etkiden fazla olmadığı tespit edilmiştir.



**Şekil 32.** Komplekslerin nükleaz etkinliklerinin UV ışığı altındaki değişimi

Kuyuların içerikleri:

a: DNA kontrol: 9.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 0.5  $\mu$ L DNA

b: DNA kontrol: 9.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 0.5  $\mu$ L DNA (UV)

c: DNA kontrol: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L DMF+ 0.5  $\mu$ L DNA

d: DNA kontrol: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L DMF+ 0.5  $\mu$ L DNA (UV)

1: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L (K1)+ 0.5  $\mu$ L DNA

2: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L (K2) + 0.5  $\mu$ L DNA

3: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L (K3) + 0.5  $\mu$ L DNA

4: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L (K4) + 0.5  $\mu$ L DNA

5: 7.5  $\mu$ L Tris-HCl+ 2  $\mu$ L (K5) + 0.5  $\mu$ L DNA

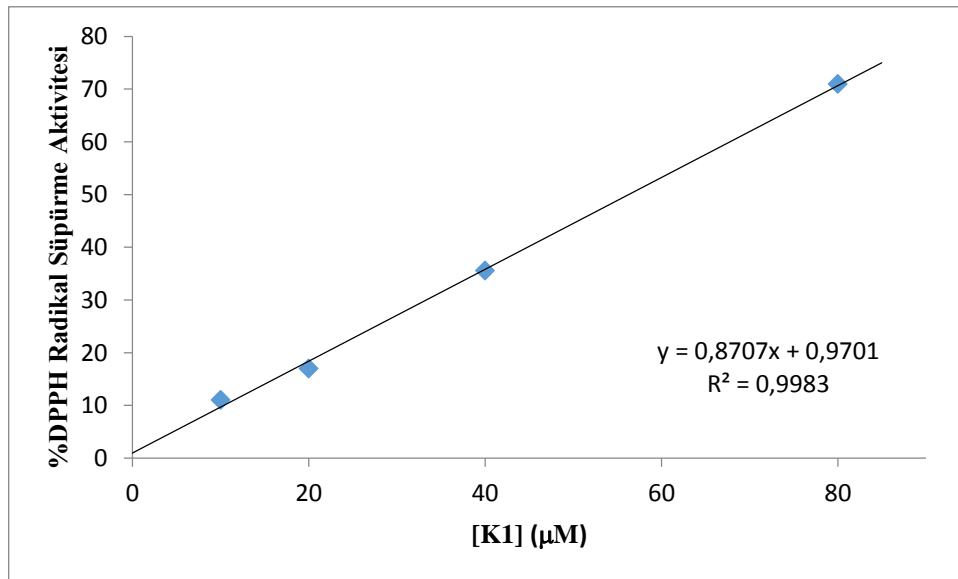
Kompleksler UV ışığı altında ve karanlıkta ayrı ayrı inkübe edilip elektroforeze tabi tutulmuştur.

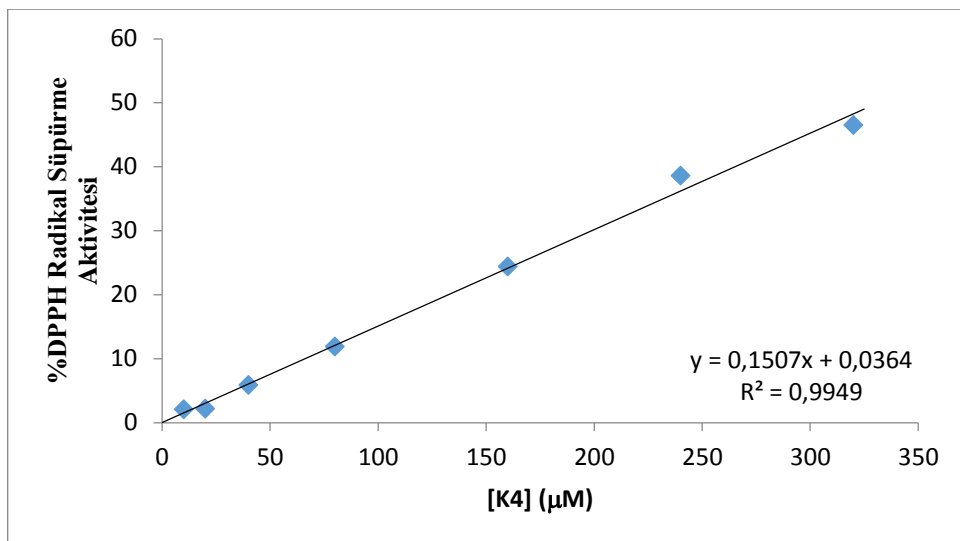
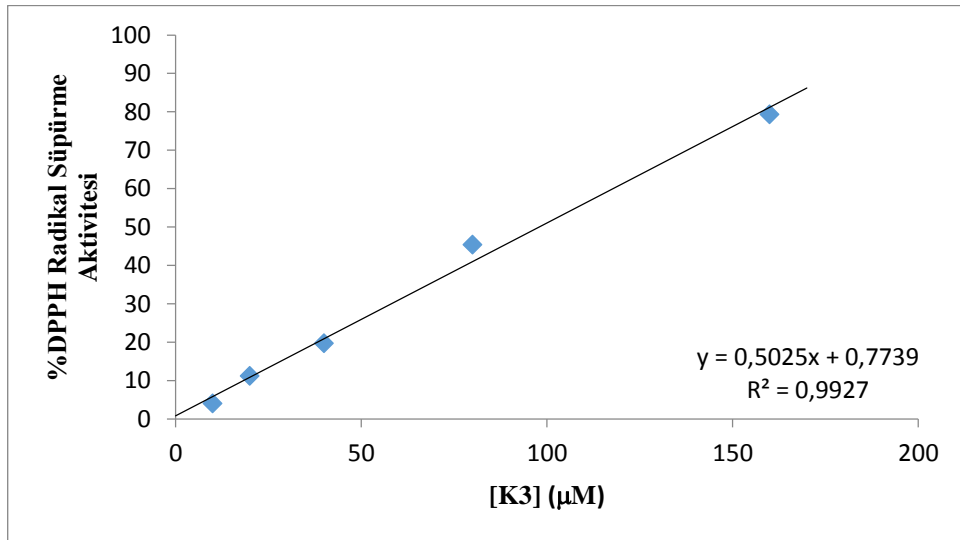
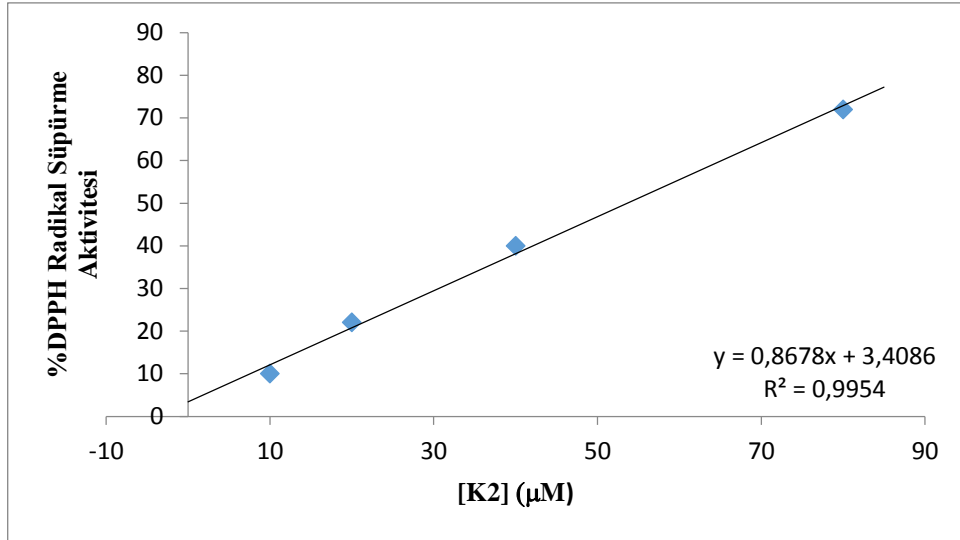
### 6.3.3. Antioksidan Aktivite

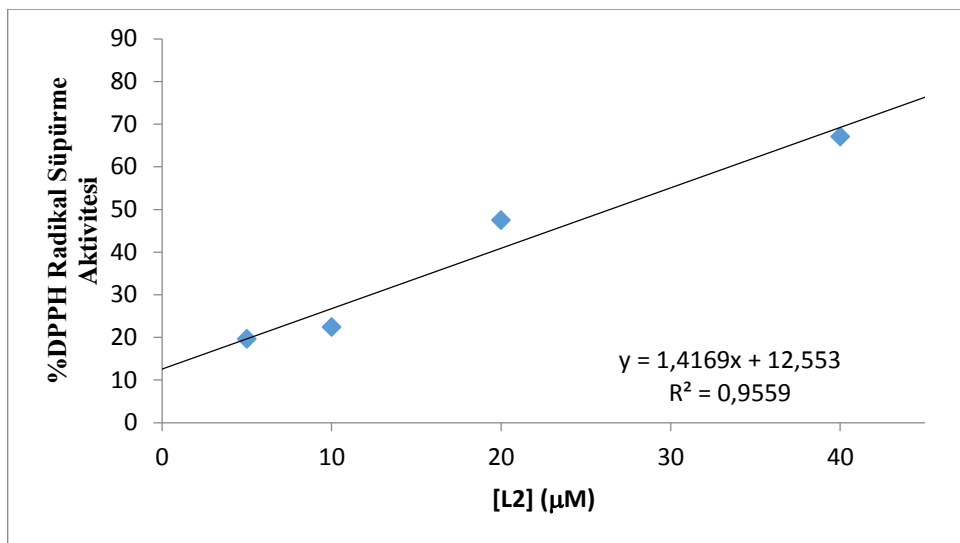
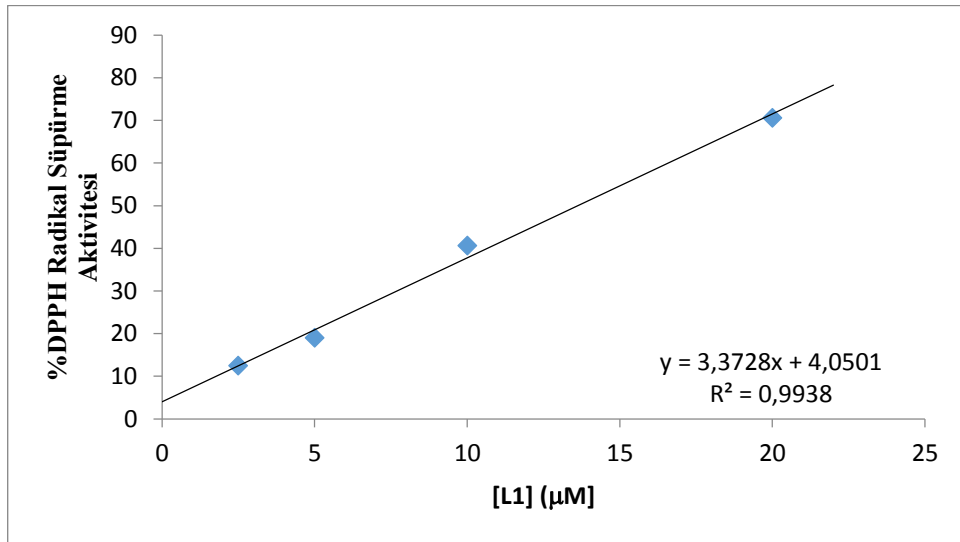
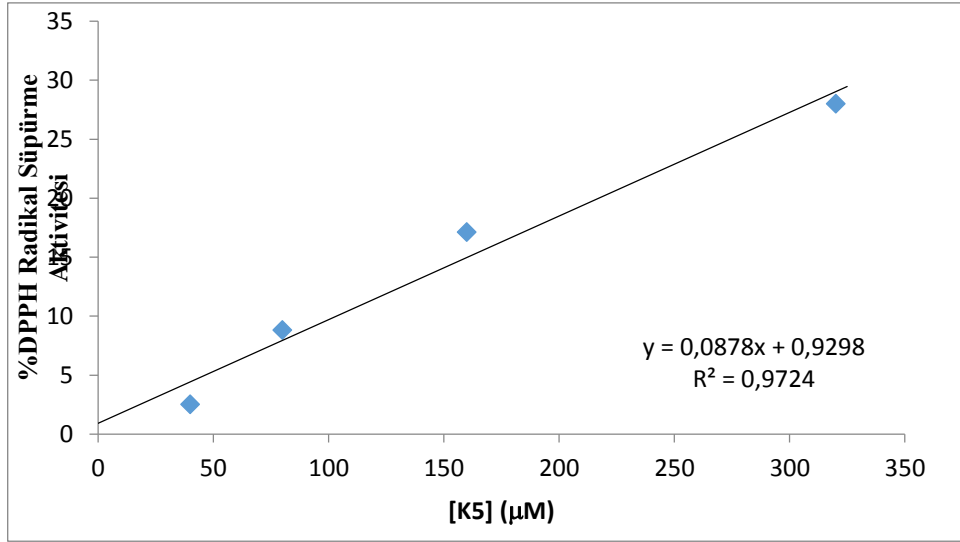
Şimdiye kadar gerçekleştirilen DNA etkileşme çalışmaları ile incelenen komplekslerin iyi derecede DNA bağlanma yeteneği ve iyi derecede kesim aktivitesi gösterdiğinin ortaya konulması sebebiyle bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri çalışmaya değer görülmüştür. Bu yüzden ligand ve komplekslerin antioksidan potansiyellerini incelemek için deneyler gerçekleştirildi. Bu amaçla ligand ve komplekslerin süperoksit ve DPPH radikal süpürme aktiviteleri incelendi.

