



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

3-AMİNOPİRİDİN BİLEŞİKLERİNİN
ANTİMUTAJENİK ETKİLERİ, BİYOLOJİK
AKTİVİTE VE DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Pınar GÖK

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

3-AMİNOPİRİDİN BİLEŞİKLERİNİN
ANTİMUTAJENİK ETKİLERİ, BİYOLOJİK
AKTİVİTE VE DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Pınar GÖK

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 26/01/2017

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

ÇANAKKALE

Pınar GÖK tarafından Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR yönetiminde hazırlanan ve 26/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**3-Aminopiridin Bileşiklerinin Biyolojik Aktivite ve DNA ile Etkileşimlerinin Araştırılması**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Başkan

Doç. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA

Üye

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Pınar GÖK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince benden bir an olsun yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezde çalışılan bileşikleri sağlayan, çalışmanın yürütülmesinde fikir ve görüşleri ile tez sonuçlarının yorumlanmasındaki katkılarından dolayı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezde kullanılan suşların teminine yardımcı olan Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hülya SİVAS'a; bakterilerin ve mayaların temini için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarının her aşamasında yardımları, bilgileri ve sevgileri ile bana destek olan Uzman Nuray YILDIRIM'a, Doktora öğrencisi Merve BALLI'ya, tez çalışmalarım süresince beni yalnız bırakmayan ve vermiş oldukları desteklerinden dolayı sevgili arkadaşlarım Salih İNAN'a, Mehmet Ali YILDIRIM'a, Melike SARAÇOĞLU'na, Elif MERDAMET'e, Feyza Rabia AKKAN'a, Hayati ÖZCAN'a ve M. Eray BOZYEL'e teşekkür ederim.

Göstermiş oldukları sabır, anlayış ve fedakarlıklar için her zaman yanımda olan babam Burhanettin GÖK'e, annem Tülay GÖK'e, erkek kardeşim Engin GÖK'e ve laboratuvar çalışmaları boyunca da desteğini esirgemeyen ve hayatımın her anında yanımda olan kız kardeşim Bahar GÖK'e sonsuz teşekkür ederim.

Pınar GÖK
Çanakkale, Ocak 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
Abs	Absorbans
ϵ	Molar Sönüm Katsayısı
CFU	Koloni Oluşturan Birim
CT-DNA	Calf Thymus-Dana Timus-DNA
DMF	Dimetil Formamid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
g	Gram
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
HB	Histidin/Biyotin
HBA	Histidin/Biyotin/Ampisilin
Kob	Koloni Oluşturan Birim
M	Molarite
MA	Molekül Ağırlığı
mg	Miligram
MGA	Minimal Glikoz Agar
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	Mililitre
N	Normalite
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NPD	4- Nitro- <i>o</i> -Fenilendiamin
OD	Optik Yoğunluk
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medyum
S9	Sıçan Karaciğer Mikrozomal Enzimi
SA (NaN ₃)	Sodyum Azid
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
UV	Ultraviyole

UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
mM	Milimolar



ÖZET

3-AMİNOPİRİDİN BİLEŞİKLERİNİN ANTİMUTAJENİK ETKİLERİ, BİYOLOJİK AKTİVİTE VE DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Pınar GÖK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

26/01/2017, 68

Bu çalışmada 3-aminopiridin Schiff bazı bileşikleri; 2-[(pridin-3-yilimino)metil]fenol (Bileşik 1) ve 4-nitro-2-[(pridin-3-yilimino)metil]fenol (Bileşik 2)'nin mutajenik, antimutajenik, antimikrobiyal, DNA bağlanma ve DNA kırma aktiviteleri araştırıldı. Bileşiklerin mutajenik ve antimutajenik etkileri Ames testi ile *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılarak çalışıldı. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin hem TA98 hem de TA100 mutant suşlarında mutajenik etkisinin olmadığı gözlemlendi. Antimutajenik aktivite çalışmaları sonuçlarına göre ise her iki bileşiğin güçlü antimutajenik etki gösterdiği belirlendi. Antimikrobiyal aktivite, broth mikrodilüsyon metodu ile bakterilere ve mayalara karşı test edildi. Bileşiklerin bakterilere karşı 128-16 µg/µL ve mayalara karşı 64-32 µg/µL konsantrasyonlarında antimikrobiyal aktivite gösterdikleri saptandı. Bileşiklerin DNA'ya bağlanma özellikleri UV-Vis absorpsiyon titrasyonu yöntemi ile Calf Thymus-DNA (CT-DNA) kullanılarak çalışıldı. Çalışma sonucunda Bileşik 1'in interkalatif ve elektrostatik olarak, Bileşik 2'nin ise elektrostatik olarak DNA'ya bağlandığı saptandı. DNA kırma çalışması agaroz jel elektroforezi yöntemi ile pBR322 plazmid DNA kullanılarak yapıldı. Her iki bileşiğinde hem hidrolitik hem de oksidatif olarak DNA'yı kırdığı belirlendi.

Anahtar sözcükler: Schiff Bazı, Mutajenite, Antimutajenite, Antimikrobiyal Aktivite, DNA Bağlanma, DNA Kırma

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIMUTAGENIC EFFECTS, BIOLOGICAL ACTIVITY AND INTERACTION WITH DNA OF THE 3-AMINOPYRIDINE COMPOUNDS

Pınar GÖK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biology

Advisor: Assist. Prof. Dr. Neslihan DEMİR

26/01/2017, 68

In this study, mutagenic, antimutagenic, antimicrobial, DNA binding and DNA cleavage activities were investigated of 3-aminopyridine Schiff bases (2-[(pyridin-3-ylimino) methyl]phenol (Compound 1) and 4-nitro-2-[(pyridin-3-ylimino) methyl] phenol (bitiştir) (Compound 2). The mutagenic and antimutagenic effect of the compounds were investigated using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 mutant strains by Ames test. The Compound 1 and Compound 2 did not show any mutagenicity in both TA98 and TA100 mutant strains. According to the results of antimutagenic studies, both compounds showed strong antimutagenic effects. Antimicrobial activity was tested by broth microdilution method against bacteria and yeasts. Antimicrobial activity was detected at concentrations of 128-16 µg/µL against bacteria and 64-32 µg/µL against yeasts. The binding activities of the compounds to DNA were studied using Calf thymus (CT-DNA) by the UV-Vis absorption titration method. As a result of the study, it was determined that Compound 1 bind to DNA via intercalative and electrostatic on the other hand, Compound 2 bind to DNA via electrostatic binding mode. The DNA cleavage study was performed using pBR322 plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. The study determined that both compounds cleavage DNA by both hydrolytic and oxidative.

Keywords: Schiff Base, Mutagenicity, Antimutagenicity, Antimicrobial Activity, DNA Binding, DNA Cleavage

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Schiff Bazları	4
2.1.1. Schiff Bazları ve Özellikleri	4
2.1.2. Schiff Bazlarının Biyolojik Aktiviteleri.....	5
2.1.2.1. Antibakteriyel Aktiviteleri	5
2.1.2.2. Antifungal Aktiviteleri	5
2.1.2.3. Antimalarial Aktiviteleri	5
2.1.2.4. Antiviral Aktiviteleri	6
2.1.2.5. Terapötik Aktiviteleri	6
2.2. Mutasyon.....	7
2.2.1. Gen Mutasyonları.....	7
2.2.1.1. Baz Değişimi Mutasyonları.....	7
2.2.1.2. Çerçeve Kayması Mutasyonu	8
2.2.2. Kromozom Mutasyonları	8
2.2.2.1 Kromozomların Yapısının Değişmesi.....	8
2.2.2.2. Kromozomların Sayısının Değişmesi	9
2.3. Mutajenite	9
2.4. Antimutajenite.....	10
2.5. Ames/ <i>Salmonella</i> Testi	10
2.6. DNA.....	12
2.7. İlaç Moleküllerinin DNA ile Etkileşimleri	12

2.7.1. DNA Bağlanma.....	13
2.7.1.1. İlaç Moleküllerinin DNA'ya Kovalent Bağlanması	13
2.7.1.2. İlaç Moleküllerinin DNA ile Kovalent Olmayan Etkileşimleri	14
2.7.1.2.1. Elektrostatik Etkileşimler.....	15
2.7.1.2.2. Oluğa Bağlanma.....	15
2.7.1.2.3. İnterkalasyon	15
2.7.2. DNA Kırma	16
2.8. Schiff Bazlarının DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler.....	17
2.8.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonu	17
2.8.2. Agaroz Jel Elektroforezi	18
2.9. Schiff Bazlarının Mutajenite, Antimutajenite, Biyolojik Aktiviteleri ve DNA ile Olan Etkileşimleri.....	20
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Schiff Bazları.....	24
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.1.2.1. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.2.2. Antimikrobiyal Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.1.2.3. DNA Etkileşim Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.3. Mutajenite ve Antimutajenite.....	26
3.1.3.1. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Test Suşları.....	25
3.1.3.2. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Stok Çözeltiler ve Besiyerleri	26
3.1.3.2.1. Vogel-Bonner E ortamı (50X VB tuz çözeltisi).....	26
3.1.3.2.2. Glikoz Çözeltisi (%20)	26
3.1.3.2.3. Histidin Çözeltisi (% 0,5)	27
3.1.3.2.4. Biotin Çözeltisi (0,5 mM).....	27
3.1.3.2.5. NaOH Çözeltisi (0,02 N)	27
3.1.3.2.6. Ampisilin Çözeltisi (% 0,8/0,02 N NaOH).....	27
3.1.3.2.7. Histidin/Biotin Çözeltisi (0,5 mM).....	27
3.1.3.2.8. Kristal Viyole Çözeltisi (% 0,1)	27
3.1.3.2.9. Sodyum-Fosfat Tamponu (0,2 M)	28

3.1.3.2.10. Tuz çözeltisi (% 0,9).....	28
3.1.3.2.11. 4-Nitro- <i>o</i> -fenilendiamin (0,1 µg/µL).....	28
3.1.3.2.12. Sodyum Azid (0,01 µg/µL).....	28
3.1.3.2.13. Histidin/Biyotin (HB) Agar.....	28
3.1.3.2.14. Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) Agar.....	29
3.1.3.2.15. Nutrient Agar (NA).....	29
3.1.3.2.16. Minimal Glikoz Agar (MGA).....	29
3.1.3.2.17. Top (Üst) Agar.....	29
3.1.3.2.18. Nutrient Broth (NB).....	29
3.1.4. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi.....	30
3.1.4.1. Antimikrobiyal Etki.....	30
3.1.4.1.1. Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesinde Kullanılan Test Suşları.....	30
3.1.4.1.2. Stok Kültürler ve Çalışma Kültürleri.....	30
3.1.4.1.3. Besiyerleri.....	30
3.1.4.1.4. Bakterilerin ve Mayaların Canlandırılması.....	30
3.1.5. İlaç Moleküllerinin DNA ile Etkileşimleri.....	31
3.1.5.1. DNA Bağlanma.....	31
3.1.5.1.1. 8 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA (TNE) Tamponu.....	31
3.1.5.2. DNA Kırma.....	31
3.1.5.2.1. 10X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) Tamponu.....	31
3.1.5.2.2. 100 mM Tris-HCl Tamponu.....	31
3.1.5.2.3. Agaroz Jel.....	31
3.1.5.2.4. 6X Agaroz Yükleme Tamponu.....	31
3.2. Yöntem.....	32
3.2.2. Mutajenite ve Antimutajenite.....	32
3.2.2.1. Mutant Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü.....	32
3.2.2.1.1. Histidin Gereksinimi Pozitif.....	35
3.2.2.1.2. <i>uvrB</i> Mutasyon Kontrolü.....	35
3.2.2.1.3. <i>rfa</i> Mutasyon Kontrolü.....	35
3.2.2.1.4. R Faktörü Kontrolü.....	35
3.2.2.2. Mutant Suşların Master Plaklarının Yapımı.....	33
3.2.2.3. Mutant Suşların Uzun Süre Saklanması ve Stok Kültürlerin Kullanılması.....	33
3.2.2.4. Mutant Suşların 16 Saatlik Kültürlerinin Elde Edilmesi.....	34
3.2.2.5. Sıvı Kültürün mL'indeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi.....	34

3.2.2.6. 3-Aminopiridin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	34
3.2.2.7. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmaları	34
3.2.2.8. Pozitif Kontrol.....	35
3.2.2.9. Negatif Kontrol	35
3.2.2.10. Spontan Kontrol	35
3.2.2.11. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	36
3.2.2.11.1. Mutajenik Aktivite	36
3.2.2.11.2. Antimutajenik Aktivite.....	36
3.2.3. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi	37
3.2.3.1. Broth Mikrodilüsyon Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (MIC)	37
3.2.4. İlaç Moleküllerinin DNA ile Etkileşimleri	37
3.2.4.1. DNA Bağlanma.....	37
3.2.4.1.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonu	37
3.2.4.2. DNA Kırma.....	38
3.2.4.2.1. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi.....	38
BÖLÜM 4.....	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	42
4.1. Schiff Bazlarının Mutajenite ve Antimutajenite Etkileri	42
4.1.1. Mutant Suşların Genetik Özelliklerinin Kontrolü.....	42
4.1.2. Mutajenik Etkinin Sonuçları	42
4.1.3. Antimutajenik Etkinin Sonuçları	46
4.2. 3-Aminopiridin Bileşiklerinin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi	49
4.2.1. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	49
4.3. İlaç Moleküllerinin DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi.....	51
4.3.1. DNA Bağlanma Sonuçları.....	51
4.3.2. DNA Kırma Sonuçları	55
BÖLÜM 5.....	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ.....	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Schiff bazlarının oluşum reaksiyonu	4
Şekil 2.2. Baz değişimi mutasyonları: Transisyon ve transversiyon	8
Şekil 2.3. DNA' nın üç boyutlu yapısı.....	12
Şekil 2.4. cis-platin'in DNA'ya kovalent olarak bağlanması.....	13
Şekil 2.5. Moleküllerin DNA'ya bağlanma şekilleri	14
Şekil 2.6. UV-Vis absorpsiyon titrasyonundaki kaymalar	18
Şekil 2.7. pBR322 plazmid haritası	19
Şekil 3.1. 2-[(Pridin-3-yilimino)metil]fenol	24
Şekil 3.2. 4-Nitro-2-[(pridin-3-yilimino)metil]fenol	24
Şekil 4.1. <i>S. typhimurium</i> TA98 suşunun histidin gereksinimi durumu	40
Şekil 4.2. <i>S. typhimurium</i> TA100 suşunun histidin gereksinimi durumu	40
Şekil 4.3. <i>S. typhimurium</i> suşlarının <i>uvrB</i> mutasyon kontrolü	41
Şekil 4.4. Kristal viyole ile hassasiyet testi	41
Şekil 4.5. <i>S. typhimurium</i> suşlarının R faktörü kontrolü	42
Şekil 4.6. <i>S. typhimurium</i> suşlarının pozitif kontrolü	42
Şekil 4.7. <i>S. typhimurium</i> suşlarının negatif kontrolü.....	43
Şekil 4.8. <i>S. typhimurium</i> suşlarının spontan kontrolü	43
Şekil 4.9. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin dört farklı konsantrasyona göre <i>S. typhimurium</i> 'un TA98 mutant suşu üzerindeki mutajenik etkileri	45
Şekil 4.10. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin dört farklı konsantrasyonunun <i>S. typhimurium</i> 'un TA100 mutant suşu üzerinde antimutajenik etkileri	45
Şekil 4.11. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin dört farklı konsantrasyonunun <i>S. typhimurium</i> 'un TA98 mutant suşu üzerinde antimutajenik etkileri	48
Şekil 4.12. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlara göre <i>S. typhimurium</i> 'un TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri	48
Şekil 4.13. Bileşik 1'in UV-Vis spektrumu	53
Şekil 4.14. Bileşik 2'nin UV-Vis spektrumu	53
Şekil 4.15. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin DNA kırma aktivitesi; a.Oksidatif kırma b.Hidrolitik kırma	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. TA98 ile TA100 suşlarının genetik özellikleri	26
Çizelge 4.1. 3-Aminopiridin bileşiklerinin farklı konsantrasyonlara göre <i>S. typhimurium</i> 'un TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkileri	44
Çizelge 4.2. 3-Aminopiridin bileşiklerinin farklı konsantrasyonlara göre <i>S. typhimurium</i> 'un TA98 ve TA100 suşları üzerindeki antimutajenik etkileri	47
Çizelge 4.3. 3-Aminopiridin bileşiklerinin MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) değerleri.....	50



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Schiff bazları, farmasotik kimyada en yaygın kullanılan bileşiklerdir. Aldehit veya ketonların primer aminler ile kondenzasyonu sonucu oluşan Schiff bazları, medikal alanda kullanılan önemli bileşiklerdir. Özellikle tiyazoldan oluşan Schiff bazları ağrı kesici ve iltihaplanmaya karşı kullanılmaktadır. Kanser ile mücadelede kullanım alanı genişleyen Schiff bazı komplekslerinin antikanser aktivitesi özelliği göstermesinden dolayı tıp dünyasında önemli bir konuma yerleşmiştir. Bununla birlikte antimikrobiyal (Sridhar ve ark., 2001), antimalaryal (Rathelot ve ark., 1995), antiviral (Sriram ve ark., 2006), antitümör (Mladenova ve ark., 2002) etkisi bulunmaktadır.

Günümüzde herhangi bir ilaç piyasaya sürülmeden önce bazı güvenlik testlerinden geçmesi ve ilacın biyolojik etkinliğini kapsayan bilgi sahibi olunması; bu bilgilerin kapsamlı veri tabanlarında toplanması öngörülmektedir (Gollapudi and Krishna, 2000). Bu nedenle çeşitli toksisite testleri uygulanmaktadır.

Son yıllarda çeşitli ülkeler, yeni ilaçların genotoksisite testlerinin doğru bir şekilde yürütülmesi konusunda bazı kılavuzlar hazırlamaktadırlar. Bu kılavuzlar genellikle üçlü grup testlerini öngörmektedir. Bu testlerden birinci grup, bakteriyel geri mutasyon testleri; ikinci grup, kromozomal hataları belirleyebilmek amacıyla *in vitro*'da memeli hücreleriyle yapılacak testler ve üçüncü grup test olarak *in vivo*'da ise memeliler kullanılarak yapılacak testlerdir. Bu test sistemlerinden birinci grup bakteriyel geri mutasyon testleri araştırmacılar tarafından daha çok tercih edilmektedir. Bunun nedeni ise bakteriyel test sistemlerinin daha çabuk, daha kolay ve güvenilir sonuçlar vermesidir.

Yeni ilaçlar geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılırken güvenilirliği konusu mümkün olduğunca erken çözümlenmelidir. En önemli güvenlik yaklaşımları farmakoloji (ilaç-hedef etkileşimlerine dayanan toksisite), kimya (yapı), toksikoloji (*in vivo* hücre kültürleri), ilaç metabolizması, farmakokinetik ve risk faktörleridir (fizyolojik, çevresel ve genetik). Sonuçlar doğrultusunda yeni ilaçların geliştirilmesi sırasında *in vitro* toksikolojik yöntemler kullanılarak en az toksikolojik özellik gösteren kimyasalların seçimi yapılmalıdır.

Son yıllarda tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar içerisinde ilk sıralarda antimikrobiyal etkili ilaçlar olmasına rağmen mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı çok çabuk direnç kazanıyor olması, mikroorganizmaların biyokimyasına ait bilgilerin yeteri kadar olmaması ve mikroorganizmalara karşı ilaçların içerdiği bazı yan etkiler bu ilaçların kullanım

alanlarını oldukça kısıtlamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, araştırmacılar daha güçlü etkiye sahip, daha az toksik etkiye ve geniş spektruma sahip antimikrobiyal ajanları arama çalışmalarına yönelmektedir. Bakterilerin antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu direncin moleküler işleyişı oldukça kompleks ve çeşitlidir. Keşiflerinden bu güne kadar tüm farklı antibiyotiklere karşı bakteriler direnç kazanabilmektedir (Alanis, 2005).

Direnç; genetiğe bağlı direnç ve genetiğe bağlı olmayan direnç olmak üzere 2 farklı yoldan gelişebilir. Değişik sebeplerin etkisiyle oluşan direnç gelişmesi, bazı enfeksiyonal hastalıkların tedavilerinde önemli sorun oluşturmakta ve bu sorunlarda, mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonlarda mortalite ve morbidite insidansını giderek arttırmaktadır (Pfaller ve Diekema, 2004). Antibakteriyel ve antifungal ajanlara karşı görülen hızlı direnç gelişimi, antimikrobiyal ilaç üzerine yapılan çalışmaları hızlandırmış, yeni ve etkili ajanlar keşfetmeye yönelmiştir. Araştırmacılar direnç gelişimini önlemenin, özellikle varolan ilaçların dışındaki yeni ilaç ve moleküllerin geliştirilmesiyle olabileceği düşüncesindedirler. Bu sebeple farklı yapılar taşıyan çok sayıdaki bileşik ile araştırmalar yapılmaktadır (Fang ve ark., 2010).

Hücre canlılığının sürdürülmesinde çok büyük önem arz eden DNA; antibiyotik, antiviral ve antitümöral ilaçlar için hedef olarak seçilmiştir. Bu nedenle DNA'ya bağlanan pekçok ilaç geliştirilmiştir. Schiff bazları gibi küçük yapıya sahip moleküller ile yapılan çalışmalarda DNA'ya bağlanma özellikleri araştırılmaktadır. Bunun nedeni ise antikanser ve antibiyotik ilaçlarının hücre içi hedeflerinin büyük bir çoğunluğunun DNA olmasıdır. Son yıllarda DNA'ya interkalasyon modu ile bağlanan küçük moleküllere yönelik yapılan çalışmalar ilgi odağı haline gelmiştir (Friedman ve ark., 1992). Küçük moleküllu bileşikler biyoteknoloji ve nanoteknoloji gibi tedaviye yönelik uygulamalarda ve nükleik asit konformasyonlarının çalışılmasında önemli araçlar haline gelmiştir.

Yapay olarak elde edilen nükleazlar ile yapılan çalışmalar ilaç sanayi ve biyoteknoloji alanlarında çok önemlidir. DNA'yı belirli bölgesinden kırabilen veya bağlanabilen bileşikler kuşkusuz yeni antibiyotik ilaçlar ve kemoterapik ajanların geliştirilmesi konusunda büyük katkı sağlayacaktır.

İlaç hammaddesi olmak üzere sentezlenen 3-aminopiridin bileşikleri aminler ve pridinden oluşmaktadır. Proteinlerin, amino asitlerin, peptitlerin, RNA ve DNA'nın yapısında bulunan amino (-NH₂) grubu birçok önemli biyokimyasal olaylarda rol alırlar (Fessenden ve Fessenden, 1990). Piridin, ilk olarak 1849 yılında Anderson tarafından kemik yağının izole edilmesi ile bulunmuştur (Anderson, 1849).

Piridin halkası içeren bileşiklerin birçoğu doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Örneğin B6 vitamini ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat gibi biyokimyasal olarak büyük öneme sahip moleküllerin yapısında yer alır. Ayrıca piridin birçok ilaç, boya ve alkolid'in yapısında da büyük bir rol oynamaktadır (Acheson, 1976).

Aminopiridin bileşikleri günümüzde merkezi sinir sistemi hastalığı olan Multiple Sklerosiz (MS) hastalığının tedavisinde kullanılan ilaç hammaddesidir (Solari ve ark., 2001; Korenke ve ark., 2008). Bu çalışmada 3-aminopiridin bileşiklerinin farklı hastalıkların tedavilerinde kullanılmak üzere ilaç olabilme potansiyellerinin araştırılması için mutajenik ve antimutajenik etkileri Ames testi ile, antimikrobiyal özellikleri broth mikrodilüsyon yöntemiyle, DNA ile olan etkileşimleri; UV-Vis absorpsiyon titrasyonu yöntemi ile, DNA kırma aktivitesi ise agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

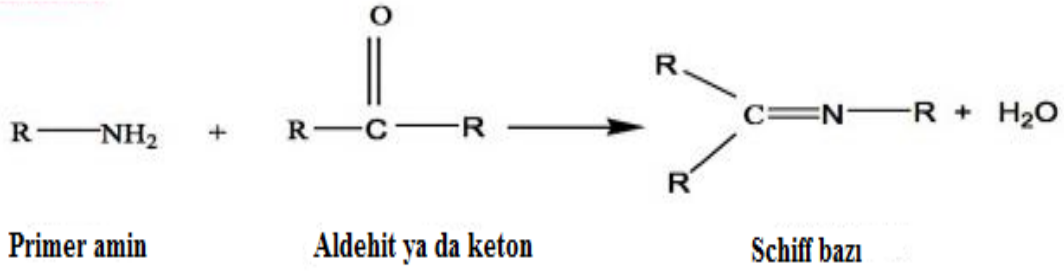
BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Schiff Bazları

2.1.1. Schiff Bazları ve Özellikleri

Schiff Bazları Alman bir kimyager olan H.J. Schiff tarafından ilk olarak 1864 yılında elde edilmiştir. Schiff bazları genel olarak $R_2C=NR$ formülü şeklindedir (Schiff, 1869). Schiff bazları aldehitlerin ve ketonların uygun reaksiyon koşullarında primer aminler ile kondenzasyonu sonucu oluşur. Yapılarında karbon-azot çift bağı (C=N) bulundurulur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Schiff bazlarının oluşum reaksiyonu (Carey ve Sundberg 2000)

Schiff bazları organik bileşikler olarak yaygın kullanılmaktadır. Boya, pigment, polimer stabilizatörü ve organik sentezlerde katalizör olarak kullanılırlar (Dhar ve Taploo, 1982). İmin ve azometin grupları doğal, doğal yolla elde edilen ve doğal olmayan bileşikler halinde görülmektedir (Da Silva ve ark., 2010). Aldehit ve aminlerin çeşitli olduğundan çok sayıda Schiff bazının elde edilebilmesi mümkündür. Fakat elde edilen her Schiff bazı için iyi bir ligand olduğu sonucuna varılmamalıdır. Örneğin; Schiff bazlarının içerisinde en iyi ligandlar orto konumundaki -NH₂, -SH, -OH ve -OCH₃ gibi gruplar bulunduranlardır.

