

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANİLİN BENZİLİDEN TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTE VE ANTİMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Bahar GÖK

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

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

ANİLİN BENZİLİDEN TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTE VE ANTİMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Bahar GÖK
Biyoloji Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih:**26/01/2017**

Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

ÇANAKKALE

Bahar GÖK tarafından Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR yönetiminde hazırlanan ve **26/01/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Anilin Benziliden Türevlerinin Biyolojik Aktivite ve Antimutajenik Özelliklerinin Belirlenmesi**" 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.

Bahar GÖK

TEŞEKKÜR

Gerek yüksek lisans, gerekse lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR'e,

Tez için bileşikleri sağlayan, çalışma süresinde bilgilerini esirgemeyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a,

Ames testi için 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

Laboratuvar çalışmalarının her aşamasında yardımları, bilgileri ve sevgileri ile bana destek olan Uzman Nuray YILDIRIM'a, Doktora öğrencisi Merve BALLI'ya, Mehmet Ali YILDIRIM'a, Elif MERDAMET'e, M.Eray BOZYEL'e, Feyza Rabia AKKAN'a ve Hayati ÖZCAN'a,

Hayatımın her evresinde benden sevgilerini ve hoşgörülerini esirgemeyip bana destek olan değerli babam Burhanettin GÖK'e, annem Tülay GÖK'e, erkek kardeşim Engin GÖK'e ve laboratuvar çalışmaları boyunca da desteğini esirgemeyen aynı zamanda meslektaşım olan ablam Pınar GÖK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bahar GÖK

Çanakkale, Ocak 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
Abs	Absorbans
A	Adenin
ε	Molar Sönüm Katsayısı
C	Sitozin
CFU	Koloni Oluşturan Birim
Cd	Kadmiyum
cm	Santimetre
Cr	Krom
Co	Kobalt
CT-DNA	Calf Thymus-Dana Timus-DNA
Cu	Bakır
DMF	Dimetil Formamid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
Fe	Demir
g	Gram
G	Guanin
H_2SO_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
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	Mililitre
N	Normalite

NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
Ni	Nikel
NPD	4- Nitro-*o*-Fenilendiamin
OD	Optik Yoğunluk
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medyum
S9	Sıçan Karaciğer Mikrozomal Enzimi
SA (NaN_3)	Sodyum Azid
Se	Selenyum
sn	Saniye
T	Timin
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge
Zn	Çinko
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mM	Milimolar

ÖZET

ANİLİN BENZİLİDEN TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTE VE ANTİMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Bahar GÖK
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR
26/01/2017, 83

Bu çalışmada, Anilin benziliden türevlerinin (Schiff bazlarının) biyolojik aktivite (antimikrobiyal aktivite, DNA kesme, DNA bağlanma) ve antimutajenik özellikleri çalışıldı.

Antimikrobiyal aktivite, *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aerouginosa* bakterileri ile *Candida tropicalis* ve *Candida albicans* mayalarına karşı mikrodilüsyon (MİK) metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda Schiff bazlarının bakteriler ve mayalar üzerinde etkili olduğu belirlendi.

DNA kesme özelliği, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile pBR322 plasmid DNA kullanılarak çalışıldı. Her iki bileşiğinde hidrolitik olarak DNA kesme aktivitesinin olmadığı, oksitleyici ajan varlığında olarak DNA kesme aktivitesinin olduğu tespit edildi.

DNA bağlanma, UV-Vis absorpsiyon titrasyonu metodu ile CT-DNA kullanılarak araştırıldı. UV-Vis sonuçlarına göre bileşiklerin her ikisinin de CT-DNA'ya bağlandığı bulundu.

Schiff bazlarının mutajenik ve antimutajenik özellikleri Ames testi ile *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılarak araştırıldı. Her iki bileşik için çalışılan tüm konsantrasyonların mutajenik özellik göstermediği, ancak konsantrasyona bağlı olarak güçlü antimutajenik özellik gösterdikleri belirlendi.

Anahtar sözcükler: Anilin Benziliden Türevleri, DNA Bağlanma, DNA Kesme, Antimikrobiyal Aktivite, Mutajenik, Antimutajenik.

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY AND ANTIMUTAGENIC EFFECT OF THE ANILINE BENZYLIDENE DERIVATIVES

Bahar GÖK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Chair for Biology Thesis, Master of Science

Advisor: Assist. Prof. Dr. Neslihan DEMİR

26/01/2017, 83

In this study, the biological activity and antimutagenic properties of aniline benzylidene derivatives (Schiff bases) were studied. Antimicrobial activity, DNA cleavage, DNA binding and mutagenic properties were investigated as biological activity.

Antimicrobial activity was studied by microdilution (MIC) method against *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aerouginosa* bacteria with *Candida tropicalis* and *Candida albicans yeasts*. As a result, Schiff bases were found to be effective bacteria and yeasts.

DNA cleavage was performed using pBR322 plasmid DNA by the agarose gel electrophoresis method. Both compounds had DNA cleavage activity in the presence of an oxidizing agent.

DNA binding was investigated using CT-DNA by UV-Vis absorption titration method. According to UV-Vis results, both of the compounds were binding to CT-DNA.

The mutagenic and antimutagenic properties of Schiff bases were investigated using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 mutant strains by Ames test. All concentrations tested for both compounds did not show any mutagenic properties however were strongly antimutagenic depending on concentration.

Keywords: Aniline Benzylidene Derivatives, DNA Binding, DNA Cleavage, Antimicrobial Activity, Mutagenicity, Antimutagenicity.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vii
ABSTRACT viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
BÖLÜM 1 .....
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 3
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....
2.1. Schiff Bazları 3
2.1.1. Schiff Bazlarının Genel Özellikleri 3
2.1.2. Schiff Bazlarının Kullanım Alanı ve Biyolojik Önemi 3
2.2. Antimikrobiyal Aktivite 4
2.3. DNA (Deoksiribonükleik Asit) 5
2.3.1. DNA-İlaç Etkileşimleri 9
2.4. DNA Kesme 9
2.5. DNA Bağlanma 10
2.5.1. Kovalent Bağlanma 10
2.5.2. Nonkovalent Bağlanma 12
2.5.2.1. İnterkalasyon 12
2.5.2.2. Elektrostatik Etkileşimler 13
2.5.2.3. Oluğa Bağlanma 14
2.6. Schiff Bazlarının DNA Kesme ve DNA Bağlanma Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler 15
2.6.1. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi 15
2.6.2. UV-Vis Absorpsiyon Yöntemi 16
2.7. Mutajenite 17
2.7.1. Mutasyonlar 17
2.7.1.1. Gen Mutasyonları 18

2.7.1.1.1. Baz Değişimi Mutasyonu 18
2.7.1.1.2. Çerçeve Kayması Mutasyonu 18
2.7.2. Kromozom Mutasyonları 19
2.7.2.1. Kromozomlarda Sayı Değişimleri 19
2.7.2.2. Kromozomlarda Yapı Değişimleri 20
2.8. Antimutajenite 20
2.9. Schiff Bazlarının Mutajenik ve Antimutajenik Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler 22
2.9.1. Ames Testi 22
2.10. Schiff Bazlarının Biyolojik Aktiviteleri ve Antimutajenite Özellikleri 25
BÖLÜM 3 .....
MATERYAL VE METOT 29
3.1. Materyal 29
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Schiff Bazları 29
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar 30
3.1.3. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi 31
3.1.3.1. Antimikrobiyal Aktivite 31
3.1.3.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Test Suşları 31
3.1.3.1.2. Kullanılan Stok kültürler 31
3.1.3.1.3. Kullanılan Çalışma kültürleri 31
3.1.3.1.4. Kullanılan Besiyerleri 32
3.1.3.1.5. Bakterilerin ve Mayaların Canlandırılması 33
3.1.3.1.6. 0.5 McFarland Turbidity Standart Hazırlanması 33
3.1.3.2. DNA Kesme 33
3.1.3.3. DNA Bağlanma Aktivite 34
3.1.4. Mutajenite ve Antimutajenite Özelliklerin Belirlenmesi 35
3.1.4.1. *Salmonella typhimurium* Test Suşları 35
3.1.4.2. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Besiyerleri ve Stok Çözeltiler 35
3.2. Yöntem 42
3.2.1. Schiff Bazlarının Çözeltilerinin Hazırlanması 42
3.2.2. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi 42
3.2.2.1. Mikrodilüsyon Testi (MİK) 42
3.2.2.2. DNA Kesme Aktivitesi 43

3.2.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi 43
3.2.2.3. DNA bağlanma Aktivitesi 44
3.2.2.3.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonu 44
3.2.3. Mutajenite ve Antimutajenite Özellikleri 45
3.2.3.1. Suşların Genetik Özelliklerinin Kontrol Edilmesi 45
3.2.3.1.1. Suşların Histidin Gereksinimi 45
3.2.3.1.2. *rfa* Mutasyon Kontrolü 45
3.2.3.1.3. *uvrB* Mutasyon Kontrolü 45
3.2.3.1.4. R Faktör Kontrolü 46
3.2.3.2. Suşların Master Plaklarının Hazırlanması 46
3.2.3.3. Test suşlarının -80'de Muhafaza Edilmesi 46
3.2.3.4. Suşların Gecelik Kültürlerinin Hazılanması 46
3.2.3.5. Sıvı Kültürün mL'sindeki Suşların Yoğunluğunun Belirlenmesi 47
3.2.3.6. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmaları 47
3.2.3.7. Suşların Pozitif Kontrolü 48
3.2.3.8. Suşların Negatif Kontrolü 48
3.2.3.9. Suşların Spontan Kontrolü 48
3.2.3.10. Ames Testi Sonuçların Değerlendirilmesi 49
3.2.3.10.1. Mutajenik Özelliklerinin Değerlendirilmesi 49
3.2.3.10.2. Antimutajenik Özelliklerinin Değerlendirilmesi 49
BÖLÜM 4 .....
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 51
4.1. Schiff Bazlarının Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi 51
4.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları 51
4.1.2. DNA Kesme Sonuçları 53
4.1.3. DNA Bağlanma Sonuçları 55
4.1.3.1. UV-Vis Absorpsiyon Sonuçları 55
4.2. Schiff bazlarının Mutajenite ve Antimutajenite Özelliklerinin Belirlenmesi 58
4.2.1. Suşların Genetik Özelliklerinin Kontrolü 58
4.2.1.1. Suşların Histidin Gereksinimi 58
4.2.1.2. *rfa* Mutasyonu Kontrolü 59
4.2.1.3. *uvrB* Mutasyonu Kontrolü 59
4.2.1.4. R Faktörü Kontrolü 60
4.2.2. Schiff Bazlarının Mutajenik Özelliklerinin Sonuçları 60

4.2.3. Schiff Bazlarının Antimutajenik Özelliklerinin Sonuçları 66
BÖLÜM 5 .....
SONUÇ VE ÖNERİLER 70
KAYNAKLAR 73
ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Schiff tarafından sentezlenmiş olan Schiff bazı 3
Şekil 2.2. DNA'nın yapısını oluşturan nükleotid 6
Sekil 2.3. DNA'daki fosfodiester bağlarının oluşumu 6
Şekil 2.4. Pirimidin ve pürin türevli organik bazlar 7
Şekil 2.5. a. DNA'nın sarmal yapısı b. DNA sarmalında olusan küçük ve büyük oluklar .8
Şekil 2.6. cis-platin'in DNA'ya kovalent bağlanması sonucu DNA omurgasında meydana gelen hasar 11
Şekil 2.7. a.DNA'ya interkalasyon seklinde bağlanma b. İnterkalatör özellik gösteren etidyum bromürün molekül yapısı 12
Şekil 2.8. DNA'ya elektrostatik olarak bağlanma 13
Şekil 2.9. DNA'nın küçük oluğuna bağlanan DAPI 14
Şekil 2.10. a.Plazmid DNA'nın üç formu ve b. Jel elektroforezinde plazmid DNA'nın üç formunun görünümü 16
Şekil 2.11. Baz değişimi mutasyonları 18
Şekil 2.12. Çerçeve kayması mutasyonu 19
Şekil 2.13. Antimutajen etki mekanizmaları 21
Şekil 3.1. (*E*)-2-((4-etenilfenilimino)metil)-6-nitrofenol (Bileşik 1) 29
Şekil 3.2. (*E*)-4-bromo-2-((4-etenilfenilimino)metil)-6-metoksifenol (Bileşik 2) 30
Şekil 4.1. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin DNA kesme aktivitesi 54
Şekil 4.2. Bileşik 1'in UV-Vis absorpsiyon titrasyonu 56
Şekil 4.3. Bileşik 2'nin UV-Vis absorpsiyon titrasyonu 56
Şekil 4.4. *S. typhimurium* TA98 mutant suşunun HB ve MGA plaklarında üreme varlığı 58
Şekil 4.5. *S. typhimurium* TA100 mutant suşunun HB ve MGA plaklarda üreme varlığı 58
Şekil 4.6. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarında kristal viyole hassasiyet testi 59
Şekil 4.7. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları *uvrB* delesyon kontrolü 59
Şekil 4.8. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları R faktörü kontrolü 60
Şekil 4.9. TA98 ve TA100 mutant suşlarının pozitif kontrolü 61
Şekil 4.10. TA98 ve TA100 mutant suşlarının negatif kontrolü 61
Şekil 4.11. TA98 ve TA100 mutant suşlarının spontan kontrolü 61
Şekil 4.12. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 mutant suşu üzerindeki mutajenik özellikleri 64
Şekil 4.13. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 mutant suşu üzerindeki mutajenik özellikleri 64
Şekil 4.14. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik özellikleri 68
Şekil 4.15. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik özellikleri 68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. *S. typhimurium*'un LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla oluşturulan mutant suşlar ve genetik özellikleri 23
Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan mutant suşların genotipik özellikleri 35
Çizelge 3.2. *S. typhimurium* suşlarının spontan *his*+ forma donüşmesi durumundaki bakteri sayıları 49
Çizelge 4.1. Schiff bazlarının MİK (µg/mL) değerleri 51
Çizelge 4.2. Schiff bazlarının dört farklı konsantrasyonunun *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşu üzerindeki mutajenik özellikleri 63
Çizelge 4.3. Schiff bazlarının dört farklı konsantrasyonunun *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşu üzerinde gösterdiği antimutajenik özellikleri 67

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Antibiyotik; aktinomistler, bakteriler ve funguslar gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenen veya sentetik olarak elde edilen, son derece düşük miktarlarda dahi mikroorganizmaların gelişmini engelleyebilen ya da onları öldürebilen ajanlar olarak tanımlanmaktadır (Sisecioglo ve ark., 2011). Mikrobiyal hastalıklarda hızla artan ölüm oranları, mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdiği dirençle doğrudan ilişkili olduğundan dolayı bu durum tedavinin etkisizleşmesinin ana unsuru haline gelmektedir (Alekshun, 2007). İlaç sanayii daha etkili mekanizmalarla aktivite gösteren yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine bu nedenle acil olarak ihtiyaç duymaktadır (Rice, 2006).

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması, işgalci bir özellik kazanması ve metastaz yapması ile kendini belli eden ve maalesef halen gelişmiş ülkelerde ölüm istatistiklerinde ikinci sırada yer alan öldürücü bir hastalık olarak bilinmektedir. Bu nedenle bilim insanları, kansere karşı etkili olabilecek, aynı zamanda insan sağlığına zarar vermeyecek yeni ilaç moleküllerinin belirlenmesi ya da sentezlenmesi üzerine dünya çapında geniş kapsamlı çalışmalar gerçekleştirmektedirler (Göçmen, 2014).

Deoksiribonükleik asit (DNA), bütün organizmaların yanında bazı virüslerin canlılığını sürdürebilmesi ve biyolojik olarak gelişebilmesi için gereken tüm bilgileri taşıyan yapıdır. Bu sebeple antitümör başta olmak üzere antiviral, antifungal ve diğer bazı tür ilaçların geliştirilmesinde DNA hedef alınır. DNA'yı hedef olarak alan ve bağlanan birçok ilaç geliştirilmiş, ayrıca çok daha fazla sayıda molekül tanımlanmıştır. Bu bağlamda, DNA-ilaç etkileşimlerini anlayarak klinik uygulamalar adına yeni ve etkin ilaçların geliştirilmesi için küçük moleküllerin DNA'ya bağlanma çalışmaları önem teşkil etmektedir (Friedman ve ark., 1992). DNA bağlanması pekçok durumda DNA kesimi için kritik adımdır. Kanser tedavisi için tümörün yerleşim mekanizmasının anlaşılmasında önemli değere sahiptir (Abdi ve ark., 2012). Bu nedenle, DNA-bağlanma çalışmaları, DNA'yı hedefleyen yeni ve daha etkili ilaçların dizaynı için önem arz etmektedir (Chitrapriya ve ark., 2010). Canlı DNA'sında kendiliğinden ya da herhangi bir nedenle taşıdığı bilgi içeriğinde meydana gelen değişim "mutasyon" olarak tanımlanmaktadır. Mutasyonlar kendiliğinden meydana geldiği gibi, mutajen adı verilen kimyasal ve fiziksel dış etkenler nedeniyle de meydana gelebilirler.

Mutajen maddeler DNA'nın yapısında hasarlar meydana getirdiğinden dolayı doğrudan kanser ile ilişkilendirilmektedir. Ancak mutajenlerin, kanser oluşumu dışında birçok kronik dejeneratif hastalıkların (kronik inflamasyon, artrit, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve karaciğer hastalıkları) gelişimi ve yaşlanma süreci ile de ilişkili olduğu bilinmektedir (Weisburger, 2001; Bhattacharya, 2011).

Mutajenik ajanların mutajenik veya kanserojenik etkilerini azaltabilen kimyasallar "antimutajen" olarak adlandırılır (Mitscher ve ark., 1986). Bu nedenle, mutajen ajanların etkilerinin kaldırılmasına, hastalık oluşumunun önlenmesine ve hastalıklarda uygulanabilir yeni antimutajenik kimyasalların sentezlenmesine ve tasarlanmasına yönelik çalışmalar önem arz etmektedir (Feil ve Metzger, 2007).

Schiff bazları yapısal ve biyolojik özellikleri nedeniyle üzerinde oldukça fazla çalışma yapılan kimyasallardır (Birbiçer, 1998). Kemoterapik özelliğinden dolayı endüstride ve ilaç sanayinde kullanma alanının olduğu bilinen Schiff bazlarının biyolojik özellikleri arasında en önemli olan ise eser elementler ile yaptıkları şelatlardır. Bu özelliğinden dolayı da geniş bir farmakolojik aktiviteye sahiptirler (Wenwu ve ark., 2000). Schiff bazlarının antitümör, antifungal, yabani ot öldürücü, böcek öldürücü ve antibakteriyel gibi biyolojik aktiviteleri oldukça iyi bilinmektedir (Oforka ve Mkpenie, 2007). Bu nedenle son yıllarda kanser terapisindeki farklı uygulamaları sebebiyle bu kimyasalların, antimikrobiyal, yapay nükleazlar, DNA probu ve antikanser ilaç olarak uygun oldukları bildirilmiştir (Kiran ve ark., 2015).

Birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilen Schiff bazlarının yenilerinin sentezlenerek çeşitli kanser ve mikrobiyal hastalıklara karşı etkili olabilecek ilaçlar geliştirilerek bilime katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

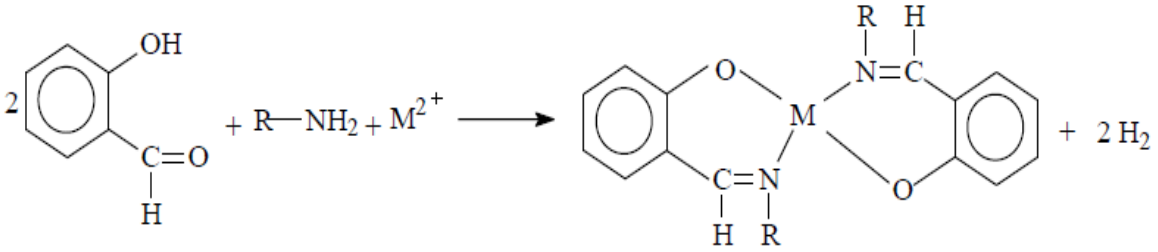
Bu tez kapsamında, Schiff bazlarının broth mikrodilüsyon metodu ile antimikrobiyal aktiviteleri, agaroz jel elektroforezi ile DNA'yı kesme özellikleri, UV-Vis absorpsiyon yöntemi ile DNA'ya bağlanma özellikleri ve Ames/*Salmonella* testi ile de hem mutajenik hem de antimutajenik özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Schiff Bazları

2.1.1. Schiff Bazlarının Genel Özellikleri

İlk olarak Alman kimyager olan H.J. Schiff tarafından sentezlenen Schiff bazları ismini kendisini keşfeden bilim adamından almıştır (Schiff, 1869) (Şekil 2.1). Schiff bazları, pirimer aminlerin aldehit ya da ketonlarla katılma-ayrılma reaksiyonu sonucunda meydana gelen bileşiklerdir.



Şekil 2.1. Schiff tarafından sentezlenmiş olan Schiff bazı (Gürcan, 2014)

2.1.2. Schiff Bazlarının Kullanım Alanı ve Biyolojik Önemi

Schiff bazları bazı ilaçların hazırlanmasında, plastik sanayinde, analitik kimyada, elektronik endüstrisinde, sıvı kristal teknolojisi, boyar maddelerin üretiminde, polimer üretiminde ve kozmetik gibi farklı alanlarda artan değere sahip kimyasallardır. Schiff bazları yapısal ve biyolojik önemleri nedeniyle pekçok çalışmada kullanılan ve halen üzerinde oldukça çalışılan kimyasallardır (Metzler ve ark., 1980). Schiff bazları katekol, aminoasitler, askorbik asit ve serbest oksijen gibi moleküllerin oksidasyonunda görev almaktadır (Niederhoffer ve ark.,1984). Farmakolojik ve kimyasal özellikleri nedeniyle antitümör, antiviral, antienflamatuar ve antineoplastik ajanlar olarak kullanılması yönünde de geniş bir ilgi görmüştür (Öztürk, 1998).

Başka bir özelliği ise alkil ile salisilaldehit ve aril aminlerin kondensasyonundan meydana gelen N-Ar salisilidenaminler, N-R, B1 vitaminlerinin ve pridoksal yapısının anlaşılması için yararlı bir model olmasıdır (Murthy ve Reddy, 1981). Bunun dışında tarımsal alanlarda fungisid ve insektisid gibi ilaçların bileşiminde bulunarak ilaçların etkinliğini arttırmak için de kullanılabilmektedir (Öztürk, 1998).

2.2. Antimikrobiyal Aktivite

Antibakteriyel ilaçlar içinde özel bir yeri olan ve önemli bir ilaç gurubu olan antibiyotikler; aktinomistler, bakteriler ve funguslar gibi çeşitli mikroorganizmaların sentezlediği ve diğer mikroorganizmaların gelişmesini önlediği ya da onları öldürdüğü kimyasal maddelerdir (Sisecioglo ve ark., 2011).

Bugün dünyada yaklaşık olarak beş bin antibiyotik bilinmekte ve bunlardan sadece titizlikle üzerinde çalışma yapılan ilaçların sayısı sadece bin tanedir. Ancak bunların da 10'da 1'i kadarı bugün aktif olarak klinik uygulamaya sahiptir. Bu antibiyotikler 5 temel hedef üzerinden etki etmektedirler:

1) Hücre duvarları (beta-laktam grubu antibiyotikler, vankomisin)

2) Nükleik asit replikasyonu ve onarımı (florokinolonlar)

3) Hücre membranları (polimiksinler)

4) Metabolizmalar (trimetoprim ve sulfametoksazol)

5) Protein sentezi (makrolidler, tetrasiklinler, aminoglikozidler)

(http://www. ankemdergi.org.tr).

Günümüzde betalaktamlar, aminoglikositler, tetrasiklinler, polienler ve makrolitler gibi antibiyotikler ve sulfonamidler, azoller, kinolonlar ve allilaminler gibi sentetik ilaçlar klinikte tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, enfeksiyon hastalıklarında oldukça önemli bir role sahiptir ancak bu ilaçların sahip olduğu toksisite sebebiyle özellikle dünyanın subtropikal bölgelerinde milyonlarca insanın durumunun kötüleşme oranı (morbidite) yahut ölüm oranı (mortalite) ciddi oranda etkilenmiştir. Ayrıca, antibiyotiklerin yanlış kullanımlarının artmasıyla pekçok fungal ve bakteri suşları antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmiştir. Örneğin; vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VRE), metisilin'e dirençli *Staphylococcus epidermis* (MRSE) ve *Staphylococcus aureus* (MRSA) ayrıca diğer dirençli patojenik suşlar, pekçok geleneksel ilacın etkisini ya azaltmış ya da tamamen etkilerinin yok olmasına neden olmuştur (Hopkins, 2011). Ayrıca geçtiğimiz son otuz yıl içinde kanser ve Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu [Acquired Immune Deficiency Syndrome-(AIDS)] gibi yüksek dozda ve uzun süreli ilaç kullanımını gerektiren hastalıklarda ve organ nakli gibi bağışıklık sistemini zayıflatan, immunosupresif enfeksiyon hastalıklarında önemli bir artış gözlenmektedir (Emami ve ark., 2004). Tüm bunlar gözönüne alındığında daha etkili antibiyotik ve antifungal ajanların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Schiff bazlarının, antibakteriyel ve antifungal olarak olarak biyolojik etkinliklere sahip oldukları daha önceki yapılan çalışmalarla araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Amin ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2009).

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları kantitatif (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu/MİK) ya da kalitatif (Disk Difüzyon Yöntemi) olarak yapılmaktadır. Minimum inhibisyon konsantrasyonu çalısmaları sonucu elde edilen MİK degerleri (μg/mL ya da μM), mikroorganizmaların gelişme ve çoğalmasının engellendigi en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanır (Andrews, 2001). Disk difüzyon yöntemi ise, nitel olarak mikroorganizmaların ilaca karşı hassas ya da dirençli olduğunu belirlemede kullanılan bir yöntemdir. MİK yöntemi, daha kesin sonuç vermesi nedeni ile disk difüzyon yöntemine göre daha çok tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında Schiff bazlarının antimikrobiyal aktivitesi için daha kesin sonuç vermesi nedeni ile MİK testi kullanılmıştır. MİK testi, antimikrobiyal ajanın seri seyreltmelerini içeren mikroplak kuyucuklarda üremenin gözle görülebilir bir bulanıklığın olması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde mikroplak kuyucuklarda uygun bir besiyeri kullanılarak mikroorganizmalar, antibakteriyal ve antifungal ajanın seri seyreltmeleri ile muamele edilir. Besiyerleri bakteriler için 37°C'de 24 saat, mayalar da ise 37°C'de 48 saat inkübe edilmesi ardından bakterilerin ve mayaların üremesini gösteren bulanıklık yönünden analiz edilir. Bakterilerin ve mayaların üremesinin önlendiği, gözle görünür bir üremenin olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak belirlenir.