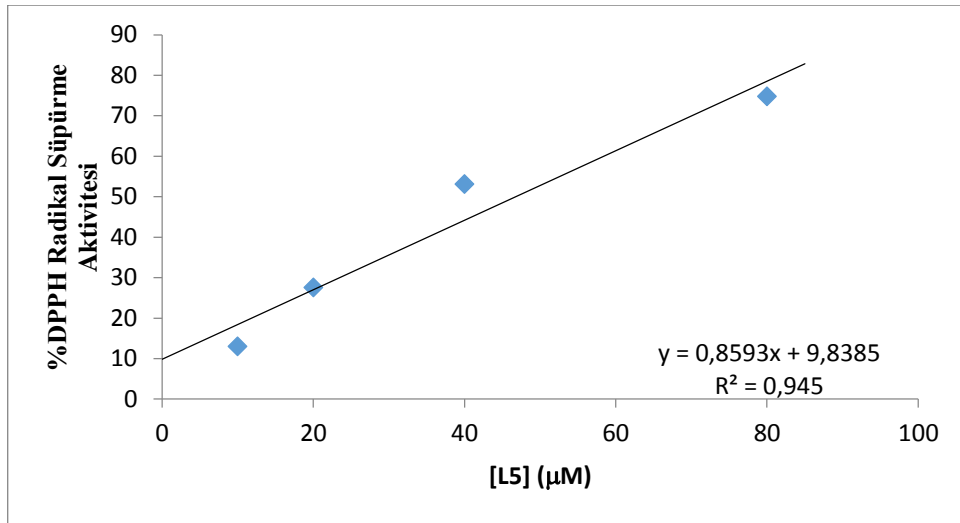
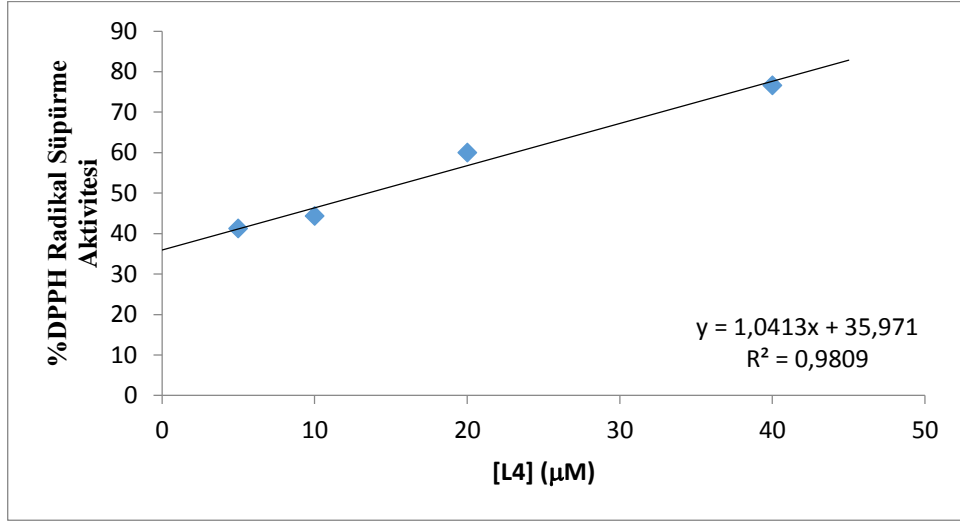
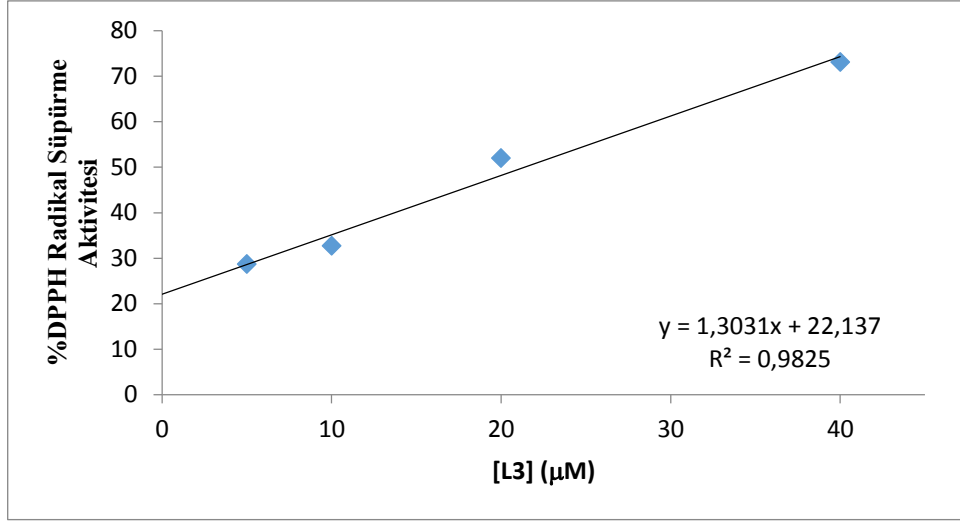
#### 6.3.3.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

İncelenen komplekslerin ve ligandların antioksidan etkinliklerini ikinci bir yolla ortaya koymak amacıyla, hızlı, basit ve uygun bir yöntem olması sebebiyle DPPH radikallerini süpürme aktivitesi de incelendi. Bu amaçla metanol içerisindeki DPPH çözeltilisinin absorbasındaki düşme kompleks ilavesiyle takip edildi. Absorbansın %50 oranında düşmesini sağlayan kompleks konsantrasyonu  $SC_{50}$  olarak değerlendirildi ve bu değer aynı şartlarda bilinen antioksidan maddeler olan AA ve BHA için yapılan denemeden elde edilen  $SC_{50}$  değeriyle karşılaştırıldı (Tablo 6). Bu karşılaştırma sonucunda K1, K2 ve K3 ve ligandların tamamının BHA'ya göre daha düşük  $SC_{50}$  değerine sahip olduğu yani DPPH radikallerini giderme etkinliğinin daha yüksek olduğu ortaya konuldu. AA ile kıyalandığında ise L1, L2, L3 ve L4'ün daha fazla aktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 33).







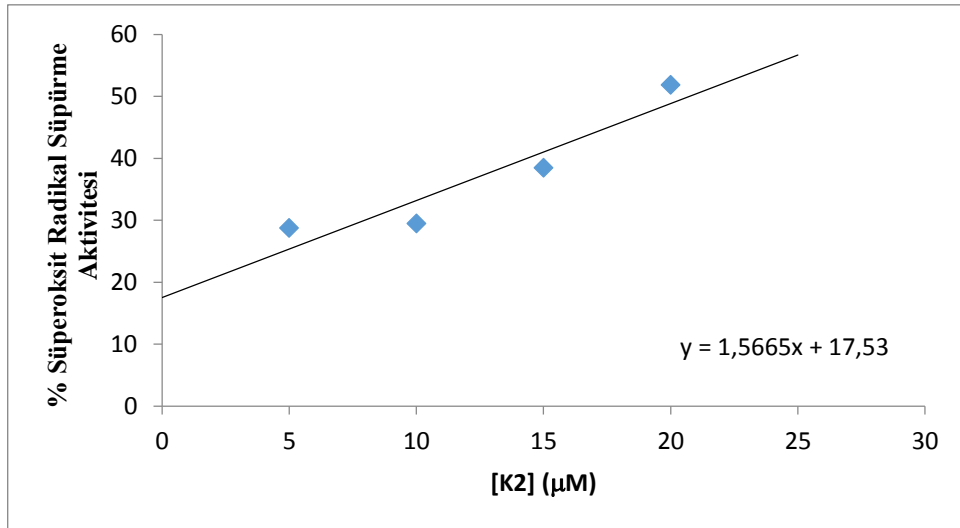
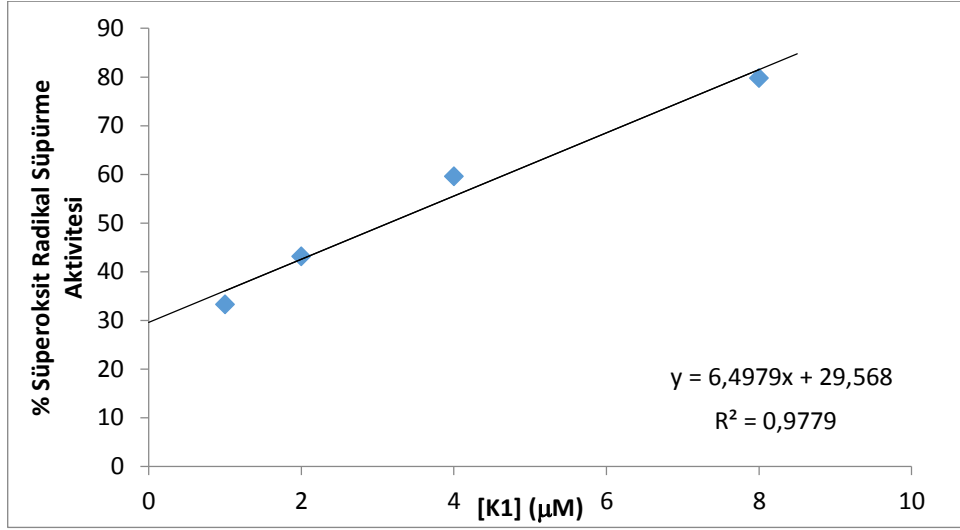


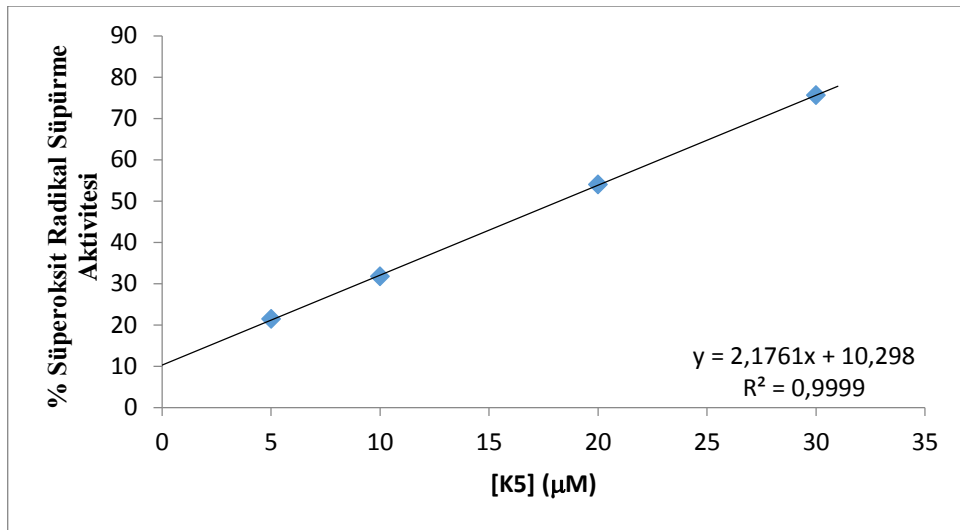
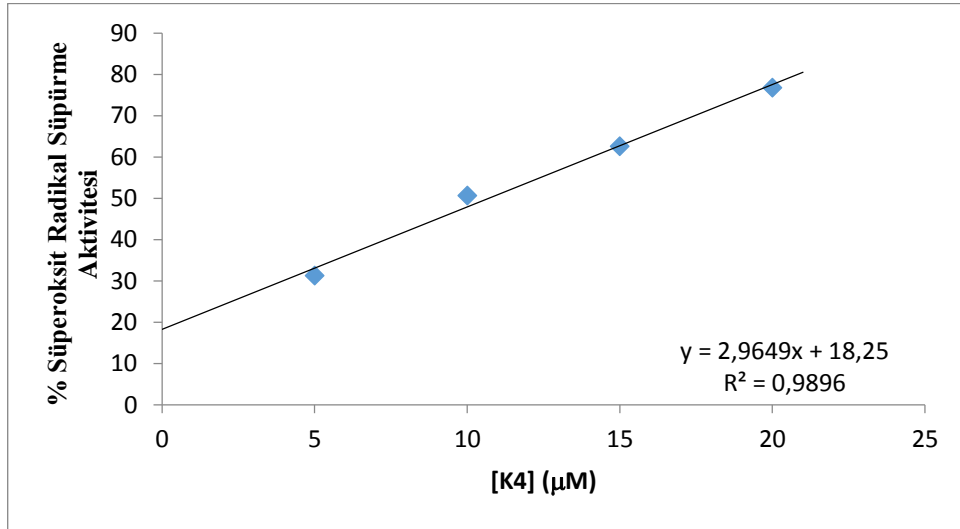
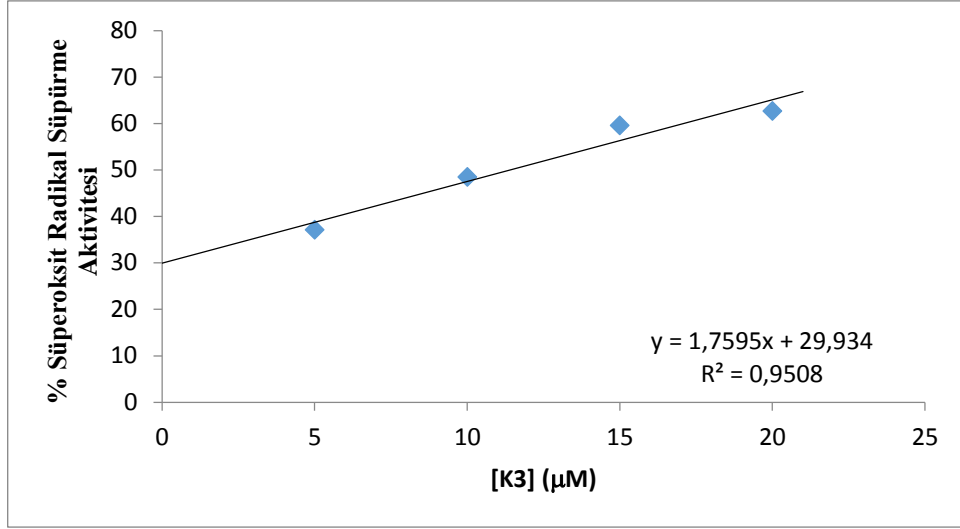
Şekil 33. Kompleks ve Ligandların % DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi-Konsantrasyon eğrileri