Schiff bazları, üzerlerinde bulunan N, O ve S donör atomları vasıtasıyla rahatlıkla kompleks yapısı oluşturabilmektedir. Sözü edilen donör atomların çeşitliliği türe bağlı olabildiği gibi bu atomların sayısının kompleks yapısına da etkisi büyüktür fakat oluşan kompleks yapısı sadece donör atomlarına bağlı olarak şekillenmez. Taşıdıkları donör atomların türü ve sayısına da bağlıdır.

2.1.2. Schiff Bazlarının Biyolojik Aktiviteleri

Schiff bazları, ilaç alanında kullanılan önemli bileşiklerdendir. Antibakteriyel (Sridhar ve ark., 2001), antifungal (Singh ve ark., 2006) ve antitümör aktivite gösteren (Mladenova ve ark., 2002) alanlarda biyolojik uygulamaları bulunmaktadır. Diamino 4 dişli Schiff bazları ve onun kompleksleri, biyomolekülerin yapısı ve biyolojik süreçlerini anlamak için biyolojik model olarak kullanılırlar (Kovacic, 1967). Schiff bazı ve komplekslerinin antimikrobiyal ajanlar olarak ümit verici özellikler gösterdikleri araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarla da bildirilmiştir (Shi ve ark., 2007).

2.1.2.1. Antibakteriyel Aktiviteleri

Bakterilerin neden olduğu hastalıklarda artan ölüm oranları, bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdiği dirençle ilişkili olduğundan hastalıklarda tedavinin etkisini yitirmesine neden olmaktadır. Bu nedenle daha etkili mekanizmalar ile aktivite gösteren yeni antibakteriyel ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Schiff bazları, yeni antibakteriyel ajanların geliştirilmesinde umut verici bir noktadadırlar. Örneğin N-(salisildien)-2-hidroksianilin, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv'e karşı 8 µg/mL düzeyinde oldukça etkilidir (De Souza ve ark, 2007). Son çalışmalarda ise 5-kloro-salisilaldehit'in primer aminlerle kondensasyonundan elde edilen bir dizi antibakteriyel Schiff Bazı türeği elde edildiği bildirilmiştir (Fita ve ark, 2006).

2.1.2.2. Antifungal Aktiviteleri

Fungal etkiler yalnızca yüzeydeki dokularla sınırlı kalmadığı gibi, önemli derecede fungal enfeksiyonun hayatı tehdit ettiği bildirilmiştir (Sundriyal ve ark., 2006). Bunun en esas sebebi, ağır cerrahi ameliyat geçiren, immun sistemi baskılanmış tedavi gören, immunodeficiency sendromuna (AIDS) yakalanmış, kanser tedavisi gören v.b. hastaların giderek artan bir şekilde risk altında olmasıdır (Nucci ve Marr, 2005). Antifungal ajanların geliştirilmesi ve araştırılması zorunlu bir hale gelmiştir. Bilinen bazı Schiff Bazları antifungal etkileriyle umut vaat etmektedir (Da Silva ve ark, 2011).

2.1.2.3. Antimalaryal Aktiviteleri

Sıtma Hastalığı, tropikal bölgelerde oldukça yaygın olup ciddi yaygın sağlık sorunlarından birisidir. Her yıl, yaklaşık 500 milyon kişi bu hastalığa yakalanıyor ve yaklaşık 1 ila 3 milyon kadarı hayatını kaybetmektedir, ölenlerin %90'nını alt-sahara Afrika bölgesinde yaşayan çocuklar oluşturmaktadır (Bohach ve ark., 2007).

Bu hastalığın insandaki ana sebebi, Anofil cinsi dişi sivirsineğin taşıdığı Plasmodium vektörüdür (Kayser ve ark., 2003). Schiff bazları, antimalaryal ajanların tasarımında ilginç kimyasal özellikler gösterirler. Rathelot ve arkadaşları azometin bağına sahip 5-nitroisoquinolinleri sentezleyerek bu bileşiklerin antimalaryal aktivitelerini *in vitro* ortamda araştırmışlardır. Schiff bazı olarak sentezlenen bileşiklerden 5-nitroisoquinolin en fazla antimalaryal aktiviteyi gösteren bileşik olmuştur (Rathelot ve ark., 1995).

2.1.2.4. Antiviral Aktiviteleri

Viral hastalıklar, bağışıklık sistemi ile ilişkili hastaların yaşamını tehdit ederler ve yönlendirici tedavi teknikleri de bu problemle başa çıkmak zorundadır. Bu hastalıklar için pekçok tedavi seçeneği olsa da virüslerin yüksek dereceli mutasyon yeteneklerinden dolayı antiviral ajanlar henüz yeteri kadar etkili değildirler. Hatta belki de yan etkilerinden dolayı ilave problemlere yol açmaktadırlar. Salisilaldehit Schiff bazlarından olan 1-amino-3-hidroksiguanidin tosilatlar yeni antiviral ajanların tasarlanmasında iyi bir zemin oluştururlar. Yapılan çalışmada, 1-amino-3 hidroksiguanidin tosilat türevli Schiff bazlarının, fare hepatit virüslerinde gelişimi 3,2 µM derişiminde bile %50 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Sriram ve ark, 2006).

2.1.2.5. Terapötik Aktiviteleri

İltihaplanmaya karşı, alerji, ağrı kesici olarak etkiye sahip olan Schiff bazları mevcuttur. Özellikle Tiyazoldan oluşan Schiff bazları ağrı kesici ve iltihaplanmaya karşı kullanılmaktadır. Salisil aldehit, glisin, L-alanin ve 2,4-dihidroksi benzaldehitten hazırlanan Schiff bazlarının metal komplekslerinin antitümör etkiye sahip olduğunu bildirilmektedir. Oluşan bu metal komplekslerin aktiflik sırası Ni > Cu > Zn > Co'dır (Kumar ve ark., 2009). Kanser ile mücadelede kullanım alanı genişleyen Schiff bazı komplekslerinin antikanser aktivitesi özelliği göstermesinden dolayı tıp dünyasında önemli bir konuma yerleşmiştir. Bu bileşiklerin araştırmalarda reaktif olarak kullanılmasına devam edilmektedir. Schiff bazı içeren diorgano-kalay (IV) komplekslerinin, antitümör olarak etki göstermesi sağlık bilimi için önemli bir araştırma alanı olmuştur (Yin ve ark., 2001).

2.2. Mutasyon

DNA moleküllerinin bilgiyi depolama, eşleme, aktarma ve deşifre etme özelliği genetik fonksiyonunun temelini oluşturur. Genetik şifre içeren DNA'nın kalıtsal değişiklikleri kendiliğinden olabileceği gibi çeşitli etkenlere bağlı olarak meydana gelebilir bu kalıtsal değişiklikler mutasyon olarak adlandırılır. DNA replikasyonu sırasında hatalara karşı birçok önlem alınmasına rağmen replikasyon mükemmel bir işlem değildir (Pasternak, 2005). Sık görülmemekle birlikte bir veya daha fazla baz çiftini etkileyen hatalar oluşabilir. Buna ek olarak çeşitli kimyasallar, ultraviyole ışın, radyasyon ve radyoaktif bileşikler gibi dış etkenler DNA molekülünün nükleotid dizisini kalıcı olarak değiştirebilirler (Pasternak, 2005). Mutasyonlar germ hücrelerinde ya da somatik hücrelerde olabilir. Germ hücrelerinde olanlar kalıtımla geçebilir ve genetik hastalıklar kadar genetik çeşitliliğin ve evrimin de temelini oluştururlar. Somatik hücrelerde olanlar lokalize hücre ölümüne, hücresel fonksiyon değişikliğine ve tümör oluşumuna yol açabilirler (Klug ve ark., 2009).

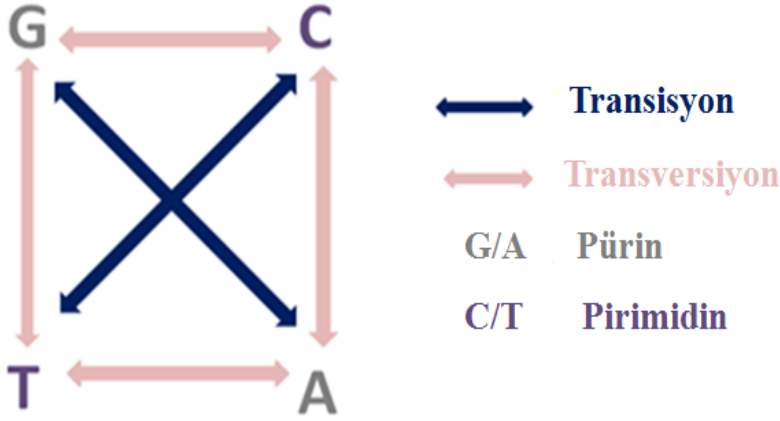
Mutasyonların etkilerinin ve çeşitlerinin büyük değişkenliğine göre genetikçiler birkaç farklı şekilde sınıflayabilirler (Klug ve ark., 2009). En geniş anlamda mutasyonlar iki temel grupta ele alınır. Bunlar “gen mutasyonları” ve “kromozom mutasyonları”dır.

2.2.1. Gen Mutasyonları

Bir genin genomda sayısının ve yerinin değişmeden sadece yapısının değişmesidir. Genetik şifre, kodon adı verilen üçlü nükleotid gruplarından meydana gelir ve her kodon bir amino asiti kodlamaktadır (sonlanma kodonları hariç), gen dizilerinde meydana gelen herhangi bir değişiklik şifrelenen bilgiyi bozabilmektedir. Şifrede değişikliklere neden olan çeşitli tipte gen mutasyonları bulunmaktadır.

2.2.1.1. Baz Değişimi Mutasyonları

Herhangi bir gen bölgesinde bulunan baz ile başka bir bazın yer değiştirmesiyle oluşan mutasyonlardır. Böyle bir mutasyonda bazların değişimi iki farklı şekilde gerçekleşebilir. Pirimidin bazının yine bir pirimidinle ya da pürin bazının yine bir pürin ile yer değiştirmesi transisyon mutasyonu olarak ve bir pirimidinin bir pürinle karşılıklı yer değiştirmesi ise transversiyon mutasyonu olarak adlandırılır. Genlerin kodlama yapan dizilerinde meydana gelen transisyon veya transversiyon mutasyonları kodonlarda değişime neden olurken, amino asitlerde de değişikliğe neden olur ve bu değişim bazen ciddi sorunlar yaratabilmektedir.



Şekil 2.2. Baz değişimi mutasyonları: Transisyon ve transversiyon

2.2.1.2. Çerçeve kayması mutasyonu

Genlerin çoğunlukla sık tekrar eden baz dizelerinin bulunduğu bölgelerde bir ya da birkaç baz çiftinin eklenmesi ya da çıkarılması ile oluşan mutasyondur. Bu tip mutasyon, DNA'da baz çifti değişikliğinin olduğu yerden itibaren kodonlarda bir ya da birkaç nükleotitik kaymaya neden olur. Bunun sonucunda kodlanan proteinin amino asit sırası değişir ve farklı işleve sahip protein üretilebilir (Lewis, 2009).

2.2.2. Kromozom Mutasyonları

Kromozom mutasyonları iki yolla gerçekleşmektedir; kromozomların yapısının değişmesi ve kromozomların sayısının değişmesi şeklindedir.

2.2.2.1. Kromozomların Yapısının Değişmesi

Kromozomlar genel olarak ya kendiliğinden ya da iyonize edici radyasyon, kimyasal bileşikler ve fiziksel stres ile kırılabilir. Kromozomal kırılmalar ya kromatit ya da kromozom düzeyinde gerçekleşmektedir (Bozcuk, 2005). Kromatitler bazen crossing-over olmadan parça değişimine, kaybolmasına veya kazanılmasına sahip olabilir. Bu değişimler genel olarak aşağıdaki gibidir.

1. Delesyon: Kromozomun bir kısmının koparak yok olmasıdır.
2. Duplikasyon: Bir kromozomun herhangi bir parçasının tekrarlanması durumudur.
3. İnversiyon: Bir kromozomun içinden kopan bir parçanın 180° dönerek koştığı yere tekrar bağlanmasıdır.
4. Translokasyon: Bir kromozomun yok olan bir parçasının diğer bir kromozoma yapışmasıdır.

2.2.2.2. Kromozomların Sayısının Değişmesi

Kromozomlar her zaman mitoz ve mayoz bölünme sırasında düzenli bir şekilde ayrılamayabilir ve kromozom sayısı bakımından farklı hücreler oluşabilir.

a. Aneuploidi (Anoployidi)

Kromozomlardan birinin ya da birden fazlasının değişmesi şeklindedir.

- Monosomi: Diploid bir bireyde tek bir kromozom eksik olmasına denir.
- Trisomi: Herhangi bir kromozomdan hücrede iki tane bulunması gerekirken üç tane bulunmasına denir.
- Tetrasomi: Bir kromozomdan iki tane yerine dört tane bulunması durumudur.
- Nullisomi: Bir fertte bir kromozomun, homologu ile beraber eksik olmasıdır.
- Polisomi: Bir takımdaki kromozomların birinin ya da birkaçının sayısının fazla olması olayıdır.

b. Euploidi (oyployidi)

Kromozom sayısının tümünün haploit veya tam katlar halinde artmasıdır. Bazen de diploit kromozomların sayısının yarısını içermesidir.

- Monoploidi: Bir canlının orijinal kromozom takımının yarısına sahip olma durumuna monoploidi denir.
- Poliploidi: Canlının sahip olduğu genomdaki kromozom sayısının $3n$, $4n$, $5n$, $6n$ şeklinde kromozom takımının artması durumudur (Temizkan, 1994).

2.3. Mutajenite

Mutajenik aktivite, kalıtsal materyalde kimyasal bir ajan tarafından ya da kendiliğinden oluşabilen kalıcı baz değişimleri olarak adlandırılır. Son çalışmalarda kanser ve mutasyonun neden olduğu hastalıkların artması kansere ve mutajene karşı yeni ajanlara yönelik çalışmaların yapılması zorunlu hale gelmektedir. Mutasyon oluşumuna sebep olan ajanlara mutajen denir.

Kanser oluşumuna sebep olan ajanlara ise kanserojen denir ve bunlar da mutajendir. Mutajene neden olan her ajan kanserin sebebi olmasa da, mutajenite ve karsinojenite birbirleriyle ilişkilidir, mutasyon araştırmaları günümüzde ciddi bir hastalık olan kanser araştırmalarında da öncül çalışmalar arasındadır (Loh ve ark., 2009).

Kansere neden olan ajanların analizlerinde mutajenlerin temel alınması iki ana unsura dayanır. İlk neden, genetik kod ile genetik sistemin evrensel olmasıdır. İkinci neden, mutajeniteyle karsinojenite arasında ilişkinin olmasıdır. Bakteriyele test sistemleri ile

yapılan çalışmalar sonucu mutajen olduğu belirlenen çoğu maddenin aynı zamanda bir karsinojen olduğu belirlenmiştir. Karsinojen etki içerip içermediği bilinmeyen 300 madde, Ames test yöntemiyle araştırıldığında 175'inin karsinojen madde olduğu bunun 157'sinin mutajen olduğu, karsinojen olmayan 108 maddenin 94'ünün mutajen olmadığı belirlenmiştir (Mc Cann ve Ames, 1976).

2.4. Antimutajenite

Antimutajenik aktivite, mutajenik etkisi bilinen maddenin inaktif hale getirilmesini veya genlerde oluşan mutasyonun değiştirilmesini ya da önleyebilmesini sağlayan maddelerdir. Antimutajenler etkilerine göre ikiye ayrılır; desmutajen ve biyoantimutajenler. Desmutajenler mutajenik maddelerin hücre içerisine girişini inhibe eden ve bunu DNA'yı etkilemeden yapan maddelerdir (Özbek, 2006). Biyoantimutajenler ise, mutajenin genetik materyal ile reaksiyona girmesinden sonra hasar görmüş DNA'nın tamir ve replikasyon mekanizmaları üzerinde rol oynar (Bhattacharya, 2011).

Mutajenlerin zarar verici etkilerini en aza indirmenin yollarından biri antimutajenlerin kullanımudur. Farklı kimyasalların mutajenik ve/veya antimutajenik potansiyel etkilerinin *in vivo* çalışmalar ile test edilmesinin daha güvenilir olmasına rağmen, bu test sistemlerinin daha uzun sürede sonuçlanması ve oldukça maliyetli olduğundan dolayı mutajenik ve/veya antimutajenik çalışmalarda bakterilerin kullanıldığı kısa zamanlı testler yaygın olarak kullanılmaktadır (Paolini ve Forti, 1997).

Bakterilerin hızlı üremeleri, sonucun çok çabuk alınabilmesi, kolay uygulanabilir ve ucuz olması gibi avantajları sayesinde bakteriyel test sistemleri mutajenite/antimutajenite çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Joseph ve ark., 1997).

2.5. Ames/Salmonella Testi

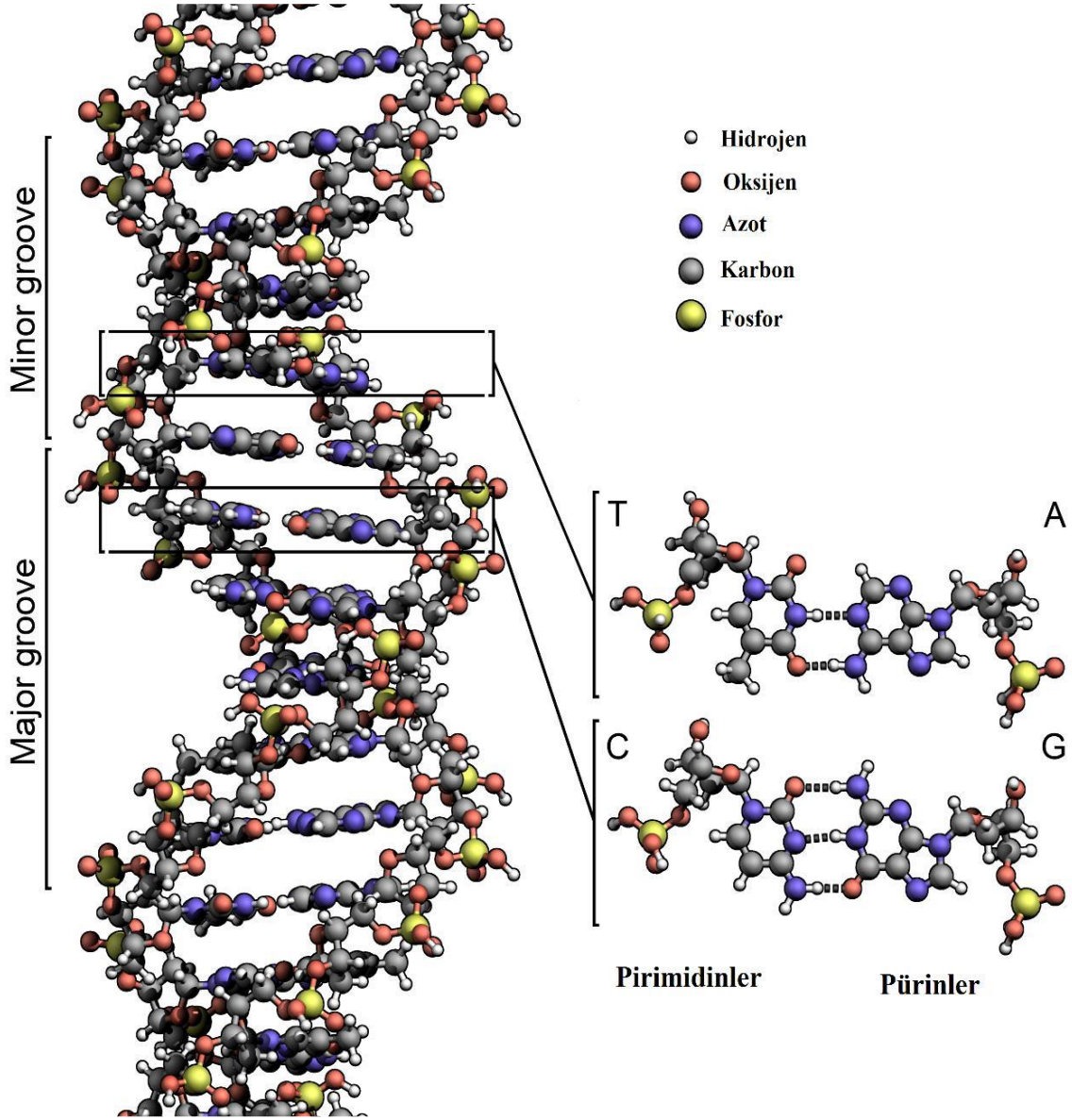
Ames testi, Bruce Ames tarafından 1970'li yıllarda geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanılan kısa sürede sonuçlanabilen bakteriyel test sistemidir. Ames/Salmonella testi bakteriyel testler içerisinde ayrıntıları iyice bilinen, uygulama kolaylığı ve hassaslığından dolayı çok fazla kullanılmakta olan yöntemdir. Bu test sisteminde *Salmonella typhimurium*'un histidin geninde farklı mutasyonlarla oluşturulan (his G, his D yada his C) ve gelişebilmesi için histidine ihtiyaç duyan değişik tipteki oksotrofik mutantlar kullanılmaktadır (Maron ve Ames, 1983).

Analizin esası, mutasyon oluşturulan *S. typhimurium*'un histidin sentezleyebilme özelliği taşımayan (His⁻ = oksotrof) suşların test bileşeniyle uygulandıktan sonra ikinci bir mutasyon geçirip his⁺ hale geri dönüşmesine dayanmaktadır. Bakteriyel mutasyon olması, kullanılan maddenin potansiyel zararı hakkında öncü bir uyarı belirtir. Bu sebeple Ames testi dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.6. DNA

DNA, tüm organizmalar ile bazı virüslerde biyolojik işlevler için gerekli bilgileri taşıyan nükleik asittir. DNA, nükleotid birimlerinden oluşan iki uzun polimer zincir sarmalından meydana gelir ve bu polimer zincirler birbirlerine fosfodiester bağları ile bağlanmışlardır. Hücre içinde kromozom olarak adlandırılan yapıların içinde yer alır. Bu sarmal iplikler arasındaki boşluklar takip edilerek iki tane oluk bulunur. Bu oluklar baz çiftlerine bitişiktirler ayrıca onlara bağlanabilmek için bir alan oluştururlar.

DNA sarmalında bulunan oluklar birbirlerinin tam karşısında bulunmadıklarından dolayı büyüklükleri farklıdır. Bunlardan 22 Å genişliğinde olan oluğa büyük oluk (majör groove), 12 Å genişliğindeki oluğa ise küçük oluk (minör groove) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. DNA' nın üç boyutlu yapısı (Gökçe, 2012)

2.7. İlaç Moleküllerinin DNA ile Etkileşimleri

Kanser ilaçlarının çoğu DNA ve RNA'yı hedef alarak onların sentezini bozmaktadır. Tiyoguanin, merkaptopürin ve methotrexat gibi antimetabolitler ya DNA'ya bağlanmakta ya da nükleotid öncüllerinin sentezini bozmaktadırlar. Bazı alkilleyici ajanlar kovalent yapılarla DNA'ya bağlanıp DNA'ya zarar vermektedirler.

Epifillotoksinler ve antrasiklinler DNA'nın tekrar bağlanmasını engellerler. Vinblastin ve paklitaksel gibi bazı ilaçlar ise tübülün fonksiyonuna hasar vererek eşleşen kromozomların iç iplikçikleri tarafından hücrenin kutuplarına çekilmesini engeller (Akyol, 2004). Antikanser ve antibiyotik ilaçlarında temel etki mekanizması DNA etkileşimi üzerinedir.

