

**YENİ NESİL PLATİN KOMPLEKSLERİNİN KÜTLE
SPEKTROMETRİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ VE
ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN *İN VİTRO* OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF NEW GENERATION PLATINUM
COMPLEXES BY MASS SPECTROMETRIC METHODS
AND THEIR ANTI-CANCER ACTIVITIES *İN VİTRO*
STUDIES**

ASLI ÇAL

**Prof. Dr. BEKİR SALİH
Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

ASLI ÇAL'ın hazırladığı "**Yeni Nesil Platin Komplekslerinin Kütle Spektrometrik Yöntemlerle İncelenmesi ve Antikanser Aktivitelerinin *in-Vitro* Olarak Araştırılması**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA

Başkan

.....

Prof. Dr. Bekir SALİH

Danışman

.....

Prof. Dr. Abdurrahman ŞENGÜL

Üye

.....

Prof. Dr. Belma IŞIK

Üye

.....

Doç. Dr. Cengiz Kavaklı

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak yazdığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde her hangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

18/04/2014

Aslı ÇAL

ÖZET

YENİ NESİL PLATİN KOMPLEKSLERİNİN KÜTLE SPEKTROMETRİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ VE ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN *İN VİTRO* OLARAK ARAŞTIRILMASI

ASLI ÇAL

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. BEKİR SALİH

Nisan 2014, 202 Sayfa

Kanserin ilaç ile tedavisinde metal içerikli cisplatin (CDDP) türevi ilaçların kullanılmasına yönelik çalışmalar, 1960'larda CDDP'nin antikanser aktivitesinin keşfi ile başlamıştır. CDDP ile tedavide karşılaşılan yan etkilerin şiddetli olması ve bazı hücre tiplerinin CDDP'ye direnç göstermesi, ilacın etki mekanizmasının araştırılmasını gerekli kılmıştır. Günümüzde yalnızca birkaç adet Pt bileşiğinin antikanser ilaç olarak klinik uygulamalarda kullanılıyor olması, yeni nesil platin ve diğer geçiş metal (Pd, Ru, Au) komplekslerinin sentezlenmesine ve *in vitro* ortamda antikanser aktivitelerinin araştırılmasına sebep olmuştur. Yapılan çalışmalar, aday antikanser molekül için hedef molekülün DNA olduğunu ve uygulanan ilacın yalnızca %1 oranında hedefe ulaştığını göstermiştir. Hedef moleküle ulaşan ilaç oranının yetersiz olması, ilacın DNA'ya ulaşana dek, hücre içinde veya dışında etkileşime girdiği diğer biyomoleküllerin tespit edilmesini ve etkileşim oranının belirlenmesini gerekli kılmıştır. Ayrıca ilacın hücre içine alınma mekanizmasının ve DNA'ya bağlanma sonrası gerçekleşen reaksiyonların aydınlatılması gerekmektedir.

Elektro Sprey İyonlaşma (ESI) ve Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonlaşmalı (MALDI) yumuşak iyonlaşma tekniklerinin keşfedilmesi ile biyomoleküllerin ve daha da önemlisi onların zayıf kovalent olmayan komplekslerinin kütle spektrometresi (MS) ile bozunmaya uğramadan analizleri mümkün hale gelmiştir. İnorganik yapının organik yapıya bağlanması öncesi ve sonrasında elde edilen kütle spektrumlarının farklılığı ilaç-biyomolekül etkileşimlerinin kütle spektrometresi ile incelenmesine olanak sağlamıştır. Organik ve inorganik yapıların aynı anda analiz edilebiliyor olması, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) gibi klasik tekniklerle elde edilemeyen düşük tayin limitlerine inilebilmesine olanak sağlaması, kristolografik tekniklerde aranan mükemmel kristal oluşumuna gereksinim göstermemesi, ön ayırma gerektirmeksizin analize imkan sağlaması nedeniyle ESI-QTOF(Dört kutuplu-uçuş zamanlı)-MS ve MALDI-TOF(uçuş zamanlı)-MS tekniklerinin ilaç-biyomolekül etkileşimlerinin izlenmesinde kullanımı yaygınlaşmıştır.