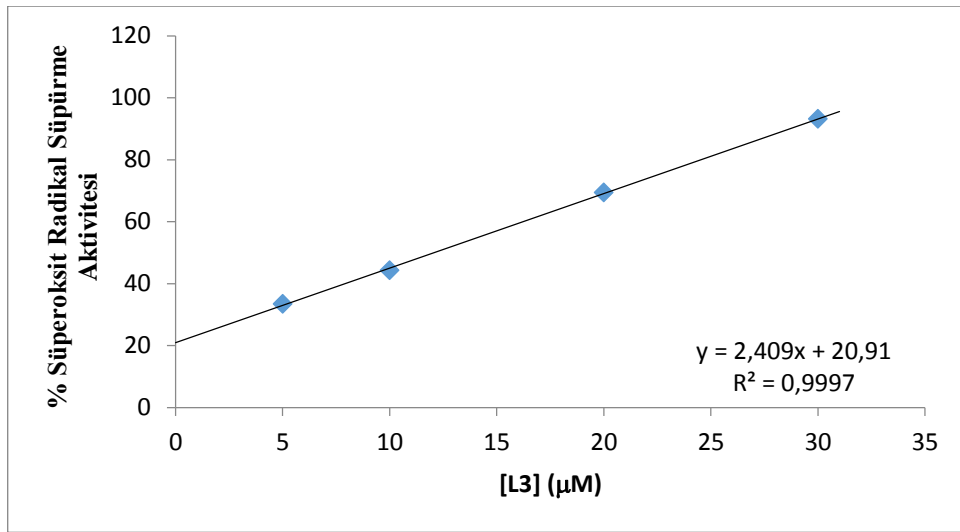
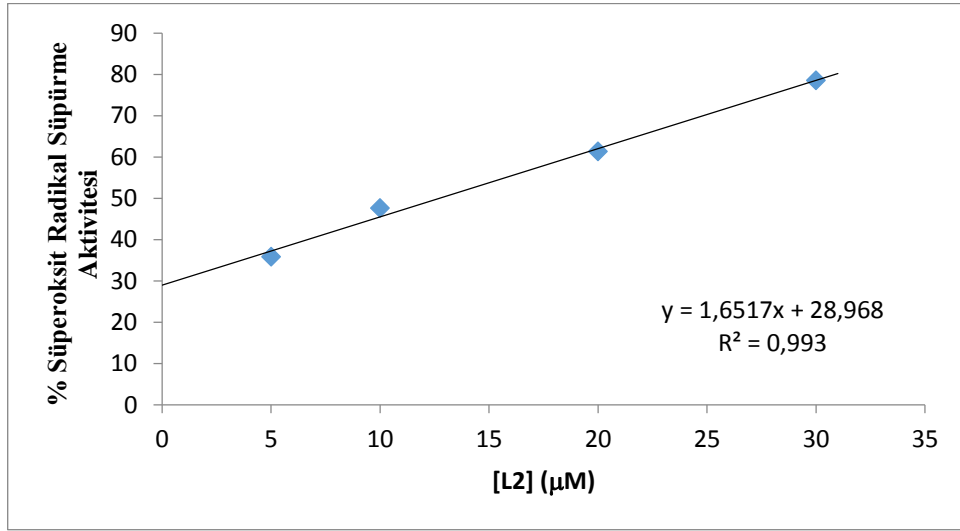
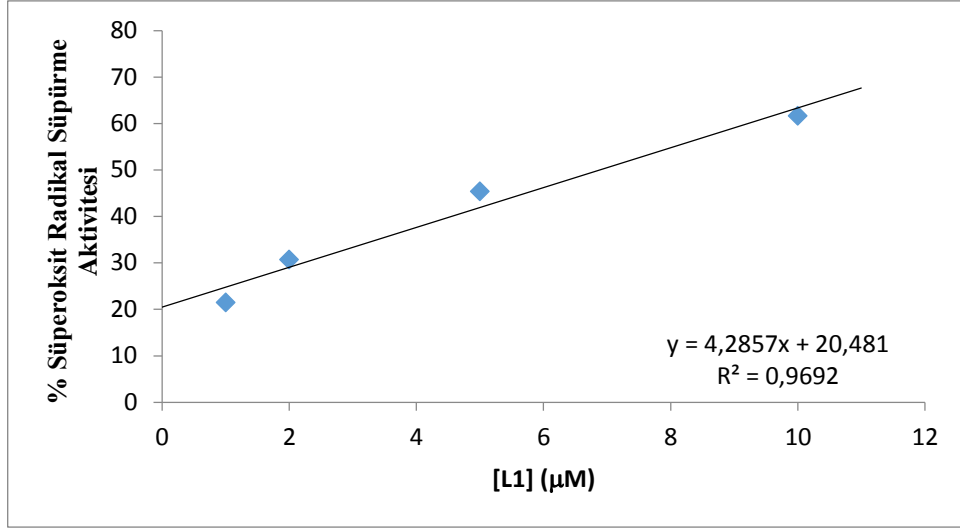


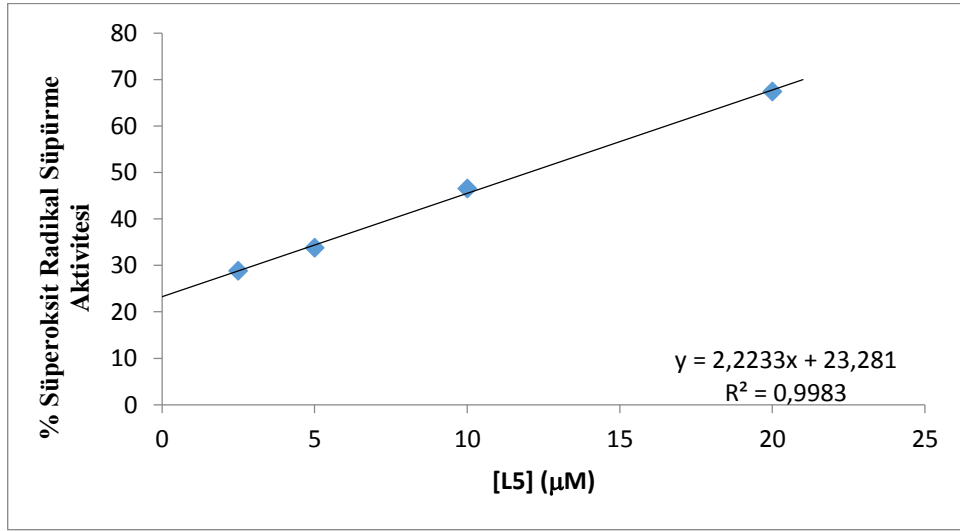
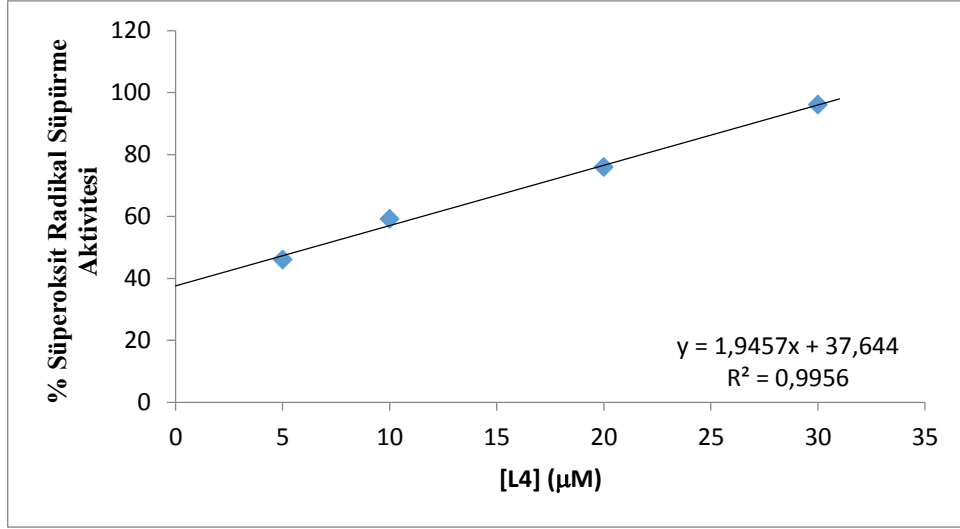
### 6.3.3.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Kompleksler NBT testi ile SOD aktivitesi için biyolojik pH (pH=7.8)'da incelendi. Yapılan çalışmalar sonrasında ortamda oluşturulan süperoksit radikallerinin %50'sini süpüren kompleks konsantrasyonları hesaplanarak aynı yöntemle test edilen ticari SOD enzimi için hesaplanan SC<sub>50</sub> değeri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 34). Elde edilen değerler Tablo 6'da özetlenmiştir.









**Şekil 34.** Kompleks ve Ligandların (SOD) % Süperoksit Radikal Süpürme Aktivitesi-Konsantrasyon grafikleri

Tablo 6'da görüldüğü gibi Süperoksit radikallerini süpürme aktivitesi en fazla olan kompleks K1 dir.

**Tablo 6.** Kompleks ve Ligandların radikal süpürme kapasiteleri ( SC<sub>50</sub> µM)

<b>KOMPLEKS KOD.</b>	<b>DPPH SC<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>SOD SC<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>LİGAND KOD.</b>	<b>DPPH SC<sub>50</sub> µM</b>	<b>SOD SC<sub>50</sub> (µM)</b>
<b>K1</b>	56.3	3.1	<b>L1</b>	13.6	6.9
<b>K2</b>	53.7	20.7	<b>L2</b>	26.4	12.7
<b>K3</b>	98	11.4	<b>L3</b>	21.4	12.1
<b>K4</b>	321.9	10.7	<b>L4</b>	13.5	6.3
<b>K5</b>	558.9	18.2	<b>L5</b>	46.7	12
<b>SOD</b>		<b>0.025</b>			
<b>AA</b>	<b>27.05</b>				
<b>BHA</b>	<b>147</b>				

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

DNA çoğu antikanser ilacının birincil hücre içi hedefidir (167). DNA ile metal komplekslerinin etkileşimi DNA hasarını indükleyerek hücre bölünmesini engeller ve neticede hücre ölümüne yol açar (168). DNA bağlanması çoğu durumda DNA kesimi için kritik adımdır ve kanser tedavisi için tümörün yerleşim mekanizmasının anlaşılmasında muazzam öneme sahiptir (169). Bu sebeple, DNA-bağlanma çalışmaları DNA'yı hedefleyen yeni ve daha etkili ilaçların dizaynı için önemlidir (170). Bu yüzden tez kapsamında incelenen ligand ve komplekslerin DNA'ya bağlanma türü ve eğilimi farklı deneysel tekniklerin yardımıyla analiz edildi.

Spektrumda gözlenen değişiklikler etkileşimin varlığı ve türü konusunda kanıt sağladığı için (171), UV spektroskopik titrasyon DNA'nın metal komplekslerle bağlanma modunu araştırmak için etkili bir metoddur (172). Ayrıca bakır (II) komplekslerinin DNA etkileşimi gösterdikleri bilindiği için (170, 173, 174) tez kapsamında incelenen ferrosen ligandlarının ve bunların bakır komplekslerinin DNA ile etkileşip etkileşmedikleri UV/Vis absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak çalışıldı.

Spektral değişiklikler ilacın DNA'ya bağlanmasını takiben DNA'nın yapısında ve konformasyonunda meydana gelen değişiklikleri yansıtır (175). Metal komplekslerinin DNA ile çeşitli türlerde etkileşimleri rapor edilmiştir. DNA çift sarmalının dış kısmındaki negatif yüklü fosfatlar boyunca gerçekleşen elektrostatik etkileşim, DNA olukları ile etkileşim ve interkalasyon yapan ajanın katlanmamış DNA'nın baz çiftleri arasına yerleştiği interkalasyon modeli önemli bağlanma türlerinden bazılarıdır (176).

Geçiş metal komplekslerinin birçok yararlı uygulamaları komplekslerin DNA ile interkalasyon modu yoluyla bağlanmalarını gerektirmektedir (177). İnterkalatörler DNA çift sarmalının baz çiftleri arasına girebilecek ve etkileşebilecek düzlemsel aromatik heterosiklik bir fonksiyonel grup içeren küçük moleküllerdir (177). İnterkalasyon yoluyla bağlanan bileşikler interkalasyon düzlemsel aromatik kromofor ile DNA'nın baz çiftleri arasında güçlü bir etkileşim içerdiği için genellikle absorpsiyon spektrumunda küçük bir kırmızı ya da maviye kaymayla birlikte ya da kayma olmaksızın hipokromizm ile sonuçlanır (178). Hipokromizm DNA'nın sarmal eksenini boyunca kısalması ve aynı zamanda konformasyon değişimi sonucunda meydana gelirken, hiperkromizm DNA çift sarmalının zarar görmesinden kaynaklanır (175).

Genelde hiperkromizm ve hipokromizm DNA'nın çift sarmal yapısındaki değişikliklerle ilgili spektral özelliklerdir. Hiperkromizm DNA'nın ikincil yapısının kırılması anlamına gelirken hipokromizm kompleksin DNA'ya elektrostatik etki ile veya sarmalı kararlaştırabilen bir etkileşim türü olan interkalasyon ile bağlandığını göstermektedir (179, 180).

Metal interkalatörlerin DNA'ya bağlanma gücünün, etkileşen aromatik halkanın büyüklüğü ve elektron yoğunluğuna bağlı olduğu kadar aynı zamanda hidrofobik ve hidrofilik etkileşimlerin birleşmiş etkisine de bağlı olduğu tahmin edilmektedir (181). İnterkalatör bileşiğin koordine aromatik halkalarının düzlemselliği ve ayrıca istiflenme, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimler arasındaki kooperativite tarafından sağlanan ilave kararlılık da DNA bağlanma ilgisini etkileyecektir (182). Özetle söylenecek olursa, genel olarak interkalasyon DNA'ya bağlanan bileşik üzerinde kısmi bir hidrofobik, polar ve düzlemsel bölge gerektirmektedir ancak interkalatör ile DNA arasındaki elektrostatik, dipoldipol ve H-bağı etkileşimleri de önemlidir (114).

Çalışılan komplekslerin absorpsiyon spektrumlarında artan CT-DNA ilavesiyle meydana gelen spektral değişiklikler incelendiğinde tüm komplekslerin maksimum absorbanlarında düşme (hipokromizm) gözlemlendi. Ancak maksimum absorbanın olduğu dalga boyunda bazı komplekslerde kırmızıya (yüksek dalga boyu, batokromik), bazı komplekslerde ise maviye (kısa dalga boyu, hipsokromik) kayma gözlenirken bileşiklerin sadece dört tanesinde de (K1, K3 ve L2) absorbansta sırasıyla %20, %42, %39 ve %20 oranında dikkate değer ölçüde azalma gözlenmesine rağmen herhangi bir kayma gözlenmedi. Bu tür spektroskopik değişiklikler kompleksin DNA ile interkalasyon yolu ile etkileşim yaptığı anlamına gelmektedir. Kompleks/ligand DNA'nın baz çiftleri ile interkalasyon etkileşimi yaptığında ligand/kompleks'in aromatik halkasının  $\pi^*$  orbitali, baz çiftlerinin orbitalleri ile çiftleşerek  $\pi-\pi^*$  geçiş enerjilerini düşürür (183). Böylece dalga boyunda kayma gerçekleşir. Öte yandan örtüşen  $\pi$  orbitali kısmen elektronlarla doludur böylece geçiş olasılıklarında düşmeyle birlikte beraberinde hipokromizm ile sonuçlanır (184). Genellikle interkalasyon yoluyla bağlanmanın gücü hipokromizmin büyüklüğü ile paralel olduğu için (185) çalışılan bileşiklerler arasında en güçlü etkileşimi L3 ligandının yaptığı söylenebilir.