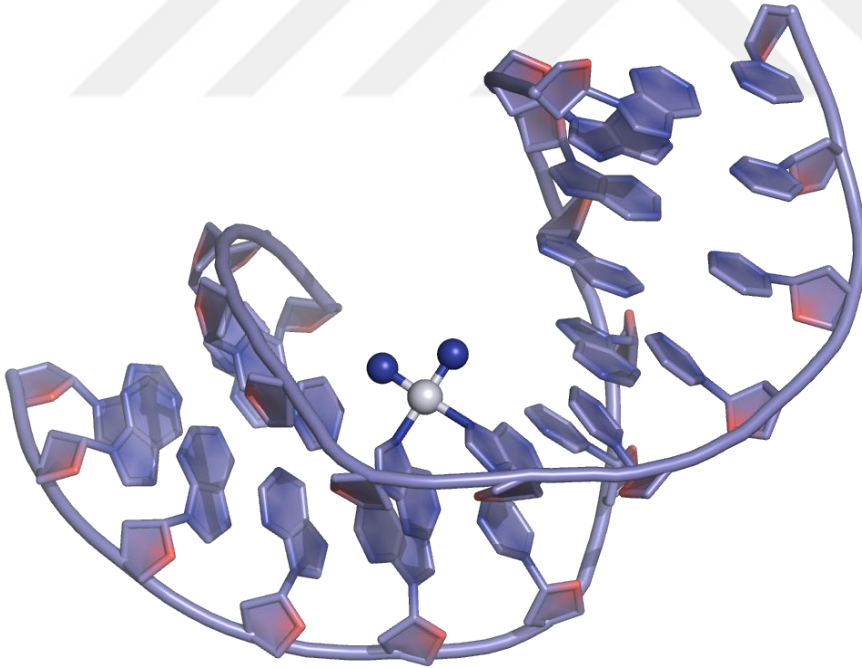
2.7.1. DNA Bağlanma

İlaç moleküllerinin DNA'ya bağlanması ile DNA-ilaç arasındaki etkileşimleri anlayabilmek, klinikteki uygulamalara yeni ve etkili ilaçları kazandırabilmek ve nükleik asitlere karşı hassas kimyasal problemler geliştirilebilmek amacıyla DNA bağlanma bu alanlarda çok kullanılmaktadır. Çünkü antikanser ve antibiyotik ilaçlarının hücre içi hedeflerinin büyük bir çoğunluğu DNA'dır.

Moleküller, DNA'ya kovalent bağ veya moleküller arası zayıf etkileşimler (non kovalent bağ) ile bağlanabilmektedir.

2.7.1.1. İlaç Moleküllerinin DNA'ya Kovalent Bağlanması

Antikanser ilaçlardan biri olarak bilinen cisplatin {*cis* diamindikloroplatin (II), *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]}, DNA sarmalında bulunan iki komşu guanin bazının N(7) azot atomları ile kovalent bağlar oluşturmaktadır (Sherman ve Lippard,1987) (Şekil 2.4). Cisplatin ile DNA arasındaki bağlanma sonucu cisplatin DNA'nın yenilenmesini durdurarak protein oluşumunu engeller ve DNA oluşan hasarı tamir edemez böylece hücre çoğalamaz ve ölür.



Şekil 2.4.cis-platin'in DNA'ya kovalent olarak bağlanması

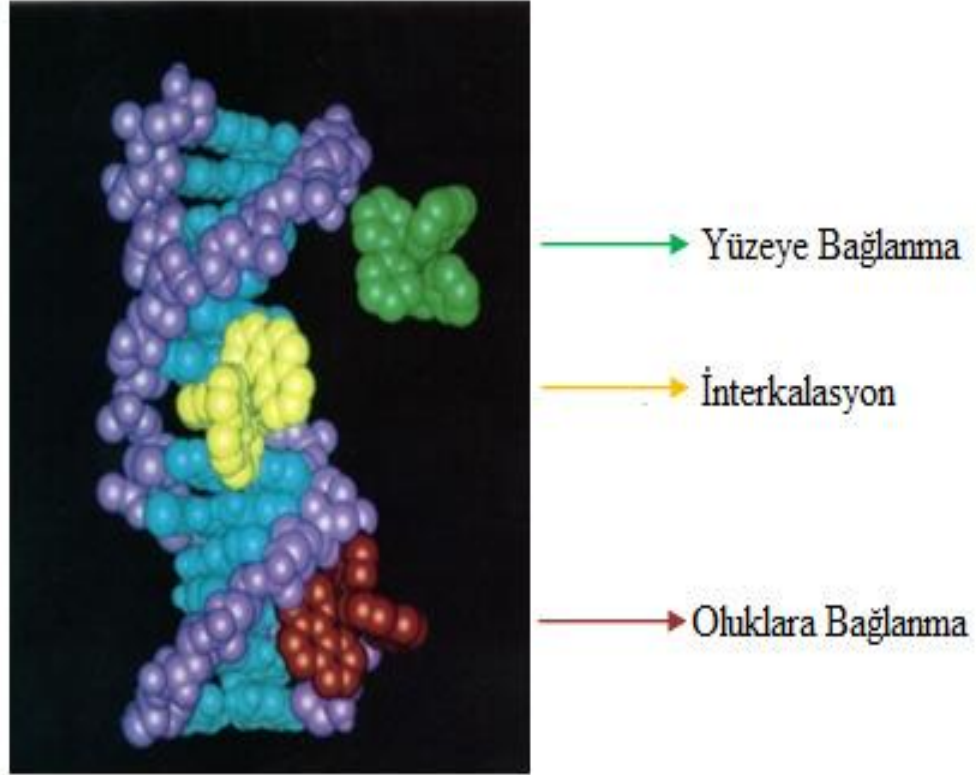
(<http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>)

Cisplatin başarılı bir antikanser ilacı olmasının yanı sıra, tedavi sırasında bazı diğer tümörlere karşı zamanla direnç oluşturması ve ciddi yan etkileri nedeniyle de yalnızca belli kanser türlerinde etkilidir (Lippert, 1999). Sonraki yıllarda farmakolojik özellikleri iyileştirilmiş ve daha az yan etkileri olan nedaplatin, karboplatin ve okzaliplatin olarak adlandırılan bir dizi platin(II) bazlı yeni ilaçlar sentezlenmiştir (İçsel, 2013). Özellikle antikanser özelliği olan ilaç moleküllerinin DNA ile etkileşimlerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenmesi ilaç geliştirme çalışmaları için oldukça önem taşımaktadır (Blackburn ve Gait 1990).

2.7.1.2. İlaç Moleküllerinin DNA ile Kovalent Olmayan Etkileşimleri

İlaçların DNA'ya bağlanması üç şekilde gerçekleşir:

- 1) Elektrostatik Etkileşimler (Yüzeye Bağlanma)
- 2) Oluklara Bağlanma
- 3) İnterkalasyon



Şekil 2.5. Moleküllerin DNA'ya bağlanma şekilleri (İçsel, 2013).

2.7.1.2.1. Elektrostatik Etkileşimler

DNA ile elektrostatik etkileşimler çoğunlukla DNA sarmalının dış yüzeyi boyunca meydana gelmektedir (Şekil 2.5). DNA, fosfat gruplarından oluşan polianyonik bir zincir gibidir. DNA ile çözeltideki metal iyonları arasında oluşan elektrostatik bağlanma katlı DNA konformasyonlarının kararlılığını sağlar. Bu şekilde bağlanan yükler, bağlanma serbest enerjisine katkıda bulunur ve uygun bir entropiye neden olan organik katyonlar, diğer elektrostatik etkileşimler tarafından negatif fosfat gruplarının yüklerinin nötr olması ile serbest kalır. Zıt yüklerin serbest kalmasının yanı sıra DNA-protein etkileşimlerinin oldukça yüksek yüke sahip moleküllerin serbest bağlanma enerjisine yardımcı olmaktadır (Blackburn ve Gait, 1990).

2.7.1.2.2. Oluğa Bağlanma

DNA sarmalında minör ve majör oluk olmak üzere iki farklı oluk bulunur (Şekil 2.5). Küçük moleküllerin çoğu DNA'nın küçük oluklarına bağlanırken, oligonükleotidler ve proteinler gibi büyük yapılar genellikle büyük oluklara bağlanır (Bischoff ve Hoffman, 2002).

İki oluk arasındaki bu fark kimyasal özelliklerinin aynı olmamasından kaynaklanır ve bunlar; hidrojen bağ karakteri, elektrostatik potansiyel değişimi, hidrasyon yeteneği ve sterik etkiler gibi etkenlere dayanır. Minör oluklara bağlanan moleküller, olukların şeklini alarak (hilal şeklinde) ve van der Waals etkileşimlerinin oluşumuna yardım ederek bağlanmayı kolaylaştırırlar. Ayrıca, bu moleküller genellikle timin (O₂) ve adenin (N₃) bazlarının atomları ile hidrojen bağları oluşturabilmektedir.

Küçük oluklara bağlanan moleküllerin çoğu, adenin-timin oranı zengin bölgelere bağlanır. Nedeni ise adenin-timin bölgeleri guanin-sitozin bölgelerine göre daha dardır, bu bölgedeki sterik engel daha az ve elektrostatik potansiyelin ise daha fazla olmasıdır. (Blackburn ve Gait, 1990).

2.7.1.2.3. İnterkalasyon

İnterkalasyon bağlanma şekli, düzlemsel aromatik halkanın DNA'nın baz çiftleri arasına yerleşmesiyle gerçekleşir (Şekil 2.5). İnterkalasyon yapan moleküller, komşu DNA baz çiftleri arasına girebilen uygun düzlemsel heterosiklik gruplar içermelidirler. İnterkalasyonun DNA bazları ve moleküller arasında istiflenme etkileşimleri ile kararlı halde olduğu düşünülmektedir.

İnterkalasyon yapan moleküller, DNA'nın çift sarmal yapısını bozmaktadır. İnterkalasyon olan yerin etrafındaki baz çiftleri arasındaki burkulma (bükülme) açısı azalır ve biyopolimerin uzunluğu artar. Bu etkilerin tümü interkalasyon yapan molekülün uzaklaştırılmasıyla ortadan kalkabilmektedir (Lerman, 1963).

İnterkalasyon yapan moleküller DNA'da güçlü yapısal bozukluklara neden olmaktadır. Etidyum bromür, daunomycin ve proflavin gibi birçok farklı bileşiğin DNA'ya interkalatör olarak bağlandığı bildirilmiştir (İçsel, 2013).

İnterkalasyon bağlanma DNA'ya bağlanma şekilleri içerisinde en önemli bağlanma türüdür. Kanser kemoterapisinde kullanılan Daunomycin ve Adriamycin organik bileşikler DNA'ya interkalasyon şeklinde bağlanan moleküllerdir. Ancak, antikanser ilaç olarak etkileri bilinen bu iki bileşiğin kardiyotoksisite gibi yan etkilerinin olması ve bazı kanser hücrelerinin bu bileşiklere karşı zamanla direnç kazanarak etkisini kaybetmesi bu ilaçların kullanımını kısıtlamaktadır.

2.7.2. DNA Kırma

DNA kırma aktivitesi, biyolojik açıdan tüm canlılar için hayati öneme sahip enzimatik reaksiyonlar sürecidir. Bu enzimatik reaksiyonlara, restriksiyon enzimleri ve polimeraz enzimleri örnek verilebilir. Restriksiyon enzimleri, DNA sarmalının her iki zincirindeki belirli nükleotitlerdeki dizileri tanır ve aynı anda onları kesen bir enzim türüdür (Kessler ve Manta, 1990). Bakteri ve alglerde bulunan bu enzim, virüslere karşı bir savunma mekanizmasına aittir. Restriksiyon enzimleri konak bakteri hücresindeki yabancı DNA'ları seçerek keserler; konak DNA restriksiyon enziminin etkinliğinden korunmak için ise metilaz ile metillenir. Bu iki olaya restriksiyon modifikasyon sistemi adı verilir. Restriksiyon enziminin DNA'yı kesmesi, DNA'nın çift sarmalındaki şeker/fosfat omurgasından iki kesme yaparak gerçekleşir.

Polimeraz ise DNA'nın replikasyonu ve onarımında görev almaktadır. Replikasyon sırasında DNA'nın ifade edileceği bölgeye çentikler atarak DNA sarmalını gevşeterek replikasyon işlemini başlatır. Ayrıca replikasyon işlemi sırasında meydana gelen hatalı kodlamaları da düzenlerler, replikasyon işlemi dışında ultraviyole gibi dış etmenler sonucu oluşan DNA hasarlarını da düzenlerler. Bu işlemlerin tümü DNA'dan hasarlı bölgeleri keserek yerine doğru kodları yerleştirme prensibine dayanır. İlaç sanayi ve biyoteknoloji alanlarında yapay kimyasal nükleazların dizayn edilmesi kemoteropik ajanların ve antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesine öncülük edeceğinden oldukça önemlidir (Addison ve ark, 1988).

Shiff bazı ve bakır kompleksi DNA-protein etkileşimlerinin detaylı bir şekilde çalışılması için gerekli olan DNA-parmak izi deneyleri için kullanılmaktadır. DNA kırma mekanizması iki şekilde gerçekleşmektedir, oksidatif kırma veya hidrolitik kırmadır. Oksidatif kırma, nükleobazlar ya da şekerde meydana gelir. Hidrolitik kırma ise DNA'nın fosfodiester bağında meydana gelir.

2.8. Schiff Bazlarının DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler

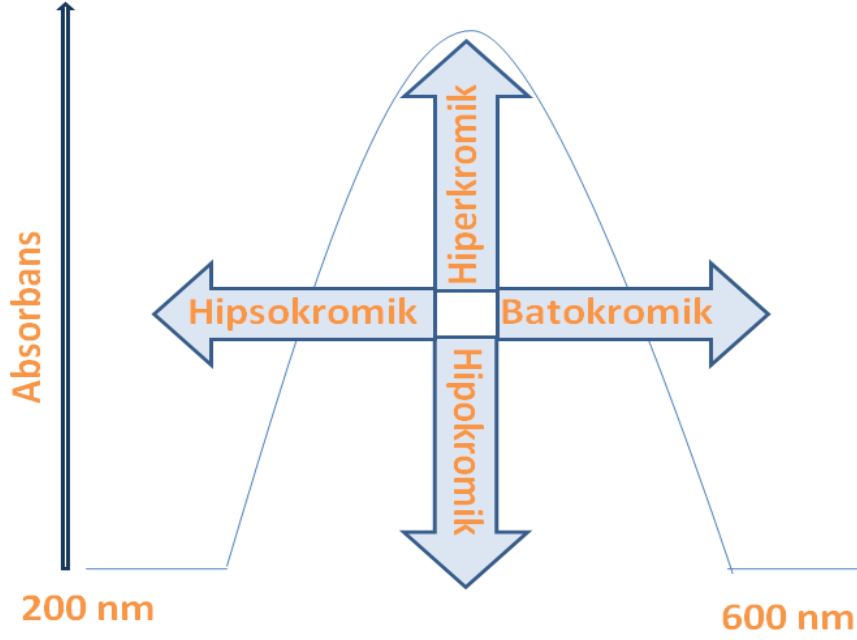
İlaç moleküllerin DNA ile olan etkileşimleri son yıllarda en ilgi çekici konu haline gelmiştir. Bu etkileşimlerinin araştırılması için kullanılan en yaygın yöntemler UV-Vis absorpsiyon titrasyonu, floresans spektroskopisi, izotermal titrasyon kalorimetri, viskozite ölçümleri linear ve dairesel dikroizm spektroskopisi ve agaroz jel elektroforezi yöntemidir.

2.8.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonu

İlaç molekülleri ile DNA etkileşimlerinin araştırılmasında sıklıkla kullanılmakta olan bir test olup uygulama yöntemi oldukça basit ve kolaydır. İlaçların DNA üzerindeki etkisi DNA'nın veya ilacın absorpsiyonunun değişmesiyle UV-Vis absorpsiyon titrasyonu gözlemlenebilir. Çalışma, ilaç konsantrasyonunu sabit tutarak ve kademeli olarak DNA eklenmesiyle absorbanındaki değişikliklerin kaydedilmesi ile gerçekleşmektedir. Bu işlem süresi absorbansta bir farklılık olmayıncaya kadar uygulanmaktadır.

DNA ile ilaç molekülleri arasındaki etkileşimde, ilaç moleküllerinin serbest olduğu anda DNA'ya bağlanabildiği maksimum absorbanstaki kaymalara bakılır. Absorbanstaki kaymanın azalması ya da artmasının ilaç molekülleri ile DNA'daki etkileşim şiddetini yansıtmakta olduğu kabul edilmektedir (Benitez ve Bribiesca, 1999).

İlaç moleküllerinin DNA'ya bağlanması ile absorpsiyonda artma (hiperkromik) veya azalma (hipokromik); dalga boyunda ise yüksek dalga boyuna kayma (batokromik) veya düşük dalga boyuna kayma (hipsokromik) şeklinde değişiklikler meydana gelir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. UV-Vis absorpsiyon titrasyonundaki kaymalar

2.8.2. Agaroz Jel Elektroforezi

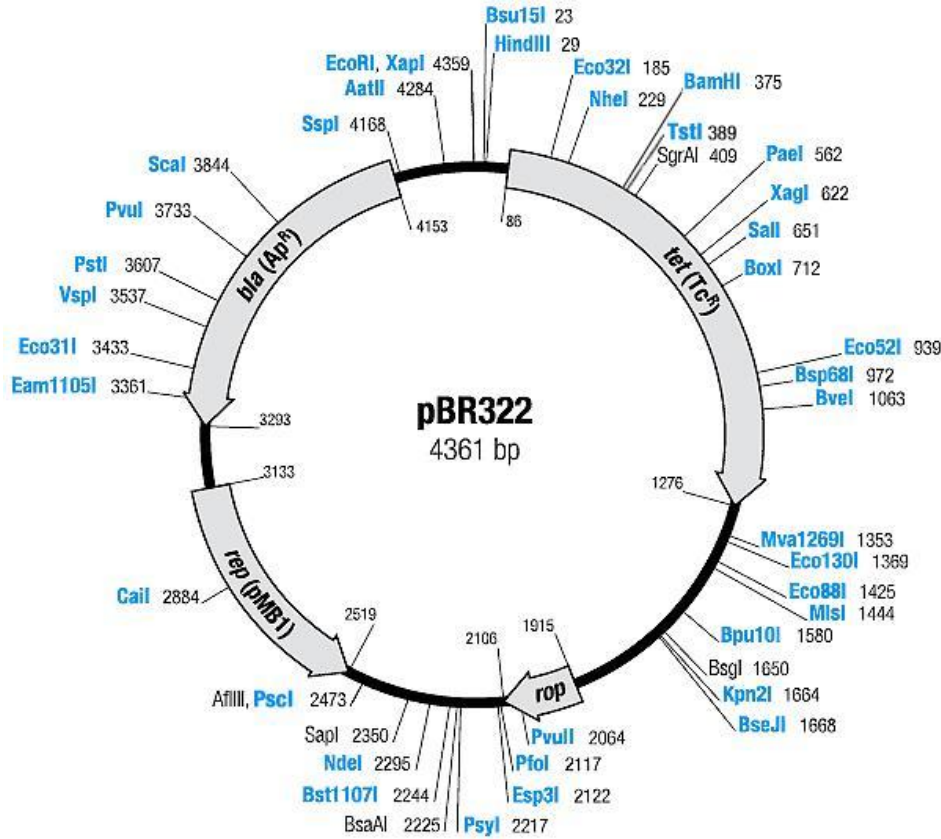
DNA moleküllerine analiz yapılırken çeşitli metotlar kullanılmaktadır ve agaroz jel elektroforezi laboratuvarlarda sıklıkla faydalanılan en kolay yöntemlerden birisidir. Agaroz jel elektroforezin avantajları oldukça basit ve hızlı sonuç elde edilebilmesidir, bunun yanı sıra diğer yöntemler ile yeteri kadar ayıramayan DNA parçaları agaroz jel elektroforezi sayesinde ayrılması sağlanmaktadır.

DNA'nın elektroforetik yönteminin temelinde, bu molekülün elektriksel bir alan içerisinde, jel üzerindeki hareketine dayanmaktadır. Bu hareketin hızı, molekülün yapısına, büyüklüğüne, jelde kullanılan maddenin yoğunluğuna, uygulanan akıma ve iyonik kuvvete göre değişebilmektedir.

Matriks, jel elektroforezinde destekleyici madde olarak kullanılır ayrıca mekaniksel etkiyi engeller ve moleküllerin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlar. Matriks agaroz veya agaroz akrilamid karışımı olabileceği gibi nişasta ve poliakrilamidten de olabilir. Poliakrilamid jellerde genel olarak küçük DNA parçaları ve RNA moleküllerinin ayırımı sağlanır. Fakat poliakrilamid jeli hazırlamak zordur ve uzun süre alır. Bununla birlikte uygulanacak DNA konsantrasyonu yüksek olması durumunda bu tip jelin kullanımı uygun değildir. Bu nedenle agaroz jel elektroforezi rutin olarak en yaygın kullanılan yöntemdir.

Bu yöntemde; ilaç ile etkileşime giren DNA'nın jeldeki hareketinin hızı ölçülür ayrıca ilacın bağlanabilmesi için kapalı halkasal DNA (genellikle plazmid DNA) kullanılır. Plazmid DNA agaroz jel elektroforezinde Form I, Form II ve Form III olmak üzere üç farklı şekilde gözlemlenir. Form I DNA'nın orijinal süper sarmal formudur. Bu formdaki DNA çift sarmalının herhangi birinde bir kırık oluşmasıyla açılmış dairesel form olan Form II oluşmakta, iki ya da daha fazla kırık oluşmasıyla ise linear form olan Form III meydana gelmektedir. Bu bilgiler DNA'yı kırabilen ürünlerin tanımlanmasında son derece yardımcı olmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan plazmid, agaroz jel elektroforezi tekniğinde çok sık kullanılmakta olan süperkırımlı pBR322 plazmid DNA'sıdır. pBR322, en fazla kullanılan klonlama vektörlerinden birisidir ve *Escherichia coli*'de kullanılmak üzere geliştirilmiş olmakla birlikte ilk çok amaçlı klonlama vektörüdür (Bolivar ve ark., 1977). pBR322'nin uzunluğu 4361 baz çifti olup, çift zincirli halkasal yapıya sahiptir. Ayrıca ampisilin ve tetrasiklin dirençli genlerini içerir (Balbás ve ark., 1986) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. pBR322 plazmid haritası (<http://parts.igem.org>)

2.9. Schiff Bazlarının Mutajenite, Antimutajenite, Biyolojik Aktiviteleri ve DNA ile Olan Etkileşimleri

Schiff bazlarının birçok biyolojik aktivitesi ve farmasötik önemi olmasından dolayı oldukça ilgi çekici bileşikler haline gelmiştir. Schiff bazları ile yapılan birçok çalışmada; mutajenite, antimutajenite, antimikrobiyal ve DNA etkileşimleri ile bu bileşiklerin önemi gösterilmiştir. Bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Jana ve ark. 2017, bir üçlü Schiff bazı ligandı, piperidin-2-ilmetil-piridin-2-ilmetilen-amin (L)'den bir mononükleer Cu (II) kompleksi [Cu (L) Cl₂] sentezlemişlerdir. Kompleksin antibakteriyel etkisini minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) yöntemiyle çeşitli bakterilere karşı test etmişlerdir ve hemen hemen tüm bakterilere karşı iyi bir antibakteriyel aktivite gösterdiği sonucuna varmışlardır. Schiff bazı kompleksinin CT-DNA ile olan etkileşimleri elektronik absorpsiyon ve floresans spektroskopisi ile araştırılmış ve kompleksin kısmi interkalasyon yoluyla CT-DNA ile etkileştiğini belirlemişlerdir.

Kumar ve ark. (2017), üç izoksazol Schiff bazlarını 2 - ((E) - (3,5-dimetilizoksazol-4-ilimino)Metil) -6-metoksifenol (L1), 2 - ((E) - (3,5-dimetilizoksazol-4-ilimino) Metil) - 4,6-diiyodofenol (L2), 2 - ((E) - (3,5-dimetilizoksazol-4-ilimino)Metil]-6-bromo-4-klorofenol (L3) ve bunların Cu (II) komplekslerini [Cu (L1) 2] (1), [Cu (L2) 2] (2) ve [Cu (L3)] (3) sentezlemişlerdir. Elektronik absorpsiyon titrasyonları, viskozite ölçümleri ve floresan söndürme çalışmalarından elde edilen DNA bağlanma verileri, Cu (II) komplekslerinin CT-DNA'ya interkalasyon moduyla bağlandığını belirlenmişlerdir. Süper-kıvrımlı pBR322 plazmid DNA ile Cu (II) komplekslerinin DNA kırma deneyleri, H₂O₂ (oksidatif kırma) ve UV ışığı (fotolitik kırma) varlığında agaroz jel elektroforezi ile araştırmışlardır. Tüm bileşiklerin DNA'yı kırma aktivitesinin olduğu sonucuna varılmıştır. Sentezlenen bileşikler, disk yöntemi ile antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri için incelenmişlerdir. Cu (II) komplekslerinin ligandlara göre daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kumaravel ve Raman (2017), yeni sentezledikleri iki imidazol türevi Schiff bazlarının, ligand ve dört farklı metal Cu (II), Ni (II), Co (II) ve Zn (II) komplekslerini çalışmışlardır. Çalışmada kullanılan Schiff bazlarının DNA bağlanma, DNA kırma aktiviteleri ve antimikrobiyal özelliklerini (bakteri, mantar ve küfler) araştırmışlardır. Sonuç olarak ligand ve komplekslerin genel olarak DNA'ya interkalatif olarak bağlandığı bildirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi tekniği ile komplekslerin kırma aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir. Tüm bileşiklerin nispeten yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu

saptanmıştır.