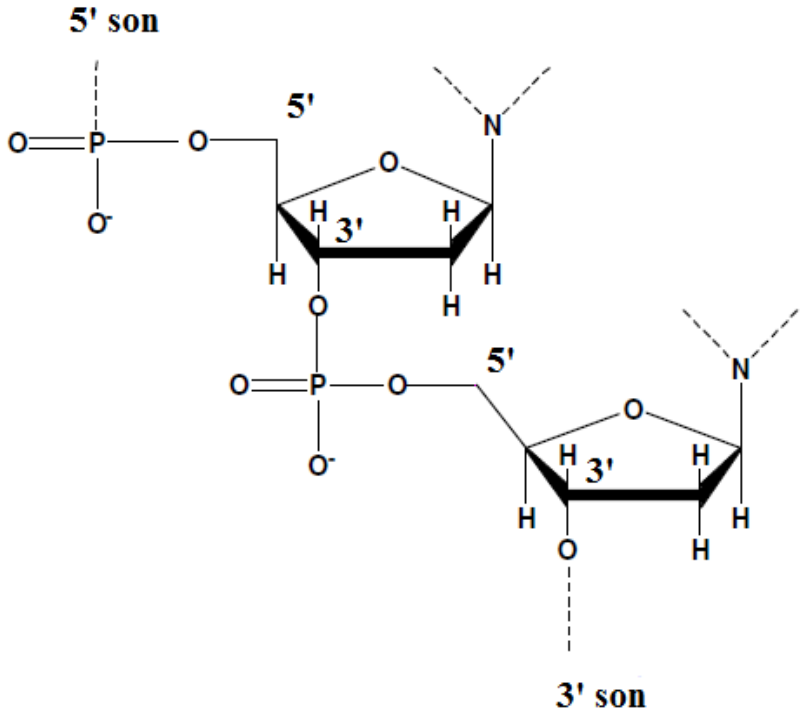
2.3. DNA (Deoksiribonükleik Asit)

DNA, ilk kez isviçreli bilim adamı Friedrich Miescher tarafından 1869 yılında izole edilmiştir (Portugal ve Cohen, 1977). Hücre çekirdeği içerisinde (nükleus) yer alması nedeni ile DNA, "nüklein" olarak adlandırıldı (Miescher, 1871; Dahm, 2005). Phoebus Levene, 1919 yılında DNA'nın nükleotid birimlerinden meydana geldiğini ve bu birimlerin baz, şeker ve fosfat gruplarından oluştuğunu ifade etmiştir. DNA kimyasal olarak nükleotidlerden oluşan bir polimerdir. Bir nükleotid, azotlu organik baz (nükleobaz), pentoz şeker (2'-deoksiriboz) ve fosfat grubu içermektedir (Şekil 2.2).



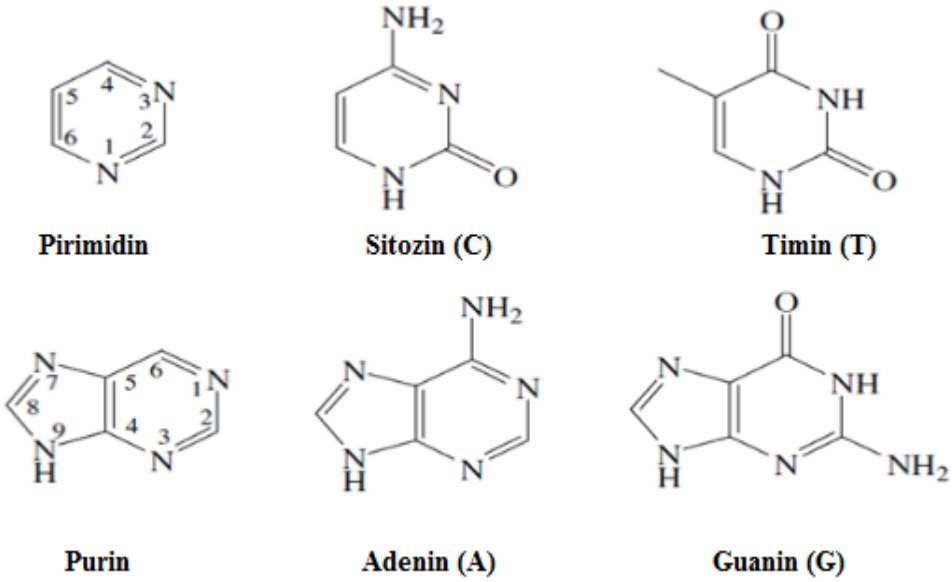
Şekil 2.2. DNA'nın yapısını oluşturan nükleotid

Bir pentoz şekerinin 3'- karbonu ile diğer pentoz şekerinin 5'- karbonu ortasındaki fosfat grubu, bir fosfodiester bağı kurar. Böylelikle şeker birimlerini birbirine bağlar. Bu durum her bir pentoz şekerinin 3'- karbonu ile diğer pentoz şekerinin 5'- karbonu ortasında oluştuğundan nükleotidler fosfodiester bağları ile bağlanarak, nükleik asitleri meydana getirir. Nükleik asit de fosfodiester bağının asimetrik olması sebebiyle DNA ipliğinin belli bir yönü vardır. DNA iplikçiklerin asimetrik uçları 3' ve 5' olarak tanımlanır, 3' bir hidroksil grubu, 5' bir fosfat grubu taşır (Şekil 2.3).



Sekil 2.3. DNA' daki fosfodiester bağlarının oluşumu

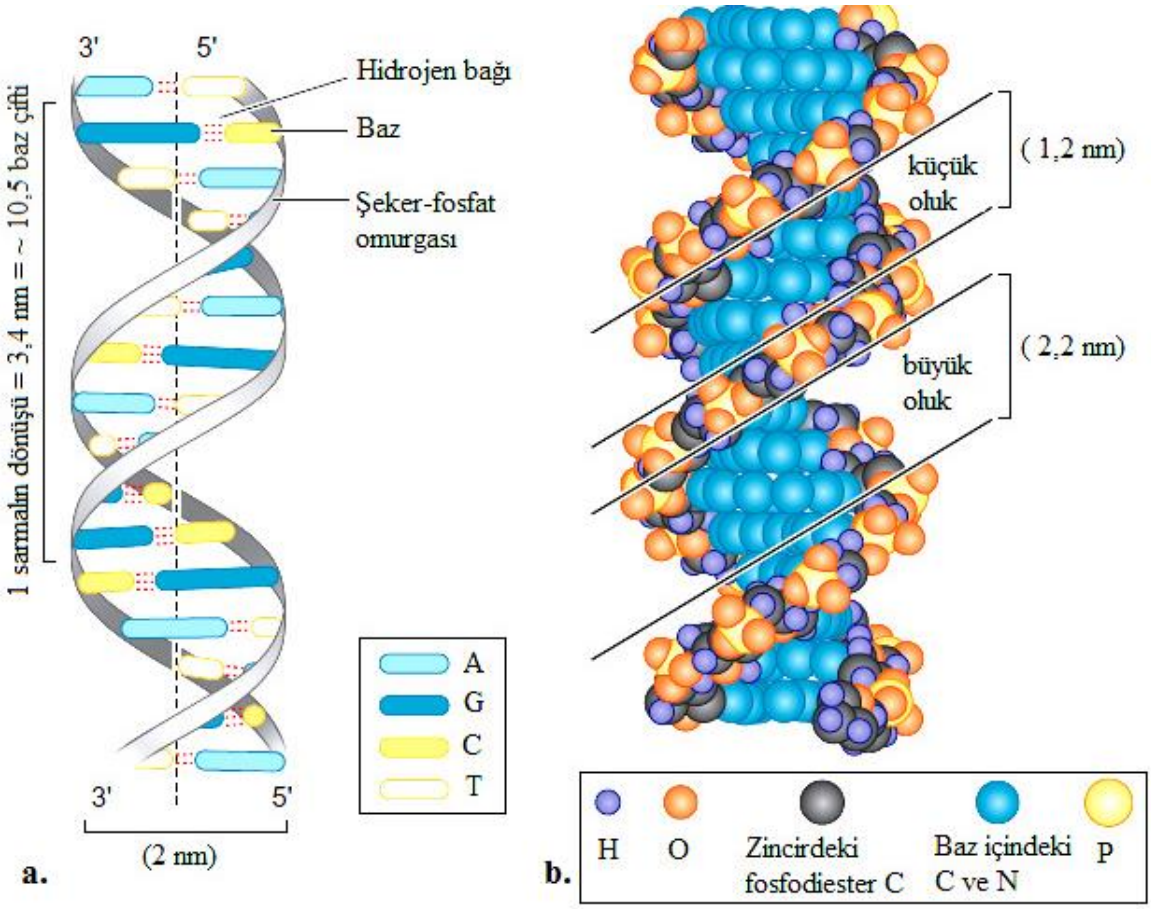
Nükleotidi oluşturan organik bazlar, pürin (adenin ve guanin) veya pirimidin (sitozin ve timin) türevli heterosiklik moleküllerdir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Pirimidin ve pürin türevli organik bazlar

James Watson ve Francis Crick, 1950'lerin başlarında DNA'nın bugün bilinen üç boyutlu halini X-ray çalışmaları sonucu ortaya koymuşlardır. Watson ve Crick bu çalışmalarında DNA'nın birbirine ters yönde antiparalel iki zıt zincirin birbirlerine zincirde bulunan azotlu bazların arasında kurulan hidrojen bağları sayesinde bağlandığını bildirmişlerdir.

Zincirler bir çift sarmal yapısı oluştururlar. Bu yapının iç kısımda hidrofobik bazlar birbirlerinin üzerine aralarında 0.34 nm mesafe olacak şekilde istiflenirler. Bu sayede sulu dış ortamdan saklı apolar bir ortam oluşur. Dış tarafta deoksiriboz şekeri ve fosfat bulunur. Sarmalın çapı yaklaşık olarak 2 nm'dir ve 10 baz çifti içeren her bir dönüş 3.4 nm uzunluğundadır (Şekil 2.5.a). Bu dönüşler esnasında yapıda iki farklı boşluk meydana gelir. Bunlar 6 Å büyüklüğündeki minor oluk ve 12 Å büyüklüğündeki major oluktur (Şekil 2.5.b).



Şekil 2.5. a. DNA'nın sarmal yapısı b. DNA sarmalında oluşan küçük ve büyük oluklar (İçsel, 2013)

DNA iki iplikten meydana gelmektedir. Bu ipliklerden birindeki bir baz, diğer iplikteki bir baz ile bağ kurmaktadır. Bu tamamlayıcı baz eşleşmesi olarak adlandırılmaktadır. Bu baz çiftleri arasında hidrojen bağları bulunur. A(adenin) ve T (timin) arasında iki hidrojen bağı oluşurken, C (sitozin) ve G (guanin) arasında üç hidrojen bağı oluşmaktadır (Şekil 2.5.a). Bu durum DNA'nın çift sarmalının kararlığını koruyan en önemli etkileşimlerdir. Bunların yanında hidrofobik etkileri ve pi istiflenmesi de vardır (Ponnuswamy ve Gromiha, 1994). Hidrojen bağları kovalent bağlardan zayıftır ve bu sebeple hidrojen bağları kopup tekrar oluşabilir, bundan dolayı DNA iki zinciri sıcaklık ve mekanik güç ile birbirinden ayrılabilir (Clausen-Schaumann ve ark., 2000).

2.3.1. DNA-İlaç Etkileşimleri

Günümüzde kullanılan ve araştırmaları yapılan pekçok ilacın farmakolojik olarak hedefi DNA'dır. DNA, tüm organizmaların ve bazı virüslerin genetik bilgisini taşıyan ve tüm hayati (beslenme, solunum, üreme vb.) fonksiyonlarını yöneten dev bir moleküldür.

DNA'nın hücrede ki en önemli iki fonksiyonu replikasyon ve transkripsiyondur. Replikasyon ve transkripsiyon; hücrelerin devamlılığının sağlanması için çok önemlidir. DNA, sadece belirli bir bölgesine özel bir düzenleyici proteininin bağlanması ile gerekli sinyali aldığında replikasyon ve transkripsiyon süreçlerine başlar. Bu nedenle düzenleyici bu proteinin gücünü ve spesifitesini taklit edebilen küçük bir molekülün bağlanmasıyla DNA fonksiyonları yapay olarak düzenlenebilir, inhibe edilebilir veya aktive edilebilir. Böylece bu küçük molekül, DNA fonksiyonlarının inhibisyonu veya aktivasyonu ile bir hastalığın tedavisi veya kontrolü için gerekli olduğunda bir ilaç olarak hareket edebilir. DNA aktivasyonu ile ilacın hedeflediği alana bağlı olarak, gerekli proteini daha fazla üretir veya DNA replikasyonuna neden olur. DNA inhibisyonuyla da, protein sentezini veya replikasyonu kısıtlar ve hücre ölümüne neden olabilir (Kostova, 2006).

DNA-ilaç etkileşimlerinin çalışılması, sadece mekanizmanın anlaşılması için gerekli değil aynı zamanda yeni ilaçların geliştirilebilmesi içinde oldukça önemlidir. Fakat bu etkileşimlere ait bilinenler halen oldukça sınırlıdır (Hajian ve ark., 2009).

2.4. DNA Kesme

DNA kesme, polimeraz enzimlerinin replikasyon sırasında DNA üzerine çentikler atarak replikasyonu başlatması, restriksiyon enzimlerinin belirli nükleotitleri tanıyarak her iki DNA zincirini kesmesi canlı hücrelerde meydana gelen temel bir olaydır (Klug ve ark., 2011).

Seçici olarak DNA kesen yapay nükleazların geliştirilmesi, kemoterapik ve antimikrobiyal ilaçların dizaynı için oldukça önemlidir (Addison ve ark., 1988). DNA kesme aktivitesi oksidatif veya hidrolitik olmak üzere iki yolla olabilir. Oksidatif kesme şeker veya nükleobazlarda meydana gelir. Buna karşılık hidrolitik kesme DNA'nın fosfodiester bağında meydana gelir. $[Fe(EDTA)]^{2-}$ veya $[Cu(Phen)CHL_2]$ gibi redoks aktif metal kompleksleri ile tekli veya çift sarmal oksidatif DNA kesmesi hidroksil radikali veya singlet oksijen türleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla başlar. Bu oluşum fenton tipi mekanizma ile yürür. Bu serbest radikallerin şeker hidrojenlerini ayırarak DNA kesmesini başlatır ve DNA kesme ürünleri oluşur. Gerçekte DNA şekerinden çıkarılan hidrojenin yeri kullanılan aktif metallonükleaza bağlıdır. Bu tip metallonükleazlar,

DNA'nın seçici olarak tanınması ve DNA parmak izi ajanları gibi uygulamalarda kullanılabilir (Maheswari ve ark., 2007).

DNA'nın omurgası biyolojik sistemlerde sık rastlanan bir kimyasal bağ olan fosfodiester zincirleriyle oluşmaktadır. Bu sebeple DNA'nın hidrolizi oldukça önemli bir enzimatik reaksiyondur. Fakat DNA'nın hidrolize olan olağanüstü kararlılığı sebebiyle bu reaksiyon oldukça güçtür. Fosfodiester bağlarını hidroliz eden enzimler çoğunlukla aktif bölgerinden katalitik metal iyonlarını içerirler. Bu sebeple metal kompleksleri fosfodiester bağının kesilmesi için uygun birer araçtır (Neves ve ark., 2001).

Çift sarmallı DNA'nın fosfodiester bağının hidrolizi ile yürüyen hidrolitik kesmesi, deoksiriboz şeker kısmından veya guanin bazından meydana gelen oksidatif DNA kesmesi ile karşılaştırıldığında hücre açısından çok daha fazla avantajlıdır. Oksidatif kesme sonucunda singlet oksijen ($^1O_2$), süperoksit (O_2^-) veya hidroksil radikali ($HO\cdot$) gibi aktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Oluşan bu oksijen türleri, şeker ve/veya baza zarar vererek parçalanmış türler oluşmasına neden olurlar. Buna karşılık başka maddeler ilave edilmediği zaman meydana gelen hidrolitik kesmenin bu tip olumsuz yan etkileri yoktur. Çünkü kesme ürünleri enzimatik süreç ile bertaraf edilebilir (Erer, 2015).

2.5. DNA Bağlanma

Temelde antikanser ilaçlar; transkripsiyon faktörlerinin ve polimerazların kontrolüyle, RNA üzerinden dolaylı olarak ya da küçük ligand moleküllerinin bağlanması şeklinde 3 farklı yol ile DNA etkileşmektedir. DNA'ya bağlanabilen küçük ligand moleküllerinin özelliklerini incelerken en önemli amaç DNA bağlanma modlarının belirlenmesidir (Suh ve Chaires, 1995). Bu moleküller DNA'ya kovalent ve nonkovalent olmak üzere iki şekilde bağlanabilirler.

2.5.1. Kovalent Bağlanma

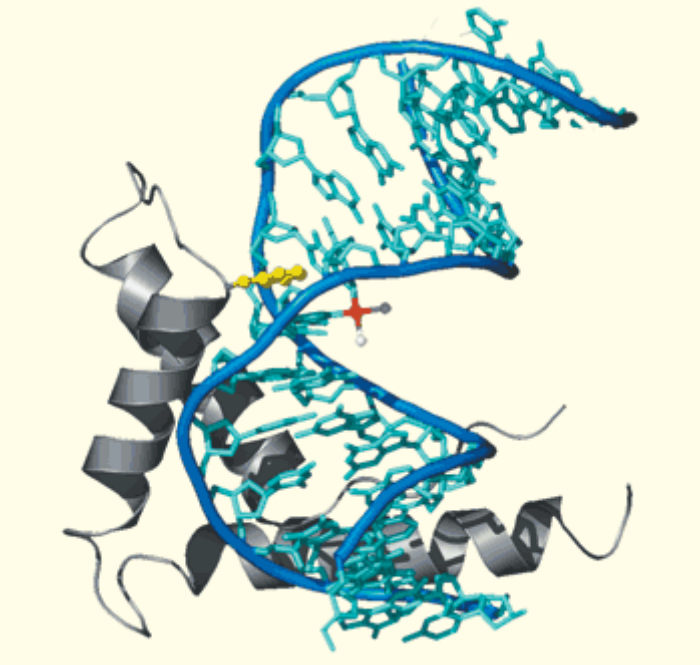
Alkilleyici etkiye sahip olan ilaçlar DNA'ya kovalent olarak bağlanırlar. Alkilleme veya sarmal içi/sarmallar arası çapraz bağlanma yoluyla oluşan bu etkileşim tersinmezdir. Yani DNA'daki proseslerin tamamen inhibe olmasına ve ardından hücre ölümüne neden olur. Kovalent bağlanma aktivitesi gösteren moleküllerin bağlanma kuvvetleri çok yüksektir. Bu yüksek bağlanma afinitesi sayesinde DNA'ya bağlanan molekül DNA omurgasında bozulmalara sebep olarak replikasyon ve transkripsiyon proseslerini etkiler (Şekil 2.6) (Erer, 2015).

DNA alkilleyici ajanlar üç mekanizma ile etkileşirler:

1. Alkilleyici ajan, DNA bazlarına alkil grupları bağlamaktadır. Bazlarda ki bu değişim, alkillenmiş bazların yenileriyle değiştirilmesi için tamir enzimlerinin DNA'yı parçalara ayırmasıyla sonuçlanmaktadır (Sirajuddin ve ark., 2013).

2. Alkilleyici ajanlar DNA'daki atomlar arasında normal ve çapraz bağlar oluşmasına neden olmaktadır. Bu mekanizmada DNA'nın iki bazı, alkilleyici ajan ile bağlanmaktadır. DNA çift sarmalda meydana gelen çapraz bağlanma, transkripsiyon ve replikasyon işlemlerini inhibe ederek apoptozise sebep olmaktadır (Sirajuddin ve ark., 2013).

3. Alkilleyici ajanlar, nükleotitlerde yanlış eşleşmelere ve buna bağlı olarak mutasyonlara sebep olmaktadır. Bu durum alkilleyici ajanın DNA ile kovalent bağ yapmasına dayanmaktadır. Kovalent bağlanma sonucu baz çiftleri arasında yanlış eşleşmeler, yer değiştirmeler veya kesip çıkarılma gibi çeşitli hatalara neden olmaktadır. Bu hatalar sonucu DNA replikasyonu ve traslasyonu engellenir veya apoptozis meydana gelmektedir (Erer, 2015).



Şekil 2.6. cis-platinin DNA'ya kovalent bağlanması sonucu DNA omurgasında meydana gelen hasar (https://pubs.acs.org/cen/coverstory/83/8325/8325cisplatin.html)

DNA'ya kovalent bağlanarak antikanser ilaç olarak kullanılan moleküller içerisinde en çok bilineni cis-platin (cis-diklorodiaminoplatin(II))'dir ve kanser tedavisindeki en başarılı ilaçtır (Pil ve Lippard, 1997).

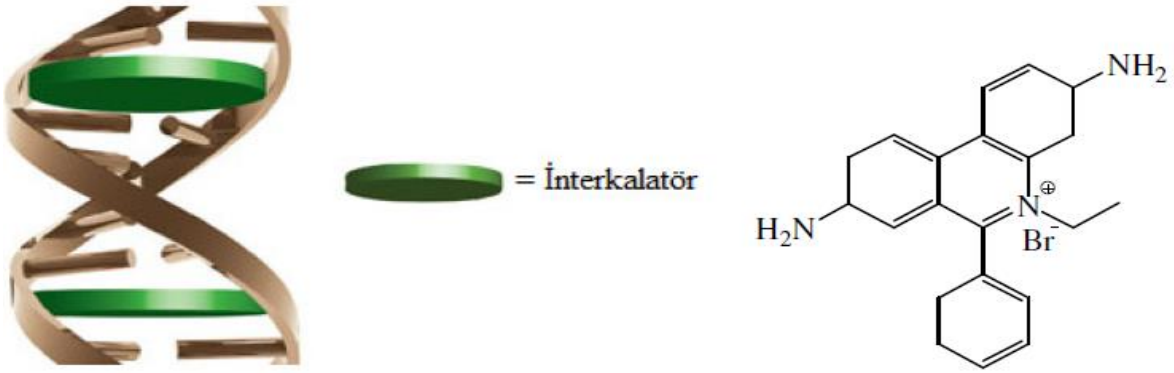
Ancak diğer tüm kemoterapik ilaçlar gibi yan etkilerinin fazla olması klinik uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu sebeple daha az yan etkiye sahip yeni moleküllerin sentezlenmesine yönelik çalışmalar günümüzde hız kazanmıştır.

2.5.2. Nonkovalent Bağlanma

Nonkovalent bağlanma; interkalasyon, elektrostatik etkileşimler ve oluğa bağlanma olmak üzere üçe ayrılmaktadır.

2.5.2.1. İnterkalasyon

İnterkalasyon ile bağlanan bileşikler, DNA'daki baz çiftleri arasına girerek bağlanır ve bu baz çiftleriyle kümelenirler (Şekil 2.7.a). İnterkalasyonda etkin olan kuvvetler yük transfer kuvvetleridir; ancak hidrojen bağları ve elektrostatik kuvvetler de kararlılıkta rol oynarlar (Neidle ve Abraham, 1984). İnterkalasyon ilk olarak Lerman (1961) tarafından, ilacın heliks eksenine hiçbir etkiye maruz kalmadan, dik olarak kovalent olmayan yolla bağlanması şeklinde açıklanmıştır. Bu da baz çiftlerinin düşey olarak ayrılmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla şeker fosfat omurgası bükülür ve heliksin yapısı bozulur. Bu durumdan interkalasyonun güçle ilgili olduğu sonucuna varılabilir (Krugh ve Reinhardt, 1975). İnterkalasyon, direkt olarak DNA'da hasar oluşturmaz ancak heliks yapıyı deforme eder.



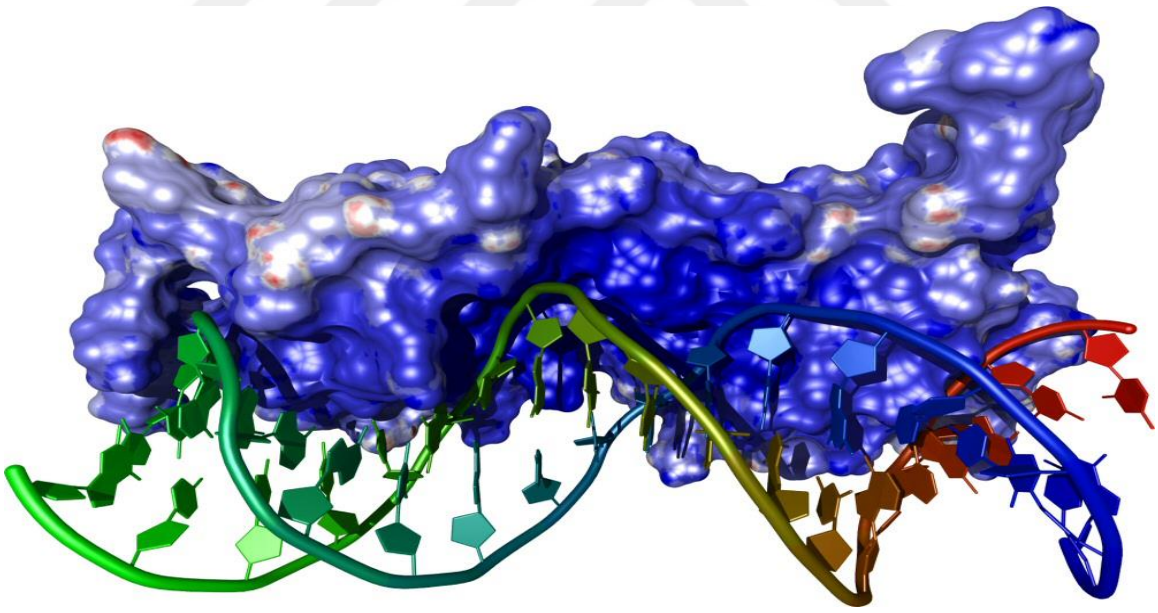
Şekil 2.7.a. DNA'ya interkalasyon seklinde bağlanma b. İnterkalatör özellik gösteren etidyum bromürün molekül yapısı (Göçmen, 2014)

İnterkalasyon yapabilen bileşiklere en bilinen örnek etidyum bromürdür (EB) (Waring, 1965). EB, çeşitli organizmalarda nükleik asit sentezini inhibe edecek biçimde DNA ile güçlü interkale olan aromatik düzlemsel bir moleküldür (Şekil 2.7.b) (Waring, 1965).

Etidyum bromür haricinde, DNA ile güçlü interkalasyon yapabilen Daunomycin ve Adriamycin gibi çeşitli kanserli hücrelere karşı etkili organik bileşikler de bulunmaktadır (Frederick ve ark., 1990). Fakat, bu bileşiklerin tedavi sırasında kardiyotoksisite gibi önemli yan etkilerinin bulunması ve bazı kanser hücrelerinin bu ilaçlara karşı zamanla direnç kazanmaları sebebi ile kullanımları sınırlanmaktadır (Göçmen, 2014).

2.5.2.2. Elektrostatik Etkileşimler

Elektrostatik etkileşimler dış bağlanma olarak adlandırılan DNA'nın dış yüzeyinde bulunan gruplarla yapılan etkileşimlerin neredeyse tamamını kapsamaktadır (Şekil 2.8) (Carrier ve ark., 1990). Diğer etkileşim türlerine göre daha zayıftır. Ancak ilaçların biyolojik aktifliklerinde önemli rol oynamaktadırlar (Anastassopoulou, 2003).



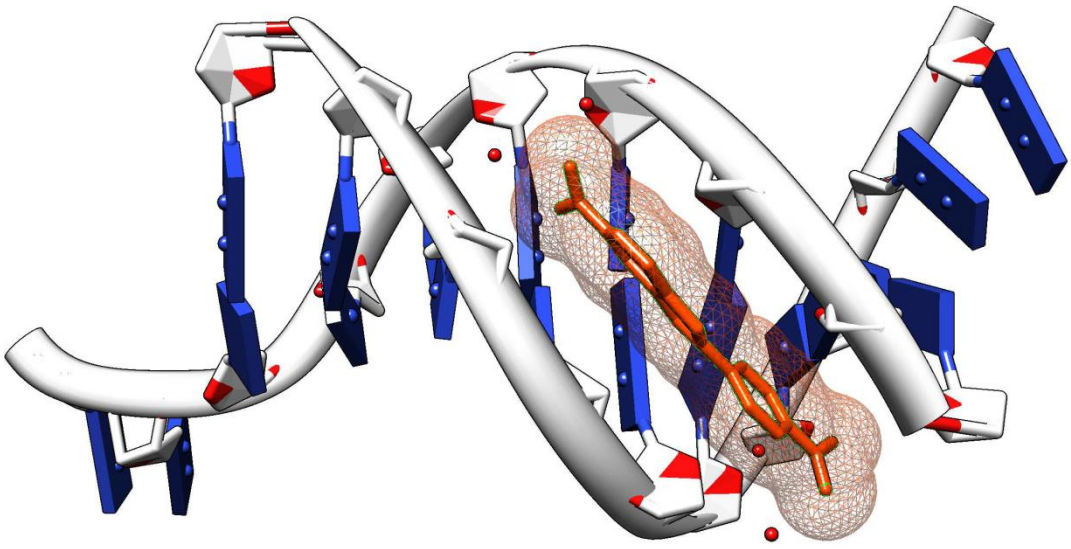
Şekil 2.8. DNA'ya elektrostatik olarak bağlanma
(httpwww.wikiwand.comdeTranskriptionsfaktor)

2.5.2.3. Oluğa Bağlanma

Oluğa bağlanan bileşikler genel olarak uzun ve hilal şeklinde ki yapılardır. Bu tür etkileşimlerde bağlanacak olan molekül, majör (büyük) ve minör (küçük) oluktan çıkıntı yapan bazların fonksiyonel grupları ile etkileşime girerek DNA'ya bağlanır. Bu etkileşimler hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleridir. İnterkalatörler kadar etkili olmasa da DNA konformasyonunu etkiler (Kumar ve ark., 2012).