Bu tez kapsamında; yeni nesil Pt komplekslerinden biri olan “Kloro-2,6-bis (N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)klorür” molekülünün (B19), IR, ¹H NMR, ESI-QTOF MS ve MALDI-TOF MS teknikleri ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Antikanser ilaçlar için hedef molekül olan DNA ile etkileşimi temsil etmesi açısından *in vivo* ortamı taklit eden *in vitro* ortamda ilk kez nükleotid/oligonükleotid (dekamer) ile inkübasyonu sonucu oluşan kompleksler incelenmiş, etkileşim bölgeleri tespit edilmiştir. Oluşan kovalent olmayan komplekslerin MALDI ve ESI iyonlaşma mekanizmaları aydınlatılmıştır. İnkübasyon mol oranı, inkübasyon süresi ve tampon çözeltinin sırasıyla kompleks oluşumuna ve kütle spektrumuna etkisi incelenmiştir.

Farklı derişimlerde hazırlanan B19 molekülüne ait ESI-QTOF MS verileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve inkübasyon çözeltilerindeki azalan B19 derişimi hesaplanarak, biyomolekül-ilaç etkileşimleri hem inkübasyon mol oranı hem de inkübasyon süresi yönünden karşılaştırılmıştır.

Hedef molekül olan DNA'ya ilacın ulaşmasında engel teşkil eden sitokrom C, lizozim ve ubiquitin gibi proteinler ile B19 molekülünün yapmış olduğu kompleksler MALDI-TOF MS ve ESI-QTOF MS ile tayin edilmiştir. Bu tür kanser ilaçlarına yüksek oranda girişim gösteren ve ilaçların aktivitesinin azalmasında önemli rol oynayan glutatyon peptidi (GSH) ve oligomerin bir arada bulunduğu yarışmalı inkübasyon ortamında B19'un davranışı detaylı olarak incelenmiştir. B19 molekülü ile elde edilen olumlu sonuçlar nedeniyle, B19 molekülünün 3 farklı türevi ön denemelere tabi tutulmuştur. B19 molekülündeki Pt yerine Pd yerleştirilerek elde edilen ve B19 ile aynı ligandlara sahip olan B20 molekülü (kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II)klorür), sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle ileri analizlere alınmamıştır. B19 molekülündeki benzimidazol halkasına bağlı olan N-metil grubunun 1,3-propilsülfonat ile değiştirilmesi ile elde edilen Pt temelli B33 bileşiği (kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridin platin(II) klorür) ve B33 ile aynı liganda sahip Pd temelli B35 bileşiğinin (kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il) piridinpaladyum(II)klorür) yapısı MALDI-TOF MS

ile tayin edilmiş ve söz konusu bu moleküllerin nükleotidler ile inkübasyonuna ait çözeltiler MALDI-TOF MS sisteminde analiz edilmiştir. B19, B33 ve B35 moleküllerinin sitotoksik etkileri prostat kanseri hücre hattı PC-3 ve akciğer kanseri hücre hattı A-549 kullanılarak test edilmiş, IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: cisplatin, Platin içerikli antikanser ilaçlar, MALDI-TOF MS, ESI-QTOF-MS, antikanser ilaç-biyomolekül etkileşimleri, kovalent olmayan ilaç-biyomolekül kompleksleri, benzimidazoller

ABSTRACT

INVESTIGATION OF NEW GENERATION PLATINUM COMPLEXES BY MASS SPECTROMETRIC METHODS AND THEIR ANTI- CANCER ACTIVITIES *IN-VITRO* STUDIES

ASLI ÇAL

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. BEKİR SALİH

Apr 2014, 202 Pages

Studies on the use of metal based drugs, derivatives of cisplatin (CDDP), in the treatment of cancer by medicine began in the 1960s with the discovery of CDDP. Investigation of the drug's effect mechanism became necessary due to the displayed CDDP resistance of many cell types and serious side effects of CDDP in treatment. Nowadays, only a few amount of Pt compounds have being used as anticancer drug in clinical applications, caused the synthesis of new generation platinum and other transition metal complexes (Pd, Ru, Au) and researching the anticancer activity of them *in vitro*. The studies showed that DNA is the target molecule of anticancer drug and only 1% of the used drug can reach the target. Since the rate of the drug reaches the target molecule is inadequate, it's necessary to detect the other biomolecules which can interact with drug until it reaches to the DNA in the cell or outside the cell and to determine the rate of interaction. Also the mechanism of drug uptake into cells and reactions that occur after binding to the DNA were should be determined.