Manjunath ve ark. (2017), 4-aminoantipirin ve 8-formil-7- 4-metilkumarin / 5-formil-6-hidroksikoumarin, hidroksipropilamin'den türetilen Schiff bazlarının Co(II), Ni(II) ve Cu(II) komplekslerinin biyolojik aktivite ve DNA kırma aktivitelerini araştırmışlardır. Biyolojik aktive olarak Schiff bazlarının antibakteriyel ve antifungal etkilerini minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) yöntemiyle incelemiştirler. DNA kırma aktivitelerini pBRR322 plazmid DNA'sı kullanarak agaroz jel elektroferezi kullanarak yapmışlardır. Sonuç olarak sentezlenen Schiff bazlarının antibakteriyel ve antifungal etkilerinin olduğu saptanmıştır. Schiff bazlarının plazmid DNA'sını kırdığı belirlenmiştir.

Vafazadeh ve ark. (2016), üç dişli Schiff bazı olan bakır (II) komplekslerinin DNA ile etkileşimlerini araştırmışlardır. Bakır (II) komplekslerinin DNA'ya bağlanma özellikleri UV-görünür alan spektroskopisi kullanılarak yapılmıştır ve bakır (II) komplekslerinin DNA'ya interkalatif olarak bağlandığı gösterilmiştir. DNA kırma aktivitesi ise agaroz jel elektroferezi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Bakır (II) komplekslerinin DNA kırma aktivitesinin olduğu sonucuna varılmıştır.

El-Sonbati ve ark. (2016), Schiff bazı olan (3-[(2-hidroksi-3-metoksibenziliden)hidrazo]-1,3-dihidroindol-2-1) ve metal komplekslerini sentezlemişlerdir. Sentezledikleri Schiff Bazı ve dört metal kompleksinin DNA'ya bağlanma etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak sentezlenen Schiff Bazı ve dört metal kompleksinin DNA'ya interkalatif olarak bağlandığını göstermişlerdir.

Yıldırım (2016) yaptığı bir çalışmada; orijinal (*E*)-3-[3,5-bis (triflorometil)fenilimino)metil]benzen-1,2-diol (Ligand 1) ve 2,2'-{4,4'-[2,2'-(etan-1,2-diyilbis(oksi))bis (etan-2,1-diyil)]bis(oksi)bis(4,1fenilen)}bis(azan-1-yil-1yilidenbis(metan-1-yil-1yiliden) difenol (Ligand 2) Schiff bazları ve Ligand 1 ve Ligand 2'nin dört farklı metal komplekslerinin biyolojik aktiviteleriyle DNA etkileşimlerini incelemiştir. Schiff bazlarının DNA kırma etkisini agaroz jel elektroferezi yöntemi ile DNA bağlanma özelliğini ise UV-Vis methodu ile belirlemiştir. UV-Vis absorpsiyon titrasyonu sonuçları bileşiklerin tamamının DNA ile etkileşime girdiğini göstermiştir. L1'in demir(II), kobalt(II), nikel(II) kompleksleriyle L2'nin mangan(II), nikel(II) komplekslerinin DNA'ya interkalasyonla bağlandığını bulmuştur. L1 ve L2'nin Cu kompleksi ile L2-Fe kompleksinin DNA'ya kısmi interkalasyon moduyla bağlandığı görülmüştür. Agaroz jel elektroferezi çalışmaları sonucu, L1'in Fe, Cu ve L2'nin Fe kompleksleri DNA'yı hidrolitik ve oksidatif şekilde kırdığı, L2-Ni ve L2-Cu komplekslerinde ise plazmid DNA'yı sadece

oksidatif olarak kırdığı görülmüştür. Schiff bazı ve komplekslerinin Gram pozitif ve Negatif bakteriler ile mayalara karşı antimikrobiyal aktivitelerini minimum inhibe edici konsantrasyon yöntemi ile çalışılmış ve ligandların antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini bildirmiştir.

Yıldırım ve Demir (2016) yaptıkları çalışmada, glisin metil ester salisiliden bileşiğinin antimutajenik, antimikrobiyal etkisi ve DNA kesme özelliği incelemiştir. Antimutajenik etkisinin araştırılmasını Ames testi ile TA98 ve TA100 suşları kullanılarak belirlemiştir. Antimikrobiyal aktivitesi broth mikrodilüsyon metodu ile çalışmışlardır. DNA kesme özelliğini ise agaroz jel elektroforezi ile tespit etmişlerdir. Deney sonuçlarında bileşiğin antimutajenik etkisinin bulunduğu, gram pozitif, gram negatif bakteriler ve mayalar üzerinde etkili olduğu göstermişlerdir. Elektroforez sonucuna göre bileşik ne hidrolitik ne de oksidatif olarak incelendiğinde herhangi bir kesme özelliğinin olmadığını belirlemiştir.

Iqbal ve Hoque (2016), Amoksisilin ve benzaldehit ligandlarından sentezledikleri Schiff bazlarının antimikrobiyal potansiyelini disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. Mikroorganizmalardan, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus* kullanılmıştır. Schiff bazlarının mikroorganizmalara karşı etkili olduğunu göstermişler ve en fazla aktivitenin *Salmonella typhi* suşuna karşı olduğunu belirlemiştir. Antifungal etkisinin antibakteriyel etkisinden daha az olduğunu bildirmiştir.

Patil ve ark. (2015), Sentezlenen Schiff bazları (o-toluidin / 3-aminobenzotriflorid ile 6-formil-7,8-dihidroksi-4-metilkumarin) ve bunların metal kompleksleri [Co (II), Ni (II) ve Cu (II)]'nin DNA kırma ve antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal ve anthelmintik) aktivitelerini araştırmışlardır. DNA kırma aktiviteleri agaroz jel elektroforezi yöntemiyle, antimikrobiyal aktiviteleri ise disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda bazı metal komplekslerinin DNA'yı tamamen kırdığı, bazılarının ise kısmen kırdığı sonucuna varılmıştır. Antimikrobiyal çalışmada ise, L1- Cu (II) ve L2- Cu (II) komplekslerinin tüm türlere karşı oldukça aktif olduğu bulunmuştur.

Bostancı (2014), on beş tane benzotiyazol türevli bileşiği çalışmıştır. Mutajenik etkilerine belirlemek için Ames testi için *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları kullanmıştır. Araştırma sonunda, test edilen bileşiklerin ikisinin TA100 mutant suşunda güçlü mutajenik, bir bileşiğin ise yalnızca TA98 için mutajenik etkisinin olduğu, bunun yanı sıra bir maddenin her iki suşta da mutajenik etki gösterdiği, bir bileşiğin ise

zayıf mutajenik olduğu gözlenmiş olup diğer on bileşiğin mutajenik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

Shebl (2014), Schiff bazı ligandı ve Cu(II), Fe(II), Ni(II), Co(II) ve VO²⁺ komplekslerinin, antimikrobiyal aktivitelerini ve DNA ile etkileşimini incelemiştir. Antimikrobiyal aktivite için kullanılan mikroorganizmalara (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*.) karşı antimikrobiyal etkisi değerlendirmiştir. Sonuç olarak ligand ve komplekslerinin biyolojik olarak aktif olduğunu bulmuştur. DNA-bağlanma özelliklerini elektronik emme, floresan ve viskozite ölçümleriyle incelemiş ve Cu komplekslerinin interkalasyon olarak bağlandığını göstermiştir.

Kurt (2011), 2,6 diaminopiridinin reaksiyonundan Schiff bazları ve komplekslerini sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin ve komplekslerin DNA bağlanma özellikleri incelenmiştir. Sonuç olarak sentezlenen bileşiklerden çoğunun DNA ile bağlandığı, hidrojen peroksit ortamında bağlanma oranının daha da yükseldiği görülmüştür bu açıdan sentezlenen bileşikler ümit verici olarak kabul edilmiştir.

Bal 2010 yılında, Schiff bazı ve komplekslerinin (nikel(II), mangan(II), bakır(II), çinko(II) ve kobalt(II)) genotoksik etkisine Ames testi ile çalışmıştır. Araştırma bulguları, kobalt kompleksinin dışındaki ligand ve komplekslerin mikrozomal enzim yokluğunda (S9-) ve varlığında (S9+), TA98 suşunun mutajenik etkisinin olduğu görülürken, TA100 suşunun sadece kobalt kompleksinin mutajenik etkisi olduğunu göstermiştir.

Akgül ve Kaya, (2004), oligo-3-aminopiridin (OAP) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi için test edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi sonucunda inhibisyon bölgeleri, 50 µg OAP'nin Gram pozitif suşlarına karşı güçlü bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur, minimum önleyici konsantrasyonu (MIC), minimum bakteri öldürücü konsantrasyon (MBC), sırasıyla, 25 µg/ml 50 µg /ml olarak bulunmuştur. Sonuçlar OAP'nin *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*'e karşı güçlü bir antibakteriyel madde olduğunu göstermektedir.

Onuska ve ark. (1996), Schiff bazı aminoguanidine bileşiklerini Ames testiyle araştırmışlardır ve *Salmonella typhimurium*'un üç farklı (TA97, TA100 ve TA102) mutant suşlarını kullanmışlardır. Sonuç olarak test edilen Schiff bazlarının mutajenik olmadığı ve bu bileşiklerin güçlü antimutajenite ve antibakteriostatik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan aminoguanidine bileşiklerini birçok hastalığın önlenmesinde olası farmakolojik ajan olarak düşünülmüştür.

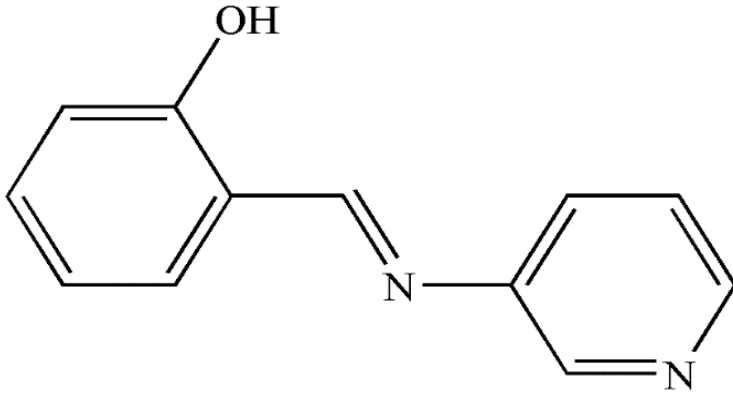
BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

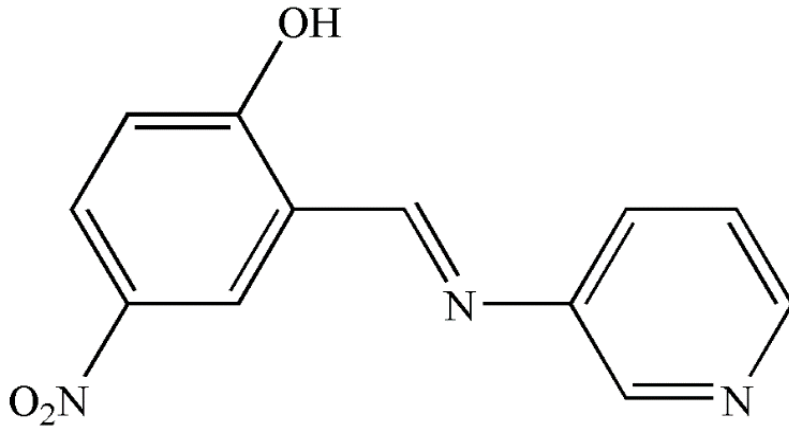
3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Schiff Bazları

Bu tez çalışmasında kullanılan 3-aminopiridin Schiff bazları Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa YILDIZ tarafından sentezlenmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. 3-Aminopiridin Schiff bazlarının kimyasal yapıları Şekil 3.1. ve 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 2-[(Pridin-3-yilimino)metil]fenol (Bileşik 1)



Şekil 3.2. 4-Nitro-2-[(pridin-3-yilimino)metil]fenol (Bileşik 2)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.2.1. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Mutajenite ve antimutajenite çalışmasında 3-Aminopiridin Schiff bazlarının farklı konsantrasyonlarının (0,5, 5, 50 ve 500 ppm) hazırlanmasında kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO), TA98 mutant suşu için standart mutajen olan 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) L-histidin, glikoz, D-biyotin, agar (Difco) Sigma-Aldrich'den temin edildi. Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), potasyum fosfat (K_2HPO_4), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), nutrient broth (Oxoid), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum klorür (NaCl), TA100 mutant suşu için standart mutajen olan sodyum azid (SA, NaN_3) Merck'den alındı.

3.1.2.2. Antimikrobiyal Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları için sülfirik asit (H_2SO_4) ve baryum klorür ($BaCl_2$) Merck'ten; Müller Hinton Broth (Oxoid) Thermo'dan elde edildi. Bakteriler için kullanılan Nutrient agar ve Mueller-Hinton broth; mayalar için kullanılan Saboraud dekstroz agar ve Roswell Park Memorial Institute Medyum (RPMI); pozitif kontrol olarak kullanılan Gentamisin, Ampisilin ve Flukonazol antibiyotikleri Sigma Aldrich'den temin edildi.

3.1.2.3. DNA Etkileşim Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA bağlanma aktivite çalışmasında kullanılan CT-DNA'sı ve etidiyum bromür Sigma Aldrich'ten; tris bazı, hidroklorik asit (HCl) ve DNA kırma aktivite çalışmasında kullanılan sodyum hidroksit (NaOH), glasiyal asetik asit (CH_3COOH), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), potasyum klorür (KCl) ve hem DNA bağlanma hem de DNA kırma aktivitesi için Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) Merck'ten elde edildi. pBR322 plazmid DNA, marker olarak kullanılan DNA ladder ve kontrol olarak kullanılan EcoRI enzimi Thermo Scientific'ten alındı.

3.1.3.Mutajenite ve Antimutajenite

3.1.3.1.Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Test Suşları

Çalışmada Ames ve arkadaşları tarafından geliştirilen *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları kullanıldı (Çizelge 1). Suşlar Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hülya SİVAS tarafından hediye edildi.

Çizelge 3.1. TA98 ile TA100 Suşlarının Genetik Özellikleri

Suşlar	Histidin Mutasyonu	LPS	R Faktör	Onarım	Mutasyon türü
TA98	hisD3052	Rfa	pKM101	Δ uvr B	Çerçeve kayması
TA100	hisG46	Rfa	pKM101	Δ uvr B	Baz çifti değişimi

*LPS: Lipopolisakkarit

** Δ : Delesyon

3.1.3.2. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Stok Çözeltiler ve Besiyerleri

3.1.3.2.1.Vogel-Bonner E ortamı (50X VB tuz çözeltisi)

Minimal glukoz agar (MGA), histidin/biyotin/ampisilin (HBA) ve histidin/biyotin (HB) agar plaklarının kullanılmak için hazırlandı. Isıtıcıli manyetik karıştırıcı üzerinde 67 mL saf su içerisine sırasıyla; 1 g magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 10 g sitrik asit monohidrat, 50 g potasyum fosfat (K_2HPO_4), 17,5 g sodyum amonyum fosfat tetrahidrat ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$) her biri çözüldükten sonra tek tek eklendi. Çözelti 100 mL saf su ile tamamlandıktan sonra otoklavda steril hale getirilerek oda sıcaklığında muhafaza edildi

3.1.3.2.2. Glukoz Çözeltisi (%20)

HB ve HBA petrilerinin hazırlanması için karbon amacıyla kullanıldı. Manyetik karıştırıcı üzerinde 10 mL saf suya 2 g glukoz eklenerek tamamen çözdürüldü. Otoklav ile steril edilerek çözelti +4 °C'de saklandı.

3.1.3.2.3. Histidin Çözeltisi (%0,5)

HB ve HBA petrilerinde kullanılmak üzere hazırlandı. Oda sıcaklığındaki 50 mL saf su içerisine L-Histidin 0,25 g eklenerek tamamen çözünmesi sağlandı. Daha sonra çözelti membran filtreyle steril hale getirildi, ardından çözelti +4 °C’de saklandı.

3.1.3.2.4. Biotin Çözeltisi (0,5 mM)

HB ve HBA petrilerinde kullanılmak üzere hazırlandı. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılan 100 mL saf suya 0,01 g D-Biotin (MA 244,3 g/mol) ilave edilerek tamamen çözünmesi sağlandı. Daha sonra çözünen karışım membran filtreyle steril hale getirilerek çözelti +4°C’de saklandı.

3.1.3.2.5. NaOH Çözeltisi (0,02 N)

Ampisilin çözeltisi için kullanıldı. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde 50 mL saf suya 0,04 g sodyum hidroksit (NaOH) (MA 40 g/mol) ilave edilerek çözünmesi sağlandı.

3.1.3.2.6. Ampisilin Çözeltisi (% 0,8/0,02 N NaOH)

HBA (master) plaklarının hazırlanması için ve pKM101 plazmidi taşıyan suşların kontrolün için kullanıldı. 25 mL 0.02 N NaOH içerisinde 0,2 g ampisilin trihidrat çözdürülerek membran filtre ile steril hale getirildi ve çözelti +4°C’de saklandı.

3.1.3.2.7. Biotin/Histidin Çözeltisi (0,5mM)

Top agar içerisine konulmak için hazırlandı. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde 250 mL saf suya 0,031 g D-Biotin (MA 244,3 g/mol) ilave edildi. Tamamen çözünen karışıma 0,024g L-Histidin. HCl (MA 191,7 g/mol) eklendi. Çözelti membran filtreyle steril edilerek +4°C’de saklandı.

3.1.3.2.8. Kristal Viyole Çözeltisi (%0,1)

Rfa mutasyonunun kontrolü için hazırlandı. 200 mL saf su ile 0,2 g kristal viyole karıştırıldı ve hazırlanan çözelti ışık almayan ortamda ve +4°C’de muhafaza edildi.

3.1.3.2.9. Sodyum-Fosfat Tamponu (0,2 M)

Çalışmada top agar içerisine konuldu. 3 mL 0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), (6,9 g/250 mL) (MA 137,99 g/mol) ve 22 mL 0,2 M disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), (8,9 g/250 mL) (MA 177,99 g/mol) 0,2 M'lık iki karışımda ayrı ayrı hazırlandıktan sonra karıştırıldı ve pH 7,4 olacak şekilde ayarlanarak otoklav ile steril edildi.

3.1.3.2.10. Tuz çözeltisi (%0,9)

Bakteri kültürlerini seyreltmek için kullanıldı. 100 mL saf su ile 0,9 g NaCl karıştırılarak otoklav ile steril hale getirildi.

3.1.3.2.11. 4-Nitro-*o*-fenilendiamin (0,1 µg/µL)

Antimutajenite çalışmasında hem mutajen olarak hemde TA98 suşunun pozitif kontrolü için hazırlandı. 10 mL DMSO içerisinde 1 mg NPD çözdürüldükten sonra membran filtreyle steril edilerek deneyde 10 µg/plak olarak kullanıldı. Mutajen +25 °C'de saklandı.

3.1.3.2.12. Sodyum Azid (0,01 µg/µL)

Antimutajenite çalışmalarında hem mutajen olarak hemde TA100 suşunun pozitif kontrolü için hazırlandı. 10mL saf su içerisinde 0,1 mg sodyum azid (SA)(NaN_3) çözdürülerek membran filtreyle steril edilerek deney sırasında 1 µg/plak olarak kullanıldı. Mutajen +4 °C'de saklandı.

3.1.3.2.13. Histidin/Biyotin Agar (HB)

Histidin gereksinimi kontrolü için kullanıldı. 0,15 g agar ve 210 mL saf su karıştırıldı ve otoklavda steril olması sağlandı. Ardından karışım 55 °C'ye kadar soğutularak sonra steril 5 mL 50X VB, 25 mL %20'lik glukoz ve 2,5 mL %0,5'lik histidin çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve ardından 1,5 mL 0,5 mM'lık biyotin çözeltisi eklendi. Karışım distile suyla 250 mL'ye tamamlanarak ardından petrilere eşit olarak (yaklaşık 25 mL) döküldü.

3.1.3.2.14. Histidin/Biyotin/Ampisilin Agar (HBA)

Çalışmalarındaki test suşlarının master plakların hazırlanması için ve ampisiline dirençlilik özelliklerinin kontrolü için kullanıldı. 0,15g agar ile 225 mL saf su karıştırıldıktan sonra otoklav ile steril edildi. Steril olan karışım 50°C olana kadar beklendi ve sonra karışım içerisine 5 mL 50X VB, 12,5 mL %20'lik glukoz ve 2,5 mL %0,5'lik histidin çözeltileri eklendi. Çözeltiler çözüldükten sonra 1,5 mL 0,5 mM'lık biyotin çözeltisi ve 787,5 mL (% 0,8/0,02 N NaOH) ampisilin eklendi ve elde edilen çözelti petrilere eşit olarak (yaklaşık olarak 25 mL) döküldü.

3.1.3.2.15. Nutrient Agar (NA)

Deneylelerdeki 16 saatlik kültürün hem mL'deki bakteri sayısının elde edilmesinde hemde genotip kontrolünde kullanıldı. 1,25 g nutrient broth (Oxoid, No:2) ve 50 mL saf su karıştırıldıktan sonra 0,75 g agar ilave edildi daha sonra otoklav ile steril edildi. Karışım soğuduktan sonra petrilere eşit olarak (yaklaşık olarak 25 mL) döküldü.

3.1.3.2.16. Minimal Glukoz Agar (MGA)

Histidin gereksiniminin kontrolü için kullanıldı. 1,5 g agar ile 83 mL distile suyla karıştırılır otoklavda steril edildikten sonra karışıma 2 mL 50X VB eklenerek çözdürüldü ve sonrasında steril halde bulunan 10 mL %20'lik glukoz eklendi. Çözelti, saf suyla 100 mL'ye tamamlandı ve 50°C olduğunda çözelti petrilere eşit olarak (yaklaşık olarak 25 mL) döküldü.

3.1.3.2.17. Top (Üst) Agar

Mutajenite ve Antimutajenite çalışmalarında kullanıldı. 1000 mL saf su içerisine 6 g agar ve 5 g sodyum klorür (NaCl) eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcıyla çözdürüldükten sonra çözelti tüplere 2 mL olarak konuldu. Agar konulan tüpler otoklavda steril hale getirildi. Steril olan tüpler su banyosuna (42°C) alındı.

3.1.3.2.18. Nutrient Broth (NB)

Çalışmalardaki 16 saatlik kültürdeki test suşlarını çoğaltmak amacıyla kullanıldı. 100 mL saf su içerisine 2,5 g nutrient broth (Oxoid, No:2) ilave edilerek çözdürüldü. Daha sonra çözünen karışım 20 mL olarak erlenlere koyuldu. Ardından sıvı besiyerleri otoklavda steril edildi.

3.1.4. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi

3.1.4.1. Antimikrobiyal Etki

3.1.4.1.1. Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesinde Kullanılan Test Suşları

3-Aminopiridin bileşiklerinin antimikrobiyal etkinin belirlenmesi için bakterilerden; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (NRRL B-3704), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) kullanıldı. Mayalardan ise *Candida tropicalis* (ATCC 13803) ve *Candida albicans* (ATCC 60193)'e karşı değerlendirildi. Bakteriler ve mayalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ tarafından hediye edildi.

Çalışma, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nde belirtilen prosedüre uygun olan broth mikrodilüsyon yöntemiyle çalışıldı (Isenberg, 1998). Çalışmada kullanılan 3-aminopiridin bileşiklerinin mikrobiyal aktivitesi minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) olarak değerlendirildi. Antimikrobiyal etkinin belirlenebilmesi için deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.1.4.1.2. Stok Kültürler ve Çalışma Kültürleri

Kültürler liyofilize olarak pasajlandı ve -80°C'de saklanan stok kültürler oluşturuldu. Ardından stok kültürleri, %15 gliserol içeren Brain Heart Infusion Broth içinde saklandı. Stoktaki kültürler Nutrient Agar içeren plaklara ekim yapıldı ve böylece test kültürleri oluşturulmuş oldu.

3.1.4.1.3. Besiyerleri

3-Aminopiridin bileşiklerinin antimikrobiyal etkinin belirlenmesi amacıyla uygulanan mikrodilüsyon metodunda Mueller Hinton Broth (Oxoid), agar, Nutrient agar, Nutrient Broth Saboraud dekstroz ve Roswell Park Memorial Institute medyum (RPMI) besiyerleri kullanıldı.

3.1.4.1.4. Bakterilerin ve Mayaların Canlandırılması

Mikroorganizmaların canlandırılması -80°C'de saklanan suşların 25°C'ye düşürüldükten sonra katı veya sıvı besiyerine ekimi yapıldı ve ardından 37 °C'de inkübe edildi.

3.1.5. İlaç Moleküllerinin DNA ile Etkileşimleri

3.1.5.1. DNA Bağlanma

3.1.5.1.1. 8 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA (TNE) Tamponu

80 mL saf su içerisine 0,121 g tris, 0,292 g NaCl ve 0,2 mL 0,05 M EDTA (pH:8.0) eklenerek çözdürülmesi sağlandı ve sonra HCl ile pH'ı 7.4'e ayarlanarak ve saf suyla 100 mL'ye tamamlandı. Membran filtreyle steril hale getirilerek oda sıcaklığında saklandı.