Klinik açıdan potansiyeli olan bileşikler, genelde interkalatörler veya oluğa bağlanabilenlerdir (Erer, 2015). Küçük oluğa bağlandığı bilinen ilk ilaç netropsin antibiyotiğidir. Ancak netropsin dışında doğal distamisin A, sentetik diarylamidines (DAPI ve pentamidin) ve bis-benzimidazoller (Hoechst 33258) de oluk bağlayıcılar olarak bilinmektedir.

DAPI (4' 6-diamino-2-fenilindol) (Şekil 2.9) ve pentadimine, iki sertifikalı DNA oluk bağlayıcısıdır ve özellikle tripanozomlara karşı etkili antiparaziter aktiviteleri olduğu bilinmektedir (Dann ve ark., 1979;). DAPI, DNA ve RNA polimerazı inhibe ettiği gösterilmiş ve çift-sarmal DNA'nın AT açısından zengin bölgelere spesifik olarak bağlandığı bildirilmiştir (Baraldi ve ark., 2004).



Şekil 2.9. DNA'nın küçük oluğuna bağlanan DAPI (Larsen ve ark., 1989)

2.6. Schiff Bazlarının DNA Kesme ve DNA Bağlanma Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler

DNA-ilaç etkileşimlerinin incelenmesi için pekçok yöntem bulunmaktadır. Bunlardan yaygın olarak kullanılan başlıca yöntemler ise floresans spektroskopisi, UV-vis absorpsiyon titrasyonu, viskozite ölçümleri, linear ve dairesel dikroizm yöntemlerdir.

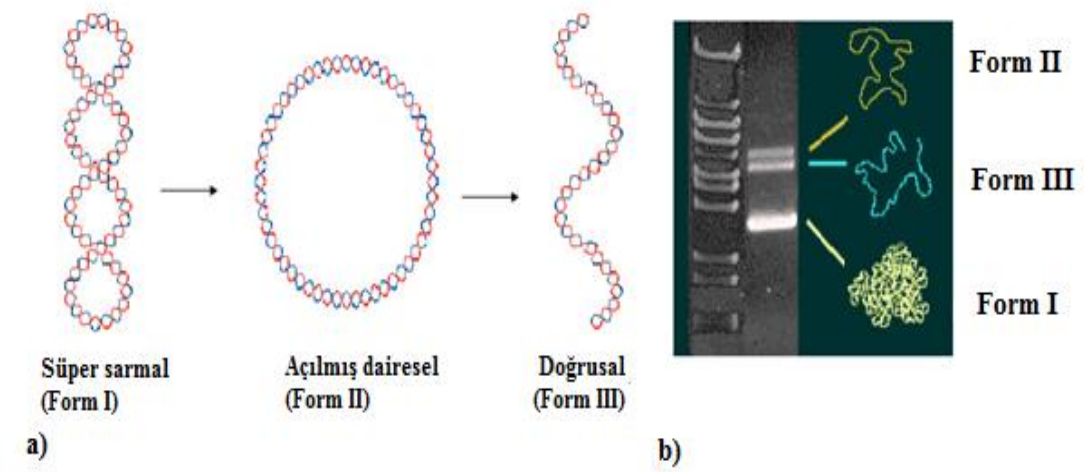
Bu tez kapsamında DNA kesme aktivitesinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi yöntemi, DNA bağlanma aktivitelerinin belirlenmesi için ise UV-Vis absorpsiyon titrasyonu yöntemi uygulanmıştır.

2.6.1. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

Moleküllerin varolan elektrik yükleri, moleküllerin elektriksel alan içindeki hareketini etkilemektedir. Agaroz jel elektroforez yöntemi bu prensibe dayanmaktadır. Nükleik asitlerin saflaştırılması, tanımlanması ve ayrılması için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Çeken, 2005).

Bu yöntem farklı amaçlar için elde edilmiş DNA'ların tanımlanabilmesi, hangi formda olduğunun saptanabilmesi, büyüklüğünün belirlenmesi ve DNA yapısında oluşan değişiklikler nedeniyle elde edilen yeni formların incelenmesinde kullanılmaktadır.

Agaroz jel elektroforez tekniği kullanılarak yapılan ilaç-DNA çalışmalarında genellikle kullanılan DNA türü plazmid DNA'dır. Plazmid DNA birden fazla konformasyonda olabileceğinden dolayı, bunlar elektroforezle farklı hızlarda ilerler. Plazmid DNA'nın orijinal süper sarmal formu olan Form I'de DNA çift sarmalının herhangi birinde bir kırık oluşmasıyla Form II oluşmakta, iki veya daha fazla kırık oluşmasıyla ise linear form olan Form III oluşmaktadır (Şekil 2.10.a). DNA, elektroforezde yürütüldüğünde Form I jelde diğerlerine göre daha hızlı ilerler. Bunun nedeni yük yoğunluğunun fazla, hacminin ise düşük olmasındandır. Form II daha yavaş ilerler. Bunun nedeni ise Form I ve Form III'e göre yoğunluğunun daha az olmasıdır. Form III ise Form II ve Form I ortasında bir hızda hareket eder (Şekil 2.10 b).



Şekil 2.10. a. Plazmid DNA'nın üç formu ve b. Jel elektroforezinde plazmid DNA'nın üç formunun görünümü (İçsel, 2013)

Bu tez kapsamında, bu yöntemde çoğunlukla kullanılan pBR322 plazmid DNA ile çalışılmıştır. Süper sarmal pBR322 plazmid DNA, çift zincirli halkasal formda olup 4361 bp uzunluğundadır. Moleküler ağırlığı ise $2{,}83 \times 10^6$ dalton'dur. Ayrıca ampisilin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı dirençli genler içermektedir (Balbás ve ark., 1986).

2.6.2. UV-Vis Absorpsiyon Yöntemi

DNA-ilaç etkileşimlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de UV-Vis absorpsiyondur. DNA'nın sahip olduğu π-elektron sistemleri ve ilacın sahip olduğu elektron sistemleri birbirlerini etkileyerek DNA'nın ve ilacın UV-Vis absorbansında değişikliklere neden olur. Bu yöntem, UV-Vis absorbansında ki bu değişikliklerin belirlenmesi esasına dayanır.

Deney, ilaç miktarının sabit tutularak üzerine düzenli miktarlarda DNA eklenerek gerçekleşmektedir. Her bir DNA eklemeden sonra ölçüm yapılır. İlaca ait spektrumda absorbanstaki ve dalga boyundaki değişimler kaydedilir. Bu veriler bize DNA ilaç etkileşim türü hakkında bilgi verir. DNA-ilaç etkileşiminde absorbsiyonda artma gözlemleniyorsa hiperkromik etki veya absorbsiyonda azalma gözlemleniyorsa hipokromik etki olarak adlandırılır. DNA-ilaç etkileşiminde düşük dalga boyuna kayma hipsokromik kayma (maviye kayma) veya daha yüksek dalga boyuna kayma batokromik kayma (kırmızıya kayma) olarak adlandırılır.

İlaç DNA'ya kısmi interkalasyon ya da elektrostatik biçiminde etkileşirse, hiperkromik etki, interkalasyon biçiminde etkileşirse de hipokromik etki oluşur. Ayrıca

maksimum absorbsiyonların kırmızıya kayması (batokromik kayma) durumu, LUMO ve HOMO arasındaki enerji farkının azaldığı ve ilacın da DNA' ya bağlandığını gösterir.

2.7. Mutajenite

İnsanlar günlük yaşamlarında pek çok kimyasal mutajen ve karsinojenlere maruz kalabilmektedir. Bunlar arasında anneoplastik ilaçlar, polisiklikaromatik hidrokarbonlar (PAH), nitrozaminler, metaller ve radyasyon bulunmaktadır. Bağışıklık sistemi bu tür kimyasal maddelere karşı çok çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmesine karşın bu tür kimyasallara maruziyetin arttması durumunda mutajenik ve karsinojenik sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Gürbüz, 2006).

Mutajenite, genlerin nükleotid dizisinde herhangi bir sebeple oluşan ve kalıtsal olan değişikler (mutasyon) olarak tanımlanmaktadır. Mutasyon yapan etkenler mutajen olarak adlandırılmakta ve mutajenik etki genotoksik etki olarak da ifade edilmektedir (Pierce, 2003).

2.7.1. Mutasyonlar

Mutasyon terimi ilk defa Hugo de Vries tarafından 1901 yılında akşamsefası bitkisinde yaptığı çaprazlamalarda gözlemlediği varyasyonu tanımlamak için kullanılmıştır. Varyasyonların çoğunun translokasyonlar nedeniyle oluştuğunu, daha sonra ki iki vakanın ise DNA'nın kimyasal kompozisyonunda gen mutasyonları sonucunda oluştuğunu bildirilmiştir (https://tr.wikipedia.org/wiki/Mutasyon).

Mutasyonlar somatik hücrelerde ya da germ hücrelerinde olabilir, fakat her mutasyon kansere çevrilmemektedir. Birçok mutajen maddenin kansere neden olabileceği yapılan çalışmalarla saptansa da her karsinojen mutajen özelliktedir, ancak her mutajen karsinojen özellikte olmayabilir. Karsinojen maddeler genellikle DNA'nın elektronca zengin gruplara saldırabilen elektrofillik yapılıdır.

Karsinojenite ve mutajenite arasındaki ilişkinin fazla olması sebebiyle karsinojen maddelerin saptanmasında mutajenite temel alınmaktadır (Temizkan, 1996). Mutasyonlar "gen mutasyonları" ve "kromozom mutasyonları" olarak iki ana gruba ayrılmaktadır.

2.7.1.1. Gen Mutasyonları

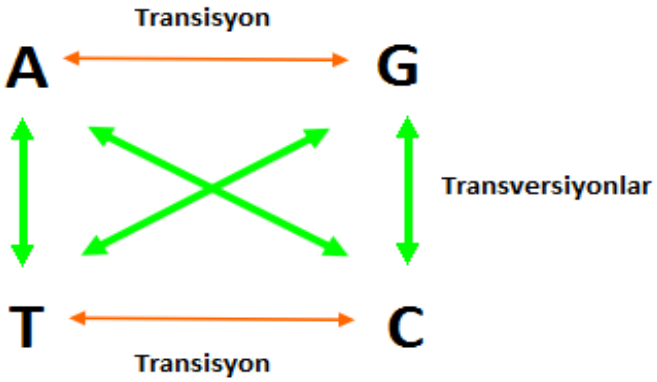
Gen mutasyonları, gen içinde herhangi bir bölgeye bir ya da daha fazla nükleotidin girmesi, kaybedilmesi ya da bir nükleotidin diğeri ile yer değiştirmesi ile sonuçlanan mutasyonlardır (Kimko ve ark., 1999). Gen mutasyonları, baz değişimi ve çerçeve kayması olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.7.1.1.1. Baz Değişimi Mutasyonu

DNA'da herhangi bir bazın başka bir baz ile yer değiştirmesi sonucu oluşan mutasyon tipidir (Levin ve Ames, 1986). Baz değişim mutasyonları transisyon ve transversiyon olarak iki gruba ayrılır (Şekil 2.11).

Transisyon: Pürin-pürin veya pirimidin-pirimidin arasındaki yer değişikliği ile meydana gelen baz değişim mutasyonuna denir.

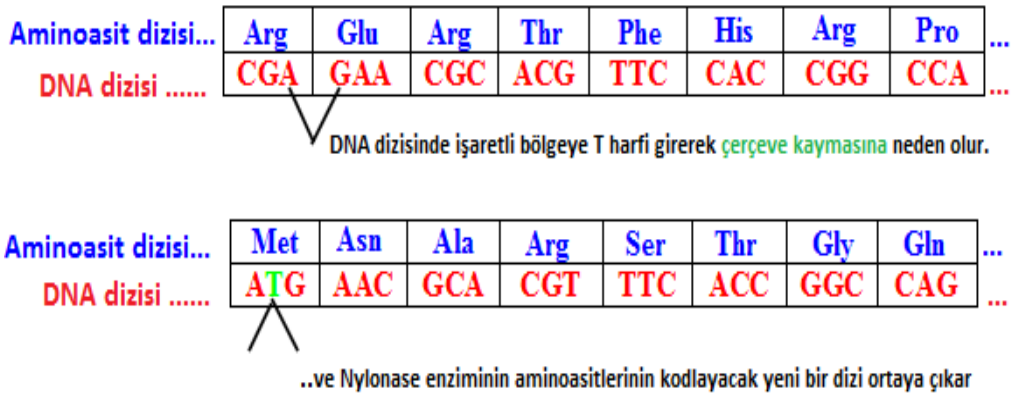
Transversiyon: Pirimidin-pürin arasındaki yer değişikliği ile meydana gelen baz değişim mutasyonuna denir.



Şekil 2.11. Baz değişimi mutasyonları (Hardison, 2005)

2.7.1.1.2. Çerçeve Kayması Mutasyonu

DNA dizisinde ki bir nükleotidin eklenmesi ya da eksilmesi, DNA' da ki üçlü kodun değişimine neden olmaktadır. Bu değişim çerçeve kayması mutasyonu olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.12). DNA dizisine bir ya da daha fazla nükleotidin eklenmesi insersiyon olarak adlandırılırken, DNA dizisinde bir ya da daha fazla nükleotidin eksilmesi delesyon olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2.12. Çerçeve kayması mutasyonu

2.7.2. Kromozom Mutasyonları

Kromozom mutasyonları iki gruba ayrılır.

2.7.2.1. Kromozomlarda Sayı Değişimleri

Kromozomlar mayoz ve mitoz bölünme sırasında bazen ayrılmazlar, bunun sonucu olarak bir ya da daha fazla haploid yada daha fazla haploid kromozom takımının ilavesi ya da kaybı kromozom sayısı bakımından bir takım farklılıklar meydana gelir. Bu mutasyon türü iki gruba ayrılır.

a. Anöploidi (Aneuploidi)

Diploid bir organizmadaki bir çift kromozomlardan birinin veya daha fazlasının sayısının değişmesi sonucu oluşan mutasyon tipidir. Bu tip mutasyonlar; Monosomi, trizomi, tetrasomi ve nullisomi olarak üç gruba ayrılır:

1. Monosomi: Organizmanın normal diploit takımından bir kromozomun eksikliği sonucunda meydana gelen duruma denir. Monosomi 2n-1 şeklinde ifade edilir ve Turner sendromu örnek verilebilir.

2. Trizomi: Kromozomlardan birinin iki kopya yerine üç kopya olarak bulunması sonucu oluşan anöploide denir. 2n+1 şeklinde ifade edilebilir. Pateu sendromu, Edwards sendromu ve Down sendromu örnek verilebilir.

3. Tetrasomi: Organizmanın diploit takımının dışında ekstra bir kromozomun homoloğu ile birlikte bulunması durumuna denir ve 2n+2 ile gösterilir.

4. Nullisomi: Bir takımda bir kromozomun homoloğu ile birlikte eksik olması sonucu oluşan anöploidiye denir. Bu tip diploid bireyler 2n-2 formülü ile gösterilirler (Sumner, 2003). Nullisomiye Klinifelter sendromu ve XYY sendromları örnek verilebilir.

b. Öploidi (Euploidi)

Bir canlıda ki kromozom sayısının takımlar halinde değişimleri ile meydana gelir ve monoploidi ve poliploidi olmak üzere ikiye ayrılır.

1. Monoploidi: Tek bir kromozom setinin var olması durumudur (n).

2. Poliploidi: İkiden fazla kromozom setinin (3n, 4n, 5n, 6n gibi) var olması durumudur.

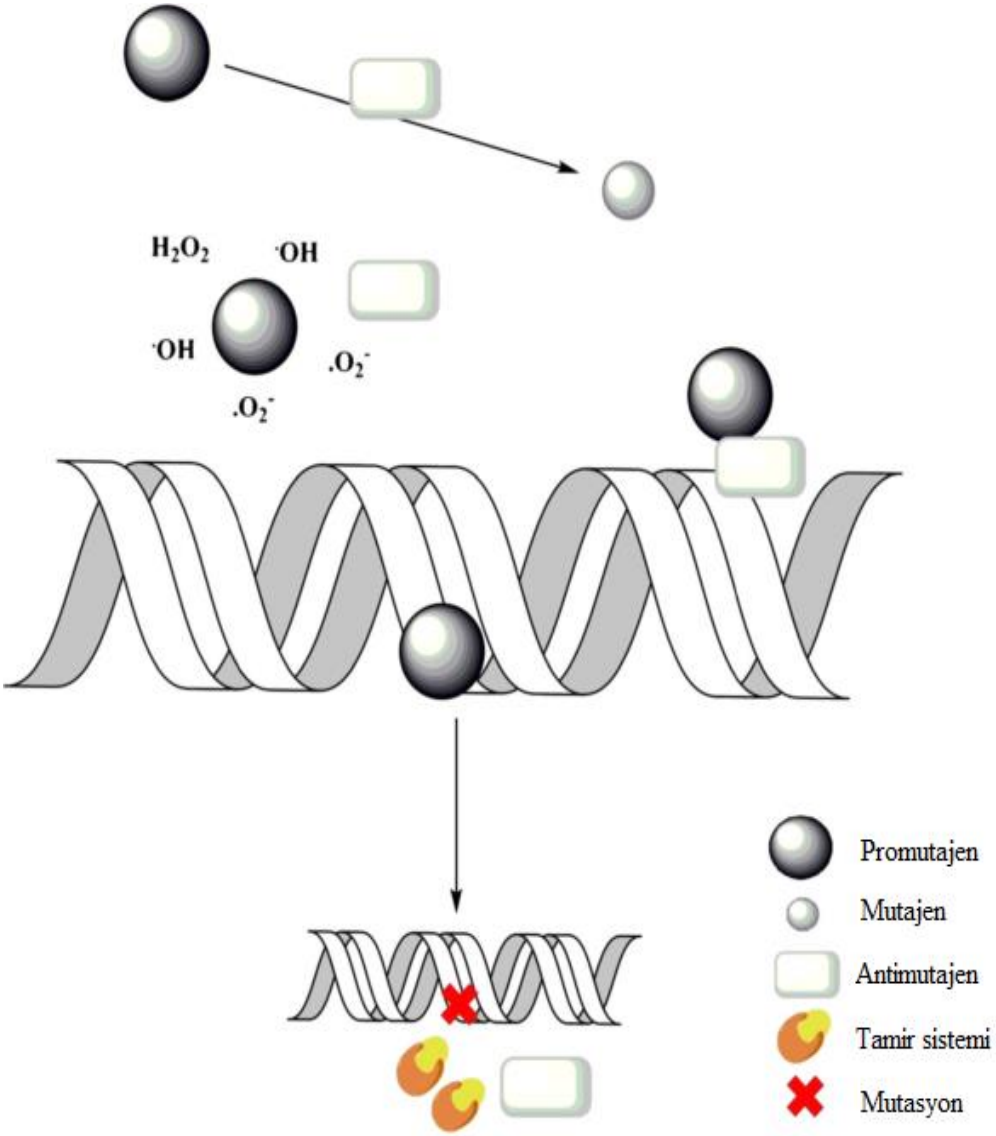
2.7.2.2. Kromozomlarda Yapı Değişimleri

Genetik materyalin yer değiştirmesi ya da kaybı sonucu ortaya çıkan bir ya da daha fazla kromozom kırıklarından oluşan mutasyondur. Kromozom yapısında meydana gelen değişiklikler ise kromozomun bir parçasının kopup kaybolması (delesyon), kopan parçanın 180º dönüp aynı kromozoma tekrar yapışması (inversiyon), kromozomdaki bir segmentin tekrarlanması (duplikasyon) ve homolog olmayan iki kromozom arasında segmentlerin yer değiştirmesi (translokasyon) şeklinde gerçekleşmektedir (Akı, 2007).

2.8. Antimutajenite

Mutajenik maddelerin kanserojenik ya da mutajenik etkilerinin ya da bunların DNA ile olan etkileşimlerinin engellenmesi "antimutajenite" olarak tanımlanmaktadır (Samejima ve ark., 1995). Mutajenik maddelerin etkilerini engelleyen maddeler ise antimutajen olarak adlandırılır. Biyoantimutajenler ve desmutajenler olarak da iki sınıfa ayrılır (Şekil 2.13).

Bir antimutajen, promutajenik bir bileşenin mutajene dönüşümünü önleyebilir, mutajeni inaktive edebilir veya mutajen ve DNA arasındaki etkileşimi engelleyebilir. Bu maddeler desmutajenler olarak adlandırılır. Antimutajenlerin bir diğeri ise biyo-antimutajenlerdir. Bu antimutajenler; DNA rekombinasyonu, replikasyonu ve tamirinde görev alan enzimleri doğrudan veya dolaylı olarak uyarabilir ve inaktive edebilir. Mutajenler, DNA ile etkileşime geçmeden önce enzimatik ya da kimyasal yolla desmutajenler tarafından tamamen veya kısmen inaktif hale getirilir. Biyo-antimutajenler ise, mutajenin genetik materyal ile reaksiyona girmesinden sonra hasar görmüş DNA'nın tamir ve replikasyon mekanizmaları üzerinde rol oynayarak etkili olmaktadırlar (Bhattacharya, 2011).



Şekil. 2.13. Antimutajen etki mekanizmaları (Słoczyńska ve ark., 2014)

Mutajenik ve kanserojenik etkenler, insanoğlunun yaşadığı ortamda varlığını sürdürmekte ve bu etkenlerin tamamının ortadan kaldırılması da maalesef mümkün olmamaktadır (De Flora ve Ramel, 1988). Mutasyonların birikimi, yaşlanma gibi çeşitli dejeneratif olguların ve çoğu kanserin gelişimi ile de yakından ilişkilidir (Migliore ve Coppede, 2002). Bu nedenle antimujenik ajanların sentezlenmesine ve tanımlanmasına yönelik çalışmalar önem arz etmektedir.

2.9. Schiff Bazlarının Mutajenik ve Antimutajenik Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler

Çeşitli maddelerin potansiyel mutajenik/antimutajenik etkilerinin deney hayvanları kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalarla test edilmesi daha mantıklıdır. Fakat bu tür testlerin sonuçlanması, hem çok uzun süre gerektirmekte hem de maliyetli olmaktadır (Paolini ve Forti, 1997). Bundan dolayı, mutajenite/antimutajenite test sistemlerinden bakterilerin kullanıldığı kısa süreli testler daha çok tercih edilmektedir. Bakterilerin üreme ortamlarında hızlı üremeleri, sonucun kısa sürede alınması, kolay uygulanabilir ve ucuz olması gibi avantajları sayesinde bakteriyel test sistemleri mutajenite/antimutajenite çalışmalarında daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Josephy ve ark., 1997; Lelie ve ark., 1997). Bakteriyel test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılan testler Ames ve WP2 testleridir.

Çalışmada ilaç hammaddesi olmak üzere sentezlenen Schiff bazlarının mutajenik ve antimutajenik özelliklerini belirlemek için Ames testi uygulanmıştır.

2.9.1. Ames Testi

Ames testi, ilaç hammaddesi olmak üzere sentezlenen test maddelerinin karsinojenik-mutajenik, toksik etkilerini araştırmak için bakteriyel mutasyon testleri arasında özellikleri en iyi aydınlatılan, karakterize edilen, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı sebebiyle araştırıcılar tarafından en çok kabul gören ve günümüzde de yaygın olarak kullanılan bir testtir (Ames ve ark., 1973).

Bu test, deney hayvanlarında ve insanlarda tümör gelişiminde, somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde oluşan mutasyonların ve ayrıca kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyerek karsinojenik ve mutajenik etkilerini ortadan kaldıran antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tespitinde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ames testi, Bruce Ames ve arkadaşları tarafından 1975 yılında geliştirilmiştir. Bu testte, *Salmonella typhimurium*'un LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla oluşturulan oksotrofik mutantlar kullanılmaktadır. Histidin operonunda yer alan çeşitli genlerde farklı tipte mutasyonlara sahiptirler. Dolayısıyla, çoğalmaları için gerekli histidin aminoasidini sentezleme yeteneğini kaybetmiş olan bu oksotrofların, ortamda histidin olmadığı sürece gelişip koloni oluşturmaları imkansızdır. Bu testin esası; oksotrof (his- = histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş) *Salmonella* suşlarının kimyasal bir ajanla muamele edildikten sonra, ikinci mutasyon sonucu prototrof (his+ = yabani tip) haline dönmesi esasına dayanır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Bu test sistemi ile çeşitli kimyasal maddelerin mutajenitesinin ve antimutajenitesinin belirlenebilmesi için *Salmonella typhimurium'*un birçok suşu kullanılmaktadır. En çok kullanılan test suşları TA100, TA98, TA97, TA102, TA1535, TA 1537 ve TA1538'dir. (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. *S. typhimurium'*un LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla oluşturulan mutant suşlar ve genetik özellikleri

Suşlar	**Histidin Mutasyonu**	**LPS**	**Onarım**	**R Faktör**	**Bileşik Sınıfları**
TA98	*hisD 3052*	*rfa*	*ΔuvrB*	pKM101	Çerçeve kayması
TA100	*hisG 46*	*Rfa*	*ΔuvrB*	pKM101	Baz çifti değişimi
TA1538	*hisD 3052*	*Rfa*	*ΔuvrB*	Plazmid yok	Çerçeve kayması
TA1535	*hisG 46*	*Rfa*	*ΔuvrB*	Plazmid yok	Baz çifti değişimi
TA1537	*hisC 3076*	*Rfa*	*ΔuvrB*	Plazmid yok	Çerçeve kayması
TA102	*hisG4 28 pAQ1_his*	*Rfa*	*ΔuvrB*	Plazmid yok	Oksidanlar, X-Işınları, U.V., Mitomisin C, Bleomisin ve Kinonlar
TA97	*hisD 6610*	*Rfa*	*ΔuvrB*	pKM101	Çerçeve Kayması

Ancak bilinen bakteriyel mutajenlerin büyük bir kısmını belirlemede çok hassas oldukları için TA98 ve TA100 suşları genel bir kabul görmüştür (Gatehouse ve ark., 1990).

Salmonella typhimurium TA98 mutant suşu: Bu suşta var olan *HisD3052* mutasyonu, *HisD* geninde meydana gelen bir mutasyondur. Bu gen histidin sentezinde işlevi olan histidinol dehidrojenaz enzimini kodlayan gendir. Bu mutasyon türü çerçeve kayması olup gendeki tek bir nükleotidin eksikliği sonucu ortaya çıkmıştır. Çerçeve kayması mutasyonu *HisD* geni içerisinde 8 defa tekrar etmiş olan G-C dizisine yakın bir bazın delesyonu ile oluşmaktadır. Ayrıca TA1538 mutant suşlarda da bu mutasyon vardır.

Salmonella typhimurium TA100 mutant suşu: Bu suşta var olan *HisG46* mutasyonu ise, *HisG* geninde meydana gelen bir mutasyondur. Bu gen histidin sentezinde kullanılan ilk enzimi kodlamaktadır. *HisG* geninde lösin amino asidinin kodonu -GAG- baz çifti değişimi sonucu olarak prolin amino asidi kodonu olan -GGG- ye dönüşmektedir. Bu mutasyon TA100 mutant suşunda baz çifti değişimlerine neden olan mutajenik kimyasallar tarafından geri dönüştürülebilmektedir. Ayrıca bu mutasyon tipi TA1535 mutant suşlarında da bulunmaktadır.