By the discovery of soft ionization techniques, electrosprey ionization (ESI) and matrix assisted laser desorption ionization (MALDI), analysis of biomolecules and most importantly their weak noncovalent complexes by mass spectrometry (MS) are made possible without degradation. The differences between mass spectra of

free organic structure and its complex compound allow to analyze the interactions of drug-biomolecule. Electrospray ionization-Quadrupole-time-of-flight (ESI-QTOF MS) and MALDI-TOFMS techniques usage became widespread for monitoring the drug-biomolecule interactions due to organic and inorganic structures can be analyzed simultaneously, low detection limit can be reached that can not be possible by classical techniques, such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR), there is no necessity to the perfect crystalline formation that is requirement for crystallographic techniques and enable to analyze the samples without any pre-separation step.

In this thesis, a new generation platinum compound, chloro-2,6-bis (N-methylbenzimidazole-2-yl)pyridineplatinum(II) chloride (B19), was characterized by ESI-QTOF-MS, MALDI-TOF MS, Infrared (IR) and proton (^1H) NMR techniques. This is the first time, the complexes were analyzed that formed at the end of nucleotide / oligonucleotide (decamer) – B19 incubation *in vitro* that mimics *in vivo* to represent the interactions of target DNA and anticancer drug, and interaction sites were identified. Ionization mechanisms of noncovalent complexes in MALDI and ESI techniques were clarified. The effects of buffer type, incubation time and mol range on complex formation and mass spectra were investigated. Biomolecule-drug interactions were compared by using either incubation mol range or incubation time according to the concentration decreasing of B19 molecule that calculated via calibration curve obtained from ESI-QTOF-MS data of B19 molecule at different concentrations.

Complexes of B19 molecule with proteins, such as cytochrome C, lysozyme, ubiquitin, obstacle to the achieving of drug to the target molecule, DNA; were identified by MALDI-TOF MS and ESI-QTOF-MS. Behavior of B19 in competitive incubation medium that contains combination of oligonucleotide and the Glutathione (GSH) peptide, shows interference at high rates to the cancer drug and plays an important role in the reduction of activity of drugs, was examined in detail.

Due to the significant results obtained with the B19 molecule, three different variants of B19 have undergone preliminary testing. B20 in which Pt was replaced with Pd, has not been studied further analysis due to its lower water solubility. The structure of Pt-based compound B33, obtained by replacing N-methyl group with ionic 1,3-propyl sulfonate group and the corresponding Pd complex compound B35, were identified by MALDI-TOF MS. The incubation of the solution of these compounds with nucleotides were analyzed by MALDI-TOF MS. Cytotoxic effects of B19, B33 and B35 molecules were tested by using PC-3 prostate cancer cell line and lung cancer cell line A-549. The IC_{50} values of each drug were determined.

Keywords: Cisplatin, Pt- based anticancer drugs, MALDI-TOF MS, ESI-QTOF-MS, anticancer drug- biomolecule interactions, noncovalent drug-biomolecule complexes, benzimidazoles.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum, çalışma ortamımızı ev sıcaklığına çeviren Değerli Hocam, Sayın Prof. Dr. Bekir Salih' e tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı ve en zor anlarımda esirgemediği anlayışı için teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca bana yardımcı olan, bilgi birikimini ve her türlü konuda tecrübelerini paylaşan, motive eden ve başarabileceğime inandıran hocam Doç. Dr. Ömür Çelikbıçak'a,

Tez süresince sentezlemiş olduğu anti tümör komplekslerle bize destek sağlayan Sayın Prof. Dr. Abdurrahman Şengül ve ekibine,

LC-MS deneyimlerini benimle paylaşan, sabırla iyonların peşinde birlikte iz sürdüğümüz, ben vazgeçsem de vazgeçmeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Mehmet Atakay ve H. Mehmet Kayılı'ya,

İnkübasyonlarımda emanetçisi ve kurtarıcısı olan, tezsiz hayatın hayallerini birlikte kurduğumuz sevgili Ülkü Güler, Funda Yıldırım ve Ayşegül Özgen'e,

Aynı ortamda bulunmaktan zevk aldığım ve desteklerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Burak Tavşanlı, Selim Gerişlioğlu, Hande Kabadayı'ya ve tüm SAREG üyelerine,