3.1.5.2. DNA Kırma

3.1.5.2.1. 10X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) Tamponu

4,84 g Tris, 0,55 mL glasiyel asetik asite; 2 mL 0,05 M EDTA ilave edildi ve 80 mL saf su ile çözdürülerek ardından pH'sı 8.0 olması sağlandı. Ardından çözelti saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.1.5.2.2. 100 mM Tris-HCl Tamponu

1,21 g Tris 75 mL distile suda çözdürüldü. Çözdürüldükten sonra HCl ile pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve steril hale getirilerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.1.5.2.3. Agaroz Jel

90 mL Tris asetat tamponu ile 0,9 g agaroz karıştırılıp ardından ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde kaynatıldı. 50-55 °C'ye kadar soğutularak içerisine 3 µL etidyum bromür ilave edilip karıştırıldı. Ardından tarak yerleştirilmiş plastik tabakaya dökülerek oda sıcaklığında yaklaşık 50 dakika jelin donması beklendi.

3.1.5.2.4. 6X Agaroz Yükleme Tamponu

0,5 M EDTA, %30 gliserol, %0,3 bromofenol mavisi ve %0,3 ksilen siyanol olacak şekilde 10 mL hazırlandı ve 4 °C'de muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

3.2.2. Mutajenite ve Antimutajenite

3.2.2.1. Mutant Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü

3.2.2.1.1. Histidin Gereksinimi

MGA'nın içerisinde histidin ile biyotin bulunmasından dolayı MGA plakları kontrol amacıyla kullanıldı. Test suşları petrilere ekim yapıldıklarında histidin oksotrofu (*his⁻*) içerip içermedikleri anlaşılır. Histidin sentezleyebilme özelliği olmayan test suşları MGA plaklarında üreme olmazken, Histidin/Biyotin agar plakları üzerinde üremektedirler (Ames ve ark., 1973). Bunun sonucunda 16 saatlik NB'da kültür elde edildi. Daha sonra MGA ve HB içeren plaklara çizgi ekim yapılarak plaklar 37°C'de 48 saat inkübasyonda tutuldu.

3.2.2.1.2. *uvrB* Mutasyon Kontrolü

Bu mutasyonun işlevi, bakterilerde ultra viyole (UV) ışınlarından kaynaklanan replikasyonda oluşan hataların düzeltilmesini sağlayan DNA onarım mekanizmasını engellemesidir. Mutant suşların bu mutasyonu içerip içermedikleri UV ışınlarına duyarlılık testi ile tanımlanmaktadır. Bu test için NA plaklarına çizgi ekim yapılarak petrinin bir kısmı çizgileri kesecek şekilde kapatıldı. Plaklar, 30 watt'lık germisidal UV lambasıyla 33 cm yükseklikten 8 sn ışınlar maruz bırakılarak ardından 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plakların UV ışınına maruz kalmayan kısmında üreme görülür ve bunun sonucunda mutant suşların *uvrB* mutasyonu içerdiği belirlenir (Ames ve ark., 1973).

3.2.2.1.3. *rfa* Mutasyon Kontrolü

rfa Mutasyonu, hücrenin dış yüzeyinde bulunan lipopolisakkarit tabakasını zayıflatarak makromolekülün hücre içine almasını sağlamaktadır. Mutant suşların *rfa* Mutasyonu bulundurup bulundurmadığı kristal viyole duyarlılığıyla değerlendirildi. Mutasyonun kontrolü için 16 saatlik kültür içerisinde 100 µL test suşu alınarak nutrient agar (NA) içeren petrilere ekim yapıldı ve 0.5cm çapındaki steril disk plağının ortalarına koyuldu. Daha sonra %0,1'lik kristal viyole çözeltisi içerisinde 10 µL alınarak diskin üzerine konuldu. Hazırlanmış olan petrilere 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon edildi ve inkübasyondan sonra disklerin etrafında 13-14 mm'lik belirlenen şeffaf zon inhibisyon zonu olarak değerlendirilir. Bu zon hücreden geçemeyen boyanın, *rfa* içeren bakteri hücrelerinin içerisine alarak oluşturduğu yapıdır. Bu sonuç mutasyon olduğunu göstermektedir (Ames ve ark., 1973).

3.2.2.1.4. R Faktörü Kontrolü

Ampisilin direncine (R faktörü) sahip olan plazmidin (pKM101) belirlenmesinin kontrolünde kullanılmak üzere mutant suşlar (TA98 ve TA100) HBA plaklarına ekildi ve 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Sonuç olarak HBA içerisinde üreyen suşların plazmidi (pKM101) içeren suşlar olduğu görüldü (Ames ve ark., 1973).

3.2.2.2. Mutant Suşların Master Plaklarının Yapımı

HBA içeren plaklara test suşları bulunan kültürlerden çizgi ekim yapılır ve plaklar 37 °C'de 48 saatlik inkübasyona bırakıldıktan sonra iyi olan ve normal büyüklükteki bir koloni seçilerek öze ile alındı. Seçilen koloni 2 mL NB içerisine konulmadan önce 6,3 µL ampisilin çözeltisi konularak ve ardından koloni ortama ekilerek sonrasında 37 °C'de 12 saatlik inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyonun ardından hazırlanmış olan taze kültür içerisinden HBA içeren plaklara ekilerek ve 37 °C'de 48 saatlik inkübasyona tabi tutuldu. Elde edilen master plakları çalışmada kullanılacağı zamana kadar +4 °C'de saklandı.

3.2.2.3. Mutant Suşların Uzun Süre Saklanması ve Stok Kültürlerin Kullanılması

Test suşlarının gerekli genetik kontrolleri yapıldıktan sonra HBA plaklarında ekim yapılmış olan suşlar içerisinden belli bir boyuta gelmiş ve iyi izole olan koloniler alındı. Seçilen koloni 63 µL ampisilin bulunan 20 mL NB içerisine ekilerek 37 °C'de 12 saatlik inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra ependorf tüplerinin içerisine 100 µL DMSO ile 900 µL bakteri kültüründen eklenerek ependorflar sıvı azot içerisinde bekletilerek ardından -80 °C'de saklandı.

Stok kültürleri kullanmak için, -80 °C'de bekletilen bakteri kültürlerini alarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Kültür öze yardımı ile ampisilin konulan NB içerisine ekilerek 37 °C'de 12 saatlik inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bakteri kültürleri NB ortamından alınarak HBA içeren petrilere ekildi ve ardından 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda belli bir boyuta gelmiş ve iyi izole olan koloniler seçilerek 16 saatlik kültürler hazırlanmış oldu. elde edilen 16 saatlik kültürler 37 °C'de 12 saat inkübe edildi ve tekrardan HBA içeren petrilere ekildi.

3.2.2.4. Mutant Suşların 16 Saatlik Kültürlerinin Elde Edilmesi

16 saatlik kültür için, master plaklardan elde edilmiş HBA plaklarındaki belli bir boyuta gelmiş ve iyi izole olan koloniler seçildi. Ampisilin (63µL) içeren NB (20mL) bulunan ortama ekim yapıp 37 °C’de 16 saatlik inkübasyona tabi tutuldu.

İnkübasyon sonunda kültürden 500 µL alınarak yeni besiyeri ortamında 37°C’de 3 saat inkübe edildi. Deneyde, belli yoğunluğa (1-2x10⁹ (kob)/mL) ulaşmış bakteri kültürü ile deneyler gerçekleştirildi.

3.2.2.5. Sıvı Kültürün mL’indeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Mutajenik ve antimutajenik etkinin belirlenmesinde kullanılan mutant suşların sıvı kültüründe mL’inde bulunan bakterileri yoğunluğu, spektrofotometre (OD₅₄₀ ~ 0,1-0,2) sonucuyla belirlendi. Bakterilerin yoğunluğunu %0,9 serum fizyolojik kullanılarak azaltıldı. Seyreltme için kültürden 100 µL alınarak 41 °C sıcaklıktaki 2000 µL top agara ilave edilerek yapıldı iyice karıştırılarak NA içeren petrilere koyuldu. Sonrasında petrilere 37 °C’de 24 saatlik inkübasyona tabi tutuldu.

3.2.2.6. 3-Aminopiridin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarda kullanılmadan önce bileşiklerin mutant suşlarda sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi gereklidir. 3-Aminopiridin bileşiklerinin çalışmada etkili konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için sitotoksik etki çalışması yapıldı. Sitotoksik konsantrasyonun saptanabilmesi için dört farklı konsantrasyon (0,5, 5, 50 ve 500 ppm) seçildi ve çalışmada uygulanan suşlarda geri dönen koloniler belirlendi. Mutajenite deneyinde negatif kontroldeki koloni sayısı ile karşılaştırılırken, antimutajenite deneylerinde spontan kontrol ile karşılaştırıldı ve uygulanan konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gösterip göstermediği değerlendirildi (Dean ve ark., 1985).

3.2.2.7. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmaları

Sentezlenen 3-aminopiridin Schiff bazları bileşikleri potansiyel mutajenik ve antimutajenik etkileri, Ames test sistemi ile gerçekleşti. Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında 3-aminopiridin bileşiklerinin 4 farklı konsantrasyonu (0,5, 5, 50 ve 500 ppm) ile değerlendirildi. Deneylerde *S. typhimurium* iki mutant suşu (TA98 ve TA100) kullanıldı. Deney süresince 41 °C’de tutulan HB içeren top agar içerisine sırasıyla 0,5 mL sodyum-fosfat tamponu, 0,1 mL test edilen bileşik (DMSO içerisinde çözülmüş 3-aminopiridin bileşikleri), 0,1 mL standart mutajen ile 0,1mL bakteri kültürü eklenip MGA

içeren petrilere dökülerek iyice yayılması sağlandı. Petriler donduktan sonra 37 °C’de 48 saat inkübe edildi ve sonrasında petrillerdeki bakteri kolonileri sayıldı. 3-Aminopiridin bileşiklerinin tüm konsantrasyonları üç tekrarlı olarak petrilere ekildi. Deney sırasında eş zamanlı olarak pozitif, negatif ve spontan kontrollerde gerçekleştirildi.

3.2.2.8. Pozitif Kontrol

Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde mutajen olarak 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) ve sodyum azid [SA, (NaN₃)] kullanıldı. Çalışmalarda NPD 10 µg/plak, SA ise 1 µg/plak olarak hazırlandı.

Deneyde 41 °C’de bekletilen HB bulunan top agar içerisine sırasıyla sodyum-fosfat tamponu (0,5 mL), standart mutajenden (0,1 mL) ve bakteri kültüründen (0,1 mL) eklendi. Hazırlana karışım MGA içeren petrilere dökülerek iyice yayılması sağlandı. Petriler donduktan sonra 37 °C’de 48 saat inkübe edildi ve sonrasında petrillerdeki bakteri kolonileri sayıldı.

3.2.2.9. Negatif Kontrol

Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında kullanılmakta olan standart mutajenler ve 3-aminopiridin bileşikleri DMSO ile çözdürüldü. Bu nedenle çözücü olarak kullanılan DMSO’nun geriye dönen bakteri sayısı üzerinde etkisinin olup olmadığı belirlemek için negatif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol için 41 °C’de bekletilen HB bulunan top agar içerisine sırasıyla sodyum-fosfat tamponu (0,5 mL), DMSO (0,1 mL) ve bakteri kültüründen (0,1 mL) eklendi. Hazırlana karışım MGA içeren petrilere dökülerek iyice yayılması sağlandı. Petriler donduktan sonra 37 °C’de 48 saat inkübe edildi ve sonrasında petrillerdeki bakteri kolonileri sayılarak değerlendirme yapıldı.

3.2.2.10. Spontan Kontrol

Histidin oksotrofu olan ve çalışmada kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kendiliğinden (spontan) his⁺ duruma gelebilmektedir.

Geri dönen TA98 suşu için;

- 20-50 revertant/plak

TA100 suşu için;

- 75-200 revertant/plak aralığında olmalıdır (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Deneyde 41°C’de bekletilen HB bulunan top agar içerisine sırasıyla sodyum-fosfat tamponu (0,5 mL) ve bakteri kültüründen (0,1 mL) eklendi. Hazırlana karışım MGA içeren petrilere dökülerek iyice yayılması sağlandı. Petriler donduktan sonra 37 °C’de 48 saat inkübe edildi ve sonrasında petrilerdeki bakteri kolonileri sayıldı.

3.2.2.11. Sonuçların Değerlendirilmesi

3.2.2.11.1. Mutajenik Aktivite

Çalışmada kullanılan 3-aminopiridin bileşiklerinin mutajenik aktivite içerip içermediği negatif kontrolle karşılaştırılarak belirlendi. Test edilen 3-aminopiridin bileşiklerinde mutajenik aktivitenin var olduğu söylenebilmesi için plaklarda oluşan koloni sayısının, negatif kontrolün iki katı veya daha fazlası olması gerekmektedir.

3.2.2.11.2. Antimutajenik Aktivite

Çalışmada kullanılan 3-aminopiridin bileşiklerinin antimutajenik aktivitesi için % inhibisyon oranı ile belirlendi. İnhibisyon oranı %25’den düşük olan değerler için test bileşiklerinin antimutajenik etki göstermediği, inhibisyon oranı %25-40 arasında olan test bileşiklerin orta dereceli antimutajenik etki gösterdiği ve %40’tan yüksek olan test bileşiklerinin ise güçlü antimutajenik etki gösterdiği belirlendi (Negi ve ark., 2003).

Test edilen 3-aminopiridin bileşikleri’nin % inhibisyon oranı aşağıdaki formülüne göre hesaplandı (3.1).

$$\text{İnhibisyon Oranı (\%)} = \frac{P-B}{P-S} \times 100 \quad (3.1)$$

P; Pozitif kontrolde (sadece mutajen varlığında) geri dönen koloni sayısı/plak

B; Test edilen bileşik ve mutajen varlığında geri dönen koloni sayısı/plak

S; Spontan koloni sayısı/plak

Deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları alınarak standart sapmaları hesaplandı.

3.2.3. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.3.1. Broth Mikrodilüsyon Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (MIC)

MIC testinde ticari olarak geliştirilmiş 96 kuyucuklu steril mikropleytler kullanılarak çalışma gerçekleştirildi. 3-Aminopiridin bileşiklerinin 500 ppm'lik konsantrasyonu kullanıldı ve test bileşiklerinin seri bir şekilde seyreltilmesi ile yapıldı. Petride üremiş olan kolonilerden benzer özelliktekiler alındı. İnokulum süspansiyonu için log fazı büyüme yöntemi uygulandı. Süspansiyon yoğunluğu $1-2 \times 10^8$ CFU/mL'dir. İnokulum 0.5 McFarlanda göre ayarlandı ve sonrasında süspansiyon karıştırılarak orijinal süspansiyondan 1000 µL alınıp 19 mL serum fizyolojinin içerisine eklendi. Pipet yardımı ile her bir kuyucuğa 10 µL konuldu ve tüm kuyucuklara 0,1 mL Müller Hinton Broth besiyeri ilave edildi.

Mikropleytdaki ilk kuyucuğa 0,1 mL test bileşeni 3-aminopiridin bileşikleri eklendi. Karıştırılma işleminden sonra 0,1 mL besiyeri içerisinden geri alındı. Böylece test bileşiklerinin seri dilüsyonları yapıldı ve 10. kuyucuktaki fazla olan kısım diğer kuyucuklardaki ile eşit miktarda olması için atıldı. 12. kuyucuk dışındaki tüm kuyucuklara inokulum süspansiyonu eklendi.

Mikrodilüsyon yönteminde bakterilere karşı kullanılan plaklar 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona mayalara karşı kullanılan plaklar ise 37 °C'ta 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonucunda üreme görülmeyen düşük konsantrasyon olan minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) yöntemi ile değerlendirildi.

3.2.4. İlaç Moleküllerinin DNA ile Etkileşimleri

3.2.4.1. DNA Bağlanma

3.2.4.1.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonu

Bu çalışmada CT-DNA ve TNE (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl ve 1 mM EDTA) tamponu kullanıldı. Tampon çözeltisi pH 7.4 olacak şekilde hazırlandı. Bileşiklerin DMSO ile 0,05 M'lık stok çözelti hazırlanarak son konsantrasyonları 20 mM olacak şekilde TNE tamponu ile gerçekleştirildi. Kör olarak stok çözeltilerin son konsantrasyonların da seyreltilmesinde kullanılan TNE tamponu kullanıldı.

Bu deneyde her iki bileşiğinde konsantrasyonları sabit tutularak, CT-DNA'nın konsantrasyonu ortama belli miktarlarda eklenerek gerçekleştirildi. CT-DNA, kuartz küvete ilave edildikten sonra karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon ardından spektrofotometrede 200-600 nm arasında okumalar yapılarak bileşiklerin CT-DNA'ya hangi modla bağlandığı belirlendi.

Titrasyon sonucunda elde edilen veriler ile bileşiklerin CT-DNA'ya hangi modla bağlandığını gösteren bağlanma sabiti değeri hesaplanabilmektedir. Bu sabitin hesaplanabilmesi için aşağıda verilen formül kullanılmıştır (3.2).

$$[CT-DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [CT-DNA]/(\epsilon_B - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_B - \epsilon_f) \quad (3.2)$$

Formülde ϵ_A ; ölçülen konsantrasyondaki sönüm katsayısı, ϵ_B ; CT-DNA'ya tüm bileşiklerin bağlanması sonrasındaki sönüm katsayısı ve ϵ_f ; serbest haldeki bileşiğin sönüm katsayısıdır. $[CT-DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ karşı $[CT-DNA]$ verileri grafiğe geçirilip eğimden K_b değeri bulunur.

Absorbans şiddetindeki değişimler ise yüzdelik oranlarıyla hesaplanabilmektedir. Bu değişimlerin hesaplanabilmesi için aşağıda verilen formül kullanılmıştır (3.3).

$$\%H = [(A_i - A_s) / (A_i)] \times 100 \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte A_i , bileşiğin serbest haldeki absorbans şiddetini, A_s maksimum konsantrasyonda CT-DNA ilave edildikten sonra bileşiğin absorbans şiddetini gösterir.

3.2.4.2. DNA Kırma

3.2.4.2.1. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

Tez çalışmasında her iki bileşiğin DNA kırma aktivitesini saptamak için, %90 süperkırımlı formda olan pBR322 plazmid DNA'sı ile çalışıldı. Bileşiklerin DMSO ile 5 mM'lık stok çözeltileri hazırlanıp 100 mM Tris-HCl tamponu ile seyreltilerek dört farklı konsantrasyonu (25, 50, 100 ve 200 μ M) hazırlandı. Pozitif kontrol olarak plazmidte çift zincir kırığına sebep olduğu bilinen EcoRI restriksiyon enzimi, marker olarak ise 1 kb'lik DNA ladder kullanıldı.

Bileşiklerin DNA kırma aktiviteleri, oksidatif ve hidrolitik olarak iki şekilde çalışıldı. 2 μ L pBR322 plazmid DNA, 2 μ L Tris-HCl tampon ve bileşiklerin dört farklı konsantrasyonları (sırasıyla 25, 50, 100 ve 200 μ M) ilave edildi. Oksidatif kırma aktivitesi deneyinde hidrolitik kırma aktivitesinden farklı olarak oksitleyici ajan (2 μ L H_2O_2) kullanıldı. Ardından karışımın hacmi 20 μ L'e tamamlandı ve 3 saat karanlıkta 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sırasında TAE tampon çözeltisinde %1'lik agaroz jel hazırlanarak jel elektroforez tankına alındı. İnkübasyondan sonra, 20 µL'lik örnekler 6X DNA (4 µL) yürütme tamponu ilave edilerek jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi. Ardından 60 dakika 60 V'luk voltajda yürütüldü. Yürütme bittikten sonra jel UV ışığı altında fotoğraflandı.



BÖLÜM 4

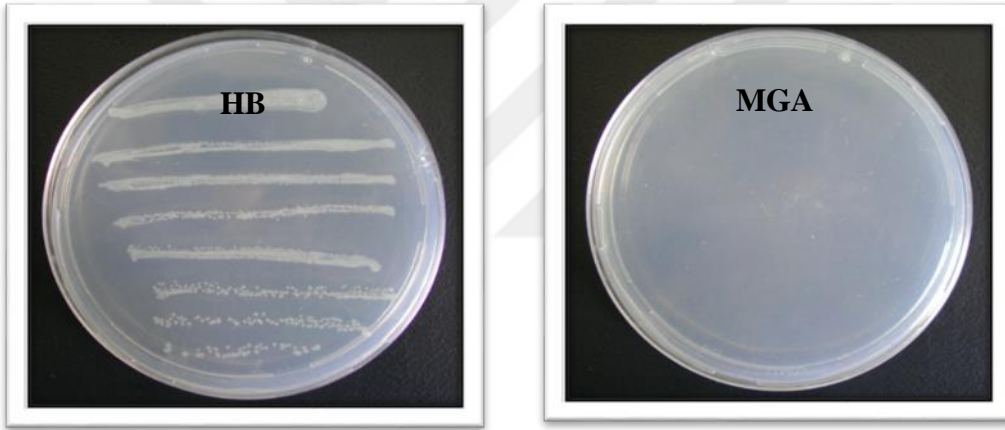
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Schiff Bazlarının Mutajenite ve Antimutajenite Etkileri

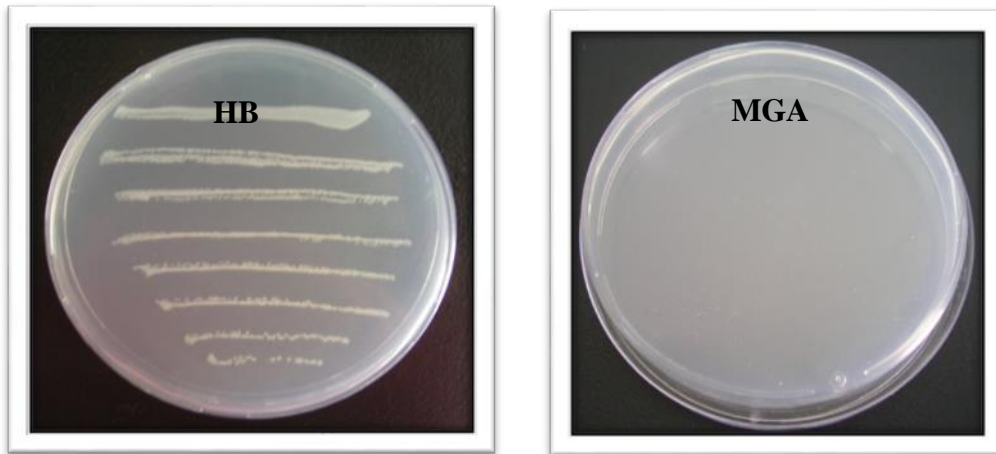
4.1.1. Mutant Suşların Genetik Özelliklerinin Kontrolü

Bu tez çalışmasında *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutantlarının orijinal genetik özelliklerinin kontrolü sonucunda kullanılan suşların mutajenite ve antimutajenite çalışmaları için uygun olduğu sonucuna varıldı.

Histidin Gereksinimi: Çalışmada *S. typhimurium* iki mutant suşunun, HB agar bulunan petrilere ve içerisinde biyotin bulunan MGA petrilere ekilmiş olup inkübasyon sonucunda HB içeren petrilere üreme olurken, histidin bulunmayan MGA içeren petrilere ise üreme olmadığı belirlendi. Bu sonuçlar suşların histidin ihtiyacının olduğunu göstermektedir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

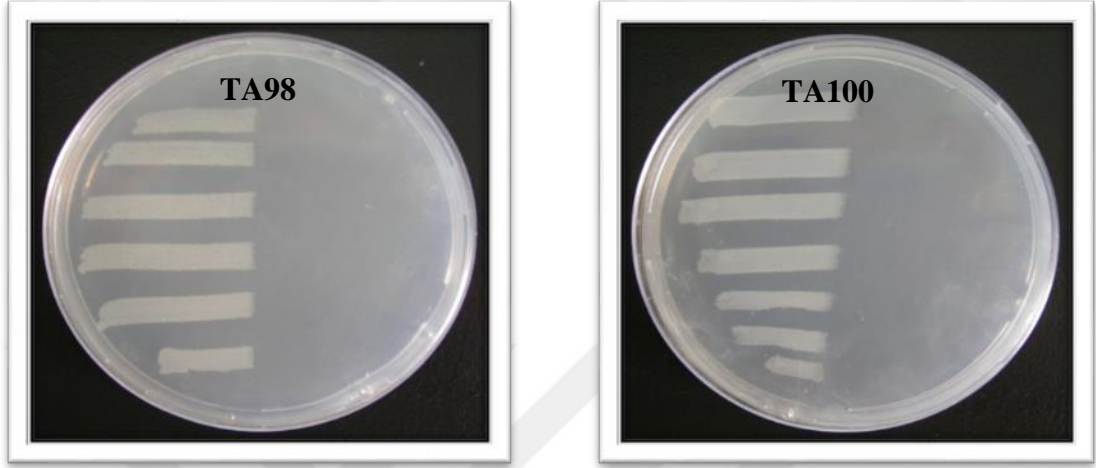


Şekil 4.1. *S. typhimurium* TA98 suşunun histidin gereksinimi durumu



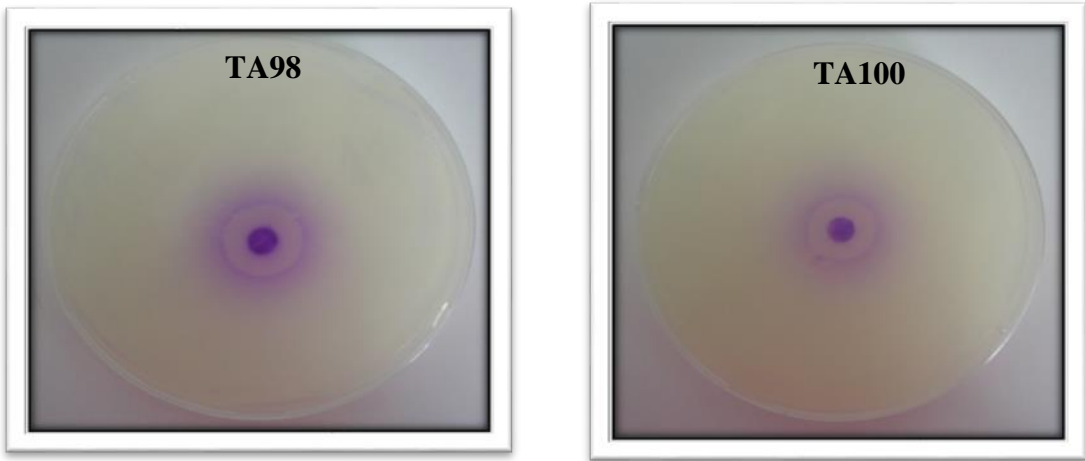
Şekil 4.2. *S. typhimurium* TA100 suşunun histidin gereksinimi durumu

uvrB Mutasyonu: Çalışmada *S. typhimurium*'un TA98 ile TA100 suşlarının ultraviyoleyle hassasiyeti belirlendi. Sonuç olarak petrilerin UV'ye maruz bırakılan kısımlardaki suşlarda üreme olmazken, korunan kısımlardaki suşlarda üreme görüldü. Bu durum sonucunda suşların *uvrB* mutasyonu taşıdığı gösterildi (Şekil 4.3).