Komplekslerin DNA ile etkileşimini daha ileri düzeyde ortaya koymak için iyi bilinen bir interkalatör olan etidyum bromür (EB) (188) kullanılarak absorpsiyon spektroskopisi tekniğiyle (189) yarışmalı bağlanma denemesi uygulandı. 480 nm civarında absorpsiyon maksimumuna sahip olan serbest EB, DNA ile etkileştiğinde maksimum absorpsiyon, absorpsiyondaki azalmayı takiben daha yüksek dalga boyuna kaymaktadır. Bu durum EB'nin DNA baz yığınları arasına interkalasyon yaptığının bir kanıtıdır (190). Şekil 27'de görüldüğü gibi serbest EB'nin absorpsiyon maksimumu (480 nm) DNA varlığında 482 nm'ye kaymış ve absorpsiyon yoğunluğu azalmıştır. Ancak EB-DNA çözeltisine komplekslerin ilavesiyle komplekslerin DNA'ya bağlanmak için EB ile yarıştığına göstergesi olacak şekilde absorpsiyon yoğunluğunda artış gözlenmiştir. Absorpsiyon spektrumunda gözlenen bu değişikliklerin iki nedeni olduğu düşünülmektedir. İlki; EB komplekslere kuvvetlice bağlanır bu durumda DNA ile interkalasyon yapan EB miktarının azalmasına yol açar. Diğeri ise DNA ile interkalasyon yapmak için komplekslerle EB arasında bir yarış vardır ve DNA-EB sisteminden bir miktar serbest EB salınır.

Yeni bir absorpsiyon piki oluşmadığı için ilk varsayım daha az desteklenmektedir (191). Çalışmada incelenen tüm komplekslerin benzer eğilimler gösterdiği gözlemlendi. Yukardaki bilgiler ışığında elde edilen sonuçlar komplekslerin DNA ile interkalatif yolla etkileştiğini açıkça göstermektedir. EB ile yarışmalı bağlanma çalışmaları literatürde yaygın bir şekilde floresans spektroskopisi ile incelenmesine rağmen (192, 193) absorpsiyon spektroskopisi tekniğiyle yapılan ve sonuçların benzer şekilde yorumlandığı çok sayıda çalışma da bulunmaktadır (189, 192, 195).

DNA erime profili sarmal kararlılığı hakkında oldukça bilgi verici (196) olduğu için farklı bağlanma modlarını ayırt etmek amacıyla DNA erime denemeleri uygulanmaktadır (195). Bu amaçla çift sarmal DNA'nın tek zincirli nükleik asitlere dönüşümünü karakterize eden DNA'nın erime sıcaklığı ( $T_m$ ) 260 nm'de sıcaklığın fonksiyonu olarak absorpsiyon takip etmekle belirlenmektedir (197).  $T_m$ , DNA'daki baz çiftlerinin yarısının eşleşmemiş olduğu sıcaklık olarak tanımlanmaktadır (198).

$T_m$ , çift sarmalın kararlılığıyla kesinlikle ilişkilidir ve kimyasalların DNA ile etkileşimi  $T_m$ 'yi değiştirebilir (182). Bu değişiklik 260 nm'de çift sarmal formdaki DNA bazlarının molar absorblama katsayısının tek zincirli formdakinden daha düşük



olması sebebiyle 260 nm'de absorbanstaki artış nedeni ile ilişkilidir (41, 199-201). Literatüre göre doğal ya da sentetik bileşiklerin DNA ile etkileşimi, istiflenme etkileşimlerini kararlaştırması sebebiyle, çift sarmalın kararlılığıyla sonuçlanır ve DNA'nın erime sıcaklığında bir artışa neden olur (202, 203). Bir tampon çözelti içerisindeki DNA'nın erime sıcaklığı ile DNA bir kimyasal ile birlikte olduğu durumdaki erime sıcaklıkları arasındaki farklılık bileşiğin DNA'ya bağlanması interkalasyon ile gerçekleşirse genellikle büyüktür. Öte yandan, DNA'ya bağlanma şekli interkalatif değilse erime sıcaklıkları arasındaki farklılık genellikle daha küçüktür (196).  $T_m$ 'deki artış DNA'daki interkalasyon bölgelerinin sayısı ile doğrudan orantılıdır (204).

UV-Vis absorpsiyon titrasyonları ile interkalasyon yoluyla etkileştiği düşünülen tez kapsamında incelenen komplekslerin yarışmalı EB bağlanma çalışmaları sonucunda da DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlandıkları gösterilmiştir. Bu düşüncelerin farklı bir teknikle bir kez daha desteklenmesi amacıyla CT-DNA'nın ligand ve kompleksler olmaksızın ve onların varlığında termal erime eğrilerinin çizilmesiyle elde edilen  $T_m$  değerleri incelendi. Literatürden elde edilen bilgiler ışığında erime sıcaklığındaki 5-12 C° arasındaki artışların DNA ile interkalasyon türü bağlanmaya işaret ettiği belirlenmiştir (205). İncelenen kompleks ve ligandların  $T_m$  değerlerindeki artış, K5 için 10.2, L5 için 10.95, K1 için 7.25 C° olarak belirlenmiş olup bileşiklerin CT-DNA ile kararlı şekilde istiflenerek interkalasyon yoluyla etkileştiğini desteklemektedir (182). K2 için  $T_m$  değeri 4.05 C° dir ve kompleksin parsiyel interkalasyon bağlanma ile CT-DNA ile etkileştiğinin göstergesidir. Diğer bileşiklerde gözlenen erime sıcaklığındaki küçük artışlar kompleksin DNA ile interkalasyon dışındaki bağlanma türleri ile etkileştiğini göstermektedir (206).

Kimyasal nükleazlar DNA'yı oksidatif bir yolla kesebilen redoks aktif koordinasyon kompleksleridir (184). Sentetik metalonükleazlar, metal iyonunu etkili bir şekilde DNA kalıbının yakınına ulaştıran ligandlara gereksinim duyarlar (173). Geçiş metal komplekslerinin nükleaz etkinliğini ortaya koyabilmek için jel elektroforezi yaygın olarak kullanılan bir tekniktir; bu metotta moleküllerin izolasyonu bir jel aracılığıyla elektrik alanı etkisi altında hareketlerinin kısmi hızına bağlı olarak gerçekleşmektedir. DNA negatif yüklüdür ve elektrik alanına yerleştiğinde anoda doğru hareket eder,

DNA'nın göçünün boyutuna, elektrik alanının gücü, tampon ve agaroz jelinin yoğunluğu ile DNA'nın büyüklüğüne bağlı olarak karar verilir. Doğal olarak elde edilen plazmid DNA başlıca kapalı çemberimsi süpersarmal formda (Form I) olduğu kadar, kırık (Form II) ve küçük parçacıklar halinde lineer form (Form III)'dadır. Küçük moleküllerin plazmid DNA ile interkalasyonu süpersarmal formdaki DNA'yı gevşetebilir veya kesebilir bu durum hareket hızını azaltır böylece agaroz jel elektroforez metodu ile ayrı ayrı görüntülenebilirken, küçük moleküllerin DNA ile basit elektrostatik etkileşimi plazmid DNA'nın süpersarmal formunu önemli derecede etkilemez böylece süpersarmal DNA'nın hareketi değişmez (207). Bu çalışmanın başlıca amaçlarından biri incelenen metal komplekslerinin antikanser bileşik olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceğini ortaya koymaktır. Genel olarak metal komplekslerinin biyolojik aktivitelerinin, bu metal komplekslerin DNA'ya bağlanma, DNA'nın yapısına zarar verme ve fonksiyonunu bozma özellikleriyle yakın şekilde ilişkili olduğuna inanılmaktadır (208). DNA fonksiyonunun bozulması replikasyon ve transkripsiyon işlemlerinin inhibisyonuna yol açar. Eğer DNA lezyonları çabuk ve uygun bir şekilde onarılmazsa neticede hücre ölümü ile sonuçlanır (193). Bu nedenle metal iyonları ile aktive edilen DNA'nın endonükleolitik kesim reaksiyonlarına oldukça ilgi vardır (209-211). Bu bilgiler ışığında eğer incelenecek komplekslerin DNA kesim aktivitesi gösterdiği ortaya konulursa kanser tedavisinde terapötik amaçla kullanılabilme imkanı bulacağı açıktır. DNA kesimi oksidatif veya hidrolitik yolla gerçekleşmektedir (212, 213). DNA'nın hidrolitik kesimi fosfodiester bağının hidrolizini içerir ve daha sonra tekrar birleşen parçalar oluşturarak bu işlemi genomik araştırmalarda önemli hale getirir. Aksine DNA'nın oksidatif kesimi şeker ve/veya bazın yıkımına yol açarak bu işlemi sıra analizi ve terapötik uygulamalar için uygun kılar. DNA'nın fotokimyasal yolla oksidatif kesimi farklı dalga boylarındaki ışığı kullanarak kanserin fotodinamik tedavisinde uygulama alanı bulur. Bu nedenle bu çalışmada farklı koşullar sağlanarak farklı tür kesim aktivitelerinin varlığı incelendi.

Plazmid DNA'nın herhangi bir ilave ajan ve ışık gerektirmeyen bir yolla kesiminin ortaya konulduğu çalışmalar biyolojik olarak öneme sahiptir (189). Hidrolitik kesim etkinliğinin en etkin olduğu koşulları belirlemek için yapılan incelemeler sonucunda çalışma kapsamında incelenen tüm komplekslerin DNA'yı herhangi bir

indirgeyici ajan olmadan kesibilme yetenekleri olduğu için hidrolitik kesim aktivitesi gösterdiği ortaya konuldu.

Son zamanlarda, geçiş metal bileşiklerinin in vitro ortamda DNA ile reaksiyonları yaygın bir şekilde çalışılmaktadır. Fakat bu çalışmaların büyük bir kısmı hidrojen peroksit (214), askorbik asit (215), merkaptopropiyonik asit (216) veya potasyum monopersülfat (217) gibi redoks kofaktörlerinin varlığında gerçekleştirilmektedir. Canlı organizmaların metal kompleksleri ile katalizlenmiş DNA hasarı üretebilmeleri için yeterli redoks kofaktörü temin etmeleri çok zor olduğu için (218) herhangi ilave redoks kofaktörü olmaksızın geçiş metal bileşiklerinin DNA kesim çalışmaları daha çok tercih edilmektedir. Bu sebeple incelenen komplekslerin hidrolitik kesim kabiliyetine sahip olmaları oldukça önemlidir.

Literatüre göre, hidrolitik yol için kesin olmayan bir mekanizma önerilebilir. Metal atomu ile ligandın oksijen atomu metallerin yükseltgenmiş hallerindeki kuvvetli asit özelliği sayesinde DNA iskeletinin fosfat grubunun oksijeni ile koordinasyon yapabilir ve DNA'nın fosfodiester bağının kırılmasına yol açabilir (189). Başka bir deyişle, hidrolitik mekanizma genellikle yük nötralizasyonu aracılığıyla nükleofilik saldırı yoluyla fosfodiester bağlarını aktiveştirmeye yardım eden ve böylece diester bağlarının doğrudan hidrolizine yol açan merkez metal iyonunun Lewis asiditesine bağlıdır (178).

Fakat bir fosfodiester bağının N-içeren ligandların (çalışmada incelenen ligandlar bu karakterdedir) bulunduğu kompleksler tarafından da hidrolitik olarak kesilebileceği daha önce rapor edilmiştir (219) bu durum da göz ardı edilemez.

DNA kesimi üzerinde iyonik gücün etkisi önemlidir. Artan iyonik güçle birlikte DNA kesimi azalmaktadır. Komplekslerin çoğunun bulunduğu ortamlarda 5 mM NaCl konsantrasyonunun üstüne çıkıldığında nükleaz aktivitesindeki belirgin azalma, elektrostatik etkileşimin DNA kesim reaksiyonunu bir derecede etkilediğini göstermektedir. Benzer bir çalışma literatürde Zhu ve arkadaşları (2010) tarafından tetraazamakrosiklik oksamido nikel(II) kompleksleri üzerinde yapılmış ve elde edilen benzer sonuç aynı şekilde yorumlanmıştır (220).

DNA'nın oksidatif kesiminin mekanizması elektron transfer süreçlerine, rol alan aktif türlere ve hedef bölgelere dayanarak farklı kategorilere ayrılabilir. Bu mekanizmalarda, reaktif oksijen veya metal-okso türleri (ROT/RMOT), nükleobaz modifikasyonları veya tek elektron transferi (SET), hidrojen atom transferi (HAT) veya protonla eşleşmiş elektron transferini içeren şeker biriminden hidrojen çıkarılması işlemleri rol alır (212).

Farklı metalonükleazların DNA-kesim kabiliyeti reaktif türlerin reaktivitesi tarafından yaygın bir şekilde belirlenir. Aerobik ortamda veya yardımcı oksitleyicilerin {Askorbat,  $H_2O_2$ , MPA (3-merkaptopropiyonik asit), DTT (ditiyotritol), MMPP (magnezyum monoperoksifitalat), PAA (poli akrilik asit)} varlığında pek çok reaktif araürün ( $\cdot OH$ ,  $\cdot O_2^-$ ) oluşur (221). Moleküler oksijenin indirgenmesi süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) gibi ROT'ların bir grubunu oluşturabilir. Hidrojen atomlarını DNA bazlarının çift bağlarına ekleyerek ya da şeker biriminden hidrojen atomlarını çıkararak DNA hasarına aracılık eden  $\cdot OH$  radikali aşırı derecede güçlüdür ve 2.8 V'luk redoks potansiyeli ile birlikte kolay difüze edilebilen bir oksidandır (222). Singlet oksijen ( $^1O_2$ ) oksijenden türeyen başka bir radikal türüdür ve sıklıkla DNA'nın oksidatif kesiminde enerji transferi ile rol alır. Çeşitli ligandların çevrelerinde olduğu geçiş metal iyonları birincil ve ikincil RMOT'ların yanında ROT'ları oluşturmak üzere redoks çevriminde anahtar bir rol oynar (221).