Rfa mutasyonu: *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasının yapımından sorumlu olan genlerde oluşan mutasyondur. Bu mutasyon ile normalde hücre içine giremeyen büyük moleküller hücre içine girebilmektedir.

UvrB mutasyonu: Bu mutasyon *uvrB* genindeki delesyon sonucunda meydana gelmektedir. *UvrB* geni, DNA tamir mekanizmasında kesip çıkarma görevini yapan enzimi kodlamaktadır. *UvrB* mutasyonu *Salmonella typhimurium*'un TA102 mutant suşu dışında tüm suşlarda bulunmaktadır. Bu mutasyon, pekçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına sebep olmaktadır. Ayrıca *UvrB* genindeki delesyon nedeni ile *bio* genleri de çıkarıldığından bu suşların üreyebilmeleri için biyotin aminoasidine ihtiyaç duyulmaktadır.

pKM101 plazmid: Bu plazmid suşların daha duyarlı/hassas olmasından sorumlu hata oranı yüksek tamir sistemi ile ilgili gen ürünlerini ve ampisilin direnç genini taşımaktadır.

pKM101 plazmidine taşımayan suşlar zayıf mutajenik etki gösterirken pKM101 plazmidi taşıyan yeni suşlar oldukça etkili sonuçlar göstermişlerdir (Durusoy ve Kambur, 2003).

2.10. Schiff Bazlarının Biyolojik Aktiviteleri ve Antimutajenite Özellikleri

Schiff bazlarının biyolojik ve farmasötik aktiviteleri nedeniyle oldukça ilgi gören ve günümüze kadar üzerinde binlerce çalışması olan bileşiklerdir. Bu çalışmada Schiff bazlarının antimikrobiyal aktiviteleri, DNA ile olan etkileşimleri, mutajenite ve antimutajenite özellikleri belirlendiğinden dolayı bu konularla ilgili çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Blanco Jerez ve ark. (2016), (E)-4-((4-nitrobenziliden)amino)fenolenol (ENBA) ve Sn (IV) kompleksli (Sn-ENBA) Schiff bazını sentezlemiş ve in vitro sitotoksik etkilerini test etmek için insan lenfoblastik lösemi MOLT-4 hücrelerinde kullanılmıştır. Bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) suşu kullanılarak minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), deneyi ile test edilmiştir pozitif kontrol olarak ampisilin kullanılmıştır. Sonuç olarak, ENBA ve kompleks Sn-EnBA'nın sitotoksik olduğunu kompleks Sn-ENBA'nın ENBA'ya göre daha sitotoksik olduğunu göstermişlerdir. Antibakteriyal aktivite ise ENBA ve Sn-ENBA sırasıyla 0.35 ppm ve 0.46 ppm olup, pozitif kontrolle (0.25ppm) karşılaştırıldığında bileşiklerin antibakteriyal potansiyeli açısından umut verici olduğunu bildirmişlerdir.

Vafazadeh ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı çalışmada, üç dişli Schiff bazı bakır (II) komplekslerinin (1-2) DNA bağlanma aktiviteleri CT-DNA ile UV-görünür alan absorbsiyon spektroskopisi yöntemi kullanarak, DNA kırma aktivitelerini ise pBR322 plazmid DNA ile agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Sonuç olarak absorpsiyon spektrumlarında 2'nin CT-DNA ile etkileşiminin güçlü olduğu, 1 ve 2' nin DNA kırma aktivitelerinin ise ana bileşikten daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Gök ve ark. (2016), 3-Aminopridin türevinin biyolojik aktiviteleri ve DNA ile olan etkileşiminin araştırdığı çalışmada biyolojik aktiviteleri olarak antimutajenite (Ames/*Salmonella* testi) özelliği ve antimikrobiyal aktivitesi (MİK) belirlenirken DNA ile etkileşimlerinde ise UV-Vis absorbsiyon spektroskopisi yöntemi ile DNA'ya bağlanma özelliği ve agaroz jel elektroforezi yöntemi ile DNA kesme aktivitesi belirlenmiştir. Sonuç olarak bileşiğin güçlü antimutajenik özellikte olduğu ve *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aerouginosa* bakterileri ile *Candida tropicalis* ve *Candida albicans* mayalarına karşı değişen oranlarda (128-32 μg/mL) etkili olduğunu bildirmişlerdir. DNA etkileşim sonuçlarında ise ligandın CT-DNA'ya hem elektrostatik hem de interkalatif olarak bağlandığı ancak DNA kesme aktivitesinin olmadığı saptanmıştır.

Haribabu ve arkadaşları 2015 yılında, oksim içerikli Schiff bazının dinükleer Cu(II) kompleksinin DNA bağlanma özelliğini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda kompleksin DNA'ya elektrosatik olarak bağlandığını göstermişlerdir.

Geren' in (2015) yaptığı çalışmada, 2-hidroksi imin bileşiği (Schiff bazı) ve metal komplekslerinin antimutajenik özellikleri Ames/*Salmonella* testi ile araştırılmıştır. *S. typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılan çalışmada Schiff bazı ligandları ve komplekslerinin antimutajenik aktiviteleri S9 varlığında (mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon) ve S9 yokluğunda (mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon yok) test edilmiştir. Schiff bazı ve komplekslerinin güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda Schiff bazı ligandlarının ve komplekslerinin antimikrobiyal aktiviteleri, *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aerouginosa* bakterileri ile *Candida tropicalis* ve *Candida albicans* mayalarına karşı mikrodilüsyon metodu ile çalışılmış ve bu çalışma sonucunda bileşiklerin mayalara karşı daha aktif olduğu tespit edilmiştir.

Yıldız ve ark. (2015a), Schiff bazı ligandının DNA ile etkileşimine UV-Vis metoduyla bakmışlardır. Çalışma sonucunda ligandın CT-DNA'yla hem interkalatif hem de elektrostatik olarak etkileştiğini saptamışlardır.

El-Sayed ve ark. (2013), imidazol[1,2-a]pridin bileşiklerinin (I-VIII) antimutajenik aktivitelerini Ames/Mikrozom testi ile araştırmışlardır. Bileşiklerin antimutajenik aktiviteleri için mutajen olarak sodyum azid ve benzopiren kullanılmıştır. Sonuç olarak, terminal imidazopyridin ve I, II, III ve V bileşikleri mutajenik etki gösterirken merkez imidazopyridin grubu VII ve VIII bileşikleri mutajenik etki göstermemişlerdir. Ayrıca IV, VII ve VIII bileşikleri S9 varlığında benzopirene ve sodyum azid karşı güçlü antimutajenik etki gösterirken, VII bileşiğin ise diğer bileşiklere göre en etkili antimutajen olarak etki gösterdiği bildirilmiştir.

Ozurkcan ve ark. (2013), β-aminoketon türevlerinin mutajenik ve antimutajenik özelliklerini *Escherichia coli* WP2 ve Ames/*Salmonella* testleri ile araştırmışlardır. Araştırma sonucunda türevlerin belli dozlarının (üç farklı doz dışında) antimutajenik özelliğe sahip olduğu ve hiçbir türevin mutajenik özellik göstermediği tespit edilmiştir.

Koçer 2012 yılında, *U. longissima* liken türünden izole edilen usnik asitten Schiff bazları türevleri (L1-L3) ve bunların metal kompleksleri ilk kez sentezlemiştir. Sentezlenen ligand ve metal komplekslerin üç farklı bakteri suşunda (*Escherichia coli* WP2 *uvrA* ve *Salmonella typhimurium* TA1537, TA1535) tüm maddelerin antimutajenik

özellik gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak Schiff bazı ligandlarının ve metal komplekslerinin değişik oranlarda, önemli antimutajenik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Genelde tüm ligandların Mn ve Co komplekslerinin güçlü antimutajenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Antimutajenite özellikleri dışında ligandların ve metal komplekslerin *Saccharomyces cerevisiae* WET 136, *Candida albicans* Klinik izolat, *Bacillus brevis* FMC3, *Enreobacter aerogenes* ATCC 27859, *Micrococcus* 28 *luteus* LA2971, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Pseudomonas aeroginosa* 9027, *Staphylococcus aureus* 6538, *Eschericha coli* ATCC25922, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 patojenlerine karşı disk difüzyon yöntemi ile test edilmiş ve test sonucunda maddelerin farklı (11-32 mm) inhibisyon zonu sergilediği buna bağlı olarak da değişen oranda antimikrobiyal özellikleri olduğunu belirlemiştir. Çalışma sonucunda ligandlar ve kompleksler birbirleriyle karşılaştırıldığında ise komplekslerin ligandlara göre hem antimutajenite aktivitesi hem de antimikrobiyal özelliklerinin daha fazla olduğu saptanmıştır.

Shahabadi ve ark. (2011), yeni Pt (II) kompleksi olan, [Pt (DIP)(LL)]$(NO_3)_2$ (DIP 4,7-difenil-1,10-fenantrolin ve LL alifatik dinitrojen olan Ligand, N,N-dimetil-trimetilendiamin), sentezlenmiş ve farklı fizikokimyasal yöntemler kullanılarak karakterize etmişlerdir. Bu kompleksin DNA ile etkileşimini, dana timus DNA (CT-DNA) 'sı kullanarak absorpsiyon, emisyon dairesel dikroizm (CD) ve viskozite ölçümleri ile DNA kırma aktivitesini ise agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak araştırmışlardır. Sonuç olarak, kompleksin CT-DNA' ya bağlanması interkalasyon modunda olduğu saptanmıştır. Kompleks ve CT-DNA arasındaki reaksiyonunda van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları ana güçler olduğunu ve kompleksin süper kıvrımlı pUC19 DNA'yı kırdığı saptanmıştır.

Abu-Youssef ve ark. (2010), [Ag(2-amino-3-metilpiridin)$_2$]NO_3 ve [Ag(piridin-2-karboksaldoksim)NO_3] kompleksleri sentezlenmiş ve bu komplekslerin çesitli bakteri ve mantarlar üzerinde antimikrobiyal etkisinin olup olmadığını MİK yöntemi ile belirlemişlerdir. Sonuç olarak, seçilen bakteri ve mantarların birçoğu üzerinde sentezlenen kompleksler, $AgNO_3$ ve bazı antibiyotiklere kıyasla daha etkili antibakteriyal ve antifungal özellige sahiptir. *M. luteus* Gram(+) bakteriye karşı [Ag(2-amino 3-metilpiridin)$_2$]NO3 ve [Ag(piridin-2-karboksaldoksim)NO_3] komplekslerinin MİK degerleri sırası ile 4 ve 2 µg/mL olarak bulunmuştur. Komplekslerin gentamisin (16 µg/mL), siprofloksazin (24 µg/mL) gibi bilinen antibiyotiklerden ve $AgNO_3$ (12 µg/mL)'den daha aktif oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, *Candida albicans* mantar türüne karşı $AgNO_3$ (48 µg/mL)'ün komplekslere (8-4 µg/mL) göre daha yüksek MİK değerine sahip olduğu bildirilmiştir.

Bal'ın 2010'da yaptığı çalışmada, yeni bir azo Schiff bazı olan MB ligandı ile ve 2-[(*E*)-{[4- (benziloksi) fenil], olarak adlandırılan çift dişli yeni Schiff bazı ve bu bazın metal tuzları ile kompleksleri sentezlemiş ve mutajenik etkilerini Ames/Mikrozom testi ile araştırmıştır. *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA100 ve TA98 mutant suşları kullanıldığı çalışmada mutajenik aktiviteleri S9 varlığında ve S9 yokluğunda test edilmiştir. Bu çalışma sonucunda MB ligandı ve bu ligandan sentezlenen komplekslerin genotoksite değerleri kontrol edilmiş ve $[Co(MB)_2].10H_2O$ kompleksi haricinde diğer tüm ligand ve kompleksleri S9 varlığında ve S9'suz ortamlarda TA98 suşu için mutajenik aktivite gösterdiği, TA100 suşu için ise yalnızca $[Co(MB)_2].10H_2O$ kompleksinin mutajenik bir aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Kasabe ve arkadaşları 2010'da, 4-kloro-(3-substitutedfenilimino)metil-[2*H*]-kromen-2-on (3a-i) Schiff bazlarının antibakteriyal aktivitelerini mikrodilüsyon metodu (200-50 µg/mL), antifungal aktivitelerini ise disk difüzyon yöntemi (200-50 µg/mL) ile çalışmışlardır. Antimikrobiyal aktiviteleri için *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli*, antifungal aktiviteleri için ise *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* türleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, sentezlenen 9 bileşiğin de orta dereceli antimikrobiyal aktiviteleri olduğu belirlenmiştir.

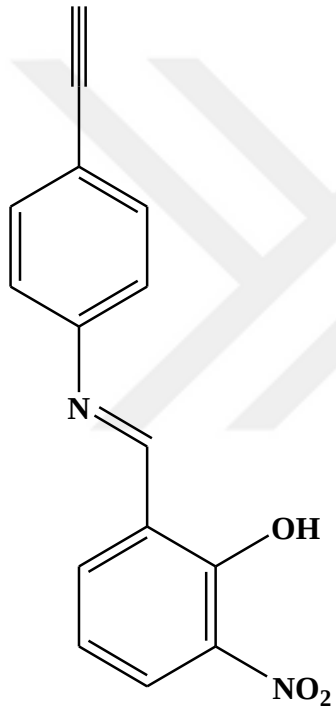
Shahabadive ark. (2010), suda çözünebilir bir Schiff bazı olan kobalt (II) kompleksinin ve SF (SF N,NO-bis{5-[(trifenil fosfonyumklorür)-metil] salisiliden}-o-fenilendiamin)'nin bağlanma interaksiyonunu calf tymus DNA (CT-DNA) ile araştırmışlardır. Bağlama sabiti Kb 5 10^4 M^{-1} ile tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında sonuçlar SF'nin bağlanma afinitesinin Co(II) kompleksinden daha güçlü olduğunu göstermektedir. Birçok spektroskopik deney SF ile karşılaştırıldığında Co(II) kompleksinin bağlama modlarının farklı olduğunu göstermektedir. DNA ile etkileşimi Co(II) kompleksinin elektrostatik bağlanma modunda SF'nin ise DNA baz çiftleri arasında interkalasyon bağlanma modunda olduğunu belirlemişlerdir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE METOT

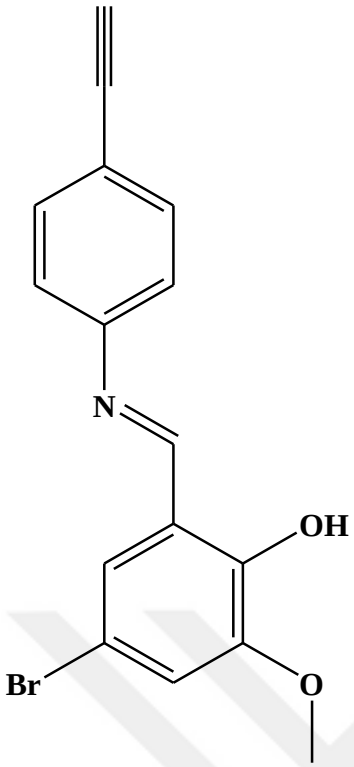
3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Schiff Bazları

Çalışmada Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya bölümü, Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mustafa YILDIZ tarafından sentezlenen ve yapıları aydınlatılan anilin-benziliden türevleri (Schiff bazları) kullanılmıştır. Kullanılan Schiff bazlarının kimyasal yapıları aşağıda Şekil 3.1 ve 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3.1. (*E*)-2-((4-etenilfenilimino)metil)-6-nitrofenol (Bileşik 1)



Şekil 3.2. (*E*)-4-bromo-2-((4-etenilfenilimino)metil)-6-metoksifenol (Bileşik 2)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan Schiff bazlarının hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO); antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan besiyerleri (Saboraud dekstroz agar, Nutrient agar, Mueller-Hinton broth, Roswell Park Memorial Institute Medyum (RPMI)) ve standart antibiyotikler (Gentamisin, ampisilin ve flukonazol) Sigma Aldrich'den temin edildi.

DNA kesme aktivite testinde kullanılan sodyum hidroksit (NaOH), potasyum klorür (KCl), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO4) ve glasiyal asetik asit (CH_3COOH) Merck'ten alınırken; pBR322 Plazmid DNA, DNA ladder ve EcoRI enzimi Thermo Scientific'ten satın alındı. Hem DNA bağlanma hem de DNA kırma aktivitesinde kullanılan Etilendiamintatraasetik asit (EDTA) Merck Millipore firmasından temin edildi. DNA bağlanma aktivite testinde kullanılan Dana timusu DNA'sı ve etidiyum bromür Sigma Aldrich'ten; tris bazı, sodyum klorür (NaCl) ve hidroklorik asit (HCl) Merck'ten satın alındı.

Hem mutajenite hem de antimutajenite çalışmalarında kullanılan magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$), sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7.H_2O$), potasyum fosfat (K_2HPO_4), sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4.H_2O$), sodyum hidroksit

(NaOH), sodyum klorür (NaCl), magnezyum klorür hekzahidrat ($MgCl_2.6H_2O$), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) ve potasyum klorür (KCl); agar (Difco) ve nutrient broth (Oxoid), L-histidin, D-biyotin, sodyum amonyum fosfat tetrahidrat ($NaHNH_4(PO_4.4H_2O)$), glukoz-6-fosfat ve mutajen olarak kullanılan 4-nitro-o-fenilendiamin (NPD) Sigma-Aldrich'den, diğer mutajen olan sodyum azid (SA, NaN_3) ise Merck'den temin edildi.

3.1.3. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi

3.1.3.1. Antimikrobiyal Aktivite

3.1.3.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Test Suşları

Sentezlenen Schiff bazlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla dört farklı Gram negatif bakteri *Escherichia coli* (NRRL B-3704), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aerouginosa* (ATCC 10145), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315); üç farklı Gram pozitif bakteri *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) ve iki farklı maya (*Candida albicans* (ATCC 60193) ve *Candida tropicalis* (ATCC 13803) kullanıldı. Bakteriler ve mayalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ tarafından hediye edildi.

Deney, Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI)'de belirtilen prosedüre uygun olan mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirildi (Isenberg, 1998). Test edilen Schiff bazlarının mikrobiyal aktivitesi en düşük konsantrasyon (MİK) değeri olarak saptandı.

3.1.3.1.2. Kullanılan Stok Kültürler

Kültürler, -20 °C'de saklanan stok kültürlerden oluşturuldu ve stok kültürler %15 gliserol içeren bakteriler için Brain Heart Infusion Broth; mayalar için %25 gliserol içinde muhafaza edildi.

3.1.3.1.3. Kullanılan Çalışma Kültürleri

Çalışma kültürleri, bakteriler için Nutrient Agar; mayalar için Saboraud Dextroz Agar bulunan petrilere stok kültürlerden ekim yapılarak elde edildi.

3.1.3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

Nutrient Agar:

Kullanım: Antibakteriyal çalışma kültürlerinin hazırlanmasında.

	150 mL'de
Nutrient Agar	3 g
Distile Su	150 mL

Besiyeri distile su ile çözüldükten sonra otoklavda steril hale getirildi.

Mueller-Hinton Broth:

Kullanım: Bakterilerin antimikrobiyal etkilerinin saptanmasında.

	100 mL'de
Nutrient Agar	6,5 g
Distile Su	100 mL

Besiyeri distile su ile çözüldükten sonra pH 7,4'e ayarlanıp otoklavda steril hale getirildi.

RPMI :

Kullanım: Mayaların antimikrobiyal etkilerinininin saptanmasında.

	900 mL'de
RPMI 1640 medyum	10,4 g
Glukoz	6,5 g
MOPS	34,53 g
Distile Su	900 mL

RPMI, Glukoz, MOPS 900 mL distile su ile çözünmesinin ardından pH 7,4'e ayarlanarak membran filtre ile steril hale getirildi.

Saboraud Dextroz Agar:

Kullanım: Antifungal çalışma kültürlerinin hazırlanmasında.

	100 mL'de
Saboraud Dextroz Agar	6,5g
Distile Su	100 mL

Besiyeri distile su ile çözüldükten sonra otoklavda steril hale getirildi.

3.1.3.1.5. Bakterilerin ve Mayaların Canlandırılması

-20°C'de muhafaza edilen bakteri ve maya suşları oda sıcaklığına getirildikten sonra katı ya da sıvı besiyerine ekilip 37 °C 'de inkübasyona tabi tutuldu.

3.1.3.1.6. 0.5 McFarland Turbidity Standart Hazırlanması

Kullanım: Bakteri ve Maya konsantrasyonu.

	10 mL'de
Sülfirik Asit (H_2SO_4) (0.36N)	9,95 mL
Baryum Klorür ($BaCl_2$) (% 1.175)	0,05 mL

H_2SO_4 ve $BaCl_2$ karıştırıcıda karıştırılmasının ardından hazırlanan karışım 625 nm'de spektrofotometrede okuması yapıldı. Optik densitesinin referans aralığı 0.08-0.10 O.D.'dir. Bu referans aralığında ayarlanan standart, tüplere dağıtılıp ardından kapatılarak muhafaza edildi.

3.1.3.2. DNA Kesme

100 mM Tris-HCl tamponu (pH: 7.6):

	200 mL'de
Tris	2,42 g
Distile su	200 mL

Tris 150 mL saf suda çözüldürüldü. Çözdürüldükten sonra HCl ile pH 7,6'ya ayarlandı ve 200 mL'ye tamamlandıktan sonra 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril hale getirildi. Kullanım süresince oda sıcaklığında muhafaza edildi.

6X Agaroz Yükleme Tamponu:

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

10X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) Tamponu (pH: 8.0):

	1000 mL'de
Tris	48,4 g
Glasiyel asetik asit	5,5 mL
EDTA	20 mL

Tris, Glasiyel asetik asite 0,5 M EDTA eklenerek 800 mL distile suda çözdürüldü ve pH 8.0'e ayarlandı. Son hacimi 1000 mL'ye tamamlandı. Kullanım süresine kadar da oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Agaroz Jel:

1g Agaroz ve 100 mL Tris asetat tamponu (1mM EDTA, 40mM tris asetat, pH 8.0) karıştırılıp ardından mikrodalga fırında kaynatıldı. 60°C' ye kadar soğutuldu ve 3 µl etidyum bromür ileve edilip karıştırıldı. Çözelti, tarak yerleştirilmiş plastik tabakaya dökülüp oda sıcaklığında 45 dakika bekletildi.

3.1.3.3. DNA Bağlanma Aktivite

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

	1000 mL'de
Tris	1,21 g
NaCl	2,92 g
EDTA	2 mL

Tris, NaCl ve 0,5 M EDTA (pH:8.0) 800 mL saf su ile çözüldürüldü. Ardından HCI ile pH'ı 7,4'e ayarlandı ve üzeri 1000 mL'ye tamamlandı. 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril hale getirildikten sonra kullanım süresince oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.1.4. Mutajenite ve Antimutajenite Özelliklerin Belirlenmesi

3.1.4.1. *Salmonella typhimurium* Test Suşları

Çalışmada Prof. Dr. Bruce Ames ve arkadaşlarının, *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirdikleri TA98 ve TA100 mutant suşları kullanıldı (Çizelge 3.1).

Test suşları Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi olan Prof. Dr. Hülya SİVAS tarafından temin edildi. Çalışmada kullanılan TA98 suşu çerçeve kayması mutasyonunun, TA100 ise baz çifti dönüşümündeki mutasyonun saptanmasında kullanıldı.

Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan mutant suşların genotipik özellikleri

Suşlar	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	R Faktör	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA98	*hisD 3052*	*Rfa*	*ΔuvrB*	pKM101	Çerçeve kayması
TA100	*hisG 46*	*Rfa*	*ΔuvrB*	pKM101	Baz çifti değişimine

*****LPS: Lipopolisakkarit
* *Δ*: Delesyon

3.1.4.2. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmalarında Kullanılan Besiyerleri ve Stok Çözeltiler

Nutrient Agar (NA)**:**

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde gecelik kültürün mL'sindeki bakteri sayısının belirlenmesinde, UV ve kristal viyole hassasiyetinde (genotip kontrolünde).

	50 mL'de
Nutrient broth	1,25 g
Distile su	50 mL
Agar	0,75 g

Agar ve nutrient broth distile su ile karıştırılarak otoklavda steril hale getirildi. Ardından steril hale gelen nutrient agar her petriye eşit olacak şekilde aktarıldı.

Histidin/Biyotin (HB) Agar:

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde histidin gereksinimi kontrolünde.

	50 mL'de
Agar	0,75 g
50X VB tuz çözeltisi	1 mL
Glukoz çözeltisi	5 mL
Histidin çözeltisi	0,5 mL
Biyotin çözeltisi	0,3 mL
Distile su	42 mL

Besiyeri ve distile su karıştırılarak otoklavda steril hale getirildi. Steril edilen karışıma sırasıyla steril 50X VB tuz çözeltisi, %20'lik glukoz ve % 0,5'lik histidin çözeltisi ilave edildi. İlave edilen çözeltilerin çözünmesi beklendikten sonra 0,5 mM biyotin çözeltisi eklendi. Çözelti 50 mL'ye distile su ile tamamlandı. Ardından her petriye eşit olacak (yaklaşık 25 mL) şekilde döküldü.

Minimal Glukoz Agar (MGA):

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen çalışmalarında ve histidin gereksinimi kontrolünde.

	100 mL'de
Agar	1,5 g
50XVB tuz çözeltisi	2 mL
Glukoz çözeltisi	10 mL
Distile su	83 mL

Agar ile distile su karıştırılarak otoklavda steril edildi. Ardından içerine 50XVB tuz çözeltisi eklendi ve çözünmesi sonrasında %20 glukoz çözeltisi eklendi. Karışımın son hacmi distile su ile 100 mL'ye olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanan besiyeri her petriye eşit olacak (yaklaşık olarak 25 mL) şekilde aktarıldı.

Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) Agar:

Kullanım**:** Mutajen ve Antimutajen deneylerinde master plate hazırlanmasında ve ampisiline dirençlilik özelliklerinin kontrolünde.

	50 mL'de
Distile su	45 mL
Agar	0,75 g
50X VB tuz çözeltisi	1 mL
Glukoz çözeltisi	5 mL
Histidin çözeltisi	0,5 mL
Biyotin çözeltisi	0,3 mL
(% 0,8/0,02 N NaOH) Ampisilin çözeltisi	0,1575 mL

Agar, distile su ile karıştırılarak otoklavda steril hale getirildi. Ardından sırasıyla karışıma 50X VB tuz, % 20 glukoz ve % 0,5 histidin çözeltileri ilave edildi. İlave edilen çözeltilerin çözünmesi ardından 0,5 mM biyotin çözeltisi ve ampisilin çözeltisi eklendi. Hazırlanan petrilere eşit olacak şekilde (yaklaşık 25 mL) dağıtıldı. Bu petrilerde suşlar +4°C'de 2 ay süre ile saklanabilmektedir.

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

Kulllanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde histidin/biyotin/ampisilin agar, histidin/biyotin ve Minimal glukoz agar plaklarının hazırlanmasında.

	100 mL'de
Distile su	67 mL
Magnezyum sülfat heptahidrat	1 g
Sitrik asit monohidrat	10 g
Potasyum fosfat	50 g
Sodyum amonyum fosfat tetrahidrat	17,5 g

45 ºC'lik distile suya yukarıda sayılan kimyasallar sırayla ilave edildi. Herbiri çözündükten sonra çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. Ardından otoklavda steril hale getirilen çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Top (Üst) Agar:

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde.

	50 mL'de
Agar	0,3 g
Sodyum klorür	0,25 g
Distile su	50 mL

Distile su içerisine agar ve sodyum klorür ilave edildi. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımı ile çözünen karışım 2 mL olacak şekilde her tüpe aktarıldı. Tüpler içerisindeki agar 121 °C'de otoklavda steril hale getirildi. Steril halde alınan tüpler ardından 42 °C' lik su banyosuna alınarak deney süresince muhafaza edildi.

Nutrient Broth (NB):

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde gecelik kültürde test suşlarının üretimi.

	40 mL'de
Nutrient broth	1 g
Distile su	40 mL

Broth, distile su içerisine ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Ardından çözünen karışım 20'şer mL olacak şekilde aktarıldı. Hazırlanan sıvı besiyerleri, otoklavda steril edildi. Hazırlanan besiyeri kullanım süresince +4 °C'de muhafaza edildi.