İş arkadaşlığımızı sitotoksiste çalışmalarındaki ortak ısrarımızla pekiştirerek akademik hayata taşıdığımız değerli arkadaşım Doç.Dr. Birsen Can Demirdöğen'e, sayesinde tanışıp çalışma fırsatı bulduğum Prof. Dr. Orhan Adalı'ya ve bizimle aynı heyecanı paylaşıp, özveriyle deneyleri yürüten Dr. Serdar Karakurt'a,

Her zaman yanımda olan ve her vazgeçtiğimde beni tekrar kendime inandıran dostlarım; Doğa Kavaz ve Meshude Akbulut'a; dostluğumuzu ailecek büyüttüğümüz, birlikte geçirdiğimiz zamanların benim için çok kıymetli olduğunu belirtmek istediğim Güneri, Gündüz, Üzdürmez ve Kıraç ailelerine,

Doktora çalışmalarım boyunca desteklerini hep arkamda hissettiğim Türkiye Halk Sağlığı Kurumu idarecilerime ve iş paylaşımını benim çalışmalarım göre düzenleyen ve yeri geldiğinde yokluğumu tolere eden mesai arkadaşlarıma,

Hayatımın virgölü olan, durduğu yerle herşeyin anlamını değiştiren, bana benden çok inan, en zor anlarımda hiç yalnız bırakmayan biricik anneme ve desteklerini esirgemeyen, başarıya birlikte kilitlendiğimiz geniş aileme,

Evliliğimiz boyunca sabırla önce yüksek lisans sonra doktora tezimin bitmesini bekleyen, her alanda yokluğumu doldurmaya çalışarak fedakarlığın en güzel örneklerini sergileyen, sevgi ve sakinliğiyle her zoru birlikte aşabileceğimizi bu süreçte bana bir kez daha gösteren biricik hayat arkadaşım Ferhan Çal'a,

Benimle olduğunu ilk öğrendiğim andan itibaren doktora çalışmalarımın tüm stresini çeken beyaz kelebeğim, güzel kızım Yaren'ime

çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY.....	i
ETİK.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
ÇİZELGELER.....	xiv
ŞEKİLLER.....	xv
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
2. ANTİTÜMÖR METAL İÇERİKLİ İLAÇLAR.....	7
2.1. Cisplatin-DNA Etkileşim Mekanizması.....	9
2.2. Hücrede Cisplatin Etkileşimleri ve Direnci.....	11
2.2.1 CDDP ve Platin İçerikli İlaçlara Karşı Direnç Oluşumu.....	12
2.2.2. CDDP Yan Etkileri ve CDDP Türevlerinin Sentezi.....	12
2.3. Yapı-Aktivite-İlaç Direnci İlişkisi.....	13
2.4 Yeni Tasarım İlaçlar.....	13
2.5 Platin-Biyomolekül Etkileşimleri.....	16
2.6 Biyoinorganik Yapıların DNA İle Etkileşim Yolları.....	16
3. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ.....	18
3.1. Kütle Spektrometrisinin Genel Prensipleri.....	18
3.2. Kütle Spektrometresinin Geçiş Metali Kompleksleri-Biyomolekül Etkileşimlerini Belirlemedeki Yeri.....	19
3.3 Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS).....	21
3.3.1. İyonlaştırma Prensipleri.....	21
3.3.2. Uçuş Zamanlı Analizörde Kütle Analizi.....	23

3.3.3. İyonların Belirlenmesi	24
3.4. Biyomolekül-Metal İçerikli İlaç Etkileşimlerinin MALDI-TOF MS ile İncelenmesi.....	24
3.4.1. MALDI-TOF MS ve Geçiş Metali Kompleksleri.....	24
3.4.2 Metal-İlaç-Oligonükleotid Komplekslerinin Analizinde MALDI-TOF MS	24
3.4.3. Metal-İlaç-Protein Komplekslerinin Analizinde MALDI-TOF MS	25
3.5. Elektrosprey İyonlaşmalı-Kütle Spektrometrisi (ESI-MS)	25
3.5.1. İyonlaşma	26
3.5.2. MS Analizlerinde Kütle Ayırıcısı Olarak Q-TOF	27
3.6. Biyomolekül-Metal İçerikli İlaç Etkileşimlerinin ESI-MS ile İncelenmesi ...	28
3.6.1. ESI-MS ve Geçiş Metali Kompleksleri	28
3.6.2. Metal-İlaç-Oligonükleotid Komplekslerinin Analizinde ESI-MS	29
3.6.3. Metal-İlaç-Protein Komplekslerinin Analizinde ESI-MS	29
3.7. Benzimidazoller ve Anti Tümör Özellikleri	30
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	33
4.1. Kimyasallar	33
4.2. Kullanılan Cihazlar	34
4.2.1. pH Metre.....	34
4.2.2. Vorteks	34
4.2.3. MALDI Kütle Spektrometresi	34
4.2.4. ESI Kütle Spektrometresi	34
4.2.5. Hücre Hatları ve Büyüme Ortamlarının Hazırlanması	36
4.2.6. Hücre Proliferasyon Çalışmaları.....	37
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	38
5.1. .Kloro-2,6-bis (N-metil-benzimidazol-2-il) piridinplatin(II)klorür, [Pt(L2)Cl]Cl Molekülünün (B19) Karakterizasyonu	38
5.1.1. IR ve H-NMR ile Karakterizasyonu	38
5.1.2. B19 molekülünün MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile Karakterizasyonu...	40
5.2. Nükleotidlerin MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile İzlenmesi.....	49
5.2.1. MALDI-TOF MS.....	49
5.2.2. ESI-QTOF-MS.....	51
5.3. Komplekslerin MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile İzlenmesi	52