Bu bilgilerin ışığında, herhangi bir ilave ajan olmaksızın uygun koşulların sağlanmasıyla Form I halindeki plazmid DNA'yı Form II ve Form III'e dönüştürme yeteneklerine sahip olan tez kapsamında incelenen komplekslerin hidrolitik kesim aktivitelerine bazı kimyasalların etkisini incelemek amacıyla yapılan denemede askorbik asit (AA) ve  $H_2O_2$ 'nin önemli derecede aktivatör etkisi gösterdiği ancak bir indirgeyici olan  $\beta$ -merkaptetanol (ME)'un aktivatör etkisinin K2, K5 dışında yok denecek kadar az olduğu tespit edildi.

İlk olarak sadece AA, ME ve  $H_2O_2$  kullanılarak kompleksler olmadan yapılan kontrol denemelerinde önemli bir DNA kesiminin gözlenmemiş olması bu komplekslerin kesimdeki katalitik rolünü ortaya koymaktadır. Tüm kompleksler  $H_2O_2$  ve AA varlığında göze çarpan bir kesim etkinliği göstermişlerdir. Bunun sebebinin hidroksil radikallerinin artan üretimi sebebiyle olabileceği düşünülmektedir (223).

Hidroksil radikalleri çeşitli kimyasal ve fiziksel proseslerle üretilmektedir. Geçiş metallere aracılık yaptığı hidroksil radikali üretiminin birkaç yolla oluştuğu bilinmektedir. İyi bilinen bir yol Fenton mekanizmasıdır (224). Bu OH<sup>\*</sup> radikalleri deoksiriboz kısmının oksidasyonunda rol alır ve şeker fosfat iskeletinin hidrolitik kesimiyle sonuçlanır. Chiou ve arkadaşları (1985) oksijen ve metal iyonları varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretebilme kabiliyeti sebebiyle askorbatın, sulu çözeltide hızlıca dismutasyona maruz kalan süperoksit ürettikleri bilinen MPA ve DTT gibi diğer indirgeyici ajanlardan daha fazla etkili olduğunu göstermiştir. Mevcut çalışmada da, DNA kesimi için en iyi aktivatörün AA olduğu saptanmıştır (225).

Işıkla indüklenmiş DNA kesimi, elektron ve enerji transferinin yaygın olarak gözlemlendiği işlemler sonucunda foto sitotoksik etki oluşturmak üzere ışığın, oksijenin ve ışığa karşı duyarlı ilaçların aynı ortamda birlikte bulunmasını gerektirmektedir (226). Toksikite oluşumuna yol açmayan ve yüksek seçici nitelikte olan ışıkla uyarılmış DNA kesimi katı tümörlerin tedavisi amacıyla artan bir ilgi görmektedir (184). DNA'nın oksidatif kesimi için kabul edilen stratejilerden biri olan UV ışığı ve doğal ışıkla uyarmaya dayanan yöntem tümör tedavisindeki potansiyel kullanımı nedeniyle önem kazanmıştır (227).

Fotodinamik terapi ajanları genellikle hücre ölümüne yol açan singlet oksijen ya da hidroksil radikalleri üreterek moleküler oksijeni etkinleştiren bir foto duyarlayıcı kullanmaktadır (228). Tez kapsamında incelenen kompleksler DNA ile birlikte UV ışığına maruz bırakılmış ve ardından gerçekleştirilen reaksiyon sonrasında incelenen kesim ürünleri ışıkla indüklemenin indüklenme yapılmayana göre K1, K2 ve K5 komplekslerinde kesimi arttırdığı görülmüştür. Buna göre komplekslerin etkisiyle gerçekleşen kesim esnasında ışık etkisiyle artan bir elektron ya da enerji transferinin olduğu ve bunun sonucunda oluşan ROT'ların miktarında bir artış meydana geldiği düşünülebilir. Bu sebeple bu bileşiklerin fototerapide kullanılma potansiyeline sahip olduğu söylenilebilir. Daha ileri düzeyde yapılacak olan çalışmalarda Chen ve arkadaşlarının (2013) rapor ettikleri çalışmada olduğu gibi oksidatif kesim şartlarında yani ortamda bir aktivatör varken ışığa maruz bırakma ve sonrasında kesim ürünlerinin incelenmesi gerçekleştirilebilir. Bu şekilde ROT'ların oluşumunun artabileceği tahmin edilmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin önemi uzun zamandır ilgi görmektedir. Hidroksil radikalleri ( $\cdot\text{OH}$ ) ve süperoksit anyon radikalleri ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) gibi serbest radikalleri içeren ROT aktive edilmiş oksijenin çeşitli şekilleridir ve hücrel hasarı ve yaşlanma sürecini kötüleştirmektedirler (207). ROT'un üretimi aerobik organizmaların yaşamında normal bir süreçtir. Oksidatif stres ya da ROT'un aşırı üretimi birçok hastalığa neden olmaktadır. Bu zararlı etkileri giderebilme yeteneği ile serbest radikal süpürme etkinliği biyolojik sistemlerde antioksidanların çok önemli bir özelliğidir (229).

Antioksidanlar insan vücudunu SR'ler ve ROT'un etkilerinden koruyabilirler ve hem birçok kronik hastalığın sürecini hem de lipid peroksidasyonunu yavaşlatırlar (207). Son zamanlarda yapılan çalışmalar geçiş metal komplekslerinin ilginç antioksidan aktiviteler gösterdiklerini öne sürmektedir (186, 187). Bu yüzden tez kapsamında incelenen ligand ve komplekslerin potansiyel antioksidanlar olarak araştırılması önemlidir. Yapılan incelemeler sonrasında incelenen bileşiklerin dikkate değer ölçüde antioksidan aktivite gösterdikleri ortaya konuldu.

Elde edilen bulgular, incelenen komplekslerin süperoksit radikallerini süpürme etkinliklerinin ticari olarak temin edilen enzim kadar yüksek olmadığını göstermesine rağmen, dikkat çekecek ölçüde yüksek bulunmuştur (K1 için  $\text{SC}_{50}$  3,1  $\mu\text{M}$ ). Elde edilen  $\text{SC}_{50}$  değerleri literatürde çalışılan geçiş metal kompleksleri için elde edilen bulgularla uyum göstermektedir. Örneğin 2, 6-di ((fenazonil-4-imino)metil)4-metilfenol ligandının Co ve Zn kompleksleri için  $\text{SC}_{50}$  değerleri sırasıyla 39.1  $\mu\text{M}$  and 55.8  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (230). Ayrıca, SOD'un farmasötikal amaçlarla kullanımına ilişkin yoğun ilgi olduğu ancak biyolojik sistemlerdeki pratik kullanımının dolaşım ömrü, hücrenin geçirgen olmayışı, immünojenite, doku hedefleme, antijenite, yüksek maliyet ve proteinin sistematik enfeksiyonu ile ilgili güçlükler sebebiyle problemli olduğu bilinmektedir ve bu sınırlamalardan kaçınmak için, düşük molekül ağırlıklı, biyolojik kararlılığa sahip, membran geçirgenliği olan, düşük maliyetli ve toksik olmayan sentetik SOD mimiklerinin geliştirilmesine yoğun ilgi vardır (231). Bu nedenle incelenen kompleks ve ligandlar SOD enzim mimiği olarak kullanılabilir niteliktedir.

Günümüzde, DPPH radikal süpürme aktivitesi sergileyen antioksidanlar gittikçe artan bir ilgi görmektedir. Bu tür antioksidanların kanser, yaşlanma ve iltihap önleyici

özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (232). DPPH süpürme aktivitesi bir bileşimin radikal süpürme gücünü tayin etmek için kullanılan basit bir metoddur (233). Bu metod antioksidanların DPPH radikalini daha kararlı bir DPPH formuna indirgeme kabiliyetine dayanmaktadır. DPPH radikali 520 nm civarında bir absorpsiyon maksimumuna sahiptir. Serbest radikal süpürücü varlığında DPPH absorbanstaki azalmayla birlikte indirgenmiş hale dönüşür (229). İncelenen kompleks ve ligandların dikkate değer ölçüde düşük SC<sub>50</sub> değerlerine sahip olduğu gözlemlendi.

Ligandların yapısındaki aktif hidroksil gruplarının kararlı makromolekül radikali oluşturmak üzere serbest DPPH radikali ile reaksiyona girebileceği ve böylece yapıdaki aktif hidroksil gruplarının antioksidan aktiviteye katkıda bulunabileceği düşünülebilir (234). Çalışmamızda incelenen komplekslerin ligand kısımları bu tür gruplar içermektedir. Askorbik asite göre daha yüksek derecede DPPH radikali süpürme aktivitesi göstermeleri bu duruma bağlanabilir. Çünkü yapısında böyle bir grubun bulunmadığı benzaldehid 4-metil-3-tiyosemikarbazon ligandının rutenyum(II) kompleksinin askorbik asite göre DPPH radikallerini süpürmede daha düşük etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (235).

## 8. KAYNAKLAR

1. Türker FA, Kayaalp SO (2002). Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10th ed. Ankara: Kayaalp SO, 380-415.
2. United Nations Department of Economic and Social Affairs (2007). World population prospects. The 2006 revision, 1-37.
3. Boyle P, Levin B, World Cancer Report (2008). International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
4. Calabresi P, Welch AD (1962). Chemotherapy of neoplastic diseases. *Ann rev med* 13: 147-202.
5. Gate L, Tew KD (2001). Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 5: 477–489.
6. Gottesman MM (2002). Mechanism of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev Med* 53: 615-627.
7. Friedman AE, Chamborn JC, Sauvage JP, Turro NJ, Barton JK (1992). Novel Dipyridophenazine Complexes of Ruthenium(II): exploring Luminescent Reporters of DNA. *J Am Chem Soc* 114: 5919–5925.
8. Aris SM, Gewitz DA, Ryan JJ, Kratt KM, Farrel NP (2007). Promotion of DNA Strand Breaks: unterstrand Cross-links and Apoptotic Cell Death in A2780 Human Ovarian Cancer Cells by Transplatinum Planar Amine Complexes. *Biochem Pharmacol* 73: 1749-1757.
9. Escola A, Crespo M, Quirante J, Cortes R, Jayaraman A, Badía J, Baldoma L, Calvet T, Font-Bardía M (2014). Exploring the Scope of  $[Pt_2(4-FC_6H_4)_4(\mu-SEt_2)_2]$  as a Precursor for New. *Organometallics* 33: 1740–1750.
10. Zorbas H, Keppler BK (2005). Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? . *Chem biochem* 6(7): 1157-1166.



11. Fuertes MA, Alonso C, Perez JM (2003). Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 103(3): 645-662.
12. Jordan P, Carmo-Fonseca M (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 57(8-9): 1229-1235.
13. Malina J, Farrell NP, Brabec V (2014). DNA Condensing Effects and Sequence Selectivity of DNA Binding of Antitumor Noncovalent Polynuclear Platinum Complexes. *Inorganic chemistry*. [Epub ahead of print]
14. Pouryas Z, Yousefi R, Nabavizadeh SM, Rashidi M, Hamidizadeh P, Alavianmehr MM, Moosavi-Movahedi AA (2014). Anticancer and DNA Binding Activities of Platinum (IV) Complexes: importance of Leaving Group Departure Rate. *App biochem biotechnol* 172(5): 2604-2617
15. Gutteridge JMC (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91: 133-140.
16. Weijl NI, Cleton, FJ, Osanto S (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy induced toxicity. *Cancer Treat Rev* 23(4): 209-240.
17. Crohns, M, Liippo K, Erhola M, Kankaanranta H, Moilanen E, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P (2009). Concurrent decline of several antioxidants and markers of oxidative stress during combination chemotherapy for small cell lung cancer. *Clin Biochem* 42(12): 1236-1245.
18. Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB (2007). Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival. *Altern Ther Health Med* 13(1): 22-28
19. Kealy TJ, Pauson PL (1951). A new type of organo-iron compound. *Nature* 168: 1039-1040.
20. Dombrowski KE, Baldwin W, Sheats JEJ (1986). Metallocenes in biochemistry: microbiology & medicine. *Organomet Chem* 302: 281-306.

21. Meunier P, Ouattara I, Gautheron B, Tirouflet J, Camboli D, Besancon J (1991). Synthesis, characterization and cytotoxic properties of the first: metallocenonucleosides. *Med Chem* 26: 351-356.
22. Kopf-Maier P (1983). Induction of Cell Arrest at G1/S and in G2 After Treatment of Ehrlich Ascites Tumor Cells with Metallocene Dichlorides and cis-Platinum in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 106: 44-52
23. Koepf-Maier P, Koepf H (1986). *Drugs Future* 11: 297-320.
24. Biot C, Francois N, Maciejewski L, Brocard J, Poulain D (2000). Synthesis and antifungal activity of a ferrocene-fluconazole analogue. *Bioorg Med Chem Lett* 10: 839-841.
25. Itoh T, Shirakami S, Ishida N, Yamashita Y, Yoshida T, Kim HS, Wataya Y (2000). Synthesis of novel ferrocenyl sugars and their antimalarial activities. *Bioorg Med Chem Lett* 10: 1657-1659.
26. Baldoli C, Maiorana S, Licandro E, Zinzalla G, Perdicchia D (2002). Synthesis of chiral chromium tricarbonyl labeled thymine PNA monomers via the Ugi reaction. *Org Lett* 4: 4341-4344.
27. Abhisek S (2013). Alfred Werner, initiator of modern inorganic stereo chemistry- A tribute in the occasion of 100th year of receiving the Nobel Prize by the great chemist. *Discov* 4(11): 29-31.
28. Pauling L (1931). The nature of the chemical bond. Application of results obtained from the quantum mechanics and from a theory of paramagnetic susceptibility to the structure of molecules. *J Am Chem Soc* 53(4): 1367-1400.
29. Bernstein, Jeremy (1980). Hans Bethe, Prophet of Energy. New York: Basic Books. ISBN 978-0-465-02903-7.
30. Bethe HA (1928). Theory of Diffraction of Electrons by Crystals. *Ann Physik* 87(55): 55-129.
31. Schiff H (1866). Eine neue reihe organischer diamine. *J Lies Ann Chem* 140(1): 92-137.