Glukoz Çözeltisi (% 20):

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde HB, HBA ve MGA plaklarının hazırlanmasında.

	10 mL'de
Glukoz	2 g
Distile su	10 mL

Distile suya glukoz eklenerek tamamen çözünmesi sağlandı. Otoklavda steril hale getirilmesinin ardından çözelti +4 °C'de saklandı.

Histidin Çözeltisi (% 0,5):

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde HB ve HBA plaklarda.

	50 mL'de
L-Histidin	0,025 g
Distile su	5 mL

Distile su içerisine histidin eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda tamamen çözünmesi sağlandı. Ardından çözünen karışım membran filtre ile steril hale getirildi ve çözelti kullanım süresince +4 °C'de saklandı.

Biyotin Çözeltisi (0,5 mM):

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde HB ve HBA plaklarda.

	150 mL'de
Distile su	150 mL
D-Biyotin	0,015 g

Biyotin, distile su içerisine eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve tamamen çözünmesi sağlandı. Daha sonra çözünen karışım membran filtre ile steril hale getirildi. Çözelti kullanım süresince +4°C'de saklandı.

NaOH Çözeltisi (0,02 N):

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde ampisilin çözeltisinin hazırlanmasında.

	10 mL'de
Sodyum hidroksit (NaOH)	0,008 g
Distile su	10 mL

NaOH distile su içerisinde çözdürüldü. Ardından çözelti 10 mL'ye tamamlandı.

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

Kullanım: Mutajen ve Antimutajen deneylerinde HBA plaklarının hazırlanmasında ve pKM101 plazmidi taşıyan suşların kontrolünde.

	25 mL'de
Ampisilin trihidrat	0,2 g
NaOH	25 mL

Ampisilin trihidrat, NaOH (0.02 N) içerisinde çözdürüldü. Ardından membran filtre ile steril hale getirildi ve çözelti kullanım süresince +4°C'de saklandı.

Sodyum-Fosfat Tamponu (pH=7,4):

Kullanımı: Mutajenite ve Antimutajenite deneylerinde top agara ilave.

	250 mL'de
0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4.H_2O$) (MA 137,99 g/mol) (6,9 g/250 mL)	30 mL
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (MA 177,99 g/mol) (8,9 g/250 mL)	220 mL

Her iki karışım da ayrı ayrı hazırlanarak bir cam şişede karıştırıldı. pH değeri 7,4'e ayarlanarak otoklavda steril hale getirildi.

Histidin/Biyotin Çözeltisi (0,5 mM):

Kullanım: Mutajenite ve Antimutajenite deneylerinde top agara ilave.

	500 mL'de
Distile su	500 mL
D-Biyotin	0,062 g
L-Histidin.HCl	0,048 g

Distile suya biyotin eklenerek ısıtıcılı karıştırıcı da tamamen çözünmesi sağlandı. Çözündükten sonra üzerine histidin eklendi. Çözünen karışım membran filtreyle steril hale getirilerek kullanım süresince +4°C'de muhafaza edildi.

Kristal Viyole Çözeltisi (% 0,1):

Kullanım: Mutajenite ve Antimutajenite deneylerinde *rfa* mutasyonu kontrolünde.

	10 mL'de
Distile su	10 mL
Kristal viyole	0,01 g

Kristal viyole distile su ile karıştırılarak hazırlandı ve ardından çözelti cam şişe içerisine konup karanlıkta kullanım süresince +4°C'de saklandı.

Serum Fizyolojik (% 0,9 Tuz çözeltisi):

Kullanım: Mutajenite ve Antimutajenite deneylerinde bakteri kültürlerinin seyreltilmesinde.

	50 mL'de
NaCl	0,45 g
Distile su	50 mL

NaCl distile su ile karıştırıldı ve hazırlanan çözelti otoklavda steril hale getirildi.

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

Kullanım: Mutajenite ve Antimutajenite deneylerinde TA98 suşu için pozitif kontrol ve mutajen olarak.

	1 mL'de
4-Nitro-*o*-fenilendiamin	0,1 mg
Dimetil sülfoksit (DMSO)	1 mL

DMSO içerisinde 4-Nitro-*o*-fenilendiamin çözdürüldü. Ardından hazırlanan çözelti membran filtre ile steril hale getirildi. Çalışmalarda 10 µg/plak olacak şekilde kullanıldı ve mutajen kullanım süresince oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Sodyum Azid (0,01 µg/µL):

Kullanım: Antimutajenite deneylerinde TA100 mutant suşu için pozitif kontrol ve mutajen olarak.

	10 mL'de
Distile su	10 mL
Sodyum Azid	0,1 mg

Distile su içerisinde sodyum azid (NaN_3) çözdürülüp ardından membran filtre ile steril hale getirildi. Çalışmalarda 1 µg/plak olacak şekilde kullanıldı ve mutajen kullanım süresince +4°C'de saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Schiff Bazlarının Çözeltilerinin Hazırlanması

Bileşiklerin çözeltilerinin hazırlanmasında ve çözücü olarak çalışmalarda DMSO kullanıldı. DNA kesme aktivitesi için, bileşiklerin 0.05mM'lık stok konsantrasyonundan ependorflara; 5, 10, 20 ve 40 µL konuldu. Daha sonra ependorflara sırasıyla; 95, 90, 80 ve 60 µL Tris tamponu ilave edildi. Böylece 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonları hazırlandı. DNA bağlanma aktivitesi için 0.05 mM bileşik, 1 mL DMSO içerisinde çözülerek çözeltileri hazırlandı. Schiff bazlarının 500 ppm'lik stok çözeltileri antimikrobiyal aktivite, mutajenite ve antimutajenite deneyleri için kullanıldı. Hazırlanan 500 ppm'lik stok çözeltiden Ames testi (mutajenite ve antimutajenite) için seyreltme yapılarak dört farklı konsantrasyonda test çözeltileri hazırlandı.

3.2.2. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.2.1. Mikrodilüsyon Testi (MİK)

İnokulum

Direkt Koloni Süspansiyonu: İzole olmuş normal büyüklükte bir koloni seçilerek öze yardımıyla serum fizyolojik içerisine alındı. Ardından 0.5 McFarland standartı ile aynı yoğunlukta olması sağlandı.

Minimim İnhibisyon Konsantrasyon Testi (MİK Testi)

Bu çalışma da ticari olarak geliştirilmiş 96 U şeklinde tek kullanımlık steril mikroplaklar kullanıldı. Schiff bazlarının antimikrobiyal aktiviteleri 256 µg/µL konsantrasyondan başlayarak seri dilüsyonları yapıldı.

Pozitif kontrol olarak bakteriler için Ampisilin ve Gentamisin, mayalar için ise Flukonazol standart antibiyotiği test edildi. Öncelikle çalışma kültürlerinin hazırlanması için bakteri kültürleri Nutrient Agar'a; maya kültürleri ise Saboraud Dextroz Agar'a ekim yapılarak 37 °C'de 20 saat inkübasyona bırakıldı. Petrilerde üretilmiş olan kolonilerden seçilerek serum fizyolojiğe süspanse edilerek yoğunluğu 0,5 McFarland'a eşit olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan süspansiyonun yoğunluğu 1-2 x 10^8 CFU/mL olarak ayarlandı. İnokulum 0.5 McFarlanda ayarlandıktan sonra süspansiyon karıştırılarak içerisinden 2 mL alınıp 38 mL serum fizyolojiğe eklenerek 1:20 oranında dilüsyon olacak şekilde ayarlanmış oldu. Daha sonra her bir kuyucuğa 10 µL koyuldu ve her bir kuyucuğa 0.1 mL Müller Hinton Broth besiyeri ilve edildi. Schiff bazı bileşikleri mikropleytlerdeki ilk kuyucuklara 0.1 mL olarak ilave edildi. Ardından besiyeri ile karıştırılarak 0.1 mL geri alındı. Bu şekilde test edilen Schiff bazı bileşiklerinin seri dilüsyonları gerçekleştirildi.

Bakteri ve mayalar için hazırlanmış olan mikroplakalar sırasıyla 24 saat ve 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Ayrıca, DMSO'nun bakteriler üzerinde etkili olup olmadığını belirlemek amacıyla DMSO ile aynı işlemler tekrarlandı ve bu çözücünün bakteri ve mayalar üzerinde etkiye sahip olmadığı görüldü.

3.2.2.2. DNA Kesme Aktivitesi

3.2.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

Bu çalışmada bileşiklerin DNA kesme aktivitelerini belirlemek amacıyla, ticari olarak satılan %90 süperkıvrımlı formda olan pBR322 plazmid DNA kullanıldı. Bileşiklerin DMSO ile 5 mM'lık stok çözeltileri hazırlanıp 100 mM Tris-HCl (tris hydroximethylaminomethane hydrochlorid) tampon (pH: 7,6) ile seyreltilerek istenilen konsantrasyonlar sağlandı. Pozitif kontrol olarak EcoRI restriksiyon enzimi kullanıldı. Bu enzim plazmidte çift zincir kırığına sebep olduğu bilinmektedir. 1 kb'lik DNA ladder ise marker olarak kullanıldı.

Bileşiklerin DNA kesme aktivitesi hem oksidatif (H_2O_2 varlığında) hem de hidrolitik olarak belirlendi. 2 µL pBR322 plazmid DNA, 2 µL Tris-HCl tampon (pH:7,6) ve sırası ile 25, 50, 100 ve 200 µM bileşikler ilave edildi. Oksidatif kesim aktivitesi için 2 µL H_2O_2 kullanıldı. Karışımın hacmi 20 µL'e tamamlanarak 3 saat karanlıkta 37 ºC'de inkübe edildi. Daha sonra, TAE tampon çözeltisinde %1'lik agaroz jel hazırlandı ve jel elektroforez tankına alındı. Elektroforez tankı, jeli ve elektrodları kapatacak sekilde TAE tamponu ile doldurulduı. İnkübasyondan sonra, pBR322 plazmid DNA içeren örnekler 4µL

6X DNA yürütme tamponu ile karıştırıldı. Hazırlanan DNA örnekleri jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi ve 1 saat 60 V'luk voltajda elektroforez edildi. Bir saat sonra jel UV ışığı altında görüntülendi.

3.2.2.3. DNA Bağlanma Aktivitesi

3.2.2.3.1. UV-Vis Absorbsiyon Titrasyonu

Bu çalışmada, çoğunlukla araştırıcılar tarafından tercih edilen Dana Timus DNA'sı (CT-DNA) kullanıldı. Tampon olarak ise TNE (10 mM Tris-HCl , 50 mM NaCI ve 1 mM EDTA) tamponu pH 7.4 olacak şekilde hazırlanarak kullanıldı.

CT-DNA'nın UV-Visible spektroskopisi (PG Instruments T+80 UV/Vis spectrophotometer) ile spektrumu alınarak, 260 ve 280 nm'deki absorbansları oranı 1,8-1,9 bulundu. Bu oran, CT-DNA'nın RNA veya protein kontaminasyonu içermediğini bildirmektedir. Bileşiklerin DMSO ile 0.05 M'lık stok çözeltileri hazırlandı ve hazırlanan stok çözeltilerin son konsantrasyonları 10-30 mM olacak şekilde TNE tampon çözeltisi içerisinde seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Kör olarak da stok çözeltilerin son konsantrasyonların da seyreltilmesinde kullanılan TNE tamponu ile çalışıldı. Bu deneyde bileşiklerin konsantrasyonları sabit tutulurken, CT-DNA'nın konsantrasyonu ortama belli miktarlarda eklenerek kademeli olarak arttırıldı. CT-DNA, kuartz küvete her ilave edilmesinin ardından karıştırılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübe sonunda spektrofotometrede 200-600 nm arasında okumalar gerçekleştirildi.

Titrasyon sonucu elde edilen veriler sayesinde bileşiklerin DNA'ya hangi modla bağlandığını gösteren bağlanma sabiti değeri hesaplanabilmektedir. Bu sabitin hesaplanabilmesi için bir formül geliştirilmiştir.

$$[DNA]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f) = [DNA]/(\varepsilon_B - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_B - \varepsilon_f) \quad (3.1)$$

Formülde ε_A; ölçülen konsantrosyandaki sönüm katsayısı, ε_B; DNA'ya tüm bileşiklerin bağlanması sonrasındaki sönüm katsayısı ve ε_f; serbest haldeki bileşiğin sönüm katsayısıdır. Burada $[DNA]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f)$ karşı [DNA] değerleri grafiğe geçirilirip eğimden K_b değeri bulunur.

Absorbans şiddetindeki değişimler ise yüzdelik oranlarıyla hesaplanabilmektedir. Bu değişimlerin hesaplanabilmesi için bir formül geliştirilmiştir.

$$\%H = [(Ai-As) / (Ai)] \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte ise Ai, bileşiğin serbest haldeki absorbans şiddetini, As ise maksimum konsantrasyonda DNA ilave edildikten sonra bileşiğin absorbans şiddetini gösterir.

3.2.3. Mutajenite ve Antimutajenite Özellikleri

3.2.3.1. Suşların Genetik Özelliklerinin Kontrol Edilmesi

3.2.3.1.1. Suşların Histidin Gereksinimi

S. typhimurium TA98 ve TA100 mutant suşları, histidin operonunun değişik bölgelerinde sırasıyla çerçeve kayması ve baz değişimleri mutasyonları bulundurmuktadır. Suşların histidin gereksinimi kontrolünde biyotin ve histidin içermemesi nedeniyle Minimal glukoz agar (MGA), kontrol plağı olarak kullanıldı. Bu agara ekilmeleri sonucu his- bakteriler his+'lardan ayırt edilebilmektedir. Bu suşlar histidin sentezleme yeteneklerini kaybettiklerinden dolayı MGA içeren petrilerde üreyemezler, ancak histidin ve biyotin varlığında üreyebildiklerinden dolayı HB agar içeren petrilerde üreyebilmektedirler. Bu amaç doğrultusunda NB'da, taze kültür için bir gece üretilen bakterilerden HB ve MGA içeren petrilere çizgi ekim yapılarak, 37°C'de 48-72 saatlik inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.1.2. *rfa* Mutasyon Kontrolü

Bu mutasyon tipi suşların hücre duvarının yapısında bulunan lipopolisakkarit yapısında meydana gelen bir mutasyondur. Bu mutasyon nedeniyle hücre duvarının geçirgenliği artmaktadır. Bu mutasyonun varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edildi. Mutasyonun kontrolü için NB'de, bir gece üretilen taze kültürden 0.1 mL bakteri alındı. Ardından NA'ya ekim yapılarak 0.5 cm çapında olan steril disk plağın ortasına yerleştirilip üzerine kristal viyole çözeltisinden (%0,1) 0.01 mL alınıp diske emdirildi. Hazırlanan petriler 37 ºC'de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonunda 14 mm'lik disk çevresinde üreme olmayan bir zon gözlendi. Bu zonda, kristal viyole suşların içine girip etkilediğinden dolayı suşların üremesi engellenmektedir. Bu durum suşların *rfa* mutasyonunu taşıdıkları bildirir.

3.2.3.1.3. *uvrB* Mutasyon Kontrolü

Bu mutasyonun kontrolü ultra viyole (UV) duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, diğer kontrol çalışmalarında olduğu gibi NB'de bir gece üretilen bakteri kültüründen alınarak NA'ya paralel ekim yapıldı. Plağın yarısı plastik bir tabaka ile kapatılarak (UV ışını almayan kısım) diğer yarısı 30 watt'lık germisidal UV lambası ile 33

cm yükseklikten 8 sn ışınlara maruz bırakıldı. Işınlanmadan sonra 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik tabaka ile kapatılan kısımda normal bir üreme gözlendi. Bu da bize kullanılacak bakterilerin *uvr*B mutasyonu taşıdığını göstermektedir.

3.2.3.1.4. R Faktör Kontrolü

R faktörü (ampisilin direnç faktörü) içeren pKM101 plazmidin kontrolü için TA98 ve TA100 mutant suşları HBA plaklarına ekim yapılarak gerçekleştirildi. 37 ºC'de 24 saat sonunda inkübe edilen HBA plaklarında üreyen TA98 ve TA100 mutant suşlar pKM101 plazmidi taşıyan suşlar olarak belirlendi (Ames ve ark., 1973).

3.2.3.2. Suşların Master Plaklarının Hazırlanması

Bakteri kültürleri -80' de bulunan stoktan alınarak oda sıcaklığında eritildi. Ardından bir öze ile alınarak 6,3 µL ampisilin çözeltisi içeren 2000 µL NB' ye ekildi ve 37 ºC'de 12 saat inkübe edildi. Süre sonunda HBA petrilerine çizgi ekim yapılarak 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi. HBA üzerine çizgi ekim yapılarak elde edilen master plaklar 2 ay boyunca +4°C'de saklandı ve pasajlamalar yapıldı.

3.2.3.3. Test Suşlarının -80'de Muhafaza Edilmesi

HBA petrilerine ekilmiş olan bakterilerden iyi izole olan koloni seçilerek öze yardımıyla 6,3 µL ampisilin çözeltisi içeren 2000 µL NB içerisine ekim gerçekleştirildi. Ardından 37 ºC'de 12 saat inkübe edildi. İnkübe sonunda steril ependorf tüplerine 100 µL DMSO ve 900 µL bakteri kültürü ilave edilip -80 ºC'de saklandı.

3.2.3.4. Suşların Gecelik Kültürlerinin Hazılanması

Suşların gecelik kültürlerinin hazırlaması için, daha önce hazırlanmış olan master plaklar kullanıldı. Bunun için master plakdan iyi izole olmuş bir koloni alındı ve 0.063 mL ampisilin içeren 20 mL NB'ye ekim yapıldı. Ardından 37 ºC'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında elde edilen gecelik kültürden 500 µL alınarak taze NB' ye aktarıldı. 37 ºC'de 3 saat inkübe edildi. Deneyde, 1 $x10^9$ ila $2x10^9$ arasında koloni oluşturan birim (kob)/mL yoğunluğundaki bakteri kültürleri ile çalışıldı.

3.2.3.5. Sıvı Kültürün mL'sindeki Suşların Yoğunluğunun Belirlenmesi

Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarının NB'deki mL'sinde bulunan suşların yoğunluğu, spektrofotometre de 540 nm'de okuma yapılarak saptandı. Suşların 0,1-0,2 arası yoğunlukta olanlar ile deneyler gerçekleştirildi. Suşların yoğunluğunun fazla olması durumunda ise seyreltilmesi için serum fizyolojik (%0,9) 10^{-1} ila10^{-7}arasında değişen miktarlarda kullanıldı.

3.2.3.6. Mutajenite ve Antimutajenite Çalışmaları

Çalışmada Schiff bazlarının potansiyel mutajenite ve antimutajenik özellikleri, Ames test sistemi ile yapıldı. Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde Schiff bazlarının belirlenen 4 farklı konsantrasyonu (0.5, 5, 50, ve 500 ppm) *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılanılarak gerçekleştirildi. Schiff bazlarının çerçeve kayması ve baz çifti değişimine nedenmi olduğu yoksa çerçeve kayması ve baz çifti değişimine neden olan kimyasallara karşı inhibe edici özelliğimi olduğu belirlendi.

Schiff bazlarının mutajenite özelliğinin belirlenmesi için çalışma sırasında 42 ºC'de su banyosunda tutulan histidin biyotin çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum/fosfat tamponu, 100 µL test edilen Schiff bazlarının ve 100 µL bakteri kültürü eklenip MGA içeren petrilere aktarılarak homojen bir şekilde dağılımı gerçekleştirildi. Homojen dağılımının gerçekleştirilmesi ardından karışımı içeren MGA petrilerinin donması sağlandı. 37 ºC'de 48 saat inkübe edilerek ardından geri dönen bakteri koloniler (his^+) sayıldı.

Antimutajenite çalışma sırasında 42 ºC'de su banyosunda tutulan histidin biyotin çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum/fosfat tamponu, 100 µL test edilen Schiff bazı, 100 µL mutajen ve 100 µL bakteri kültürü eklenip MGA içeren petrilere aktarılarak homojen bir şekilde dağılımı gerçekleştirildi. Homojen dağılımının gerçekleştirilmesi ardından karışımı içeren MGA petrilerinin donması sağlandı. 37 ºC'de 48 saat inkübe edilerek ardından geri dönen bakteri koloniler (his^+) sayıldı.

3.2.3.7. Suşların Pozitif Kontrolü

Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde mutajen olarak *S. typhimurium* TA98 mutant suşu için NPD ve *S. typhimurium* TA100 mutant suşu için NaN_3 ile çalışıldı.

Çalışmalarda pozitif kontrolde TA98 için 42 ºC'de tutulan 222 µL histidin biyotin çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum/fosfat tamponu, 100 µL mutajen NaN_3 ve 100 µL bakteri kültürü eklenerek MGA içeren petrilere aktarıldı, TA100 için ise 42 ºC'de tutulan 222 µL histidin biyotin çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum/fosfat tamponu, 100 µL mutajen SA ve 100 µL bakteri kültürü eklenerek MGA içeren petrilere aktarıldı ve homojen bir şekilde dağılımı gerçekleştirildi. Homojen dağılımının gerçekleştirilmesinin ardından karışımı içeren MGA petrilerinin donması sağlandı. 37 ºC'de 48 saat inkübe edilerek ardından geri dönen bakteri koloniler (his^+) sayıldı.

3.2.3.8. Suşların Negatif Kontrolü

Mutajenite ve antimutajenite deneylerinde negatif kontrolün belirlenmesi için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldı. Bunun nedeni ise çalışmada kullanılan mutajenlerin ve Schiff bazlarının çözmek amacıyla kullanıldığından dolayı geriye dönen bakteri sayısının üzerinde bir etkisi olup olmadığını belirlemektir.

Çalışmalarda negatif kontrol için 42 ºC'de tutulan 222 µL histidin biyotin çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum/fosfat tamponu, 100 µL DMSO ve 100 µL bakteri kültürü eklenerek MGA içeren petrilere aktarıldı ve homojen dağılımı gerçekleştirildi. Homojen dağılımının gerçekleştirilmesi ardından karışımı içeren MGA petrilerinin donması sağlandı. 37 ºC'de 48 saat inkübe edilerek ardından geri dönen bakteri koloniler (his^+) sayıldı.

3.2.3.9. Suşların Spontan Kontrolü

S. typhimurium histidin oksotrofu olan ve çalışmalarda kullanılan TA98 ve TA100 mutant suşları kendiliğinden (spontan) his^- formdan his^+ forma geçebilmektedir. Bu spontan geçiş TA98 mutant suşu için farklı bir revertant/plak TA100 mutant suşu için farklı bir revertant/plak'tır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *S. typhimurium* suşlarının spontan *his+* forma dönüşmesi durumundaki bakteri sayıları

***Salmonella typhimurium* test suşları**	**revertant/plak**
TA98	20-50
TA100	75-200

Çalışmalarda spontan kontrol için, 42 ºC'de bulunan 222 µL histidin biyotin çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum/fosfat tamponu ve 100 µL bakteri kültürü ilave edildi ve ardından MGA içeren petrilere dökülüp homojen dağılımı gerçekleştirildi. Homojen dağılımının gerçekleştirilmesi ardından karışımı içeren MGA petrilerinin donması sağlandı. 37 ºC'de 48 saat inkübe edilerek ardından geri dönen bakteri koloniler (his^+) sayıldı.

3.2.3.10. Ames Testi Sonuçların Değerlendirilmesi

3.2.3.10.1. Mutajenik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan Schiff bazlarının mutajenik özelliğe sahip olup olmadıkları negatif kontrolle karşılaştırılarak belirlendi. Test edilen Schiff bazlarının petrilerde oluşturduğu revertant koloni sayısının, negatif kontrolün iki katı ve daha üstü olması durumunda mutajenitenin var olduğu söylenebilmektedir. Konsantrasyona bağlı olarak koloni sayısında bir artış gözlenmesi durumunda ise, zayıf mutajenik aktiviteden bahsedilmektedir (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

3.2.3.10.2. Antimutajenik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan Schiff bazlarının antimutajenik özellikleri inhibisyon oranı belirlenerek değerlendirildi. Test edilen ligandın inhibisyon oranı;

- %25'in altında değerde ise test bileşiklerinin antimutajenik bir özelliği yoktur.
- %25 ile %40 arasında bir değerde ise test ligandının orta dereceli antimutajenik özelliği vardır.
- %40'tan yüksek değerde olan test bileşiklerin ise güçlü bir antimutajenik özelliği vardır.

Test edilen bileşiklerin inhibisyon oranları Hong ve Lyu (2001)'nun vermiş olduğu formüle göre hesaplandı.

$$\text{İnhibisyon Oranı (\%)} = \frac{A-B}{A-C} \text{ X } 100 \qquad (3.3)$$

A: Pozitif kontrolde geri dönen koloni sayısı/plak

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

C: Spontan koloni sayısı/plak

Her iki çalışma sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları alınarak standart sapmaları hesaplandı.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Schiff Bazlarının Biylojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Schiff bazlarının antibakteriyel aktiviteleri Gram negatif bakterilerden *Escherichia coli, Pseudomonas aerouginosa, Proteus vulgaris* ve Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Bacillus subtilis,* mayalardan ise *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* suşlarına karşı broth mikrodilüsyon metodu ile araştırıldı. Pozitif kontrol olarak Ampisilin, Gentamisin ve Flukonazol isimli antibiyotikler kullanıldı. Çalışma sonucunda mikroorganizmanın üremesinin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak saptandı.

Çizelge 4.1'de antimikrobiyal aktivite deneyinden elde edilen MİK değerleri verilmiştir. İki bileşiğin de test edilen mikroorganizmalara karşı farklı değerlerde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bileşik 1'in antibakteriyel aktivite olarak 128-64μg/mL konsantrasyon aralığında, antifungal aktivite olarak ise 64 μg/mL konsantrasyonda gösterdiği belirlenmiştir

Bileşik 2'de ise 256-128μg/mL konsantrasyon aralığında antibakteriyel aktivite, 64 μg/mL konsantrasyonda da antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Fakat, her iki bileşiğinde pozitif kontrollerle kıyaslandığında zayıf etkili oldukları saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Schiff bazlarının MİK (μg/mL) değerleri

	Bakteriler							**Mayalar**	
Bileşikler	***S. aureus* ATCC 25923**	***E. faecalis* ATCC 29212**	***B. subtilis* ATCC 6633**	***E. coli* NRRL B-3704**	***E. coli* ATCC 25922**	***P. aeruginosa* ATCC 10145**	***P. vulgaris* ATCC 13315**	***C. albicans* ATCC 60193**	***C. tropicalis* ATCC 13803**
Bileşik 1	128	128	64	128	128	64	128	64	64
Bileşik 2	128	256	128	256	256	128	256	64	64
Gentamisin	1	0,5	0,06	0,13	0,13	0,06	0,13	-	-
Ampisilin	0,06	1	0,06	16	32	2	0,06	-	-
Flukanozol	-	-	-	-	-	-	-	0,0625	0,5
DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Schiff bazlarının MİK değerlerine bakıldığında test edilen Gram negatif bakteri ve Gram pozitif bakterine karşı benzer değerlerde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ancak Bileşik 1'in Bileşik 2'ye göre daha etkili olduğu görülmüştür. Schiff bazlarının antifungal aktiviteleri incelendiğinde ise mayalara karşı bakterilerden daha etkili olduğu bulunmuştur. Her iki bileşiğin antifungal aktivitesi 64 μg/mL konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Akkan 2016 yılında, Glikozamin Schiff bazlarının antimikrobiyal aktiviteleri belirlemek için Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas aerouginosa, Escherichia coli, Proteus vulgaris,* Gram pozitif bakterilerden *Enterococcus faecalis, Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*; mayalardan ise *Candida tropicalis* ve *Candida albicans* mayalarına karşı broth mikrodilüsyon (MİK) yöntemi ile çalışmıştır. Test edilen ligandların Gram pozitif bakterilere 128-32 μg/mL aralığında, gram negatif bakterilere 256-128 μg/mL aralığında, mayalara ise 128-2 μg/mL aralığında etkili olduğu bildirmiştir.