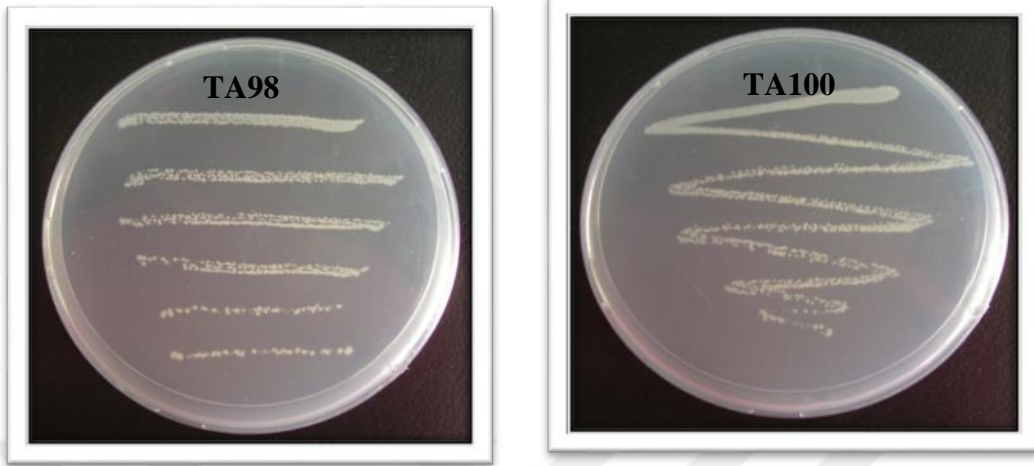
Şekil 4.3. *S. typhimurium* suşlarının *uvrB* mutasyon kontrolü

rfa Mutasyonu: Çalışmada *S. typhimurium* iki suşuna kristal viyoleyle hassasiyet testi uygulandı. Uygulama sonrasında, kristal viyole çözeltisiyle muamele edilmiş disklerin çevresine 14 mm'lik zon görüldü ve böylece iki suşunda *rfa* taşıdığı sonucuna varıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kristal viyole ile hassasiyet testi

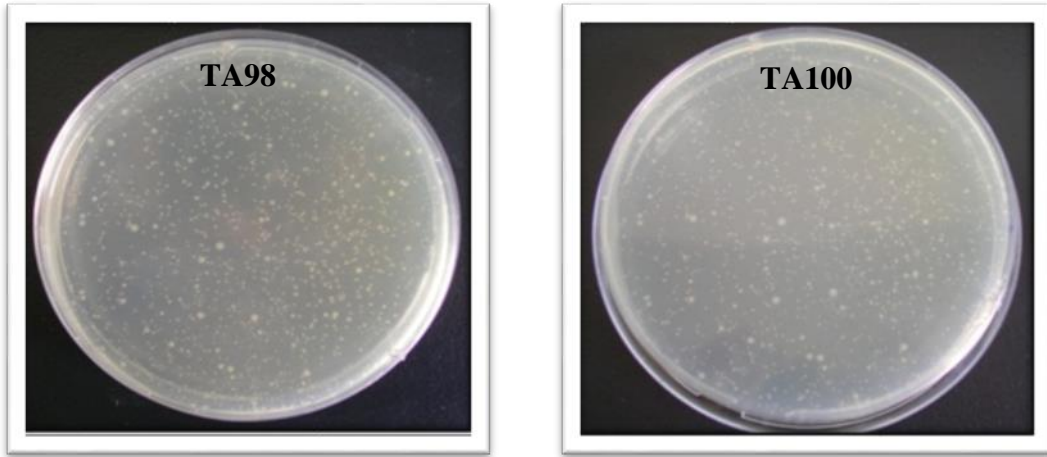
R Faktörü: Çalışmadaki mutant suşların ampisilin direnci gösteren pKM101 plazmidin varlığı HBA içeren petrilere üremesi ile tanımlandı (Şekil 4.5).



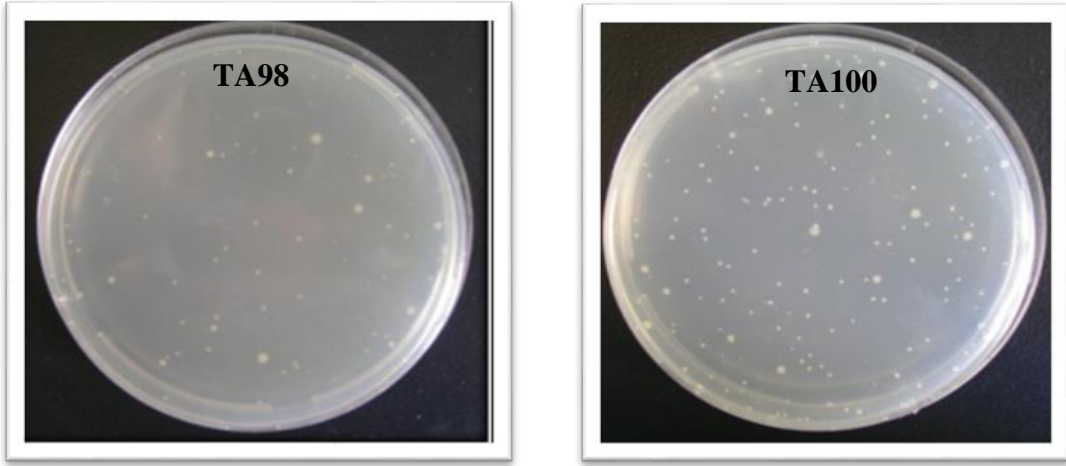
Şekil 4.5. *S. typhimurium* suşlarının R faktörü kontrolü

4.1.2. Mutajenik Etki Sonuçları

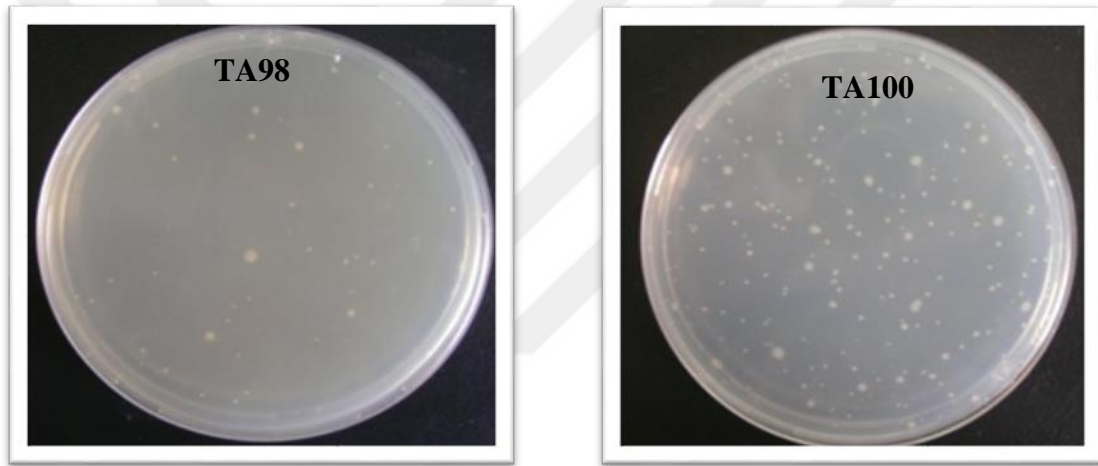
Bu tez çalışmasında, 3-aminopiridin bileşiklerinin mutajenik özelliğe sahip olup olmadıkları Ames test yöntemi ile belirlendi. Aşağıda pozitif (Şekil 4.6), negatif (Şekil 4.7) ve spontan (Şekil 4.8) kontrolleri verildi. Deneyde histidin sentezleyemeyen oksotrof suşların (*S. typhimurium* TA98 ve TA100) histidini sentezleyip sentezleyemediği 3-aminopiridin bileşiklerinin farklı konsantrasyonları ile belirlenmeye çalışıldı. Mutajenite araştırmaları sonunda elde edilen bulgular 3-aminopiridin bileşikleri (Bileşik 1, Bileşik 2) için Çizelge 4.1’de verildi.



Şekil 4.6. *S. typhimurium* suşlarının pozitif kontrolü



Şekil 4.7. *S. typhimurium* suşlarının negatif kontrolü



Şekil 4.8. *S. typhimurium* suşlarının spontan kontrolü

Bileşik 1'in mutajenite sonuçlarına göre TA98 ile TA100 suşuna uygulanan dört farklı konsantrasyonda da mutajenik etki göstermediği belirlendi.

Bileşik 2'in ise TA98 ile TA100 suşuna uygulanan dört farklı konsantrasyonda mutajenik etki göstermediği belirlendi. Çalışma sonucunda her iki bileşikde de mutajenik etki görülmedi (Çizelge 4.1, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

Çalışmada test bileşiklerine paralel olarak yürütülen pozitif, negatif ve spontan kontrollerde belirlenen koloni sayısı literatüre uygunluk göstermektedir (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Çizelge 4.1. 3-Aminopiridin bileşiklerinin farklı konsantrasyonlara göre *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkileri

Uygulama	Konsantrasyon (ppm)	His ⁺ Revertant Koloni Sayısı/Plak	
		TA98	TA100
		Ort±SD	Ort±SD
Bileşik 1	0,5	18,33±01,52	121,66±01,52
	5	22,33±02,51	136,00±04,58
	50	23,33±05,68	165,00±04,35
	500	26,66±1,52	167,33±06,41
Bileşik 2	0,5	13,66±02,51	93,00±04,58
	5	17,33±02,30	108,66±07,76
	50	23,00±2,00	115,33±05,03
	500	25,33±01,15	126,66±05,85
Pozitif Kontrol	NPD 10 ⁻²	545,00±15,14	
	SA 10 ⁻³	930,00±10,00	
Negatif Kontrol	DMSO	17,00±02,22	175,00±01,50
Spontan Kontrol		14,33±03,01	155,66±02,31

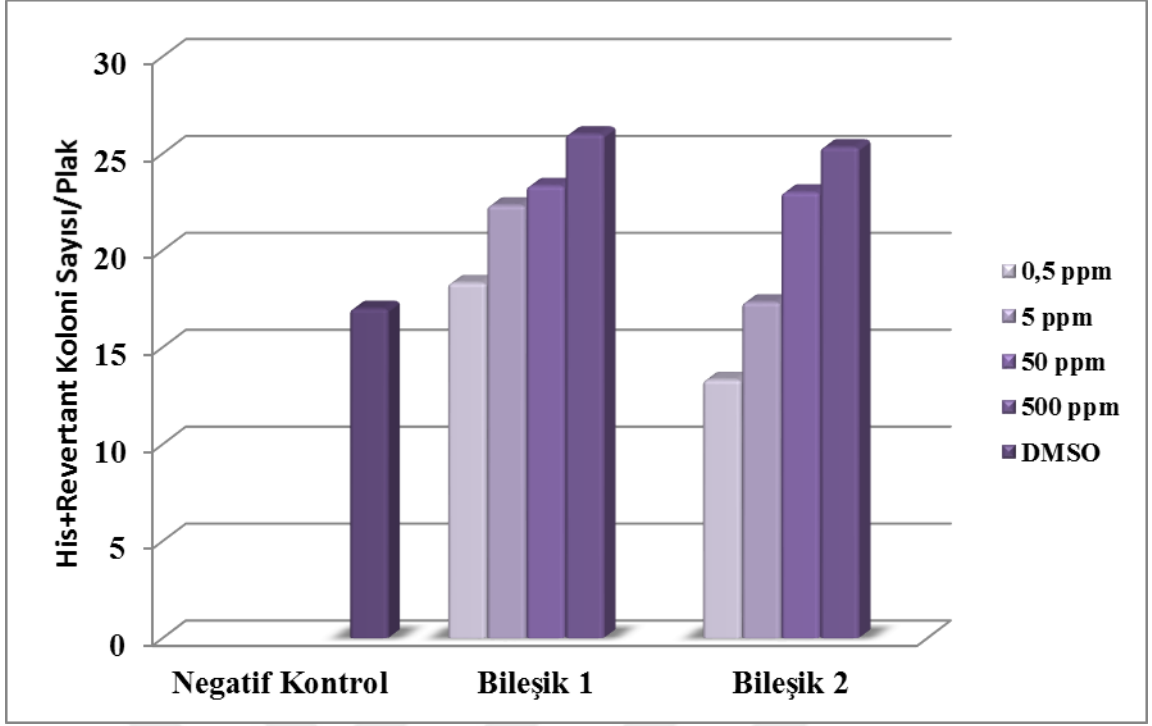
*Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

** NPD: 4-Nitro-*o*-fenilendiamin

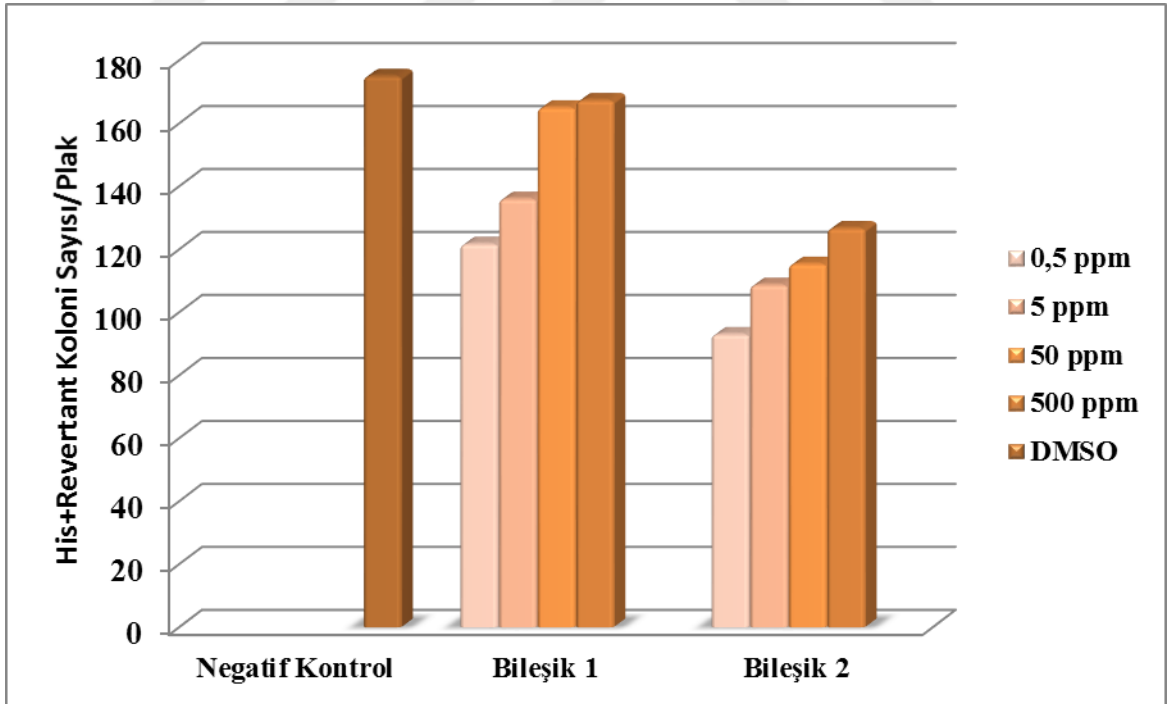
***SA: SodiumAzid

***NPD ve SA konsantrasyonu (mg/mL)

****DMSO: Dimetil sülfoksit



Şekil 4.9. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin dört farklı konsantrasyona göre *S. typhimurium*'un TA98 mutant suşu üzerindeki mutajenik etkileri



Şekil 4.10. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin dört farklı konsantrasyona göre *S. typhimurium*'un TA100 mutant suşu üzerindeki mutajenik etkileri

Ozurkcan ve arkadaşları 2013 yılında, β -aminoketon bileşiklerinin mutajenik ve antimutajenik etkilerini bakteriyal test sistemleriyle belirlemişlerdir. Bileşiklerin hiçbirinde mutajenite özelliği olmadığı, bazı dozlarının ise antimutajenite özelliğinin olduğu sonucuna varmışlardır.

Korkmaz ve Mercangöz (2012), sentezledikleri 1-etil-2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol ve türevlerinin mutajenik etkilerini Ames testiyle incelemişlerdir. Çalışmada *S. typhimurium*'un iki mutant suşu (TA98 ve TA100) üzerindeki etkilerine S9'lu (+) ve S9'suz (-) ortamlarda bakılmış ve çalışmanın sonunda 1-etil-2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol ve türevlerinin hiçbirinin mutajenik etkisi görülmemiştir.

Soysal (2009) yaptığı çalışmada, onbeş adet benzoksazol türevlerinin mutajenite özelliklerini incelemiştir. *S. thyphimurium*'un TA98, TA100 ve TA102 suşlarıyla yaptıkları çalışmada benzoksazol türevlerinin hiçbirinde mutajenik özelliğe rastlanmamıştır.

Forster ve ark. (1992), imidazol ve ilişkili bileşiklerinin mutajenik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Imidazol, Ames Testi sonuçlarına göre mutajenik ve genotoksik iken imidazol bileşiğinin üç türevinin (hydantoic asit, hydantoin ve *N*-acetyl-imidazole) Ames testinde mutajenik ve genotoksik bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Yapılan çalışmaların sonuçları ile 3-aminopiridin bileşiklerinin mutajenite sonuçları desteklenmektedir.

4.1.3. Antimutajenik Etkinin Sonuçları

Çalışmada 3-aminopiridin bileşiklerinin antimutajenik etkilerinin olup olmadıkları Ames testi ile belirlendi. Bu amaçla, 3-aminopiridin bileşiklerinin antimutajenik aktivite çalışmaları *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma sonrası değerlendirme her iki bileşiğin farklı konsantrasyonlarının pozitif kontrol ve spontan kontrol ile karşılaştırılması yapılarak gerçekleştirildi.

3-Aminopiridin bileşiklerinin antimutajenik aktivite çalışma sonucundan elde edilen veriler çizelge 4.2, şekil 4.11 ve şekil 4.12'de verildi.

Bileşik 1'in *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları ile yapıldığı çalışma sonucunda, tüm konsantrasyonlarının (0,5, 5, 50 ve 500 ppm) antimutajenik etkiye sahip olduğu belirlendi. Bileşik 1'in *S. typhimurium*'un TA98 suşu ile yapılan çalışma sonucunda sadece 0,5 ppm'lik konsantrasyonda orta dereceli antimutajenik (%39,63) etkisi olduğu, diğer konsantrasyonlarda ise yüksek inhibisyona (50 ppm; %41,49, 50 ppm; %45,86, 500 ppm; %51,73) sahip olduğu ve bunun sonucunda güçlü antimutajenite etkisinin olduğu saptandı. Bileşik 1'in *S. typhimurium*'un TA100 suşu ile yapılan çalışma sonucunda tüm

konsantrasyonların güçlü antimutajenik etkiye sahip olduğu görüldü. Bileşik 2'nin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile yapılan çalışma sonucunda, tüm konsantrasyonların (0,5, 5, 50 ve 500 ppm) güçlü antimutajenik etkiye sahip olduğu belirlendi. Bileşik 2'nin antimutajenik etkisi Bileşik 1'in antimutajenik etkisine göre daha güçlü olduğu belirlendi.

Verilere göre her iki bileşiğinde artan konsantrasyona bağlı olarak antimutajenik etkilerinin olduğu ve bunun sonucunda hem baz çifti değişimine hem de çerçeve kayması mutasyonuna engel olduğu sonucuna varıldı.

Çizelge 4.2. 3-Aminopiridin bileşiklerinin farklı konsantrasyonlara göre *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşları üzerindeki antimutajenik etkileri

Uygulama	Konsantrasyon (ppm)	His ⁺ Revertant Koloni Sayısı/Plak			
		TA98	%	TA100	%
		Ort±SD	İnhibisyon	Ort±SD	İnhibisyon
Bileşik 1	0,5	469,33±25,32	39,63	555,00±09,16	64,80
	5	455,66±30,33	41,49	599,66±10,50	65,52
	50	423,33±21,54	45,86	675,33±24,50	72,59
	500	380,00±18,00	51,73	699,66±11,01	77,35
Bileşik 2	0,5	421,33±50,52	46,13	291,33±05,50	71,06
	5	390,66±46,37	50,29	260,53±04,50	76,82
	50	373,33±41,95	52,39	204,66±05,68	84,85
	500	359,33±49,90	54,53	174,33±09,29	89,25
Pozitif Kontrol	NPD SA	10 ⁻² 10 ⁻³	762,00±71,04	793,00±39,61	
Negatif Kontrol	DMSO		33,00±06,24	110,66±10,50	
Spontan Kontrol			23,66±02,51	99,66±01,52	

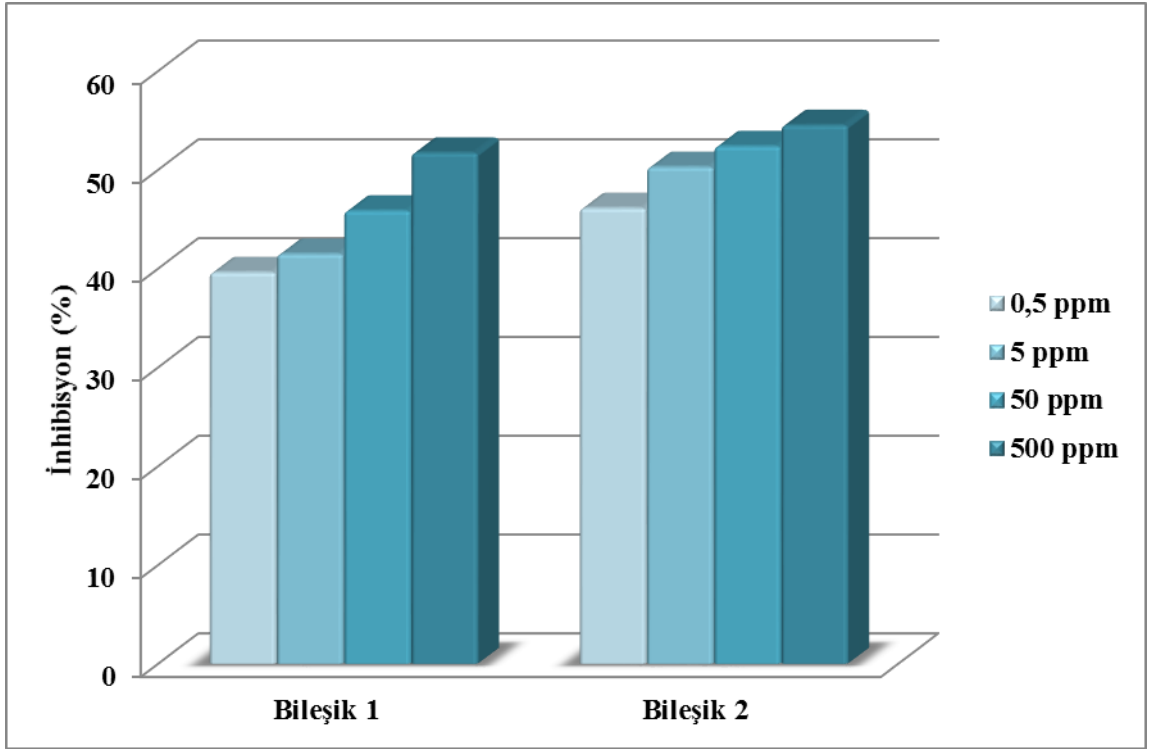
*Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

** NPD: 4-Nitro-*o*-fenilendiamin

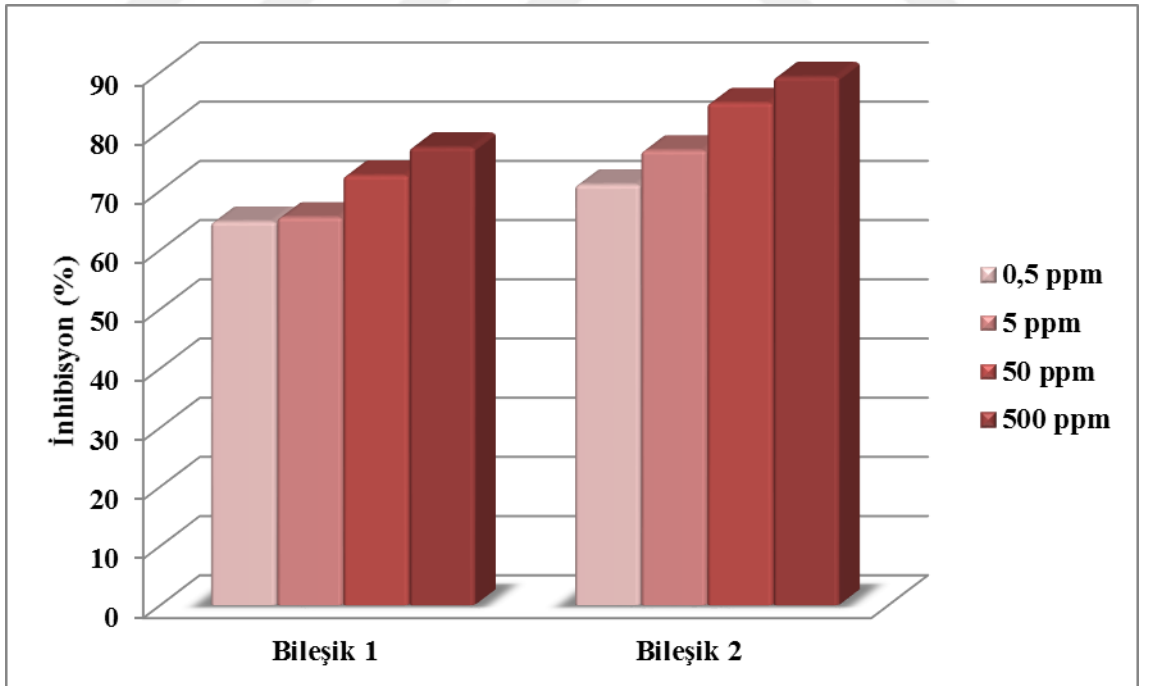
***NPD ve SA konsantrasyonu (mg/mL)

****SA: SodiumAzid

*****DMSO: Dimetil sülfoksit



Şekil 4.11. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin dört farklı konsantrasyonunun *S. typhimurium*'un TA98 mutant suşu üzerinde antimutajenik etkileri



Şekil 4.12. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin dört farklı konsantrasyonunun *S. typhimurium*'un TA100 mutant suşu üzerinde antimutajenik etkileri

Akkan (2016), Glikozamin Schiff bazlarının antimitojenik aktivitelerine *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarını kullanarak bakmıştır. Sonuç olarak bileşiklerin antimitojenik özelliklerinin olduğu ve her iki mutasyona engel olduğu tespit edilmiştir.