32. Pfeiffer P, Breith E, Lübbe E, Tsumaki T (1933). Tricyclische orthokondensierte Nebervalenzringe. *J Lie Ann Chem* 503(1): 84-130.
33. Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. *Nature* 222:385.
34. Dharmaraj N, Viswanathamurthi P, Natarajan K (2001). Ruthenium(II) complexes containing bidentate Schiff bases and their antifungal activity. *Trans Met Chem* 26(12): 105-109.
35. Tiwari GD, Tripathi A, Kumari O, Reddy MVB (1994). Studies on 2-Salicylhydrazonobenzothiazole Metal-Chelates as Potent Antifungal and Antibacterial Drugs. *J Indian Chem Soc* 71(12): 755-756.
36. Akyol H (2004). Kemoterapinin Temel İlkeleri. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, İzmir, 18-22 Mayıs 2004, 159-163.
37. Avcu F (2008). Hematolojik Malignitelerde İlaç Direnç Mekanizmaları. *Türk Hematoloji Derneği Bülteni* 3: 61-64.
38. Parashar RK, Sharma RC, Mohan G (1990). Biological-Activity of Some Schiff-bases and their Metal-Complexes. *Biol Trace Elem Res* 23: 145-150.
39. Ren S, Wang R, Komatsu K, Bonaz-Krause P, Zyryanov Y, Mckenna CE, Csapke C, Tokes ZA, Lien EJ (2002). Synthesis, biological evaluation, and quantitative structure-activity relationship analysis of new Schiff bases of hydroxysemicarbazide as potential antitumor agents. *J Med Chem* 45(2): 410-419.
40. Cory JG, Carter GL, Bacon PE, Tang A, Lien EJ (1985). Inhibition of ribonucleotide reductase and L1210 cell growth by N-hydroxy N'-aminoguanidine derivatives. *Biochem Pharmacol* 34: 1124-1130.
41. Modi JD, Sabnis SS, Deliwala CV (1971). Antitumor agents. Schiff bases from benzaldehyde nitrogen mustards and 2-phenyl-4-[(3-amino-4-methoxy)phenyl]thiazole. *J Med Chem* 14(5): 450-451.

42. Holla BS, Veerendra B, Shivananda MK, Poojary B (2003). Synthesis characterization and anticancer activity studies on some Mannich bases derived from 1, 2, 4-triazoles. *Eur J Med Chem* 38: 759-767.
43. Shabani F, Ghammamy S, Mehrani K, Teimouri MB, Soleimani M, Kaviani S (2008). Antitumor Activity of 6-(cyclohexylamino)-1,3-dimethyl-5(2-pyridyl)furo[2,3-d]pyrimidine-2, 4(1H,3H)-dione and Its Ti(IV), Zn(II), Fe(III), and Pd(II) Complexes on K562 and Jurkat Cell Lines. *Hindawi Publ Corp Biol Chem* 50: 10-21.
44. Guo AJ, Xu XS, Hu YH, Wang MZ, Tan X (2010). Effects of ternary complexes of copper with salicylaldehydeamino acid Schiff base coordination compounds on the proliferation of BGC823 cells. *Chin J Cancer* 29: 277-282.
45. Ali SMM, Azad M, Jesmin M, Ahsan S, Rahman MM, Khanam JA, Islam MN, Shahriar SMS (2012). In Vivo Anticancer Activity of Vanillin Semicarbazone. *Asian Pac Trop Biomed* 438-442.
46. Qiao X, MA ZY, Xie CZ, Xue F, Zhang YW, Xu JY, Qiang ZY, Lou JS, Chen GJ, Yan SP (2011). Study on potential antitumor mechanism of a novel Schiff base copper(II) complex: synthesis, crystal structure, DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity. *J Inorg Biochem* 105(5): 728-737.
47. Ghorab MM, Shaaban MA, Refaat HM, Heiba HI, Ibrahim SS (2012). Anticancer and radiosensitizing evaluation of some new pyranothiazole-Schiff bases bearing the biologically active sulfonamide moiety. *Eur J Med Chem* 53: 403-407
48. Osowole AA, Akpan EJ (2012). Synthesis, Spectroscopic Characterisation, In-Vitro Anticancer and Antimicrobial Activities of Some Metal (II) Complexes of 3-(4, 6-Dimethoxy Pyrimidinyl) Iminomethyl Naphthalen-2. *Eur J App Sci* 4: 14-20.
49. Chavain N, Biot C (2010). Organometallic complexes: new tools for chemotherapy. *Curr med chem* 17(25): 2729-2745.
50. Fouda MF, Abd-Elzaher MM, Abdelsamaia RA, Labib AA (2007). On the medicinal chemistry of ferrocene. *App Organomet Chem* 21(8): 613-625.

51. Fischer OE, Jira R (2001). How metallocene chemistry and research began in Munich. *J Organomet Chem* 7(12): 637–639.
52. Pauson PL (2001). Ferrocene-how it all began. *J Organomet Chem* 3(6): 637–639.
53. Wilkinson G, Rosenblum M, Whiting MC, Woodward RB (1952). The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *J Am Chem Soc* 74: 2125-2126.
54. Osella D, Ferrali M, Zanello P, Laschi F, Fontani M, Nervi C, Cavigliolo G (2000). On the Mechanism of the Antitumor Activity of Ferrocenium Derivatives. *Inorg Chem Acta* 306-342.
55. Yeary RA (1969). Chronic toxicity of dicyclopentadienyliron (ferrocene) in dogs. *Toxicol App Pharmacol* 15: 666-676.
56. Nikula KJ, Sun JD, Barr EB, Bechtold WE, Haley PJ, Benson JM, Eidson AF, Burt DG, Dahl AR, Henderson RF (1993). Fundamental and Applied Toxicology: thirteen-week, repeated inhalation exposure of F344/N rats and B6C3F1 mice to ferrocene. *Official J Soc Toxicol* 21: 127-139.
57. Pigeon P, Top S, Vessières A, Huché M, Görmén M, El Arbi M, Jaouen G (2011). A new series of ferrocifen derivatives, bearing two aminoalkyl chains, with strong antiproliferative effects on breast cancer cells. *New J Chem* 35(10): 2212-2218.
58. Hardman JG, Limbird EL (2002). Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. McGraw-Hill, New York: Alfred Goodman Gilman, 1613.
59. Li P, Scowen IJ, Davies JE, Halcrow MA (1998). Co-ordination chemistry of bis (ferrocenylcarbalimine) Schiff bases. *Journal of the Chem Soc - Dalton Trans* 17 (22): 3791-3799.
60. Benito A, Cano J, Martinez R, Soto J, Paya J, Loret F, Julve M, Faus J, Marcos D (1993). Ferrocene-containing chelating ligands: solution study, synthesis, crystal-structure and electronic-properties of bis(n,n'ethylenebis ((ferrocenylmethyl) amine)) copper(ii) nitrate. *Inorg Chem* 32(7): 1197-1203.

61. Neuse EW, Meirim MG, Bloom NF (1988). Metallocene-containing platinum complexes as potential antitumor agents. 1Dichloro(1,6-diferrocenyl-2,5-diazahexane)platinum(II) and cis-dichlorobis(1-ferrocenylethylamine)platinum(II). *Organometallics* 7(12): 2562-2565
62. Rebolledo AP, Lima GM, Speziali NL, Piro OE Castellano EC, Ardisson JD, Beraldo H (2006). Tin (IV) complexes obtained by reacting 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones with SnCl<sub>4</sub> and Ph<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub>. *J Organomet Chem* 691: 3919-3930.
63. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T (1996). Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem pharm* 52(12): 1855-1865.
64. Rajput JR, Moss AT, Hutton DT, Hendricks CE, Imrie AC (2004). Synthesis, characterization and cytotoxicity of some palladium(II), platinum(II), rhodium(I) and iridium(I) complexes of ferrocenylpyridine and related ligands. Crystal and molecular structure of trans-dichlorobis(3-ferrocenylpyridine)palladium(II). *J Organomet Che* 689: 1553-1568.
65. Wheate NJ, Collins JG (2003). Multi-nuclear platinum complexes as anti-cancer drugs. *Coord Chem Rev* 241: 133.
66. Koepf-Maier P, Koepf H, Neuse EW (1984). Ferrocenium Salts the first antineoplastic iron compounds. *Angew. Chem Int Edn Eng* 123: 456.
67. Allardyce CS, Dorcier A, Scolaro C, Dyson P (2005). Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals. *Appl Organometal Chem* 19: 1.
68. Neuse EW (2005). Macromolecular Ferrocene Compounds as Cancer Drug Models. *J Inorg Organomet Polym Mater* 15: 1.
69. Van Staveren DR, Metzler-Nolte N (2004). Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem. Rev* 104: 5931

70. Fish RH, Jaouen G (2003). Bioorganometallic Chemistry: Structural Diversity of Organometallic Complexes with Biologands and Molecular Recognition Studies of Several Supramolecular Hosts with Biomolecules, Alkali-Metal Ions. *Organomet Pharm* 22: 2166.
71. Huxham LA, Cheu ELS, Patrick BO, James BR (2003). The synthesis, structural characterization, and in vitro anti-cancer activity of chloro(p-cymene) complexes of ruthenium(II) containing a disulfoxide ligand. *Inorg Chim Acta* 352: 238.
72. Top S, Vessieres A, Cabestaing C, Laios I, Leclercq G, Provot C, Jaouen GJ (2001). Studies on organometallic selective estrogen receptor modulators. (SERMs) Dual activity in the hydroxy-ferrocifen series. *Organomet Chem* 637: 500-506.
73. Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, Boyle P (2003). Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet* 361(9354): 296-300.
74. Top S, Dauer B, Vaisserman J, Jaouen GJ (1997). Facile route to ferrocifen, 1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)]-1-(phenyl-2-ferrocenyl-but-1-ene), first organometallic analogue of tamoxifen, by the McMurry reaction. *Organomet Chem* 541: 355-361.
75. Top S, Vessieres A, Leclercq G, Quivy J, Tang J, Vaissermann J, Huche M, Jaouen G (2003). Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Chem. Eur J* 9(21):5223-5236.
76. Dorcier A, Dyson PJ, Gossens C, Rothlisberger U, Scopelliti R, Tavernelli I (2005). Binding of Organometallic Ruthenium(II) and Osmium(II) Complexes to an Oligonucleotide: A Combined Mass Spectrometric and Theoretical Study. *Organometallics* 24: 2114.

77. Scolaro C, Geldbach TJ, Rochat S, Dorcier A, Gossens C, Bergamo A, Cocchietto M, Tavernelli I, Sava G, Rothlisberger U, Dyson PJ (2006). Influence of Hydrogen-Bonding Substituents on the Cytotoxicity of RAPTA Compounds. *Organometallics* 25: 756.
78. Quideau S, Vessieres A, Top S, Pigeon P, Hillard E, Boubeker L, Spera D (2004). Plant “Polyphenolic” Small Molecules Can Induce a Calorie Restriction-Mimetic Life-Span Extension by Activating Sirtuins: Will “Polyphenols” Someday Be Used as Chemotherapeutic Drugs in Western Medicine? . *Chem Biochem* 5(4): 427-430.
79. Jaouen GJ, Hillard E, Vessieres A, Le Bideau F, Plazuk D, Spera D, Huch M (2005). Modification of the Estrogenic Properties of Diphenols by the Incorporation of Ferrocene. Generation of Antiproliferative Effects in Vitro. *Med Chem* 48: 3937.
80. Kelner MJ, McMorris TC, Beck WT, Zamora JM (1987). Preclinical Evaluation of Illudins as Anticancer Agents. *Cancer Res* 47: 3186–3189.
81. Kinder FR, Wang RM, Bauta WE, Bair KW (1996). Design, synthesis, and antitumor activity of bicyclic and isomeric analogues of illudin M. *Bioorg Med Chem. Lett* 6: 1029–1034.
82. Knauer S, Biersack B, Zoldakova M, Effenberger K, Milius W, Schobert R (2009). Melanoma-specific ferrocene esters of the fungal cytotoxin illudin M. *Anti-Cancer Drugs* 20: 676–681.
83. Neuse EW, Khan FBD, Meirim MG (1987). Hydrophilic tetrachloroferrate(III) salts of ferricenyl-substituted carboxylic acids. *Appl Organomet Chem* 2: 129
84. Koepf Maier P, Koepf H, Neuse EW (1984). Ferricenium complexes: A new type of water-soluble antitumor agent. *J Cancer Re. Clin Oncol* 108: 336.
85. Meirim MG, Neuse EW, Caldwell GA (1997). Poly(ethylene Oxide)-Modified Polyaspartamide–Ferrocene Conjugates. *J Inorg Organomet Polym* 7: 71.



86. Meirim MG, Neuse EW, Caldwell GA (1998). Water-Soluble Polymer–Ferrocene Conjugates Based on Polyamide Carriers Containing Intrachain-Type Secondary Amine Functions as Binding Sites. *J Inorg Organomet Polym* 8: 225.
87. Neuse EW, Meirim MG, Caldwell GA (1999). Antineoplastic activity of polyaspartamide–ferrocene conjugates. *J Inorg Organomet Polym* 9: 221.
88. Malonne H, Atassi G (1997). DNA topoisomerase targeting drugs: mechanisms of action and perspectives. *Anticancer Drugs* 8: 811.
89. Fiorani P, Bjornsti M, Ann NY (2000). Mechanisms of DNA Topoisomerase I-Induced Cell Killing in the Yeast: *saccharomyces cerevisiae*. *Acad Sci* 922: 965.
90. Gong Y, Firestone GL, Bjeldanes LF (2006). 3,3'-Diindolylmethane is a novel topoisomerase II $\alpha$  catalytic inhibitor that induces S-phase retardation and mitotic delay in human hepatoma HepG2 cells. *Mol Pharmacol* 69: 1320.
91. Krishna ADS, Panda G, Kondapi AK (2005). Biophys Mechanism of action of ferrocene derivatives on the catalytic activity of topoisomerase II $\alpha$  and beta--distinct mode of action of two derivatives. *Arch Biochem* 438: 206.
92. Ong CW, Jeng JY, Juang SS, Chen CF (1992). A ferrocene-intercalator conjugate with a potent cytotoxicity. *Bioorg Med Chem Lett* 2: 929–932
93. Lebwahl D, Canetta R (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 34: 1522–1534.
94. Henderson W, Alley SR (2001). Platinum(II) complexes containing ferrocene-derived phosphonate ligands; synthesis, structural characterisation and antitumour activity. *Inorg Chim Acta* 322: 106–112.
95. Al-Allaf TAK, Rashan LJ (1999). Heterobimetallic complexes of platinum(II) with diferrocenylphenylphosphine and their in vitro activity against P388 leukaemia. *Appl. Organomet. Chem* 13: 63-68.