Kumar ve Sheriff (2016), üç farklı Schiff bazı ve Co(II) kompleklerinin antibakteriyal aktivitelerini minimum inhibisyon konsantrasyonu ile araştırmışlardır. Araştırmalarında *Streptococcus pyogenes, Bacillus cereus, Salmonella typhi, Escherichia coli* ve *Listeria monocytogens* bakterilerini kullanmışlardır. Sonuç olarak tüm ligand 125-31.25 μg/mL ve komplekslerinin 125-62.5 μg/mL aralığında etkili olduğunu bildirmişlerdir. *Listeria monocytogens* 31.25 μg/mL MİK değeri ile en duyarlı bakteri suşu olduğunu saptamışlardır.

Gunal ve arkadaşları 2012 yılında, benzimidazolyum türevinden sentezlenen gümüş(I) kompleksini, bakteri (*Pseudomonas aerouginosa, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli*) ve mantarlara (*Candida tropicalis* ve *Candida albicans*) karşı mikrodilüsyon yöntemi ile incelemişlerdir. Sentezlenen kompleksin MİK değerlerinin (25-800 μg/mL) çok düşük derişimlerde (0,4–3,1 μg/mL) etkili olan Amfisilin, Siprofloksazin ve Flukanazol antibiyotiklerine kıyasla aktivite göstermediği görülmüştür.

Genel olarak bir değerlendirme yapıldığında, antimikrobiyal etki bazı parametrelere göre değişkenlik gösterebilir. Yani, bir tür bakteri üzerinde etkili ilaç molekülü baska bir bakteri üzerinde aktivite göstermeyebilir. Bunun nedenlerinden biri, bakterilerin Gram(-) ve Gram(+) olarak sınıflandırılması seklinde yorumlanabilir. Bakteri türünün yanı sıra, tıpta kullanılan antibiyotiklerin etki mekanizmaları da çesitlilik göstermektedir (Gürcan, 2014). Örnegin, Gentamisin, aminoglikozid sınıfı bir antibiyotiktir. Bakteriler üzerindeki

etkisi, ribozomların alt birimlerine bağlanması ile kodonda değişikliğe yol açarak mRNA'nın mutasyona uğraması şeklindedir. Böylece mRNA'nın taşıdığı mesajın yanlış okunmasına neden olur (http://en.wikipedia.org/wiki/Gentamicin). Ampisilin, β-Laktam sınıfı bir antibiyotiktir. Bakteriler üzerine etkisi ise bakteri hücre duvarını inhibisyonu ve otolitik enzim (murein hidrolaz) aktivasyonuna neden olarak hücrenin ölümüne yol açmaktadır. Flukanazol ise triazol sınıfı bir antibiyotiktir ve mayalarda sitoplazma membran permeabilitesini bozarak etki etmektedir.

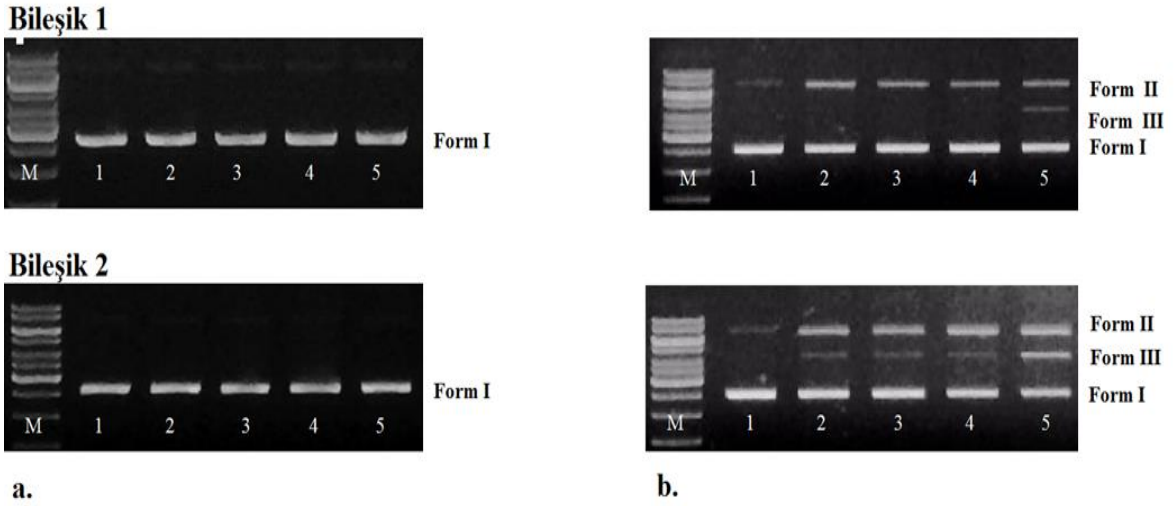
Bu bilgiler doğrultusunda, antibiyotiklerin bakteriler ve mayaların üzerinde seçicilik göstermesinin bu gibi özelliklere bağlı olduğu ve bu nedenle, sentezlenen yeni ilaçların antibakteriyal ve antifungal aktivite çalışmalarında olumlu ya da olumsuz sonuçlar vermesi muhtemeldir.

4.1.2. DNA Kesme Sonuçları

Plazmid pBR322 DNA'nın bileşiklerin dört farklı konsantrasyonu (25-200 μM) ile hidrolitik ve oksidatif reaksiyonları sonucu DNA kesme aktiviteleri agaroz jel elektroforezi yöntemi sonucunda elde edilen bant formları incelenerek araştırıldı.

Agaroz jel elektroforezi yöntemi ile jelde plazmid pBR322 DNA'nın üç farklı formu üç farklı bant şeklinde gözlemlenmektedir. DNA kesme, süpersarmal formun (Form I), halkasal forma (Form II) ve lineer forma (Form III) dönüşümü ile gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi olan Form I plazmidin kesilmemiş halidir ve jel üzerinde en hızlı ilerleyen formdur. Eğer kesme plazmid DNA' nın tek zincirinden meydana gelirse, plazmidin aşırı sarmal hali gevşeyerek Form II' ye dönüşmektedir. Bu form jel üzerinde en yavaş ilerleyen formdur. İki zincirin birlikte kesildiği durumda ise plazmid DNA Form I ve Form II arasında ilerleme hızına sahip olan Form III' e dönüşmektedir.

Çalışma sonucunda, Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin hidrolitik olarak DNA kesme aktivitesinin olmadığı oksidatif olarak ise DNA kesme aktivitelerinin olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin DNA kesme aktivitesi; a. Hidrolitik kesme (M marker, 1. Plasmid DNA, 2. DNA+ 25μM Bileşik, 3.DNA+ 50μM Bileşik 4.DNA+ 100 μM Bileşik, 5.DNA+200μM Bileşik), b. Oksidatif kesme (M marker (1 kb), 1. plazmid DNA, 2. DNA+ 25μM Bileşik+H_2O_2, 3.DNA+ 50μM Bileşik +H_2O_2, 4.DNA+ 100 μM Bileşik+H_2O_2, 5.DNA+ 200μM Bileşik+H_2O_2).

Yıldırım (2016), Schiff bazı (L1 ve L2) ve komplekslerinin (Cu, Ni, Fe, Co) DNA kesme aktivitelerini agaroz jel elektroforezi yöntemi ile plazmid pBR322 DNA kullanarak araştırmıştır. Araştırma sonucunda L1, L1-Ni ve L1-Co kompleksi ile L2, L2-Mn kompleksinin oksidatif veya hidrolitik olarak DNA kesme aktivitesinin olmadığı L2-Ni kompleksinin pBR322 plazmid DNA'yı sadece H_2O_2 varlığında oksidatif olarak kırdığını diğer ligand ve komplekslerinin ise hem hidrolitik hem de oksidatif olarak farklı formlarda kesme aktivitesi olduğunu bildirmiştir.

Kong ve ark. 2008 yılında, tetraazammakrosiklikoksamido Ni(II) komplekslerinin DNA kesme aktivitelerini agaroz jel elektroforezi çalışmışlardır. Çalışma sonucunda tüm komplekslerin plazmid DNA'yı oksidatif olarak kestiği bildirilmiştir.

Bulut 2014 yılında, 4-Benzoil-1-(2,4-dinitrofenil)-5-fenil-1H-pirazol-3- karboksilli asit klorür ve 4-Benzoil-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1H-pirazol-3-karboksilli asit klorür bileşiklerinin hidrazin, hidrazit ve üre ile reaksiyonu sonucunda elde edilen 19 adet pirazol türevinin (MC1-MC12, K1-K6, AC3, AC6 ve AC14) DNA kesme aktivitelerini pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlemiştir. Test edilen bileşiklerden (MC2), (AC3), (K1), (K2) ve (K5)'in bileşiklerin kesme aktivitesinin olmadığını diğer bileşiklerin ise DNA'nın süper sarmal yapısının bozduğu ve hareketini yavaşlattığını saptamıştır. Yapılan çalışmalar, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer sonuçlar vermiştir.

4.1.3. DNA Bağlanma Sonuçları

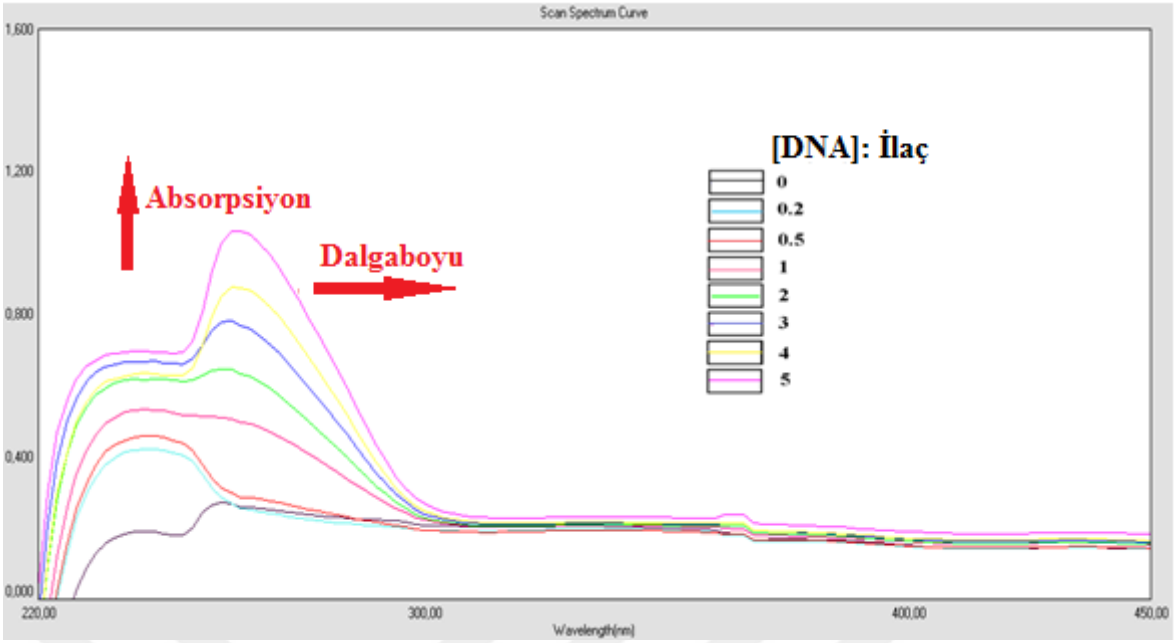
4.1.3.1. UV-Vis Absorpsiyon Sonuçları

UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi, küçük moleküllerle DNA'nın etkileşiminin belirlenmesinden yaygın kullanılan tekniktir. Bu teknik ilacın ya da DNA'nın absorpsiyon özelliklerinin değişiminin izlenmesi esasına dayanmaktadır. İlaç DNA arasında herhangi bir etkileşim olup olmadığını anlamak için serbest molekül ile DNA'ya bağlı molekülün maksimum absorbansındaki değişmeler karşılaştırılmaktadır. İlaç ile DNA arasında ki etkileşim elektrostatik, interkalasyon ve oluğa bağlanma olarak üç farklı şekilde olmaktadır.

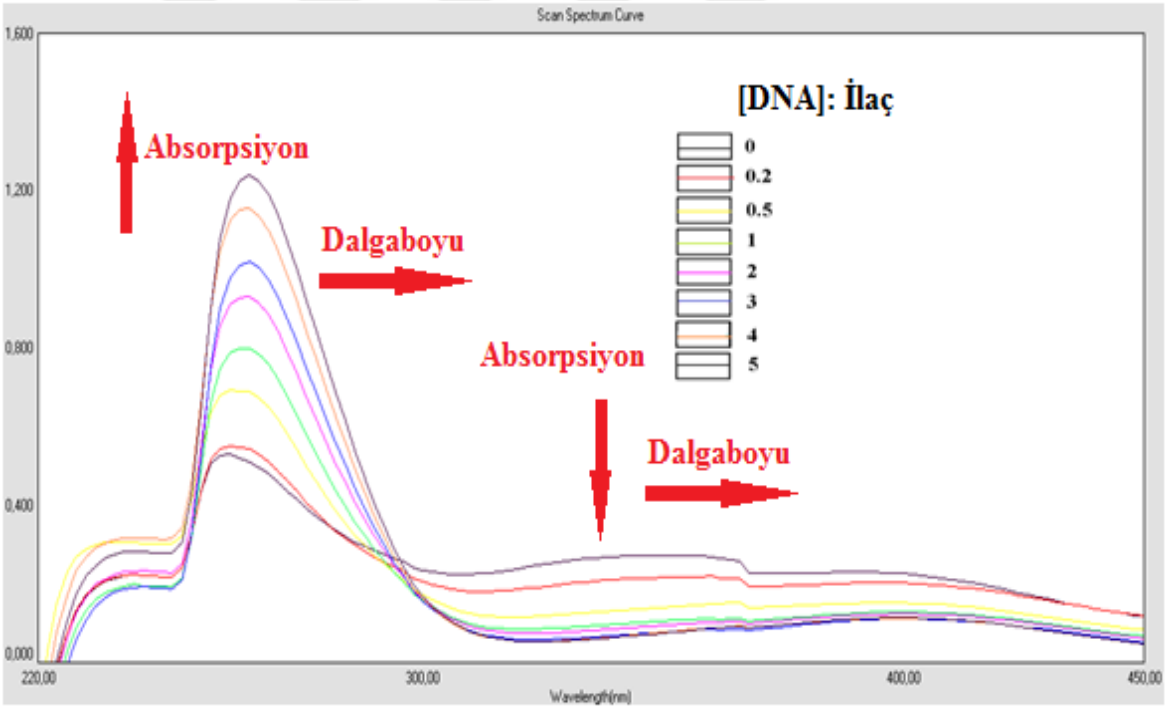
Bileşik 1'in UV-Vis spektrumu incelendiğinde, kademeleri olarak eklenen CT-DNA konsantrasyonu ile absorbans şiddetindeki değişimin hiperkromizm yönünde olduğu görülmektedir (Şekil 4.2). Bileşik de %384 hiperkromizm ve 258 nm'de ki absorpsiyonda 2 nm batokromik (kırmızıya) kayma gözlenmiştir. Bu veriler Bileşik 1'in CT-DNA ile elektrostatik olarak etkileştiğini göstermektedir.

Bileşik 2'nin UV-Vis spektrumu incelendiğinde, CT-DNA konsantrasyonunun artışıyla absorbans şiddetindeki değişimin 260 nm'de hiperkromizm, 340 nm'de ise hipokromizim olduğu görülmektedir (Şekil 4.3). Bileşik de %231 hiperkromizm, %90 hipo kromizim ve 260 ile 340 nm'de ki absorpsiyonlarda 1-4 nm batokromik (kırmızıya) kayma gözlenmiştir. Bu sonuç Bileşik 2'de hem elektrostatik, hemde interkalatif olarak etkileşmenin olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak her iki bileşiğin CT-DNA ile etkileştiği bulunmuştur (Qiao ve ark., 2011; Yıldız ve ark., 2015a; Haribabu ve ark., 2015).



Şekil 4.2. Bileşik 1'in UV-Vis absorpsiyon titrasyonu



Şekil 4.3. Bileşik 2'nin UV-Vis absorpsiyon titrasyonu

Bileşik ve DNA arasındaki etkileşim elektrostatik olduğunda, DNA yapısında ve konformasyonunda meydana gelen değişiklikler hiperkromik etki olarak gözlemlenir. Hiperkromik etki, DNA'nın denatürasyonu üzerinde absorbansındaki artış olarak bilinmektedir. DNA'nın çift sarmal yapısı, istiflenme etkileşimi hidrojen bağları ve komplementer bazlar arasındaki hidrofobik etkileşimler ile bir arada tutulmaktadır. DNA

çift sarmal denatüre ajanlar ile muamele edildiğinde, yapıyı bir arada tutan bu etkileşimlerin kuvveti bozulur ve çift sarmal yapı rastgele olarak sarmal yapıya dönüşmüş iki zincire ayrılır. Bu anda, baz-baz etkileşimi azalır, serbest formdaki bazlar ve komplementer bazlar arasında hidrojen bağları oluşmaması sebebiyle DNA çözeltisi UV absorbansı artar. Bundan dolayı, tek zincir DNA konsantrasyonu, aynı konsantrasyondaki çift zincir DNA' dan % 40 daha yüksek olur (Erer, 2015).

Bileşiklerin DNA'ya interkalasyonla bağlandığı durumlarda genellikle hipokromizm ve batokromizm meydana gelir. Çünkü interkalatif bağlanma, aromatik kromofor grup ile DNA baz çiftleri arasında istiflenme etkileşimi içerir. DNA'ya bağlanan bileşikler arasındaki uzaklığın azalması, hipokromizmi meydana getirir. Bu nedenle de DNA bazlarının π elektronları ile bileşiğin π elektronlarının kombinasyonu orantılıdır. Sonuç olarak $\pi \rightarrow \pi^*$ geçiş enerji seviyesinin azalması kırmızıya kaymaya sebep olur. Bu da hipokromik etkiye katkıda bulunur (Erer, 2015).

Yıldırım (2016), Schiff bazı ligandları (L1 ve L2) ve bu ligandların komplekslerinin (Cu, Ni, Fe, Co ve Mn) DNA bağlanma aktivitesini CT-DNA kullanarak UV-Vis metodu ile gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak L1-Cu, L2-Fe ve L2-Cu komplekslerinin yaklaşık 260 nm maksimum absorbans şiddeti göstererek DNA'ya kısmi interkalatif olarak Ligandların ve diğer komplekslerin ise DNA ile interkalatif olarak etkileştiği bildirilmiştir.

Akkan (2016), Schiff bazı ligandlarını (L1 ve L2) UV-Vis metodu kullanarak DNA'ya bağlanma özelliğini incelemiştir. Bunun için CT-DNA kullanmıştır. Çalışma sonucunda ligand 1'in interkalatif olarak bağlandığını ligand 2'nin ise kısmi interkalatif olarak bağlandığını tespit etmiştir.

Yıldız ve arkadaşları (2015b), Schiff bazı ligandı ve bu ligandın Mn kompleksinin DNA bağlanma aktivitesini CT-DNA kullanarak UV-Vis metodu ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda ligandın hem elektrostatik hemde interkalatif olarak kompleksin (Mn) ise sadece elektrostatik olarak CT-DNA ile etkileştiği belirlenmiştir.

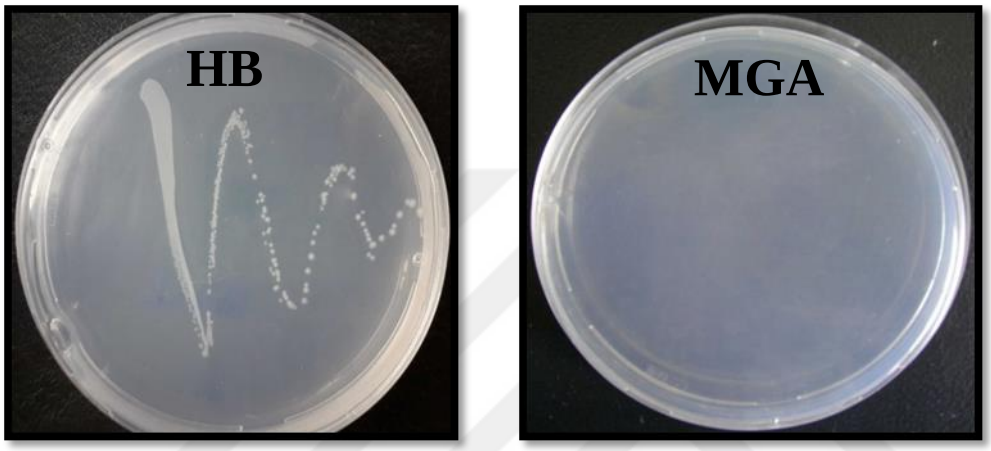
Literatür çalışmalarına baktığımızda bizim çalışmamızla benzer sonuçlar görülmektedir.

4.2. Schiff Bazlarının Mutajenite ve Antimutajenite Özelliklerinin Belirlenmesi

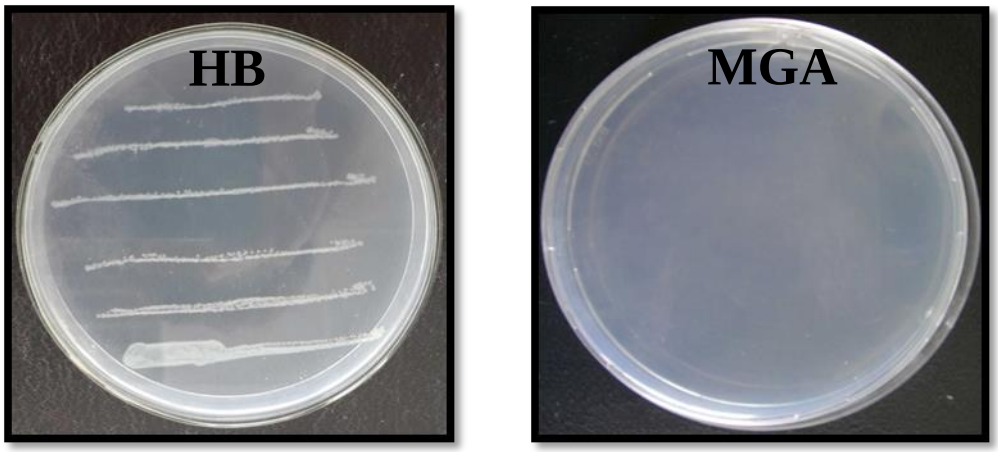
4.2.1. Suşların Genetik Özelliklerinin Kontrolü

4.2.1.1. Suşların Histidin Gereksinimi

Çalışmalarda kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları, MGA plaklarına ve HB agarlara ekim yapılarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında HB plaklarında üreme oluşurken, histidin içermeyen MGA plaklarında üreme oluşmadı. Bu sonuçlar her iki mutant suşunda his^- özellik taşıdığını ispatladı (Şekil 4.4 ve 4.5).



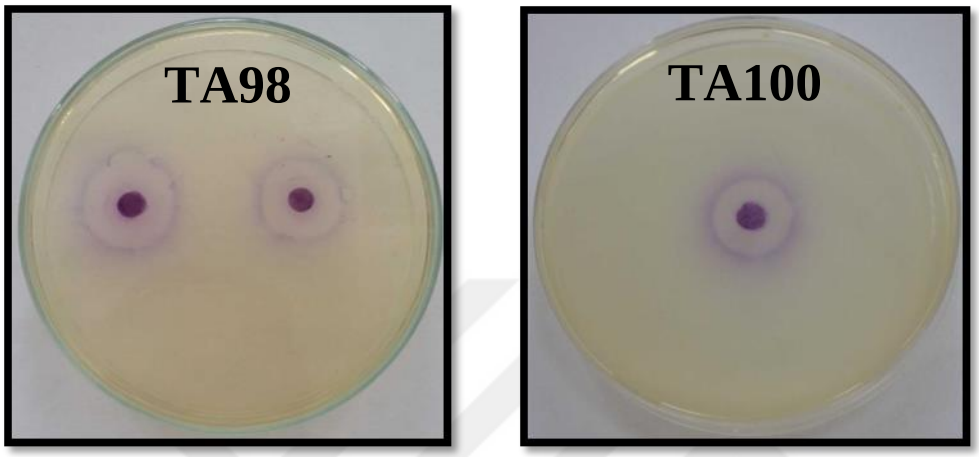
Şekil 4.4. *S. typhimurium* TA98 mutant suşunun HB ve MGA plaklarında üreme varlığı



Şekil 4.5. *S. typhimurium* TA100 mutant suşunun HB ve MGA plaklarda üreme varlığı

4.2.1.2. *rfa* Mutasyonu Kontrolü

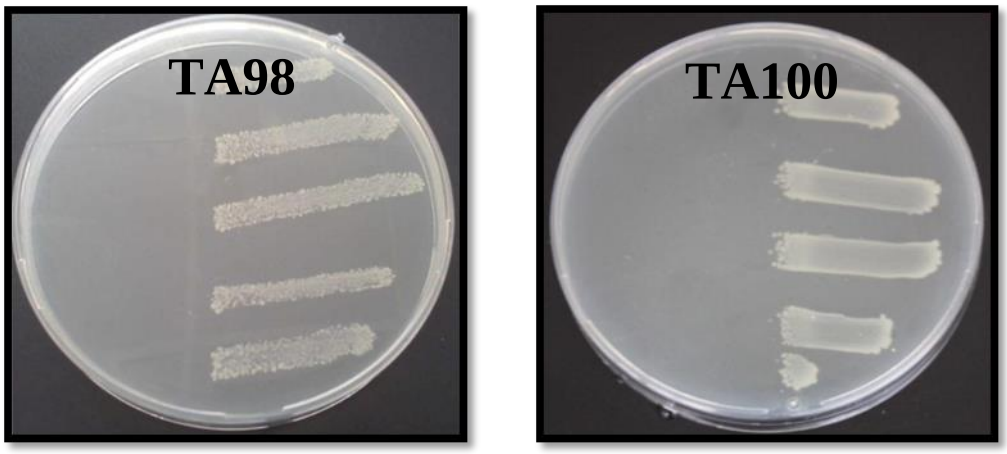
Çalışmada kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarına *rfa* mutasyonu kontrolü kristal viyole hassasiyeti testi ile belirlendi. Test sonucunda, kristal viyole çözeltisi ile muamele edilen disklerin etrafında 14 mm çapta şeffaf bir zon gözlendi. Bu da kullanılan her iki mutant suşun da *rfa* taşıdığını doğruladı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarında kristal viyole hassasiyet testi

4.2.1.3. *uvrB* Mutasyonu Kontrolü

Çalışmada kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarının *uvrB* mutasyonu taşıyıp taşımadıklarını belirlemek amacıyla ultraviyole (UV) hassasiyet testi yapıldı. Test sonucunda her iki mutant suşların petrinin UV'ye maruz kalan kısımlarda üremenin olmadığı ancak plastik bir tabaka ile kapanan bölgede üremenin olduğu saptandı. Böylece kullanılan mutant suşların *uvrB* mutasyonu bulundurduğu kanıtlandı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları *uvrB* delesyon kontrolü

4.2.1.4. R Faktörü Kontrolü

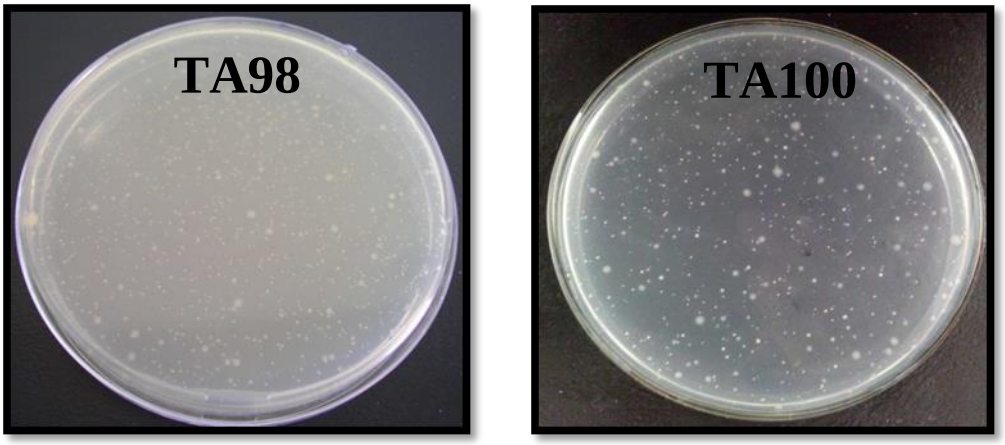
Çalışmada kullanılan *S. typhimurium* mutant suşlarının pKM101 plazmidlerini (ampisilin direnç geni) taşıyıp taşımadığı HBA plaklarında üremesi sonucu ispatlandı (Şekil 4.8).