Yıldırım ve Demir 2016, yaptıkları çalışmada glisin metil ester salisiliden bileşiğinin antimitojenik etkisini Ames testi ile *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılarak belirlemişlerdir. Deney sonucunda bileşiğin her iki mutant suş üzerinde antimitojenik etkisinin bulunduğu saptamışlardır.

Onuska ve ark. (1996), Schiff bazı aminoguanidine bileşiklerinin etkilerini Ames testi ile araştırmışlardır ve *S. typhimurium*'un üç farklı (TA97, TA100 ve TA102) mutant suşlarını kullanmışlardır. Sonuç olarak test edilen Schiff bazlarının mitojenik olmadığı ve bu bileşiklerin güçlü antimitojenite ve antibakteriyostatik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan aminoguanidine bileşiklerinin birçok hastalığın önlenmesinde olası farmakolojik ajan olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan çalışmaların sonuçları ile 3-aminopiridin bileşiklerinin sonuçları tutarlıdır. Bu sonuçlar genellikle Schiff bazlarının antimitojenik etkisinin olduğu doğrultusundadır.

4.2. 3-Aminopiridin Bileşiklerinin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi

4.2.1. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

3-Aminopiridin bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri broth mikrodilüsyon metodu ile belirlendi. Antibakteriyel aktivite çalışması için Gram pozitif bakterilerden; *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus*, Gram negatif bakterilerden; *Escherichia coli* (NRRL B-3704), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Proteus vulgaris*, mayalardan ise *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* suşları ile çalışıldı.

Pozitif kontrol olarak antibiyotik ve antifungal ilaçlar olan Ampisilin, Gentamisin ve Flukonazol kullanıldı. Çalışmada kullanılan suşun üreme olmadığı en düşük konsantrasyonu MIC olarak belirlendi. Antimikrobiyal aktivite deneyinden elde edilen MIC değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin de test edilen Gram pozitif bakteri, Gram negatif bakteri ve mayalara karşı farklı değerlerde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu saptandı. Bileşik 1'in Gram pozitif bakterilerde 64-32 µg/mL, Gram negatif bakterilerde 128-64 µg/mL, mayalarda ise 64-32 µg/mL konsantrasyon aralığındadır.

Bileşik 2’de ise Gram pozitif bakterilerde 64-16 µg/mL, Gram negatif bakterilerde 128-64 µg/mL, mayalarda ise 64-32 µg/mL konsantrasyon aralığında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. 3-Aminopiridin bileşiklerinin MIC (µg/mL) değerleri

Bileşikler	Bakteriler								Mayalar	
	Gram pozitif bakteriler				Gram negatif bakteriler					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Bacillus cereus</i> NRRL B-3711	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25492	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	<i>Candida albicans</i> ATCC 60198	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803
Bileşik 1	64	64	64	32	64	64	64	128	32	64
Bileşik 2	64	64	64	16	128	64	64	64	32	64
Gentamisin	1	1	0,125	0,008	0,125	0,03	0,08	0,125	-	-
Ampisilin	0,016	0,016	0,125	0,06	32	32	2	0,06	-	-
Flukanazol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0625	0,5
DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-Aminopiridin bileşiklerinin MIC değerlerine bakıldığında test edilen Gram pozitif ve negatif bakteri suşlarına karşı benzer değerler olsada bileşiklerin Gram pozitif bakteriler, Gram negatiflere göre daha etkili olduğu görüldü. Genel olarak antimikrobiyal aktiviteye bakıldığında Bileşik 2'nin Bileşik 1'e göre daha etkili olduğu belirlendi.

Shebl 2014 yılında, yeni asimetrik Schiff bazı ligandı ve beş farklı kompleksinin (Cu(II), Fe(II), Ni(II), Co(II) ve VO⁺²) antimikrobiyal aktivitelerini incelemiştir. İnceleme sonucunda Antimikrobiyal aktivite için Gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus*), Gram negatif bakteri (*Escherichia coli*), maya (*Candida albicans*) ve fungusu (*Aspergillus flavus*) karşı etkisini değerlendirmiştir. Ligand ve komplekslerinin bazılarının biyolojik olarak aktif olduğunu bulmuştur.

Osoyole ve arkadaşları (2012), sentezlemiş oldukları nitrofenol Schiff bazı ve mangan(II), bakır(II), çinko(II) ve kurşun(II) komplekslerinin çeşitli mikroorganizmalara (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*) karşı etkisine bakmışlardır. Çalışma sonucunda nitrofenolün ligandı ve çinko kompleksinin sırası ile 10,0-20,0 ve 10,0-17,0 mm oranlarında inhibisyon zonu ile güçlü antimikrobiyal bir etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Akgül ve Kaya, (2004), oligo-3-aminopiridin (OAP) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherchia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmıştır. Disk difüzyon yöntemi sonucunda inhibisyon bölgeleri 50 µg konsantrasyondaki OAP'nin Gram pozitif suşlarına karşı güçlü bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya koydu; minimum önleyici konsantrasyonu (MIC) ve minimum bakteri öldürücü konsantrasyon (MBC), sırasıyla, 25 µg/mL ve 50 µg /mL olan konsantrasyonda görülmüştür. Sonuçlar OAP'nin *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* karşı güçlü bir antibakteriyel madde olduğunu göstermektedir.

Yapılan çalışmaların sonuçlarına bakıldığında Schiff bazı ligandlarının ve komplekslerinin farklı mikroorganizmalara karşı farklı değerlerde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, 3-aminopiridin bileşiklerinin antimikrobiyal sonuçlarını desteklemektedir.

4.3. İlaç moleküllerinin DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi

Tez kapsamında; 3-aminopiridin bileşiklerinin DNA ile olan etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla, DNA bağlanma özelliğini UV-Vis absorpsiyonu ile DNA kırma aktivitesini ise agaroz jel elektroforez yöntemleriyle test edildi.

4.3.1. DNA Bağlanma Sonuçları

DNA bağlanma, ilaç-DNA etkileşimlerini anlayabilmek, klinik uygulamalarda ise etkili ve yeni ilaçların elde edilmesi ve nükleik asit yapılarına hassas kimyasal problemlerin geliştirilmesi gibi alanlarda oldukça kullanılan bir yöntemdir.

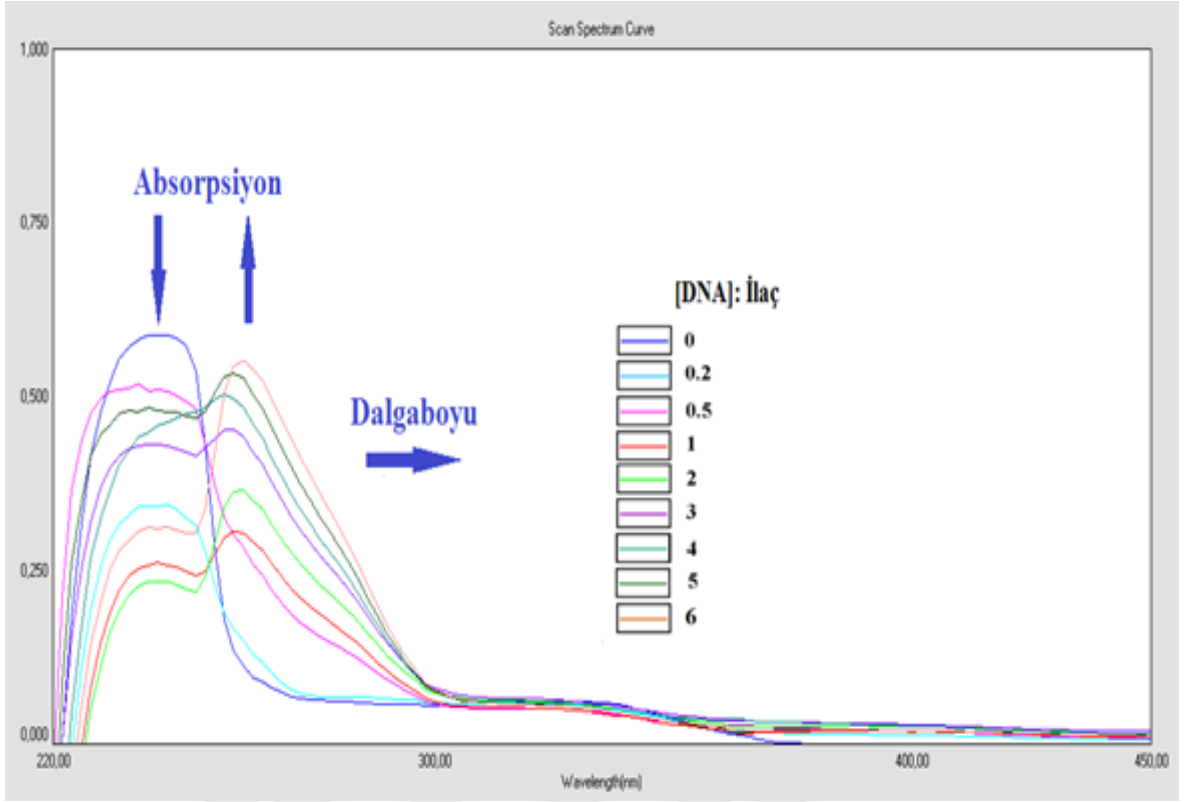
UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi, ilaç-DNA etkileşimlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ile ilacın veya DNA'nın absorpsiyon özelliklerinin farklılaşması takip edilir. İlaç ile DNA arasında etkileşim olup olmadığını belirlemek için, serbest molekül ile DNA'ya bağlı molekülün maximum absorbansındaki değişimler karşılaştırılmaktadır. İlaç-DNA arasında

interkalasyon, elektrostatik ve oluğa bağlanma olarak üç şekilde etkileşim gerçekleşmektedir. Son zamanlardaki çalışmalarda kanserin tedavisi için kullanılan ilaçların elde edilmesinde DNA'yla etkileşime giren, biyolojik etkisi belirlenen pekçok Schiff bazları ve komplekslerinin sentezlenmesiyle çalışmalar yapılmıştır.

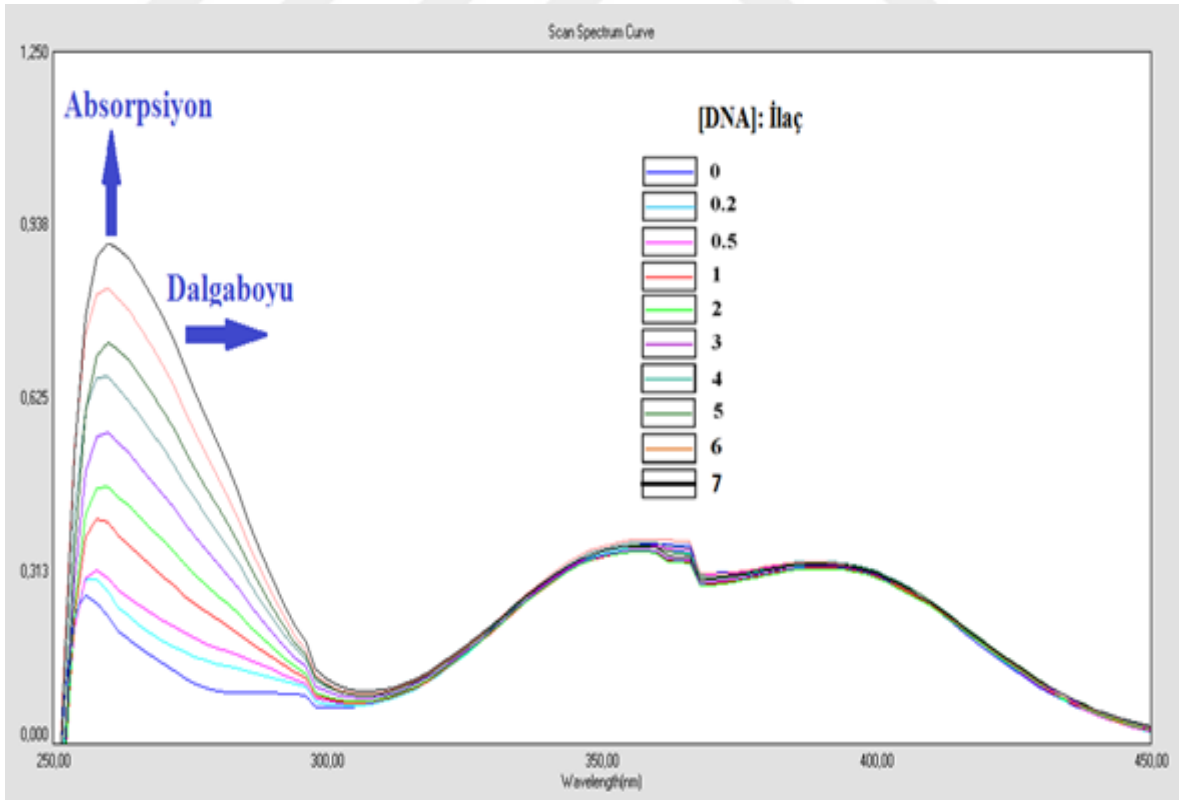
Bu bağlamda, Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin DNA bağlanma aktiviteleri UV-vis spektroskopisi ile incelenmiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

Bileşik 1'in UV-Vis spektrum verileri değerlendirildiğinde, belirli miktarda eklenen CT-DNA ile absorbans şiddetinin hem arttığı hem de azaldığı, ayrıca spektrumun dalga boyunundaki değişimin de arttığı saptanmıştır. Bileşik 1'in absorbans şiddetindeki artışı 589 nm'de %57 hiperkromizm, absorbans şiddetindeki azalması ise 268 nm'de %501 hipokromizm şeklinde meydana gelmiştir. Ayrıca 589 ile 268 nm'de ki absorpsiyonlarda 6-8 nm batokromik (kırmızıya) kayma gözlenmiştir. Bu sonuçlar bileşiğin hem interkalatif, hemde elektrostatik olarak CT-DNA ile etkileştiğini göstermektedir.

Bileşik 2'nin UV-Vis spektrumu sonuçlarına bakıldığında, artan CT-DNA konsantrasyonu ile absorpsiyonunda arttığı görülmektedir. Bununla birlikte spektrumun yüksek dalga boyuna (kırmızıya, batokromik etki) kaymaktadır. Bileşik 2'nin hiperkromisitesi %338 olarak belirlenirken, batokromik etki (yüksek dalga boyuna kayma) 4 nm olarak ölçüldü. Elde edilen bu sonuçlara göre Bileşik 2'nin DNA'ya bağlanma modunun elektrostatik şeklinde olduğu belirlendi.



Şekil 4.13. Bileşik 1'nin DNA bağlanma UV-Vis spektrumu



Şekil 4.14. Bileşik 2'nin DNA bağlanma UV-Vis spektrumu

Kumar ve ark. 2017, Üç izoksazol Schiff bazlarını 2 - ((E) - (3,5-dimetilizoksazol-4-ilimino)Metil) -6-metoksifenol (L1), 2 - ((E) - (3,5-dimetilizoksazol-4-ilimino) Metil) -4,6-diiyodofenol (L2), 2 - ((E) - (3,5-dimetilizoksazol-4-ilimino)Metil]-6-bromo-4-klorofenol (L3) ve bunların Cu (II) kompleksleri [Cu (L1) 2] (1), [Cu (L2) 2] (2) ve [Cu (L3)] (3) sentezlemişlerdir. Elektronik absorpsiyon titrasyonları, viskozite ölçümleri ve floresan söndürme çalışmalarından elde edilen DNA bağlanma çalışmaları, Cu (II) komplekslerinin CT-DNA'sına interkalasyon moduyla bağlandığı belirlenmişlerdir.

El-Sonbati ve ark. (2016), Schiff Bazı olan (3-[(2-hidroksi-3-metoksibenziliden)hidrazo]-1,3-dihidroindol-2-1) ve metal komplekslerinin sentezlemişlerdir. Sentezledikleri Schiff Bazı ve dört metal kompleksinin DNA'ya bağlanma etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak sentezlenen Schiff Bazı ve dört metal kompleksinin DNA'ya interkalatif olarak bağlandığını göstermişlerdir.

Yıldırım (2016) yaptığı çalışmada, Schiff bazları ve dört farklı metal komplekslerinin biyolojik aktiviteleriyle DNA etkileşimleri incelemiştir. Schiff bazlarının DNA bağlanma özelliğini UV-Vis methodu ile belirlemiştir. UV-Vis absorpsiyon titrasyonu sonuçları bileşiklerin tamamının DNA ile etkileşime girdiğini göstermiştir. L1'in demir(II), kobalt(II), nikel(II) kompleksleri ile L2'nin mangan(II), nikel(II) kompleksleri DNA'ya interkalasyon ile bağlandığı bulmuştur. L1 ve L2'nin Cu kompleksi ile L2-Fe kompleksinin DNA'ya kısmi interkalasyon moduyla bağlandığı görülmüştür.

Shahabadi ve arkadaşları 2010 yılında, sentezlemiş oldukları Co(II) Schiff bazı kompleksinin SF (SF=N,N'-bis(5-[(trifenilfosfinyumklorür)-metil]salisiliden)-ofenilendiamin)'in CT-DNA ile etkileşimlerini UV-Vis absorpsiyon spektrofotometre, dinamik viskozite ölçümü yöntemleri ve floresans ve sirküerdikroizm (CD) spektropolarimetriyle belirlemişlerdir. Spektroskopik çalışmalar sonucu SF ve Co(II) kompleksinin DNA'ya bağlanma şekilleri belirlenmiştir. Co(II) kompleksi elektrostatik olarak DNA'ya bağlanırken, SF'nin baz çiftleri arasına interkalasyonla bağlandığı bildirilmiştir.

Önceki çalışmalar, çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir. DNA ile etkileşime giren Schiff bazlarının özellikle de interkalatif moduyla bağlananların etkili Schiff bazları olduğunu göstermektedir.

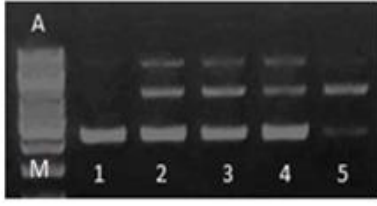
4.3.2. DNA Kırma Sonuçları

DNA kırma aktivitesi, pBR322 plazmid süpersarmal formunun (Form I), açılmış dairesel forma (Form II) ve lineer forma (Form III) dönüştürülmesi konsantrasyona bağlı olarak yapılmıştır. Form I plazmid pBR322'nin kırılmamış orjinal halidir ve iyon yükü fazla, hacmi az olduğu için jel üzerinde diğerlerinden hızlı ilerler. Eğer bileşikler kırma plazmid DNA'nın tek zincirinde meydana getirirse, plazmidin süper sarmal hali gevşeyerek Form II'ye (açılmış dairesel forma) dönüşür ve bu form iyon yükü en az, hacmi en fazla olan olduğu için jelde diğerlerinden daha yavaş ilerleyen formdur. İki kırık oluştuğunda meydana gelen Form III ise Form II ve Form I arasında bir iyon yüküne ve hacme sahip olduğu için jelde Form II ve Form I'nin arasında bir bant oluşturur.

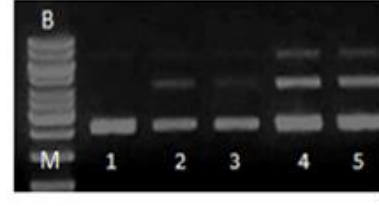
Bu bağlamda, Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin plazmid pBR322 DNA'yı kırma aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (25, 50, 100 ve 200 μ M) belirlendi. Bileşiklerin hem hidrolitik hemde oksidatif kırma sonucu agaroz jel elektroforezi yöntemi ile jel üzerinde görülen bant formları incelenerek gerçekleştirildi.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin hem oksidatif hem de hidrolitik olarak DNA'yı kırma (Form II ve Form III) aktivitesinin olduğu belirlendi. Fakat her iki bileşikte de hem hidrolitik hemde oksidatif olarak kırma sonucunda ortamda hala kırılmamış DNA (Form I) kaldığı görülmektedir. Bileşiklerin agaroz jel elektroforezi sonucu Şekil 4.15'te verilmiştir.

Bileşik 1

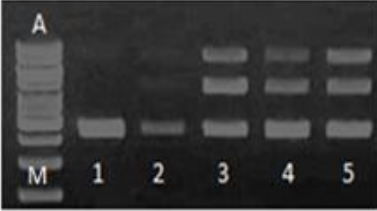


Form II
Form III
Form I



Form II
Form III
Form I

Bileşik 2



Form II
Form III
Form I



Form II
Form III
Form I

Şekil 4.15. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin DNA kırma aktivitesi; a. Oksidatif kırma: M marker, 1.kuyu (plazmid DNA), 2. kuyu (DNA+ 25 µM Bileşik +H₂O₂), 3.kuyu (DNA+ 50 µM Bileşik+H₂O₂), 4.kuyu (DNA+ 100 µM Bileşik +H₂O₂), 5.kuyu (DNA+ 200 µM Bileşik +H₂O₂), b. Hidrolitik kırma: M marker, 1.kuyu (Plazmid DANN), 2. kuyu (DNA+ 25 µM Bileşik), 3.kuyu (DNA+ 50 µM Bileşik) 4. kuyu (DNA+ 100 µM Bileşik), 5. kuyu (DNA+ 200 µM Bileşik).

Kumaravel ve Raman (2017) yeni sentezledikleri iki imidazol türevi Schiff bazlarının, ligand ve dört farklı metal Cu (II), Ni (II), Co (II) ve Zn (II) komplekslerini çalışmışlardır. Çalışmada kullanılan Schiff bazlarının DNA kırma aktivitesini agaroz jel elektroforezi tekniği ile gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak komplekslerin kırma aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir.

Manjunath ve ark. (2017), 4-aminoantipirin ve 8-formil-7- 4-metilkumarin / 5-formil-6-hidroksikoumarin, hidroksipropilamin'den türetilen Schiff bazlarının CoII, NiII ve CuII komplekslerinin DNA kırma aktivitelerini araştırmışlardır. DNA kırma aktivitelerini pBRR322 plazmid DNA'sı kullanarak agaroz jel elektroforezi kullanarak yapmışlardır. Sonuç olarak sentezlenen Schiff bazlarının plazmid DNA'sını kırıdığı belirlenmiştir.

Vafazadeh ve ark. (2016), üç dişli Schiff bazı olan bakır (II) komplekslerinin DNA ile etkileşimlerini araştırmışlardır. Bakır (II) komplekslerinin DNA kırma aktivitesi ise agaroz jel elektroforezi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Bakır (II) komplekslerinin DNA kırma aktivitesinin olduğu elde edilmiştir.