96. Spencer J, Casini A, Zava O, Rathnam RP, Velhanda SK, Pfeffer M, Callear SK, Hursthouse MB, Dyson PJ (2009). Excellent correlation between cathepsin B inhibition and cytotoxicity for a series of palladacycles. *Dalton Trans* 10731–10735.
97. Viotte M, Gautheron B, Kubicki MM, Mugnier Y, Parish RV (1995). new iron(II)-containing and gold(I)-containing metallocenes - x-ray structure of a 3-coordinate gold(I) ferrocenophane-type representative. *Inorg Chem* 34: 3465–3473.
98. Horvath UEI, Bentivoglio G, Hummel M, Schottenberger H, Wurst K, Nell MJ, Van Rensburg CEJ, Cronje S, Raubenheimer HG (2008). A cytotoxic bis(carbene)gold(I) complex of ferrocenyl complexes: synthesis and structural characterisation. *New J Chem* 32: 533–539.
99. Han Ang W, Dyson PJ (2006). Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: towards Targeted Chemotherapy. *J Inorg Chem Eur* 4003–4018.
100. Von Poelhsitz Bogado GAL, de Araujo MP, Selistre-de-Araujo HS, Ellena J, Castellano EE, Batista AA (2007). Synthesis, characterization, X-ray structure and preliminary in vitro antitumor activity of the nitrosyl complex fac-[RuCl<sub>3</sub>(NO)(dppf)], dppf = 1,1'-bis(diphenylphosphine)ferrocene. *Polyhedron* 26: 4707–4712.
101. Auzias M, Gueniat J, Therrien B, Renfrew AK, Dyson PJ (2009). Arene–ruthenium complexes with ferrocene-derived ligands: synthesis and characterization of complexes of the type [Ru(η<sup>6</sup>-arene)(NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NHOC-C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>FeC<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)Cl<sub>2</sub>] and [Ru(η<sup>6</sup>-arene)(NC<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O<sub>2</sub>C-C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>FeC<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)Cl<sub>2</sub>]. *J Organomet Chem* 694: 855–861.
- 102.I Ott K, Kowalski R, Gust J, Maurer P, Winter RF (2010). Tuning the electronic properties of dppz-ligands and their palladium(II) complexes. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 866–869.

103. Duivenvoorden WCM, Liu Y, Schatte G, Kraatz HB (2005). Synthesis of redox-active ferrocene pyrazole conjugates and their cytotoxicity in human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *Inorg Chim Acta* 358: 3183–3189.
104. Abd-Elzaher M, Moustafa S, Labib A, Ali M (2010). Synthesis, Characterization and Anticancer Properties of Ferrocenyl Complexes Containing Salicylaldehyde Moiety. *Monatsh Chem* 141: 387–393.
105. Güner S (2007). *Biyokimya-I, Biyomoleküllerin Yapısı ve İşlevi*. KTÜ Fen Ed. Yayınları, No.224, Trabzon, 231-243.
106. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (2007). *Moleküler Biyoloji*. İkinci baskı. Nobel Yayın Dağıtım, No.1170, Ankara, 613.
107. Konuk M (2004). *Moleküler Biyoloji (Çeviri Notları)*. Nobel dağıtım, No.121, Ankara, 31-41.
108. Gökçe C (2012). Bazı geçiş metallere yeni hidrazon schiff bazı ligandları ile koordinasyon bileşiklerinin hazırlanması, yapılarının aydınlatılması, dna etkileşmelerinin ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
109. Braña MF, Cacho M, Gradillas A, Pascual-Teresa B, Ramos A. (2001). Intercalators as Anticancer Drugs. *Curr Pharm Des* 7(17): 1745-1780.
110. Blackburn GM, Gait MJ (1996). *DNA and RNA structure: nucleic Acids in Chemistry and Biology*. 3rd ed. Blackburn GM, Gait MJ. England: Oxford University Press, 28-39.
111. Bischoff G, Hoffmann S (2002). DNA-Binding of Drugs Used in Medicinal Therapies. *Curr Med Chem* 9(3): 321-348.
112. Anastassopoulou J (2003). Metal-DNA Interactions. *J Mol Struct* 651-653: 19-26.
113. Neidle S (2001). DNA Minor-Groove Recognition by Small Molecules. *Nat Prod Rep* 18: 291-309.

114. Palchaudhuri R, Hergenrothee PJ (2007). DNA as a Target for Anticancer Compounds: methods to Determine the Mode of Binding and the Mechanism of Action. *Curr Opin Biotechnol* 18(6): 497-503.
115. Martinez R, Garcia LC (2005). The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: what it Worked and What did not Work. *Curr Med Chem* 12(2): 127-151.
116. Strekowski L, Wilson B (2007). Noncovalent Interactions with DNA: an Overview. *Mutation Res* 623(1-2): 3-13.
117. Kottke T, Stalke D (1993). Crystal Handling at Low Temperatures. *J Appl Cryst* 4: 615-619.
118. Maheswari PU, Barends S, Ozalp YS, De Hoog P, Casellas H, Teat SJ (2007). Unique Ligand-Based Oxidative DNA Cleavage by Zinc(II) Complexes of Hpyramol and Hpyrimol. *Chemistry-A Eurp J* 13: 5213-5222.
119. Neves A, Terenzi H, Horner, R. (2001). Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex. *Inorg Chem Comm* 4: 388-391.
120. Brookers P, Lawley PD (1961). Reaction of Mono- and Difunctional Alkylating Agents With Nucleic Acids. *Biochem J* 80: 496-503.
121. Lawley PD, Brookes P (1963). Further Studies on the Alkylation of Nucleic Acids and Their Constituent Nucleotides. *Biochem J* 89: 127-138.
122. Bennett RAO, Swerdlow PS, Povirk LF (1993). Spontaneous Cleavage of Bleomycin-induced Abasic Sites in Chromatin and Their Mutagenicity in Mammalian Shuttle Vectors. *Biochemistry* 32: 3188-3195.
123. Sugiyama H, Fujiwara T, Ura A, Tashiro T, Yamamoto K, Kawanishi S, Saito I (1994). Chemistry of Thermal Degradation of Abasic Sites in DNA. Mechanistic Investigation on Thermal DNA Strand Cleavage of Alkylated DNA. *Chem Res Toxicol* 7: 673-683.
124. Breen AP, Murphy JA (1995). Reactions of Oxyl Radicals With DNA. *Free Radical Biol Med* 18: 1033-1077.

125. Von Sonntag C, Hagen U, Schon-Bopp A, Schulte-Frohlinde D (1981). Radiation Induced Strand Breaks in DNA. Chemical and Enzymatic Analysis of end Groups and Mechanistic Aspects. *Adv Radiat Biol* 9: 109-142.
126. Zady MF, Wong JL (1980). Unusual Competition Between Nitrogen and Carbon Methylation of Nucleosides by Methyl Radical in Various Aqueous Media. *J Org Chem* 45: 2373-2377.
127. Tullius TD, Dombroski BA, Churchill MEA, Kam L (1987). Hydroxyl Radical Footprinting: a High-resolution Method for Mapping Protein-DNA Contacts. *Methods Enzymol* 155: 537-558.
128. Yamane T, Davidson N (1961). On the Complexing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Bymercuric Ion. *J Am Chem Soc* 83: 2599–2607.
129. Froystein NA, Sletten E (1991). The Binding of Manganese(II) and Zinc(II) to the Syntheticoligonucleotide [d(CGCGAATTCGCG)]<sub>2</sub>. *Acta Chem Scand* 45: 219–225.
130. Vinje J, Parkinson JA, Sadler P, Brown T, Sletten E (2003). Sequence-selective metalation of double-helical oligodeoxyribonucleotides with Pt(II), Mn(II) and Zn(II) ions. *Chem Eur J* 9: 1620–1630.
131. Hurley LH (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2: 188-200.
132. De Hoog P, Pachon LD, Gamez P, Lutz M, Spek AL, Reedijk J (2004). Solution Stable Trinuclear Zinc(II) Cluster From 4-methyl-2-N-(2 pyridylmethylene) aminophenol (HPyrimol). *Dalton Trans* 17: 2614-2615.
133. Addison AW, Palamiandavar M, Driessen WL, Paap F, Reedijk J (1988). Copper Complexes of Some Tetradentate Pyrazolyl Amines. *Inorg Chim Acta* 142: 95-100.

134. Addison AW, Rao TN, Reedijk J, Vanriijn J, Verschorr GC (1984). Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Copper(II) Compounds Containing Nitrogen–Sulphur Donor Ligands; the Crystal and Molecular Structure of Aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) Perchlorate. *J Chem Soc-Dalt Trans* 7: 1349-1356.
135. Keleştemur GT, Özdemir Y (2011). Balıklarda antioksidan savunma ve oksidatif stres. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 4(1): 69-73.
136. Kopáni, M, Celec P, Danišovič L, Michalka P, Biró C (2006). Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta* 364: 61-66.
137. Mercan U (2004). Toksikoloji de Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15 (1-2): 91-96.
138. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Biol Med Bull* 49: 481-493.
139. Akça A (2012). Biber çeşitlerinin antioksidan kapasiteleri ve bileşenleri açısından değerlendirilmesi, Yüksek lisans tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
140. Yılmaz İ (2010). Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif Stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 17 (2) 143-153.
141. Shahidi F (2000). Antioxidant factors in plant foods and selected oilseeds. *Biofactors* 13(1): 179-185.
142. Cash TP, Pan Y, Simon MC (2007). Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Rad Biol Med* 43: 1219–1225.
143. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Bio Interactions*. 160: 1-40.
144. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.

145. Bektaşoğlu B (2007). Hidroksil radikal süpürölmesine dayalı antioksidan aktivite ölçümünde yeni bir yöntem geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, İÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
146. Gutteridge JMC (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828.
147. Kara N (2011). Serumda toplam antioksidan kapasitenin modifiye cuprac (bakır(II) indirgeme esaslı antioksidan kapasite) metoduyla belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
148. Özyürek M, Bektaşoğlu B, Güçlü K, Apak R (2008). Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *An chim acta* 616: 196–206.
149. Ardestani A, Yazdanparast R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem* 104: 21–29.
150. Yıldız L, Başkan K, Tütem E, Apak R (2008). Combined HPLCCUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta* 77: 304–313.
151. Pellegrini N, Miglio C, Del Rio D (2009). Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int J Food Sci Nutr* 60(2): 12–22.
152. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J Control Release* 113: 189–207.
153. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res* 681: 51–67.
154. Özyürek, M, Güçlü K, Apak R (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Anal Chem* 30 (4): 652-664.
155. Parlakpınar H, Ölmez E, Acet A (2009). Beneficial effects of apricot-feeding on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Food Chem Toxicol* 47: 802–808.

156. Kusano C, Ferrari B (2008). Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Haliç University J Cell Mol Biol* 7: (1) 1-15.
157. Cornelli U (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol* 27: 175–194.
158. Davidson GP, Decker TR (2009). Chemopreventive Role of Fruits and Vegetables in Oropharyngeal Cancer. *Nutr Clin Pract* 24: 250–260.
159. Moller P, Loft S (2006). Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Rad Biol Med* 41: 388– 415.
160. Kapoor VK, Durej A, Chadha R (2009). Herbals in the control of ageing. *Drug Discov Today* 14(19–20): 992–998.
161. Moure A, Cruz JM, Franco JD (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 172: 145–171.
162. Giacco R, Clemente G, Cipriano D (2010). Effects of the regular consumption of wholemeal wheat foods on cardiovascular risk factors in healthy people. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20(3): 186–194.
163. Stahl W, Berg H, Arthur J (2002). Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med* 23: 39–100.
164. Sertsever G (2003). Dogal Antioksidanların Biyoyararlılığı. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, 2-4 Ekim, 83-98.
165. Huang, D, Ou B, Prior RL (2005). The Chemistry Behind Antioxidant Capacity. *J Agric Food Chem* 53: 1841-1856.
166. Mathew S, Abraham TE (2006). In Vitro Antioxidant Activity and Scavenging Effects of *Cinnamomum verum* Leaf Extracts Assayed by Different Methodologies. *Food Chem Toxicol* 44: 198-206.
167. Chauhan M, Banerjee K, Arjmand F (2007). DNA binding studies of novel Copper(II) complexes containing L-tryptophan as chiral auxiliary: in vitro antitumor activity of Cu-Sn<sub>2</sub> complex in human neuroblastoma cells. *Inorg Chem* 46(8): 3072-3082.



168. Arjmand F, Aziz M, Chauhan M (2008). Synthesis, Spectroscopic Studies of New Water-Soluble Co(II) and Cu(II) Macrocyclic complexes of 4,15-bis(2-hydroxyethyl)-2,4,6,13,15,17-hexaazatricyclodocosane: their Interaction Studies with Calf Thymus DNA and Guanosine 5' Monophosphate. *J Inc Phen Macrocyclic Chem* 61(3-4): 265-278.
169. Abdi K, Hadadzadeh H, Weil M, Salimi M (2012). Mononuclear copper(II) complex with terpyridine and an extended phenanthroline base, [Cu(tpy)(dppz)]<sup>2+</sup>: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity. *Polyhedron* 31(1): 638-648.
170. Chitrapriya N, Mahalingam V, Zeller M, Lee H, Natarajan K (2010). Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage studies of Ru(II) complexes containing oxime ligands. *J Mol Struct* 984(1-3): 30–38.
171. Chao H, Mei W, Huang Q, Ji L (2002). DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. *J Inorg Biochem* 92(3-4): 165–170.
172. Barton JK, Danishefsky A, Goldberg J (1984). Tris(phenanthroline)ruthenium (II): stereoselectivity in binding to DNA. *J Amer Chem Soc* 106 (7): 2172–2176.
173. Surendra Babu MS, Krishna PG, Reddy KH, Philip GH (2009). Synthesis, characterization, electrochemical studies, DNA binding, and cleavage activity of mixed copper(II)oxime DMSO complexes. *Main Group Chem* 8(2): 101–114.
174. Colak A, Terzi Ü, Col M, Karaoglu ŞA, Karaböcek S, Küçükdumlu A, Ayaz FA (2010). DNA binding, antioxidant and antimicrobial activities of homo- and heteronuclear copper(II) and nickel(II) complexes with new oxime-type ligands. *Eur J Med Chem* 45(11): 5169-5175.
175. Li QS, Yang P, Wang HF, Guo ML (1996). Diorganotin(IV) antitumor agents. (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub> (phen)/Nucleotides aqueous and solid-state Coordination chemistry and its DNA binding studies. *J Inorg Biochem* 64(3): 181-195.