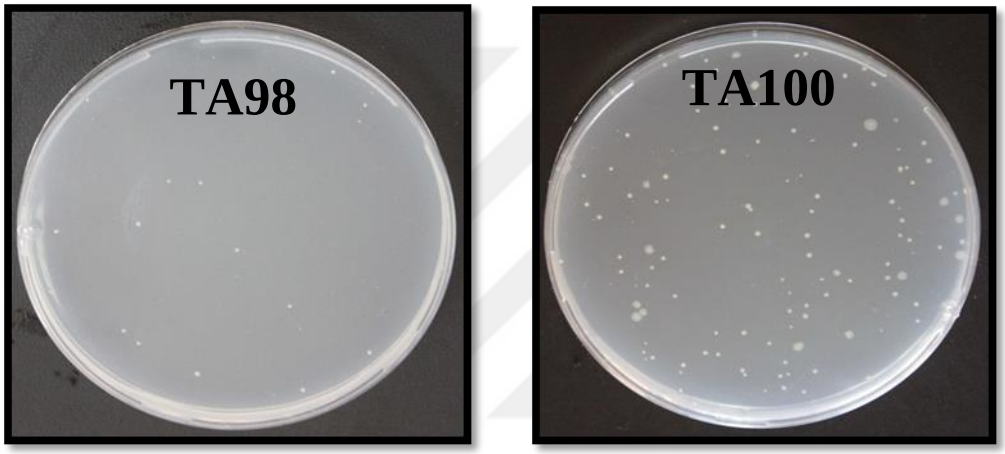
Şekil 4.8. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları R faktörü kontrolü

4.2.2. Schiff Bazlarının Mutajenik Özelliklerinin Sonuçları

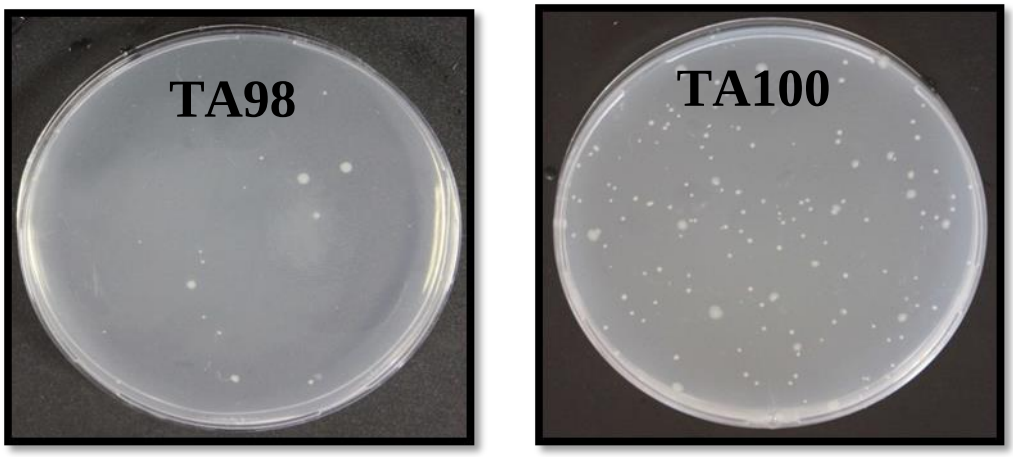
Bu çalışmada, Schiff bazlarının mutajenik özellikte olup olmadıkları, Ames/*Salmonella* test sistemi ile tespit edilmeye çalışıldı. Çalışmada histidin sentezleyemeyen oksotrof suşlar (*S. typhimurium* TA98 ve TA100) kullanıldı ve bu suşların histidini tekrar sentezleyebilir hale gelmesini sağlayan Schiff bazı bileşiklerinin konsantrasyonları belirlenmeye çalışıldı. Bunun belirlenmesi için, histidini yeniden sentezleyebilen (his^+ revertant) kolonilerin sayısı ile negatif kontrol grubu karşılaştırıldı. Negatif kontrolde gözlenen koloni sayısını 2 katına veya daha fazla katına çıkaran ligand, mutajenik sayıldı. Ayrıca geriye dönen bakteri sayısında doza bağlı bir artış olduğunda ise, bu durum zayıf mutajenik etki olarak kabul edildi (Mortelmans ve Zeiger, 2000).



Şekil 4.9. TA98 ve TA100 mutant suşlarının pozitif kontrolü



Şekil 4.10. TA98 ve TA100 mutant suşlarının negatif kontrolü



Şekil 4.11. TA98 ve TA100 mutant suşlarının spontan kontrolü

Çalışmada paralel yürütülen pozitif, negatif ve spontan kontrollerde gözlenen revertant koloni sayısı, daha önce yapılan çalışmalara ve literatüre uygunluk gösterdi (Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11) (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Schiff bazlarının mutajenite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmadan elde edilen veriler Çizelge 4.2, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de verildi.

Test edilen Bileşik 1'in tüm konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 mutant suşunun geri dönen (revertant) koloni sayısı negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, mutajenik özelliğinin olmadığı hatta 50 ppm'lik konsantrasyonun kontrolden daha az geri dönen koloni sayısının olduğu 5ve 500 ppm'lik konsantrasyonun ise kontrolle aynı geri dönen koloni sayısının olduğu saptandı.

Bileşik 2'nin *S. typhimurium* TA98 mutant suşu ile yapılan çalışma sonucunda ise sadece 500 ppm'lik konsantrasyonun kontrolden daha az geri dönen koloni sayısının olduğu diğer konsantrasyonlarının ise kontrolden fazla geri dönen koloni sayısının olduğu ancak kontrolün iki katı ya da daha fazlası olmadığından dolayı hiçbir konsantrasyonun mutajenik özellikte olmadığı tespit edidi.

S. typhimurium TA100 mutant suşu ile test edilen Bileşik 1'in 0.5, 50 ve 500 ppm'lik konsantrasyonlarının geri dönen koloni sayısının kontrolden daha az olduğu diğer konsantrasyonun ise kontrolden fazla olmasına karşın iki katı olmamasından dolayı tüm konsantrasyonlarının baz çifti değişimi tipindeki mutasyona neden olmadığı belirlendi.

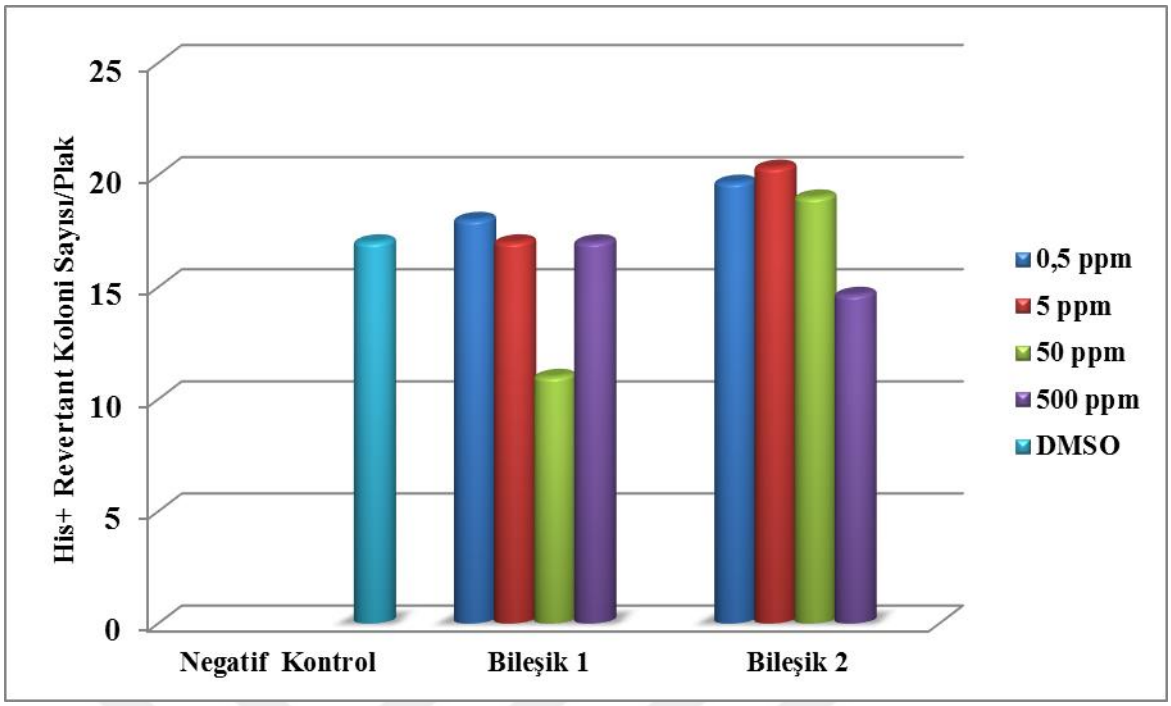
S. typhimurium TA100 suşu ile test edilen Bileşik 2'nin 0.5 ve 50 ppm'lik konsantrasyonlarının geri dönen koloni sayısının kontrolden daha az olduğu saptandı. Bileşiklerin diğer konsantrasyonlarının (5 ve 50 ppm) ise kontrolden fazla olmasına karşın iki katı olmamasından dolayı mutajenik sayılmadı.

Sonuç olarak, her iki bileşiğin tüm konsantrasyonları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında hiçbir konsantrasyonun mutajenik özelliğinin olmadığı belirlendi.

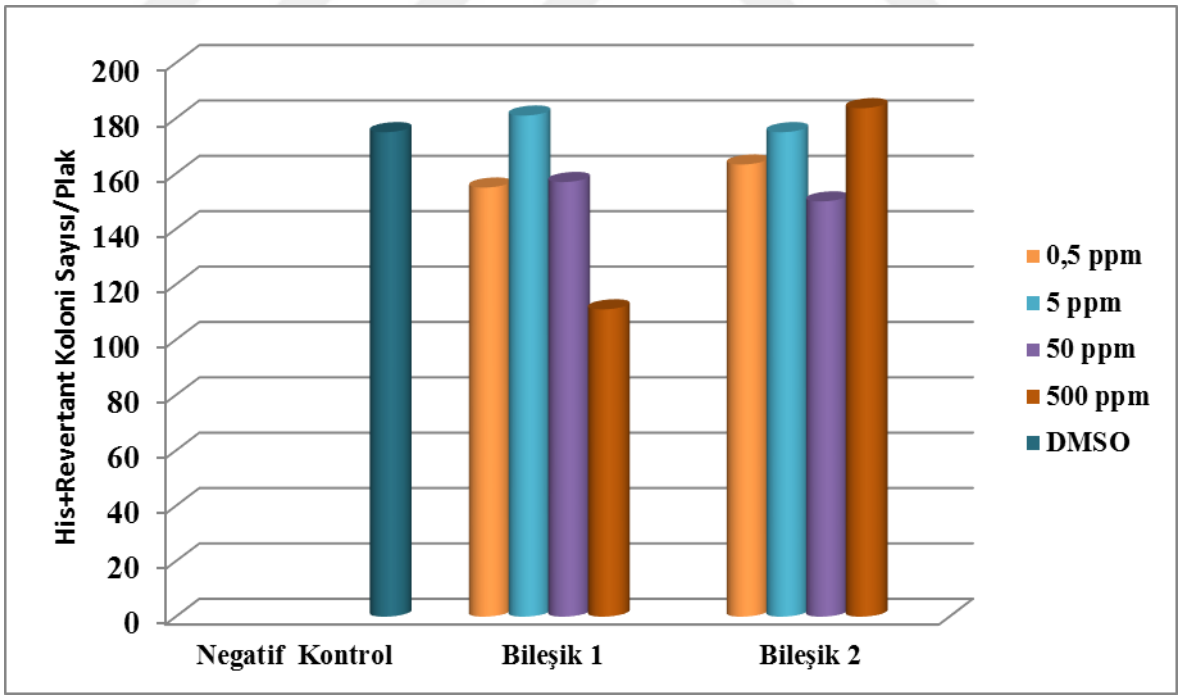
Çizelge 4.2. Schiff bazlarının dört farklı konsantrasyonunun *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşu üzerindeki mutajenik özellikleri

Uygulama		Konsantrasyon (ppm)	His^+ Revertant Koloni Sayısı/Plak	
			TA98	TA100
			Ort±SD	Ort±SD
Bileşik 1		0,5	18,00 ±02,00	155,00±07,00
		5	17,00±02,00	181,00±08,54
		50	15,00±02,64	157,00±37,00
		500	17,00±04,00	111,00±13,52
Bileşik 2		0,5	19,66±00,57	163,33±21,54
		5	20,33±02,51	175,66±15,05
		50	19,00±01,00	150,00±20,00
		500	14,66±01,52	183,66±54,51
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
****DMSO: Dimetil sülfoksit
*****NPD ve SA konsantrasyonu (mg/mL)



Şekil 4.12. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 mutant suşu üzerindeki mutajenik özellikleri



Şekil 4.13. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 mutant suşu üzerindeki mutajenik özellikleri

Soysal 2009 yılında, farklı onbeş adet benzoksazol bileşiğinin mutajenik özellik taşıyıp taşımadığını *Salmonella typhimurium* TA102, TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılarak Ames/*Salmonella* testi ile araştırmıştır. Araştırma sonucunda test edilen onbeş bileşiğin hiçbirinin mutajenik özellik göstermediğini saptamıştır.

Korkmaz ve Mercangöz 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada, 1-etil-2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol ve altı farklı bileşiğinin Ames/*Salmonella* testi ile mutajenik özellik taşıyıp taşımadığını araştırmışlardır. *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarının kullanıldığı test sonucunda sentezlenen bileşiklerin hiçbirinin mutajenik özellik göstermediğini bildirmişlerdir.

Daha önce yapılan bu çalışmalar bizim çalışmamızla aynı sonuçları vermektedir. Bunun nedeni bileşiklerin kimyasal özelliklerinin benzer olmasından kaynaklı olabilir.

Mercangöz ve Tüylü (2000), ilaç etken maddesi olarak kullanılması hedeflenen 2, 4, 5 tri fenil imidazol ve dokuz türevinin mutajenik etkilerini Ames test sistemiyle araştırmışlardır. Sonuç olarak bileşiğin yapısında metoksi grupları (4-metoksi) bulunan imidazol türevlerini *Salmonella typhimurium* TA98 suşunda mutajen bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda ki Bileşik 2'nin yapısında da metoksi bulunmaktadır, ancak *Salmonella typhimirium* TA98 mutant suşunda bu bileşiğin mutajen olmadığı saptanmıştır. Bunun nedeninin metoksi grubunun farklı konumda (6-metoksi) olmasından kaynaklı olabilir.

Yüksel (2005), Benzinidenilin türevlerinin mutajenik etkileri, metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğu olarak Ames/*Salmonella* testi ile belirlenmiştir. Deneyde *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 mutat suşları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda bileşiklerin doza bağlı artışın olduğu bu nedenle zayıf mutajeniteye sahip olduğu Cl bulunduran 4-Kloro benzinidenilinin *Salmonella typhimurium* TA100 (S9'suz) suşunda mutajen olduğunu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara benzememektedir. Bunun nedeni ise bizim bileşiklerin yapısında CI bulunmaması olabilir.

4.2.3. Schiff Bazlarının Antimutajenik Özelliklerinin Sonuçları

Çalışmada Schiff bazlarının antimutajenik özelliğe sahip olup olmadıkları mutajenik aktivitede olduğu gibi Ames testi ile tespit edildi. Bu amaçla, Schiff bazlarının antimutajenik özelliklerin çalışmaları mutajenik özellikte olduğu gibi *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları ile yapıldı. Çalışmalara paralel olarak pozitif, negatif ve spontan kontroller de yapıldı. Pozitif kontrolde TA98 mutant suşu için NPD, TA100 mutant suşu için ise SA kullanıldı. Değerlendirme pozitif kontrol ile his^+ revertant kolonilerin sayısının karşılaştırılması ile gerçekleştirildi.

Schiff bazlarının antimutajenik aktivite çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.3, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verildi.

Test edilen Bileşik 1'in *S. typhimurium* TA98 suşu ile yapılan çalışma sonucunda, tüm konsantrasyonlarının güçlü antimutajenik etki gösterdiği belirlendi. Bileşik 2'nin *S. typhimurium* TA98 suşu ile yapılan çalışma sonucunda ise sadece 50 ve 500 ppm'lik konsantrasyonların yüksek inhibisyon oranı gösterdiği (sırasıyla %49,70 ve %44,11) ve güçlü antimutajenik etkisi olduğu, 5ppm'lik konsantrasyonunun orta dereceli antimutajenik etkisi (%29,81) olduğu ve 0.5 ppm'lik konsantrasyonunun ise antimutajenik etkisi olmadığı belirlendi.

S. typhimurium TA100 suşu ile test edilen Bileşik 1'in 50 ve 500 ppm'lik konsantrasyonlarının (sırasıyla %45,00 ve %51,11) güçlü antimutajenik aktiviteye, 0.5 ve 5 ppm'lik konsantrasyonlarının ise orta dereceli antimutajenik aktiviteye (%31,32, %34,65) sahip olduğu saptandı. *S. typhimurium* TA100 suşu ile test edilen Bileşik 2'nin 5, 50 ve 500 ppm'lik konsantrasyonları güçlü antimutajenik aktiviteye (sırasıyla %40,81, %44,96, %58,54); 0.5 ppm'lik konsantrasyonun ise orta dereceli antimutajenik aktiviteye (%38,07) sahip olduğu tespit edildi.

Bulgulara göre her iki bileşiğin artan konsantrasyona bağlı olarak çerçeve kayması mutasyonu ve baz çifti değişimi tipindeki mutasyona karşı yüksek oranlarda koruyucu etkiye sahip oldukları belirlendi.

Çizelge 4.3. Schiff bazlarının dört farklı konsantrasyonunun *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşu üzerinde gösterdiği antimutajenik özellikleri

Uygulama		Konsantrasyon (ppm)	His^+ Revertant Koloni Sayısı/Plak			
			TA98	% İnhibisyon	TA100	% İnhibisyon
			Ort±SD		Ort±SD	
Bileşik 1		0,5	296,66±28,58	46,87	699,66±11,01	31,32
		5	267,33±36,66	52,54	675,33±24,50	34,65
		50	246,00±39,15	56,66	599,66±10,50	45,00
		500	210,00±14,10	63,61	555,00±09,16	51,11
Bileşik 2		0,5	459,00±22,53	15,51	650,33±11,37	38,07
		5	385,66±21,54	29,81	630,33±19,50	40,81
		50	310,00±44,71	44,11	600,00±10,00	44,96
		500	286,00±06,55	49,70	500,66±09,60	58,54
Pozitif Kontrol	NPD	10^{-2}	539,33±24,78			
	SA	10^{-3}			928,66±09,01	
Negatif DMSO Kontrol			29,33±02,51		200,00±01,34	
Spontan Kontrol			21,66±02,08		197,66±02,51	

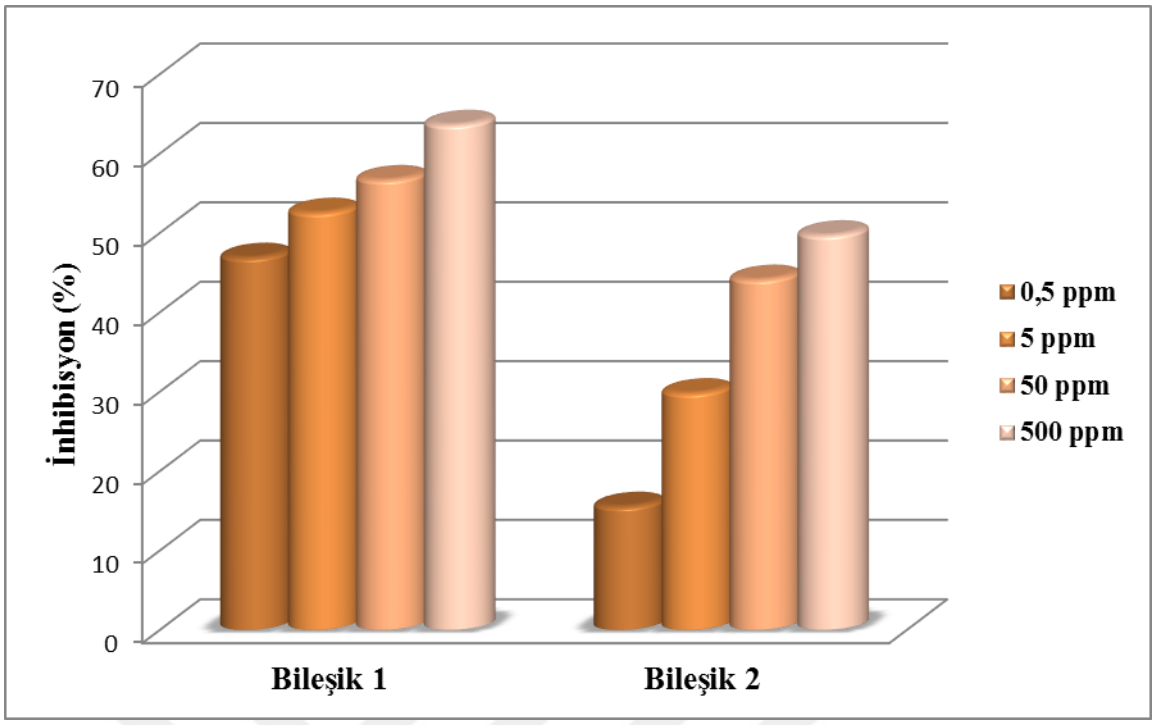
*Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

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

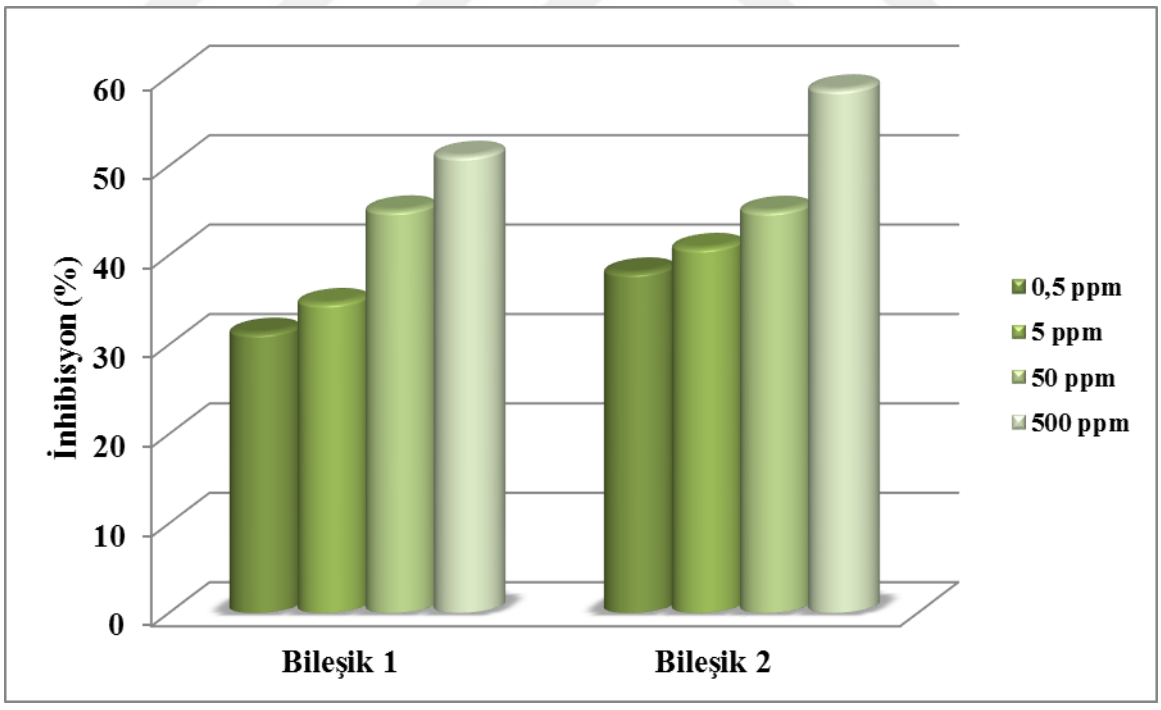
***SA: SodiumAzid

****DMSO: Dimetil sülfoksit

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



Şekil 4.14. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik özellikleri



Şekil 4.15. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik özellikleri

Günümüzde, kanserin mutasyonların birikimi sonucu meydana geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte, Ames/*Salmonella* testi gibi kısa zamanlı bir genetik test mutajenleri/kanserojenleri veya antimutajenleri/antikanserojenleri belirlemek için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Rausher ve ark., 1998). Antimutajenik özelliğe sahip maddeler, çevresel mutajenlerin sebep olduğu genetik hasarı önlemeye yardımcı olmaktadırlar. Bu çevresel mutajenlere içecek, yiyecek ve ilaçlarla aldığımız kimyasallar da dahildir (Lakashmi ve ark., 2003).

Akkan (2016), Glikozamin Schiff bazlarını Ames testi ile *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarını kullanarak antimutajenite özelliklerini araştırmıştır. Sonuç olarak ligandların farklı konsantrasyonlarda farklı antimutajenik özellik gösterdiğini bildirmiştir.

Geren 2015 yılında, 2-hidroksi Schiff bazı ligandları ve metal komplekslerinin antimutajenite özellikleri Ames testi ile *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarını kullanarak incelemiştir. İnceleme sonucunda test edilen ligandların ve komplekslerinin TA98 ve TA100 mutant suşları üzerinde konsantrasyondan bağımsız olarak güçlü antimutajenik özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir.

Koçer (2012), likenden izole edilmiş Schiff bazı türevleri (L1-L3) ve bu ligandların komplekslerinin (Co, Mn, Ni, Cu) antimutajenite özellikte olup olmadıkları *S. typhimurium* TA1537 ve TA1535 mutant suşları kullanılarak Ames/*Salmonella* testi ile belirlemişlerdir. Sonuç olarak tüm maddelerin antimutajenik etki gösterdiği özellikle de Mn ve Co komplekslerinin diğerlerine göre daha etkili antimutajenik özellik gösterdiği saptanmıştır.

Bazı Schiff bazlarının antimutajenik özelliklerini belirleyebilmek için *in vitro* İnsan Lenfosit Hücre Kültürü yöntemi ve MN Testi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda Schiff bazlarının antimutajenik özelliklerinin dozlara bağlı olduğu ortaya çıkmıştır (Şakiyan ve ark., 2013).

Ames/*Salmonella* testi ile yaptığımız çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre Schiff bazlarının sahip olduğu antimutajenik özelliğin konsantrasyona bağlı olduğu tespit edildi.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaşadığımız yüzyılda insan sağlığında biyolojik, genetik ve fiziksel yapı gibi etkenlerin yanında çevresel etkilerin de önemli bir yer tuttuğu araştırıcılar tarafından vurgulanmaktadır. Çevremizde biyolojik etkileri henüz bilinmeyen ve sayıları milyonlara varan doğal ve sentetik kimyasal madde bulunmaktadır. Endüstriyel devrimle birlikte çevremizdeki kimyasal maddelerin sayısında önemli bir artış söz konusudur (Somay, 2009).

Bu kimyasal maddeler bugünkü çağdaş yaşamın vazgeçilmez gereksinimi halindedir. Faydalarının yanında, maalesef çeşitli nedenlerden dolayı doğrudan maruz kalma ya da kullanımları sonucu çevreye yayılarak insanlara ve tüm ekosisteme zarar verebilme potansiyeline sahiptirler (Vural, 2005). Çevresel faktörlerin, davranışsal faktörlerin ve diyetin insanlarda kanser oluşumunda %70-90 oranında etkili olduğu tahmin edilmektedir (Klaassen, 2008).