Yıldırım (2016) yaptığı çalışmada, Schiff bazları ve L1'in demir(II), kobalt(II), nikel(II) ve bakır(II) kompleksi ile L2'nin mangan(II), demir(II), nikel(II) ve bakır(II) komplekslerinin biyolojik aktivitelerini ve DNA'yla olan etkileşimlerini araştırmıştır. DNA kırma aktivitesi agaroz jel elektroforezi tekniği ile çalışmıştır. Agaroz jel elektroforezi çalışmaları sonucu, L1'in demir ile bakır, L2'nin de demir kompleksinin DNA'yı hidrolitik ve oksidatif kırdığı görülürken, L2'nin nikel ve bakır komplekslerinin plazmid DNA'yı sadece oksidatif yolla kırabilmiştir.

Çalışmanın sonucu yapılan çalışmalarla uyum sağlayarak 3-aminopiridin bileşiklerinin DNA kırma aktivitesine sahip olduğunu desteklemektedir.



BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzde hızla artan teknolojik gelişmelerle birlikte, kimyasal ve fiziksel ajanlarında dahil olduğu birçok çevresel faktör nerede ise bütün canlıları olumsuz yönde etkilemektedir ve bu olumsuz etkiler hücredeki kalıtsal materyalde kalıcı hasarlara neden olmaktadır. Bu hasarlar mutasyon olarak adlandırılmaktadır. DNA’da oluşan mutasyonlar nedeniyle kontrolsüz çoğalan hücreler meydana gelebilmekte ve bu durum kansere yol açmaktadır.

Kanser, onkogenlerin ve tümör supresörlerle ilişkili olan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple mutasyona neden olan kimyasal ajanlar için genellikle karsinojenik potansiyelinin olduğu bilinmektedir. Günlük yaşantımızda çoğu kimyasallarla insanlar sürekli kontak halindedirler. Bu kimyasalların her biri karsinojenik potansiyelleri için test edilmek zorundadır.

Bilim insanları kanserin tedavisi için kullanılabilecek çeşitli antimitojen ve antikanserojen maddeleri araştırırlar. Kemoterapide DNA’ya bağlanabilen yeni ve etkili antikanser ilaçların geliştirilmesi son zamanlar da araştırmacıların üzerinde çok çalıştığı konulardan biridir.

Schiff bazlarının, antiülser, antimitojenik, antitümör, antimikrobiyal ve DNA ile bağlanabilmesi gibi özelliklere sahip olması yapılan çalışmalarla saptanmış ve sağlık sektörünün her alanında kullanılabilmesinin yanında kemoterapi tedavilerinde kullanılması bu bazlara olan ilgiyi arttırmaktadır.

Bu tez çalışmasında, 3-aminopiridin bileşiklerinin mitojenik/antimitojenik etkileri, biyolojik aktivitesi ve DNA ile olan etkileşimleri araştırıldı.

3-Aminopiridin bileşiklerinin mitojenik ve antimitojenik etkilerinin sonucunda Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin herhangi bir mitojenik etkisinin olmadığı görülürken iki bileşimde güçlü antimitojenik aktiviteye sahip olduğu görüldü. Bileşik 2'nin Bileşik 1'e göre daha etkili antimitojenik özelliğe sahip olduğu belirlendi. Bunun nedeni ise Bileşik 2'nin yapısında bulunan ve Bileşik 1'in yapısında bulunmayan nitro grubu olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda 3-aminopiridin bileşiklerinin baz çifti değişimi ve çerçeve kayması mutasyonuna neden olmadığı, aksine bu tip mutasyonları engellediği ortaya konulmuştur.

3-Aminopiridin bileşiklerinin genotoksik bir etkisinin olmadığı Ames testi ile belirlenmiştir. Ames testi ile pozitif sonuç veren bir ajanın insan ya da diğer memelilerde mutajenik ya da karsinojeniktir denilemez. Bakteriye mutasyon olması, kullanılan maddenin potansiyel zararı hakkında sadece öncü bir uyarı belirtir. Bu nedenle yapılan çalışmanın *in vivo* memeli test sistemleri ile de desteklenmesi gerekmektedir.

Bu çalışma, yeni ilaçların geliştirilmesi sırasında *in vitro* genotoksik yöntemler kullanılarak en az toksikolojik özellik gösteren kimyasalların seçiminin yapılmasını sağlamaktır.

3-Aminopiridin Schiff bazı bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesi olduğu belirlendi. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin MIC değerleri incelendiğinde Gram pozitif bakterilerin, Gram negatiflere göre daha etkili olduğu görüldü. Genel olarak antimikrobiyal aktiviteye bakıldığında ise Bileşik 2'nin Bileşik 1'e göre daha etkili olduğu belirlendi bunun nedeni ise Bileşik 2'nin yapısında bulunan nitro grubu olabilir.

3-Aminopiridin Schiff bazı bileşiklerinin DNA ile olan etkileşimleri için DNA bağlanma ve DNA kırma aktiviteleri incelendi. DNA bağlanma sonuçlarına göre Bileşik 1'in CT-DNA'sına hem interkalatif olarak hemde elektrostatik olarak bağlandığı görülürken Bileşik 2'nin elektrostatik olarak bağlandığı görüldü. DNA kırma aktivitesi sonuçlarına göre Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin DNA'yı hem hidrolitik hemde oksidatif olmak üzere iki şekilde kırabildiği görülmüştür.

Antikanser ve antibiyotik ilaçların temel etki mekanizmaları DNA etkileşimleri üzerinedir. Bu nedenle bileşiklerin DNA etkileşim mekanizmalarını daha iyi anlamak amacıyla farklı tekniklerden yararlanılır. DNA'yı belirli bölgesinden kırabilen veya bağlanabilen bileşikler kuşkusuz yeni antibiyotik ilaçların ve kemoterapik ajanların geliştirilmesi konusunda büyük katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Acheson M., 1976. An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Addison A.W., Palamiandavar M., Driessen W.L., Paap F., Reedijk J., 1988. Copper Complexes of Some Tetradentate Pyrazolyl Amines. *Inorganica Chimica Acta*, 142: 95-100.
- Akgül C., Kaya İ., 2004. Potent Antibacterial Activity of Oligo-3-Aminopyrdine Against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 41: 120-122.
- Akın D., 2010. *Celtis glabrata*'nın Bazı Ekstraktlarının Ames/*Salmonella* Mikrozoom Test Sistemi ile Antimutajenik Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye.
- Akkan F.R., 2016. Glikozamin Bileşiklerinin Animikrobiyal ve Antimutajenik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Akyol H., 18 Mayıs 2004. Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı.
- Alanis A.J., 2005. Resistance to Antibiotics: Are we in the Post-Antibiotic Era, *Archives of Medical Research*, 36: 697-705.
- Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E., Lee F.D., 1973. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70 (8): 2281-2285.
- Anderson., 1849. A General First Benzenesulfonamide, *Transactions of Royal Society of Edinburg.*, 16. 123 p.
- Bal M., 2010. Yeni Azo-Schiff Bazı Türü Ligand ve Metal Komplekslerinin Sentezi, Spektroskopik ve Genotoksik Özelliklerin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, Türkiye.
- Balbás P., Soberón X., Merino E., Zurita M., Lomeli H., Valle F., Flores N., Bolivar F., 1986. Plazmid Vector pBR322 and its Special-Purpose Derivatives-A review. *Gene*,

50 (1-3): 3-40.

- Baquero F., 1997. Gram-Positive Resistance: Challenge for the Development of New Antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39 (Suppl.A): 1-6.
- Benitez-Bribiesca L., Sanchez-Suarez P., 1999. Oxidative Damage Blemycin and Gamma Radiation Induce Different Types of DNA Strand Breaks in Normal Lymphocytes: A Comet Assay Study. *Annals of the New York Academy Science*, 887: 133-149.
- Bhattacharya S., 2011. Natural Antimutagens: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5 (2): 116-126.
- Bischoff G., Hoffman S., 2002. DNA-Binding of Drugs Used in Medicinal Therapies. *Current Medicinal Chemistry*, 28: 321-348.
- Blackburn G.M., Gait M.J., 1990. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Baskı, New York.
- Bohach G.A., Fast D.J, Nelson R.D., Schlievert P.M., 2007. Malaria. in:Rodes J., Benhamou J.P., Blei A., Reichen J., Rizzetto M., editors. *The textbook of hepatology: from Basic Science to Clinicalpractice*. Oxford (UK): Wiley Blackwell; p. 1029-1034.
- Bolivar F., Rodriguez R.L., Betlach M.C., Boyer H.W., 1977. Construction And Characterisation of New Cloning Vehicles. I. Ampicillin-Resistant Derivatives of Plasmid pMB9. *Gene*, 2 (2): 75-93.
- Bostancı Ş.E., 2014. Bazı Benzotiyazol Türevi Bileşiklerin Mutajenik Potansiyellerinin Ames Test Sistemi ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Türkiye.
- Bozcuk A., 2005. Genetik, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Palme Yayıncılık, Ankara, 215-216.
- Da Silva C. M., Da Silva D. L., Modolo L. V., Alves R. B., De Resende M. A., Martins C. V.B., De Fatima A., 2010. Schiff Bases: A Short Review of Their Antimicrobial Activities, p 3.
- Da Silva C. M., Da Silva D. L., Modolo L. V., Alves R. B., De Resende M. A., Martins C. V.B., De Fatima A., 2011. Review Schiff bases: A Short Review of Their

- Antimicrobial Activities, Cairo University, Journal of Advanced Research 2: 1-8
- Carey A. C., Sundberg R. J., 2000. Advanced Organic Chemistry, Part B Reactions and Synthesis, Springer, 31.
- De Souza A.O., Galetti F.C.S., Silva C.L., Bicalho B., Parma M.M., Fonseca S.F., 2007. Antimycobacterial and Cytotoxicity Activity of Synthetic and Natural Compounds. *Quimica Nova*, 30 (7): 1563-1566.
- Dean B.J., Brooks T.M., Hodson-Walker G., Hutson D.H., 1985. Genetic Toxicology Testing of 41 Industrial Chemicals. *Mutation Research*, 153 (1-2): 57-77.
- Dhar D.N., Taploo C.L., 1982. Schiff Bases and Their Applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 41 (8): 501- 506.
- El-Sonbati A.Z., Diab M.A., El-Bindary A.A., Abou-Dobara M.I., Seyam H.A., 2016. Molecular Docking, DNA Binding, Thermal Studies and Antimicrobial Activities of Schiff Base Complexes *Journal of Molecular Liquids* *Journal of Molecular Liquids*, 218: 434-456.
- Fang B., Zhou C.H., Rao X.C., 2010. Synthesis and Biological Activities of Novel Amine-Derived Bis-Azoles as Potential Antibacterial and Antifungal Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (9): 4388-4398.
- Fessenden., R.J., Fessenden S.S., 1990. *Organic Chemistry Brooks*, Cole publishing company, 4th edition, California, USA, 1108-1114 p.
- Fita P.E., Luzina T., Dziembowska Cz., Radzewicz A., Grabowska., 2006. Chemistry, Photophysics, and Ultrafast Kinetics of two Structurally Related Schiff Bases Containing the Naphthalene or Quinoline Ring. *Journal Chemistry Physics*, 125: 184508.
- Forster R., Blowers S.D., Cinelli S., Marquardt H., Westendorf J., 1992. Mutagenicity Testing of Imidazole and Related Compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 298: 71-79.
- Friedman A.E., Chamborn J.C., Sauvage J.P., Turro N.J., Barton J.K., 1992. Novel Dipyrrophenazine Complexes of Ruthenium(II): Exploring Luminescent Reporters of DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 114: 5919-5925.

- Gollapudi B. B., Krishna G., 2000. Practical Aspects of Mutagenicity Testing Strategy: An Industrial Perspective, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455 (1-2): 21-28.
- Gökçe C., 2012. Bazı Geçiş Metallerinin Yeni Hidrazon Schiff Bazı Ligandları ile Koordinasyon Bileşiklerinin Hazırlanması, Yapılarının Aydınlatılması, DNA Etkileşimlerinin ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Muğla Üniversitesi, Muğla, Türkiye.
- Isenberg H.D., 1998. Essential Procedures for Clinical Microbiology. American Society for Clinical Microbiology, Washington DC, 126-223 p.
- Iqbal A. ve Hoque F., 2016. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Studies of Schiff Base Ligand-Derived from Amoxicillin and Benzaldehyde Bangladesh Pharmaceutical Journal, 19 (2): 211-214.
- İçsel C., 2013. 2-(Hidroksi Metil)Piridin ve 2-(2-Hidroksi Etil)Piridin Ligantları İçeren Palladyum(II) ve Platin(II) Komplekslerinin Sentezi, Kristal Yapıları, Spektroskopik, Termik ve DNA Bağlanma Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, Türkiye.
- Jana K., Maity T., Mahapatra T. S., Mohapatra P. K., Debnath S. C., Das S., Hossain M., Samanta B. C., 2017. A Square Pyramidal Copper(II) Complex of a Schiff Base Ligand: Synthesis, Crystal Structure, Antibacterial and DNA Interaction Studies. Transit Met Chem 42:69–78 DOI 10.1007/s11243-016-0108-6.
- Joseph P.D., Gruz P., Nohmi T., 1997. Recent Advances in The Construction of Bacterial Genotoxicity Assays. Mutation Research, 386: 1-23.
- Kayser O., Kiderlen A.F., Croft S.L., 2003. Natural Products as Potential Antiparasitic Drugs. Parasitology Research 90 (Suppl 2): S55-62.
- Kessler C., Manta V., 1990. Specificity of Restriction Endonucleases and DNA Modification Methyltransferases a Review, Gene, 92 (1-2): 1–248.
- Kumar M. P., Vamsikrishna N., Ramesh G., Subhashini N. J. P., Nanubolu J.B., Shivaraj 2017: Cu(II) Complexes with 4-amino-3,5-dimethyl isoxazole and Substituted Aromatic Aldehyde Schiff bases: Synthesis, Crystal Structure, Antimicrobial Activity, DNA Binding and Cleavage Studies, Journal of Coordination Chemistry,

DOI:n10.1080/00958972.2017.129250.

- Kumar S., Dhar D.N., Saxena P.N., 2009. Applications of metal complexes of Schiff bases-A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 68: 181-187.
- Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A., 2009. Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, s.361-378.
- Korenke A.R., Rivey M.P., Allington D.R., 2008. Sustained-Release Fampridine for Symptomatic Treatment of Multiple Sclerosis. *Annals of Pharmacotherapy*. 42 (10): 1458–1465.
- Korkmaz F., Mercangöz A., 2012. Mutagenicity of 1-Ethyl-2,4,5-Triphenyl-1H-Imidazole and Six Derivates in *Salmonella typhimurium*. *Gazi University Journal of Science*, 25 (1): 1-8.
- Kovacic J.E., 1967. The C=N Stretching Srequency in the Infrared Spectra of Schiff's Base Complexes-I. Copper Complexes of Calicylidene Anilines, *Spectrochim. Acta* 23A: 183-187.
- Kumaravel G., Raman N., 2017. A Treatise on Benzimidazole Based Schiff Base Metal(II) Complexes Accentuating Their Biological Efficacy: Spectroscopic Evaluation of DNA Interactions, DNA Cleavage and Antimicrobial Screening. *Materials Science and Engineering*, 70 184–194.
- Kurt B.,2011 Yeni Ligand ve Komplekslerin Sentezi, Karakterizasyonu, Polimerizasyonu, DNA Etkileşimi ve Optik Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, Türkiye.
- Lerman L.S., 1963. Structure of DNA-Acridine Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 49 (1): 94-98.
- Lewis R., 2009. *Human Genetics: Concepts and Applications* 9th Edition, McGaw-Hill Co.
- Lippert B., 1999. Impact of Cisplatin on the Recent Development of Pt Coordination Chemistry: a Case Study, *Coordination Chemistry Reviews*, 182: 263-295.
- Loh D.S.Y., Er H.M., Chen Y.S., 2009. Mutagenic and Antimutagenic Activities of Aqueous and Methanol Extracts of *Euphorbia hirta*. *Journal of Ethnopharmacology*

126 (3): 406-414.

- Manjunath M., Kulkarni A. D., Bagihalli G. B., Malladi S., Patil S.A., 2017. Bio-important Antipyrene Derived Schiff Bases and Their Transition Metal Complexes: Synthesis, Spectroscopic Characterization, Antimicrobial, Anthelmintic and DNA Cleavage Investigation. *Journal of Molecular Structure*, 1127: 314-321.
- Maron D.R., Ames B.N., 1983. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test, *Mutation Research*, 113: 173-215.
- McCann and Ames B.N., 1976. Detection of Carcinogens as Mutagens in The *Salmonella*/Microsome Test: Assay of 300 Chemicals: Discussion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73 (3): 950-954.
- Mladenova R., Ignatova M., Manolova N., Petrova T., Rashkov I., 2002. Preparation, Characterization and Biological Activity of Schiff Base Compounds Derived from 8-Hydroxyquinoline-2-Carboxaldehyde and Jeffamines ED, *European Polymer Journal* 38: 989-999.
- Mortelmans K., Zeiger E., 2000. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay, *Mutation Research*, 455: 29-60.
- Negi P.S., Jayaprakasha G.K., Jena B.S., 2003. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Pomegranate Peel Extracts. *Food Chemistry*, 80: 393-397.
- Nucci M., Marr K.A., 2005. Emerging Fungal Diseases. *Clinical Infectious Diseases* 41 (4): 521-526.
- Onuska K.D., Lahitova N., Carsky J., 1996. Antimutagenic and Bacteriostatic Activities of Schiff-Base Compounds Derived from Aminoguanidine, Semicarbazone and Tthiosemicarbazone and a Copper (II)-Coordination Complex. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 57: 163-170.
- Osowole A.A., Ott I., Ogunlana O.M, 2012. Synthesis, Spectroscopic, Anticancer, and Antimicrobial Properties of Some Metal(II) Complexes of (Substituted) Nitrophenol Schiff Base. *International Journal of Inorganic Chemistry*, p 6.
- Ozurkcan S.A., Turhan K., Turgut Z., Karadayi M., Gulluce M., 2013. Ultrasonic Synthesis, Characterization of β -Aminoketones by Bismuth (III) Triflate and

- Determination of Antigenotoxic Properties. *Toxicology and Industrial Health*, 1-9.
- Özbek, T., 2006. Doğu Anadolu Tıbbi Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/*Salmonella* Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye.
- Paolini M., Forti G.C., 1997. On The Metabolizing Systems for Short-Term Genotoxicity Assays A Review. *Mutation Research*, 387: 17-34.
- Pasternak J.J., 2005. *An Introduction to Human Molecular Genetics: 2nd Edition* A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Patil S. A., Prabhakara C. T., Halasangi B. M., Toragalmath S.S., Badami P.S., 2015. DNA Cleavage, Antibacterial, Antifungal and Anthelmintic Studies of Co(II), Ni(II) and Cu(II) Complexes of Coumarin Schiff Bases: Synthesis and Spectral Approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 137: 641–651.
- Pfaller M., Diekema D.J., 2004. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance Beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4419.
- Rathelot P., Vanelle P., Gasquet M., Delmas F., Crozet M.P., Timon-David P., 1995. Synthesis of Novel Functionalized 5-Nitroisoquinolines and Evaluation of *in vitro* Antimalarial Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 30 (6): 503-508.
- Schiff H., 1869. Über Die Aldehyd und Amin Reaktionen. *Liebigs Annalen der Chemie*, 150-197.
- Shahabadi N., Kashanian S., Darabi F., 2010. DNA Cleavage Studies of Water Soluble Cobalt(II) Complex Containing Dinitrogen Schiff Base Ligand: The Effect of Metal on the Mode of Binding. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45: 4239-4245.
- Shebl M., 2014. Synthesis, Spectroscopic Characterisation and Antimicrobial Activity of Binuclear Metal Complexes of A New Asymmetrical Schiff Base Ligand: DNA Binding Affinity of Copper(II) Complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117: 127-137.
- Sherman S.E., Lippard S.J., 1987. *Structural Aspects of Platinum Anticancer Drug*

- Interactions with DNA. *Chemical Reviews*, 87: 1153-1181.
- Shi L., Ge H.M., Tan S.H., Li H.Q., Song Y.C., Zhu H.L., 2007. Synthesis and Antimicrobial Activities of Schiff Bases Derived from 5-Chloro-Salicylaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42 (4): 558-564.
- Singh K., Barwa M.S., Tyagi P., 2006. Synthesis, Characterization and Biological Studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) Complexes with Bidentate Schiff Bases Derived by Heterocyclic Ketone, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41: 147-153.
- Solari A., Uitdehaag B., Giuliani G., Pucci E., Taus C. 2001. Solari A., ed. Aminopyridines for Symptomatic Treatment in Multiple Sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* (4): CD001330. doi:10.1002/14651858.
- Soysal Z., 2009. Bazı Benzoksazol Türevi Bileşiklerin Ames Test Sistemi ile Mutajenik Potansiyellerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- Sridhar S.K., M. Saravanan, A. Ramesh. 2001. Synthesis and Antibacterial Screening of Hydrazones, Schiff and Mannich Bases of Isatin Derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36: 615-625.
- Sriram D., Yogeewari P., Myneedu N.S., Saraswat V., 2006. Abacavir Prodrugs: Microwave-Assisted Synthesis and Their Evaluation of Anti-HIV Activities. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 16 (8): 2127-2129.
- Strekowski L., Wilson B., 2007. Noncovalent Interactions with DNA: An Overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623: 3-13.
- Sundriyal S., Sharma R.K., Jain R., 2006. Current Advances in Antifungal Targets and Drug Development. *Current Medicinal Chemistry*, 13 (11): 1321-1335.
- Temizkan G.O., 1994. Genetik İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul.
- Vafazadeh R., Jafari F., Heidari M. M., Willis A. C., 2016. Alkyl Chain Length Effect on Construction of Copper (II) Complexes with Tridentate Schiff Base Ligand and DNA Interaction, *Journal of Coordination Chemistry*, DOI: 10.1080/00958972.2016.1163547.

Yıldırım M.A., Demir N., 2016. Glisin metil ester salisiliden bileşiğinin antitumör aktivite ve DNA ile etkileşimlerinin araştırılması. Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi. p. 48.

Yıldırım N., 2016. Bazı Schiff Bazları ve Komplekslerinin DNA'ya bağlanma özellikleri ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.

Yin D. D., Yan L., Shah L., 2001. Synthesis Characterization of Diorganotin(IV) Schiff Base Complexes and Their *in vitro* Antitumoractivity. Chinese Journal of Chemistry 19: 1136-1140.

<http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>.

<http://parts.igem.org>.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Pınar GÖK

Doğum Yeri: Eyüp / İSTANBUL

Doğum Tarihi: 22.11.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen-Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Bölümü

(2011-2015)

İstanbul Üniversitesi

Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi

İşletme Bölümü

(2016- Devam ediyor)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

(2015- 2017)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

Gök P., Demir N., Yıldız M., Gök B., 2016. Investigation of some Biological Activity and DNA Interactions of the 3-Aminopyridine Derivative. International Istanbul Technical University Molecular Biology and Genetics Student Congress'16, October 7-9th, 2016, Istanbul-Turkey, p.51.

Gök B., Demir N., Yıldız M., Gök P., 2016. Synthesis, Antimicrobial Activity, Antimutagenic Effect, DNA binding and DNA Cleavage Studies of 4-bromo-2-{(E)-[4-*tert*-butylbenzyl)imino) methyl}-6-methoxyphenol. International Istanbul Technical University Molecular Biology and Genetics Student Congress'16, October 7-9th, 2016, Istanbul-Turkey, p.46.

- Gök P., Demir N., Yıldız M., Gök B., 2016. Antimicrobial Activity, Genotoxicity and DNA Interactions Studies of Some Imine Compounds. 2nd International Congress of Forensic Toxicology, May 26-30 2016, Ankara - Turkey, p.139.
- Gök P., Demir N., Gök B., 2016. Determination of Genotoxicity and Cytotoxicity of Promocarb-HCl by *Allium cepa* Test. 2nd International Congress of Forensic Toxicology, May 26-30 2016, Ankara - Turkey, p.146.
- Gök B., Demir N., Yıldız M., Gök P., 2016. Synthesis, Characterization, Antimicrobial Activity, Antimutagenic Effect and DNA Binding Studies of 2-Hydroxy Schiff Bases. 2nd International Congress of Forensic Toxicology, May 26-30 2016, Ankara - Turkey, p.137.
- Gök B., Demir N., Gök P., 2016. Genotoxic and Cytotoxicity Effects of Indoxacarb Insecticide on *Lactuca sativa* L. Plant. 2nd International Congress of Forensic Toxicology, May 26-30 2016, Ankara - Turkey, p.138.
- Gök, P., Demir, N., 2016. Aminopiridin Bileşiklerinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması. Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale, p. 52.

Katıldığı Projeler

- Kepez (Çanakkale) Bölgesinden Örneklenen Akdeniz Midyesi (*Mytilus Galloprovincialis* L., 1819) Türünde Ağır Metal Kirliliğinin Metallotiyonin Biyomarkırı İle Belirlenmesi, Tübitak, Tübitak 2209-A, Proje Yürütücüsü, Haziran 2014 - Haziran 2015.

İLETİŞİM

E--posta Adresi: p-nar-gk2@hotmail.com