176. Kumar RS, Arunachalam S, Periasamy VS, Preethy CP, Riyasdeen A, Akbarsha MA (2008). DNA binding and biological studies of some novel water-soluble polymer-copper(II)-phenanthroline complexes. *Eur J Med Chem* 43(10), 2082-2091.
177. Lerman LS (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J Mol Bio*, 3(1): 18-30.
178. Liu ZC, Wang BD, Li B, Wang Q, Yang ZY, Li TR, Li Y (2010). Crystal structures, DNA-binding and cytotoxic activities studies of Cu(II) complexes with 2-oxo-quinoline-3-carbaldehyde Schiff-bases. *Eur J Med Chem* 45(11): 5353-5361.
179. Efthimiadou EK, Karaliota A, Psomas G (2010). Metal complexes of the thirdgeneration quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: structure and biological evaluation. *J Inorg Biochem* 104(4), 455-466.
180. Long EC, Barton JK (1990). On demonstrating DNA intercalation. *Acc Chem Res* 23(9): 271-273.
181. Odani A, Shimata R, Masuda, H, Yamauchi O (1991). Platinum DNA intercalator mononucleotide adduct formation - cooperativity between aromatic ring stacking and electrostatic interactions. *Inorg Chem* 30(9): 2133-2138.
182. Shahabadi N, Kashanian S, Purfoulad M (2009). DNA interaction studies of a platinum(II) complex, PtCl<sub>2</sub>(NN) (NN = 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline), using different instrumental methods. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc* 72(4): 757-761.
183. Chen FJ, Xu M, Xi PX, Liu HY, Zeng ZZ (2011). Synthesis, DNA binding and cleavage activities of copper (II) thiocyanate complex with 4-(N,Ndimethylamino) pyridine and N,N-dimethylformamide. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc* 81(1): 21- 27.

184. Raman N, Jeyamurugan R, Sakthivel A, Mitu L (2010). Novel metal-based pharmacologically dynamic agents of transition metal(II) complexes: designing, synthesis, structural elucidation, DNA binding and photo-induced DNA cleavage activity. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc* 75(1): 88-97.
185. Verma VK, Asatkar AK, Jain TA, Tripathi SK, Singhc R, Hitchcock PB, Nigam S, Gupta SK (2009). Synthesis, structure and DNA binding studies of mononuclear copper(II) complexes with mixed donor macrocyclic ligands, 2,6-bis({N-[2&3-(phenylselenato)alkyl]}benzimidoyl)-4-methylphenol. *Polyhedron* 28(13): 2591–8.
186. Ji HF, Zhang HYA (2004). Theoretical Study on Cu(II) Binding Modes and Antioxidant Activity of Mammalian Normal Prion Protein. *Chem Res Toxicol* 17(4): 471–475.
187. Adsule S, Barve V, Chen D, Ahmed F, Dou QP, Padhye S, Sarkar FH (2006). Novel Schiff base copper complexes of quinoline-2 carboxaldehyde as proteasome inhibitors in human prostate cancer cells. *J Med Chem* 49(24): 7242–46.
188. Wilson WD, Ratmeyer L, Zhao M, Streckowski L, Boykin D (1993). The search for structure-specific nucleic acid-interactive drugs: effects of compound structure on RNA versus DNA interaction strength. *Biochem* 32(15): 4098-4104.
189. Reddy PR, Shilpa A (2011). Oxidative and hydrolytic DNA cleavage by Cu(II) complexes of salicylidene tyrosine schiff base and 1,10 phenanthroline/bipyridine. *Polyhedron* 30(4): 565–572.
190. Li Y, Wu Y, Zhao J, Yang P (2007). DNA-binding and cleavage studies of novel binuclear copper(II) complex with 1,1'-dimethyl-2,2'-biimidazole ligand. *J Inorg Biochem* 101(2): 283-290.
191. Reddy PR, Shilpa A, Raju N, Raghavaiah P (2011). Synthesis, structure, DNA binding and cleavage properties of ternaryamino acid Schiff base-phen/bipy Cu(II) complexes. *J Inorg Biochem* 105(12): 1603-1612.

192. Li Y, Yang ZY (2009). DNA binding affinity and antioxidative activity of copper(II) and zinc(II) complexes with a novel hesperetin Schiff base ligand. *Inorg Chim Acta* 362(13): 4823–4831.
193. Tabassum S, Afzal M, Arjmand F (2012). New heterobimetallic Cu(II)—Sn<sub>2</sub>(IV) complex as potential topoisomerase I inhibitor: in vitro DNA binding, cleavage and cytotoxicity against human cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B: Bio*. 115: 63–72.
194. Zhou JJ, Mei Y, Pan Z, Zhou H (2012). Structure, DNA binding and cleavage of a new Zn(II)Mn(II) macrocyclic complex. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc* 99: 329-334.
195. Reddy PR, Shilpa A, Raju N, Raghavaiah P (2011). Synthesis, structure, DNA binding and cleavage properties of ternary amino acid Schiff base-phen/bipy Cu(II) complexes. *J Inorg Biochem* 105(12): 1603-1612.
196. Özçeşmeci M, Ecevit ÖB, Sürgün S, Hamuryudan E (2013). Tetracationic fluorinated zinc(ii)phthalocyanine: synthesis, characterization and DNA binding properties. *Dyes and Pigments* 96(1): 52-58.
197. Li ZS, Yang HX, Zhang AG, Luo H, Wang KZ (2011). pH effects on optical and DNA binding properties of a thiophene-containing ruthenium(II) complex. *Inorg Chim Acta*, 370(1): 132–140.
198. Waring MJ (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Bio* 13(1): 269–274.
199. Ortmans I, Elias B, Kelly JM, Moucheron C, Demesmaeker AK (2004). [Ru(TAP)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup> a DNA intercalating complex, which luminesces strongly in water and undergoes photo-induced proton-coupled electron transfer with guanosine-5'-monophosphate. *Dalton Trans* 21(4): 668-676.
200. Ambroise A, Maiya BG (2000). Ruthenium(II) Complexes of Redox-Related, Modified Dipyridophenazine Ligands: synthesis, Characterization, and DNA Interaction. *Inorg Chem* 39(19): 4256–4263.

201. Maheswari PU, Palaniandavar M (2004). DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium(II) complexes of modified 1,10-phenanthrolines – effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity. *J Inorg Biochem* 98(2): 219–230.
202. Kelly JM, Tossi AB, McConnel DJ, OhUigin CO (1985). A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nuc Acids Res* 13(17): 6017–6034.
203. Neyhart GA, Grover N, Smith SR, Kalsbeck WA, Fairely TA, Cory M, Throp H (1993). Binding and kinetic studies of oxidation of DNA by oxoruthenium(IV). *J Am Chem Soc* 115(11): 4423-4428.
204. Bjorndal MT, Fyngsan DK (2002). DNA melting in the presence of fluorescent intercalating oxazole yellow dyes measured with a gel based assay. *Biopolymers* 65(1): 40-44.
205. Kumar CV, Punzalan EHA, Tan WB (2000). Adenine–thymine base pair recognition by an anthryl probe from the DNA minor groove. *Tetrahedron* 56: 7027-7040.
206. Lingthoingambi NG, Singh NR, Damayanti M (2011). DNA interaction and biological activities of Copper(II) complexes of alkylamidio-O-methylurea. *J Chem Pharm Res* 3(6): 187-194.
207. Sathiyaraj S, Sampath K, Raja G, Butcher RJ, Gupta SK, Jayabalakrishnan C (2013). DNA binding/cleavage, antioxidant and cytotoxic activities of water soluble cobalt(II) and copper(II) antipyrine complexes. *Inorg Chim Acta* 406: 44-52.
208. Liang F, Wang P, Zhou X, Li T, Li Z, Lin H, Gao D, Zhen C (2004). Nickel(II) and cobalt(II) complexes of hydroxyl-substituted triazamacrocyclic ligand as potential antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* 14(8): 1901–1904.
209. Sigman DS (1986). Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion. *Acc Chem Res* 19(6): 180-186.

210. Armitage B (1998). Photocleavage of nucleic acids. *Chem Rev* 98(3): 1171-1200.
211. Sitlani A, Long EC, Pyle AM, Barton JK (1992). DNA photocleavage by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium(III): shape-selective recognition and reaction. *J Am Chem Soc* 114(7): 2303-2312.
212. Burrows CJ, Muller JG (1998). Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chem Rev* 98(3): 1109-1152.
213. Wolkenberg SE, Boger DL (2002). Mechanisms of in situ activation for DNA targeting antitumor agents. *Chem Rev* 102(7): 2477-2495.
214. Kong DM, Wang J, Zhu LN, Jin YW, Li XZ, Shen HX, Mi HF (2008). Oxidative DNA cleavage by Schiff base tetraazamacrocyclic oxamido nickel(II) complexes. *J Inorg Biochem* 102(4), 824-832.
215. Uma V, Castineiras A, Nair BU (2007). Copper(II) complexes of N4 tetradentate ligands with flexible alkyl spacers: crystal structure, DNA binding and cleavage studies. *Polyhedron* 26(13): 3008-3016.
216. Zhao Y, Zhu J, He W, Yang Z, Zhu Y, Li Y, Zhang J, Guo Z (2006). Oxidative DNA Cleavage Promoted by Multinuclear Copper Complexes: Activity Dependence on the Complex Structure. *Chem Eur J* 12(25): 6621-6629.
217. Liu Y, Sletten EJ (2003). Interaction between macrocyclic nickel complexes and the nucleotides GMP, AMP and ApG. *J Inorg Biochem* 93(3-4): 190-196.
218. Matkar SS, Wrischnik LA, Jones PR, Hellmann-Blumberg U (2006). Two closely related nickel complexes have different effects on DNA damage and cell viability. *Biochem Biophys Res Commun* 343(3): 754-761.
219. Branum ME, Tipton AK, Zhu S, Que LJ (2001). Double-strand hydrolysis of plasmid DNA by dicerium complexes at 37 degrees. *J Am Chem Soc* 123(9): 1898-1904.
220. Zhu LN, Kong DM, Li XZ, Wang GY, Wang J, Jin YW (2010). DNA cleavage activities of tetraazamacrocyclic oxamido nickel(II) complexes. *Polyhedron* 29(1): 574-580.

221. Jiang Q, Xiao N, Shi P, Zhu Y, Guo Z (2007). Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. *Coord Chem Rev* 251(15-16): 1951-1972.
222. Marnett LJ, Riggins JN, West JD (2003). Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 111(5): 583–593.
223. Raman N, Sobha S, Mitu L (2013). Design, synthesis, DNA binding ability, chemical nuclease activity and antimicrobial evaluation of Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) metal complexes containing tridentate Schiff base. *J Saudi Chem Soc* 17(2): 151-159.
224. Hangan A, Bodoki A, Oprean L, Alzuet G, Liu-Gonzalez M, Borrás J (2010). Synthesis, crystallographic and spectroscopic characterization and magnetic properties of dimer and monomer ternary copper(II) complexes with sulfonamide derivatives and 1,10-phenanthroline. Nuclease activity by the oxidative mechanism *Polyhedron* 29(4): 1305-1313.
225. Chiou SH, Ohtsu N, Bensch KG (1985). *Biological and Inorganic Copper Chemistry*. 3rd eds Karlin D, Zubieta J, New York: Adenine Press, 119.
226. Chen GJ, Wang ZG, Kou YY, Tian JL, Yan SP (2013). Impact of metal on the DNA photo-induced cleavage activity of a family of Phterpy complexes. *J Inorg Biochem* 122: 49-56.
227. Nathan JP (2008). Photophysical properties of metal complexes. *Annu Rep Sect A: Inorg Chem* 104: 498-528.
228. Kyle D, David K, Yiling H, Shawn S (2008). A porphyrin–ruthenium photosensitizer as a potential photodynamic therapy agent. *Inorg Chem Commun* 11(5): 584-586.
229. Ates B, Abraham L, Ercal N (2008). Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with Nacetylcysteine (NAC). *Free radical Res* 42(4): 372-377.

230. Liu H, Shi X, Xu M, Li Z, Huang L, Bai D, Zeng Z (2011). Transition metal complexes of 2,6-di ((phenazonyl-4-imino)methyl)-4-methylphenol: structure and biological evaluation. *European J Med Chem* 46(5): 1638–47.
231. Nagami, M, Umakoshi, H., Shimanouch, T., Kuboi, R (2004). Variable SOD-like activity of liposome modified with Mn(II)–porphyrin derivative complex. *Biochem Eng J* 21(3): 221-7.
232. Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Chaviara AT, Bolos CA (2006). Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of mixed-ligand Cu(II) complexes of dien and its Schiff dibases with heterocyclic aldehydes and 2-amino-2-thiazoline'', *Bioorg Med Chem Lett* 16(8): 2234–7.
233. Wang BJ, Lien YH, Yu ZR (2004). Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chem* 86: 237-243.
234. Sun T, Zhou DX, Xie JL, Mao F (2007). Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol* 225(3-4): 451-456.
235. Sampath K, Sathiyaraj S, Jayabalakrishnan C (2013). DNA binding, DNA cleavage, antioxidant and cytotoxicity studies on ruthenium(II) complexes of benzaldehyde 4-methyl-3-thiosemicarbazones. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc* 105: 582–592.



## 9. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Soyadı, Adı:** GÜRCAN Nihan

**Uyruğu:** TC

**Doğum tarihi ve yeri:** 20/02/1976 Samsun

**Medeni hali:** Evli

**E-Posta:** nihangurcan@hotmail.com.

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İ.Ü. Eczacık Fakültesi	2001
Lise	Ondokuzmayıs Lisesi Samsun	1994