Yüzyılın hastalıkları arasında gösterilen kanserin tedavisi için büyük uğraş veren moleküler biyologlar, biyokimyacılar ve genetik mühendisleri gibi bilim insanları nükleik asitleri hedef alarak çalışmalarını sürdürmektedirler. Bu amaçla DNA/RNA'ya değişik mekanizmalarla bağlanabilen ve spesifik olarak kesebilen küçük organik moleküllerin dizaynı ve sentezine yönelik çalışmalar son otuz yılda odak noktası haline gelmiştir (Sierra ve ark., 2012).

DNA (Deoksiribonükleik asit), hücre canlılığının sürdürülmesinde çok büyük önem taşır. Bu nedenle antiviral, antibiyotik, ve antitümöral ilaçlar için hedef olarak seçilmiştir. Küçük moleküllerin DNA'ya bağlanma çalışmaları, DNA-ilaç etkileşimlerini anlayarak, klinik uygulamalar için daha etkili ve yeni ilaçların geliştirilmesi ve nükleik asit yapılarının duyarlı kimyasal problarının geliştirilmesi alanlarında oldukça kullanışlıdır. Çünkü antibiyotik ve antikanser ilaçlarının hücre içi hedeflerinin büyük bir kısmı DNA'dır (Friedman ve ark., 1992).

Son yıllarda Schiff bazına olan ilgi bu anlamda gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan çalışmalarla Schiff bazlarının antibakteriyel, antifungal, antiülser, antimalaryal, antitümör gibi aktivitelerinin olduğu bildirilmiş ve bundan dolayı da ilaç sanayinde ve tıp alanındaki biyolojik araştırmalarda kullanılması bu bazlara olan ilgiyi arttırmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, iki farklı Schiff bazının biyolojik aktiviteleri ve antimutajenik özellikleri araştırıldı. Schiff bazlarının antimikrobiyal aktivitesi broth mikrodilüsyon metodu ile çalışıldı. Çalışmadan elde edilen verilere göre her iki bileşiğin farklı derecelerde antimikrobiyal etkilerinin olduğu saptanmıştır.

Bir ilacın antibakteriyal ya da antifungal aktivitesinin geniş spektrumlu olması, istenilen özelliklerden biridir. Bu nedenle her iki bileşiğin antimikrobiyal aktiviteri daha farklı bakteri suşları, maya suşları ve küflere karşı da değerlendirilebilir.

Schiff bazlarının DNA kesme aktivitesi hidrolitik ve oksidatif olmak üzere iki farklı şekilde agaroz jel elektroforezi yöntemi ile çalışıldı. Çalışma sonucunda her iki bileşiğin de hidrolitik olarak etkili olmadığı, oksidatif olarak DNA'yı kestiği gözlendi. DNA bağlanma sonuçlarından elde edilen verilere göre Bileşik 1'in CT-DNA'ya elektrostatik olarak bağlandığı Bileşik 2'nin ise hem elektrostatik hem de interkalatif olarak etkileştiği tespit edildi.

Bileşik 2'nin DNA kesme ve DNA'ya bağlanma çalışma sonuçları, kanser tedavisinde kullanılabilecek nitelikte olduğunu göstermektedir. Fakat, bileşiğin DNA etkileşim mekanizmalarını daha iyi anlamak ve spesifik olarak kanser tedavilerinde kullanılması amacıyla farklı tekniklerden yararlanılabilir. Bunun için bileşiklerin DNA'ya bağlanma özelliğinin sekansa özgü olması araştırılabilir, *in vitro* kanser hücre hatlarında ve *in vivo* memelilerde çalışılabilir.

Schiff bazlaının mutajenik aktivitesi Ames testi ile incelendi ve sonuç olarak bileşiklerin herhangi bir mutajenik özellikte olmadığı bulundu. Bu bileşikler için bu test sisteminde histidin amino asidinin sentezini düzenleyen gen bölgelerinde baz çifti değişimi ve çerçeve kayması mutasyonuna neden olmadığı söylenebilir.

Schiff bazlarının antimutajenik aktivitesini mutajenik aktivitede olduğu gibi Ames testi ile incelendi. İnceleme sonucunda her iki bileşiğin doza bağlı olarak güçlü antimutajenik aktivitesinin olduğu saptandı. Bileşiklerin hem baz çifti değişimi mutasyonunu hemde çerçeve kayması mutasyonunu engellediği saptandı.

İnterkalasyon yapan ilaçlar geniş çapta antitümör, antineoplastik, antifungal ve antibakteriyal ilaçların hepsi olmasa da tüm inretkalatörler genotoksik etki göstermezler (Snyder, 2007). Mutajenik çalışma sonucunda interkalasyon yapan Bileşik 2'nin genotoksik etki göstermediği saptandı.

Mutajenite ve antimutajenite sonuçları değerlendirildiğinde mutasyonlarla ilişkilendirilen başta kanser olmak üzere, kronik inflamasyon, artrit, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer hastalıklarının gelişimi ve yaşlanma süreci gibi pek çok hastalığın önlenmesine yönelik yapılacak ileriki çalışmalar için ön bilgi olabilecek nitelikletedir.

Ancak bir bileşiğin Ames testinde mutajenik ya da antimutajenik sonuç vermesi insan ya da diğer memeliler de mutajenik ya da antimutajenik denilemez. Bakteriyel mutasyonun pozitif olması ya da negatif olması, bileşiğin potansiyel zararı veya yararı hakkında bir ön uyarı anlamı taşır. Bundan dolayı bileşiklerin mutajenik ve antimutajenik özelliklerini daha iyi anlayabilmek için *in vitro* memeli hücreleri ve *in vivo* memeli test sistemleriyle çalışılabilir.

Sonuç olarak çalışmadan elde edilen verilerin hepsi değerlendirildiğinde medikal alanında yapılacak olan diğer çalışmalara faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abdi K., Hadadzadeh H., Weil M., Salimi M., 2012. Mononuclear Copper(II) Complex with Terpyridine and an Extended Phenanthroline Base, $[Cu(Tpy)(Dppz)]^{2+}$: Synthesis, Crystal Structure, DNA Binding and Cytotoxicity Activity. Polyhedron 31 (1): 638-648.

Abu-Youssef M.A.M., Soliman S.M., Langer V., Gohar Y.M., Hasanen A.A., Makhyoun M.A., Zaky A.H, Ohrstrom L.R., 2010. Synthesis, Crystal Structure, Quantum Chemical Calculations, DNA Interactions, and Antimicrobial Activity of [Ag(2-Amino-3 Methylpyridine)2]NO_3 and [Ag(Pyridine-2-Carboxaldoxime)NO_3]. Inorganic Chemistry, 49: 9788–9797.

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.

Akı C., 2007. Genel Genetik (4. Baskı). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Teksirleri Serisi No:1, Çanakkale. 60-62.

Akkan F.R., 2016. Glikozamin Bileşiklerinin Animikrobiyal ve Antimutajenik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.

Alekshun M.N,. 2007. Levy S.B., Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Cell, 128 (6): 1037-1050.

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.

Amin R., Krammer B., Kader N.A., Verwanger T., EL-Ansary A., 2009. European Journal of Medicinal Chemistry, 1-7.

Anastassopoulou J., 2003. Metal-DNA Interactions. Journal of Molecular Structure, 651-653: 19-26.

Andrews N.M., 2001. Determinations of Minimum Inhibitory Concentrations. Journal of Antimicrobial Chemothreaphy, 48 (S1): 5–16.

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. Plasmid Vector pBR322 and its Special-Puppose Derivatives-A review. Gene, 50 (1-3): 3-40.

Baraldi P.G., Bovero A., Fruttarolo F., Preti D.,Tabrizi M.A., Pavani M.G., Romagnoli R., 2004. DNA Minor Groove Binders as Potential Antitumor and Antimicrobial Agents, Medicinal Research Reviews, 24 (4): 475-528.

Bhattacharya S., 2011. Natural Antimutagens: A Review. Research Journal of Medicinal Plant, 5 (2): 116-126.

Birbiçer N., 1998. Suda Çözünülebilir Boyar Maddelerin Metal Komplekslerinin Sentezi ve Boyar Madde Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye.

Blanco Jerez L.M., Rangel Oyervides L.D., Gómez A., Jiménez-Pérez V.M., Muñoz-Flores B.M., 2016. Electrochemical metallization with Sn of (E)-4-((4-nitrobenzylidene)amino)phenol in Non-aqueous Media: Characterization and Biological Activity of the Organotin Compound, International Journal of Electrochemical Science, 11: 45-53.

Bulut D.C., 2014. Bazi Pirazol–3- Karboksilli Asit Türevlerinin Biyolojik Aktiviiteleri ve DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye.

Carrier A., Le Ber P., Auclair C,. 1990. Spin-Labeled Oxazolopyridocarbazole as A Probe for Studying Nonintercalating DNA Groove Binding Ligands. Biochemistry, 29 (25): 6002-6009.

Chitrapriya N., Mahalingam V., Zeller M., Lee H., Natarajan K., 2010. Synthesis, Characterization, DNA Binding and Cleavage Studies of Ru(II) Complexes Containing Oxime Ligands. Journal of Molecular Structure, 984 (1-3): 30-38.

Clausen-Schaumann H., Rief M., Tolksdorf C., Gaub H., 2000. Mechanical Stability of Single DNA Molecules, Biophysical Journal, 78: 1997-2007.

Çeken B., 2005. Sentetik Maddeler ile DNA Kesimi.Yüksek Lisans Tezi. Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, Türkiye.

Dahm R., 2005. Friedrich Miescher and the Discovery of DNA, Developmental Biology 278: 274-288.

Dann O., Lang S., Lurding G., Pfeifer W., Bergen G., Fernbach R., Demant E., 1979. Trypanocidal Diamidines with 3 Rings in 2 Isolated Ring-Systems, Annalen Der Chemie-JustusLiebig, vol. 760, no. Jun-J, 37-40.

De Flora S., Ramel C., 1988. Mechanisms of Inhibitors of Mutagenesis and Carcinogenesis. Classification and Overview. Mutation Research, 202: 285-306.

Durusoy M., Kambur S., 2003. The application of the UMU test system for screening mutagenicity of surface water. Turkish Journal of Biochemistry, 28 (1): 3-7.

El-Sayed W.M., Hussin W.A., Al-Faiyz Y.S., Ismail M.A., 2013. The Position of İmidazopyridine and Metabolica Activation are Pivotal Factors in the Antimutagenic Activity of Novel İmidazo[1,2-a]. European Journal of Pharmacology, 715: 212-218.

Emami S., Falahati M., Banifatemi A., Shafiee A., 2004. Stereoselective Synthesis and Antifungal Activity of (Z)-trans-3-azolyl-2-methyl Chromanane Oxime Ethers. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12 (22): 5881-5889.

Erer O., 2015. Donör Azot Atomlu Yeni 2-Sübstitüe 1,2,3- Triazol N-Oksit Ligandlar ve Ni(II)Kompleksleri: Sentez, Karakterizasyon ve DNA Etkileşimleri. Yüksek Lisans Tezi. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, Türkiye.

Feil R., Metzger D., 2007. Conditional Mutagenesis: An Approach to Disease Models. Springer No: 178, 500 p, Heidelberg, Germany.

Frederick C.A., Williams L.D., Ughetto G., van der Mare, G.A., van Boom J.H., Rich A., Wang, A.H.-J., 1990. Structural Comparison of Anticancer Drug-DNA Complexes: Adriamycin and Daunomycin. Biochemistry. 29: 2538-2549.

Friedman A.E., Chamborn J.C., Sauvage J.P., Turro N.J., Barton J.K., 1992. Novel Dipyridophenazine Complexes of Ruthenium(II): Exploring Luminescent Reporters of DNA. Journal of the American Chemical Society, 114: 5919-5925.

Gatehouse D.G., Rowland I.R., Wilcox P., Callander R.D. ve Foster R., 1990. Basic

Mutagenicity Ukems Recommended Procedures. In: Kirkland, D.J., Ed. Bacterial Mutation Assay. The Bath Press, Avon, Great Britain, UK.

Geren E., 2015. Bazı İmin Bileşiklerinin Antimutajenik Aktivitelerinin Ames Testi Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.

Göçmen E., 2014, Bazı Tek ve Çift Dişli Tersiyer Fosfin Ligantları İçeren Yeni Gümüş(I) Sakkarinat Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu, Yapıları, DNA Bağlanma ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi, Bursa, Türkiye.

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, 139 p.

Gunal S., Kaloglu N., Özdemir I., Demir S., Özdemir I. 2012. Novel Benzimidazolium Salts and Their Silver Complexes: Synthesis and Antibacterial Properties. Inorganic Chemistry Communications, 21: 142-146.

Gürbüz N., 2006. Antimutagens and Anticarcinogens (Cancer Chemopreventıon): Medical Education. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 26 (3): 312-8.

Gürcan N., 2014. Ferrosen Aktif Birimi İçeren Yeni Azin Türevlerinin DNA Bağlanma, DNA Kesim ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye.

Hajian R., Shams N., Mohagheghian M., 2009. Study on the Interaction between Doxorubicin and Deoxyribonucleic Acid with the Use of Methylene Blue as a Probe, Journal of the Brazilian Chemical Society, 20 (8): 1399-1405.

Hardison R.C., 2005. Mutation and Repair of DNA. In: Working with Molecular Genetics, 21 Mayıs 2012, http://www.personal.psu.edu/rch8/workmg/RepairDNACh7.pdf.

Haribabu J., Jeyalakshmi K., Arun Y., Bhuvanesh N. S. P., Perumal P. T., Karvembu R., 2015. Synthesis, DNA/protein Binding, Molecular Docking, DNA Cleavage and *in vitro* a Anticancer Activity of Nickel(II) bis(thiosemicarbazone) Complexes. RSC Advances, 5: 46031-46049.

Hong C.E. ve Lyu S.Y., 2011. Genotoxicity Detection of Five Medicinal Plants in Nigeria. The Journal of Toxicological Sciences, 36 (1): 87-93.

Hopkins A.L., Bickerton G.R., Carruthers I.M., Boyer S.K., Rubin H., Overington J.P., 2011. Rapid Analyses of Pharmacology for Infectious Diseases, Current Topics in Medicinal Chemistry, 11: 1292-1300.

Isenberg H.D., 1998. Essential Procedures for Clinical Microbiology. American Society for Clinical Microbiology, Washingtoon DC, 126-223.

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.

Josephy P.D., Gruz P., Nohmi T., 1997. Recent Advences in The Construction of Bacterial Genotoxicity Assays. Mutation Research, 386: 1-23.

Kasabe A., Mohite V., Ghodake J., Vidhate J., 2010. Synthesis, Characterization and Primary Antimicrobial, Antifungal Activity Evaluation of Schiff bases of 4-Chloro-(3-substitutedphenylimino) - methyl-[2H] - chromene-2-one. E-Journal of Chemistry, 7(2): 377-382.

Kimko H.C., Cross J.T., Abernethy D.R., 1999. Pharmacokinetics and Clinical Effectiveness of Methylphenidate. Clinical Pharmacokinetics, 37 (6): 457-470.

Kiran T., Prasanth V.G., Balamurali M.M., Vasavi C.S., Munusami P., Sathiyanarayanan K.L., Pathak M., 2015. Synthesis, Spectroscopic Characterisation and *in vitro* Studies of New Heteroleptic Copper(II) Complexes Derived from 2-hydroxy Napthaldehyde Schiff's Bases and N, N Donor Ligands: Antimicrobial, DNA Binding and Cytotoxic Investigations. Inorganica Chimica Acta, 433: 26-34.

Klaassen C.D., 2008, Casarett and Doulls's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7nd edition, McGraw-Hill Com. 362 p.

Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A., 2011. Genetik Kavramlar, 8. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 677 s.

Koçer S., 2012. Liken Metaboliti Usnik Asitin Bazı Aril -Aminofenoller ile Schiff bazları Türevleri ve Metal Komplekslerinin Sentezi Antimutajenik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis, Türkiye.

Kong D. M., Wang J., Zhu L. N. Jin J. W., Li X. Z., Shen H. X., Mi H. F., 2008. Oxidative DNA Cleavage by Schiff Base Tetraazamacrocyclic Oxamido Nickel(II) Complexes. Journal of Inorganic Biochemistry, 102: 824-832.

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.

Kostova I., 2006. Platinum Complexes as Anticancer Agents, Recent Patents Anticancer Drug Discovery, 1: 1-22.

Krugh T.R, Reinhardt C.G., 1975. Evidence for Sequence Preferences in the Intercalative Binding of Ethidium Bromide to Dinucleoside Monophosphates, Journal of Molecular Biology, 97: 133-162.

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.

Kumar D., Sathis Ibrahim Sheriff A.K., 2016. Synthesis, Characterization, Antibacterial Activity and DNA Cleavage Studies of Schiff Base Co(II)Transition Metal Complexes. Research Journal of Chemical Sciences, 6 (2): 1-9.

Kumar S., Pandya P., Gupta S.P., Chopra A., 2012. Structural Studies on Ligand- DNA Systems: A Robust Approachin Drug Design. Journal of Biosciences, 37 (3): 553-561.

Lakashmi B., Ajith T.A., Jose N. ve Janardhanan K.K., 2003. Antimutagenic Activity of Methanolic Extract of *Ganoderma lucidum* and Its Effect on Hepatic Damage Caused by Benzo[a]Pyrene. Journal of Ethnopharmacology, 19: 297-303.

LarsenT.A., Goodsell D.S., Cascio D., Grzeskowiak K., Dickerson R.E., 1989. The Structure of DAPI Bound to DNA, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 7 (3): 477-491.

Lelie D., Regniers L., Borremans B., Provoost A., Verschaeve L., 1997. The VİTOTOX Test, An SOS Bioluminescence *Salmonella typhimurium* Test to Measure Genotoxicity Kinetics. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 389 (2-3): 279-290.

Lerman L.S., 1961. Structural Considerations in The Interaction of DNA and Acridines journal of Moleculer Biology, 3:18-30.

Levene P., 1919. The Structure of Yeast Nucleic Acid. The Journal of Biological Chemistry, 40 (2): 415–24.

Levin D.E., Ames B.N., 1986. Classifying Mutagens as to Their Specifity in Causing the Six Positive Transitions, Transversions a Simple Analysis Using the Mutagenity Assay, Enur. Mutagenesis, 8: 9-28.

Maheswari, P.U., Barends S., Ozalp Y.S., De Hoog P., Casellas H., Teat S.J., 2007. Unique Ligand-Based Oxidative DNA Cleavage by Zinc(II) Complexes of Hpyramol and Hpyrimol, ChemistrY -A European Journal, 13: 5213-5222.

Maron D.R., Ames B.N., 1983. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test, Mutation Research, 113: 173-215.

Mercangöz A., Tüylü B., 2000. 2,4,5 Tri (Sübstitüe) Fenil Imidazol ve Türevlerinin Mutajenik Etkilerinin Ames/*Salmonella* Test Sisteminde Saptanması, Turkish Journal of Biology, 24: 57-64.

Metzler C.M., Cahil A., Metzler D.E., 1980. Equilibriums and Absorption Spectra of Schiff bases, Journal of the American Chemical Society, 102 (19): 6075-6082.

Miescher F., 1871. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. Medicinisch-chemische Untersuchungen, 4: 441-460.

Migliore L., ve Coppede F., 2002. Genetic and Environmental Factors in Cancer and Neurodegenerative Diseases. Mutation Research, 512: 135-153.

Mitscher L.A., Drake S., Gollapuri S.R., Harris J.A., Shankel D.M., 1986. Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms. Plenum Press, New York, 153.

Mortelmans K., Zeiger E., 2000. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay,

Mutation Research, 455: 29-60.

Murthy A.S.N., Reddy A.R., 1981. Electronic Absorption Spectroscopic Studies of Enolimine-ketoamine Equilibria in Schiff Bases. Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Chemical Sciences, 90: 519.

Neidle S., Abraham Z., 1984., Structural and Sequence-Dependent Aspects of Drug Intercalation Into Nucleic Acid, Critical Reviews in Biochemistry, 17: 73-121.

Neves A., Terenzi H., Homer R., 2001. Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by A Dinuclear Iron(III) Complex. Inorganic Chemistry Communications, 4: 388-391.

Niederhoffer E.C., Timmons J.H., Martel A.G., 1984. Thermodynamics of Oxygen Binding in Natural and Synthetic Dioxygen Complexes. Chemical Reviews, 84-137.

Oforka N.C., Mkpenie V.N., 2007. A new method of synthesis of azo Schiff base ligands with azo and azomethine donors: Synthesis of N-4-methoxybenzylidene-2-(3-hydroxyphenylazo)-5-hydroxyaniline and its Nickel(II) Complex. Chinese Journal of Chemistry, 25: 869-871.

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.

Öztürk N.S., 1998. Değişik Piridin Aldehitler ile çeşitli Anilinlerden Türeyen Schiff Bazlarınınn Sentezi ve Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin Hazırlanması, Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

Paolini M., ve Forti G.C., 1997. On The Metabolizing Systems for Short-Term Genotoxicity Assays A Review. Mutation Research, 387: 17-34.

Pierce B.A., 2003. Genetics A Conceptual Approach. 4th ed, W.H. Freeman & Company Publishers, USA, 234-265.

Pil P., Lippard S.J., 1997. In Encyclopedia of Cancer; Bertino, J. R., Ed.; Academic Press: San Diego, Vol. 1, 392-410.

Ponnuswamy P.K., Gromiha M. M., 1994. On the conformational stability of folded proteins. Journal of Theoretical Biology, 166: 63-74.

Portugal H.F., Cohen S.J., 1977. A Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance. Cambridge, Massachusetts: MIT Baskı, 384 p.

Qiao X., Ma Z.Y., Xie C.Z., Xue F., Zhang Y.W., Xu J.Y., Qiang Z.Y., Lou J.S., Chen G.J., Yang S.P., 2011. Study on Potential Antitumor Mechanism of a Novel Schiff Base Copper (II) Complex: Synthesis, Crystal Structure, DNA Binding, Cytotoxicity and Apoptosis Induction Activity. Journal of Inorganic Biochemistry, 105: 728-737.

Rausher R., Edenharder R. ve Platt K.L., 1998. *In viitro* Antimutagenic and *in vivo* Anticlastogenic Effects of Carotenoids and Solvent Extracts from Fruits and Vegetables Rich in Carotenoids. Mutation Research, 413: 129-142.

Rice L.B., 2006. Unmet Medical Needs in Antibacterial Therapy. Biochemical Pharmacology, 71 (7): 991-995.

Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H., Danno, G. I. (1995). Luteolin: A Strong Antimutagen Against Dietary Carcinogen, Trp-P-2, in Peppermint, Sage and Thyme. Journal of Agricultural and Food, 43, 400-414.

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.

Shahabadi N., Kashanian S., Mahdavi M., Sourinejad N., 2011. DNA Interaction and DNA Cleavage Studies of a New Platinum(II) Complex Containing Aliphatic and Aromatic Dinitrogen Ligands. Bioinorganic Chemistry and Applications Volume. DOI:10.1155/2011/525794.

Sierra S., Duskova K., Fernández M.J., Gude L., Lorente, A., 2012. One-Step Template-Directed Synthesis of Acridine-Based Rigid Cyclophanes. Tetrahedron, 68: 8773-8782.

Sirajuddin M., Ali S., Badshah A., 2013. Drug–DNA Interactions and Their Study by UV–Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 124: 1-19.

Sisecioglu M., Uguz M.T., Çankaya M., Özdemir H., Gülçin İ., 2011. Effects of Ceftazidime Pentahydrate, Prednisolone, Amikacin Sulfate, Ceftriaxone Sodium and Teicoplanin on Bovine Milk Lactoperoxidase Activity. International Journal of Pharmacology, 7: 79-83.

Słoczyńska K., Powroźnik B., Pękala E., Waszkielewicz A.M., 2014. Antimutagenic Compounds and Their Possible Mechanisms of Action. Journal of Applied Genetics, 55:273-285.

Snyder R.D., 2007. Assessment of Atypical DNA Intercalating Agents in Biological and in Silico Systems. Mutation Research, 623: 72-82.

Somay T., 2009, İlaç Etken Maddesi Olarak Tasarlanmış Bazı Nitrolu Bilişiklerin Umu-Test Sistemi İle Genotoksik Potansiyellerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye.

Soysal Z., 2009. Bazı Benzoksazol Türevi Bileşiklerin Ames Test Sistemi ile Mutajenik Potansiyellerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye.

Suh D., Chaires J.B., 1995. Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 3: 723-728.

Sumner A.T., 2003. Chromosome and Dieseas. Chromosomes Organization and Function. Blackwell Publishing. Nort Berwick, United Kingdom, 206-227.

Şakiyan I., Anar M., Ogutcu H., Agar G., Sarı N., 2014. Schiff Bases Attached L-glutamine and L-asparagine: First Investigation on Antimutagenic and Antimicrobial Analyses. Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology, 42 (3): 199-204.

Temizkan G.O., 1996. Moleküler Genetik, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, s:281.

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.

Vural N., 2005. Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, s. 1, 42-92.

Waring M.J., 1965. Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. Journal of Molecular Biology, 13: 269-282.

Wataha J.C., 2000. Biocompatability of Dental Casting Alloys: A review. Journal of Prosthetic Dentistry, 83: 223-234.

Weisburger J.H., 2001. Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, from The Past to The Future. Mutation Research, 480-481: 23-35.

Wenwu Q., Yanling Z., Weisheng L., Minyu T., 2000. Synthesis and Infrared and Fluorescence Spectral Properties of Luminescent Terbium and Europium Complexes with Open-chain Carboxylate Crown Ethers, Spectrochimica Acta Part A, 59: 3085-3092.

Yıldırım N., 2016. Bazı Schiff Bazları ve Komplekslerinin DNA'ya Bağlanma Özellikleri ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.

Yıldız M., Karpuz Ö., Zeyrek T.C., Boyacıoğlu B., Dal H., Demir N., Yıldırım N., Ünver H., 2015b. Synthesis, Biological Activity, DNA Binding and Anion Sensors, Molecular Structure and Quantum Chemical Studies of a Novel Bidentate Schiff Base Derived from 3,5-Bis(Triflouromethyl)Aniline and Salicylaldehyde. Journal of Moleculer Structure, 1094: 148-160.

Yıldız M., Tan E., Demir N., Yıldırım N., Ünver H., Kiraz A., Mestav B., 2015a. Synthesis and Spectral, Antimicrobial, Anion Sensing, and DNA Binding Properties of Schiff Base Podands and Their Metal Complexes. Russian Journal of General Chemistry, 85 (9): 2149-2162.

Yüksel S., 2005. Bazı Sübstitüe Benzinidenilin Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin *Salmonella* Mutajenite Testi İle Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.

http://en.wikipedia.org/wiki/Gentamicin

https://pubs.acs.org/cen/coverstory/83/8325/8325cisplatin.html

https://tr.wikipedia.org/wiki/Mutasyon

http://www.wikiwand.comdeTranskriptionsfaktor

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Bahar GÖK

Doğum Yeri: Eyüp / İSTANBUL

Doğum Tarihi: 12.03.1991

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- Devam ediyor)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

Gök B., Aki C., 2016. The Effects of Pesticides on Total Protein Amount and Peroxidase Activity in *Capsicum annuum* L. Varieties, Annals of Biological Research, 7: 25-32.

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

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 Universty Molecular Biology and Genetics Student Congress'16, October 7-9th, 2016, Istanbul-Turkey, p.46.

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 Universty 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, 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., 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-HCI by *Allium cepa* Test. 2nd International Congress of Forensic Toxicology, May 26-30 2016, Ankara - Turkey, p.146.

Gök, B., Demir, N., 2016. Anilin Benziliden Türevlerinin Antimikrobiyal ve Antimutajenite Özelliklerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale, p. 51.

c) Katıldığı Projeler

"Pestisitlerin Farklı Dozlarının *In Vivo* Olarak Yetiştirilen *Capsicum annum* L. Varyetelerinde Enzimatik ve Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi", TÜBİTAK, Tübitak 2209-A, Proje Yürütücüsü, Haziran 2014 - Haziran 2015

İLETİŞİM

E-posta Adresi: bahar.991@hotmail.com