5.3.1. B19-Nükleotid Etkileşmelerinin Kütle Spektrometrik İncelenmesi	53
5.3.2. Özgün Etkileşimin Araştırılması	66
5.3.3. Tuz Etkisinin İncelenmesi	68
5.3.4. Tampon Seçimi (in vitro, Hücre İçi Ortam)	71
5.3.5. Yarışmalı İnkübasyon	74
5.3.6. Kompleks Oluşumunun Stokiyometrik İncelenmesi	76
5.3.7. Kompleks Oluşumu-İnkübasyon Süresi İlişkisi	86
5.3.8. İnkübasyon Süresi ve Mol Oranının Oluşan B19-Nükleotid Kompleksleri Üzerine Etkisinin ESI-Q-TOF-MS ile İncelenmesi	92
5.4. GSH Peptidi-B19 Etkileşimi	95
5.5. Oligonükleotid-B19 Etkileşimi	100
5.5.1. Oligonükleotidlerin MALDI-TOF MS ile Tayini	100
5.5.2. Oligonükleotid-B19 Komplekslerinin MALDI-TOF MS ile Tayini	104
5.5.3. Oligonükleotidlerin-B19-GSH Yarışmalı Etkileşimlerinin MALDI-TOF MS ile Tayini	108
5.5.4. Oligonükleotid-B19 Kompleks Oluşumunun Stokiyometri ve İnkübasyon Süresine Bağımlılığının İncelenmesi	114
5.6. B19 - Protein Etkileşimleri	121
5.6.1. Sitokrom C ile etkileşimleri	121
5.6.1.1. MALDI-TOF MS Analizleri	121
5.6.1.2. LC-ESI-QTOF-MS Analizleri	125
5.6.2. Ubiquitin ile Etkileşimleri	127
5.6.2.1 MALDI-TOF MS Analizleri	127
5.6.2.2. ESI-QTOF-MS Analizleri	131
5.6.3. Lizozim ile Etkileşimleri	133
5.6.3.1 MALDI-TOF MS Analizleri	133
5.6.3.2 ESI-QTOF-MS Analizleri	136
5.7. Yeni İlaç Adayları ve Ön Denemeleri	138
5.7.1. Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II) klorür Bileşiği (B33)	138
5.7.2. Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-l) piridinpaladyum(II) klorür Bileşiği, B35.	144
5.8. B19, B33 ve B35 Moleküllerin Antikanser Aktivitelerinin Belirlenmesi	150

6. TOPLU SONUÇLAR	153
EK-1	158
KAYNAKLAR.....	161
ÖZGEÇMİŞ	174

ÇİZELGELER

Çizelge 4.1. B19 molekülü, GMP, AMP, CMP ve nükleotidleri-B19 komplekslerinin analizi için uygulanan ESI-MS metodundaki değişkenlerin değerleri.	35
Çizelge 4.2. TMP ve UMP nükleotidlerinin ESI-MS analizleri için uygulanan ESI-MS metodundaki değişkenlerin değerleri.	35
Çizelge 4.3. Cyt C, lizozim ve ubiquitin proteinleri ve bu proteinlerin B19 molekülü ile inkübasyonu sonucu elde edilen çözeltilerin analizlerinde kullanılan LC-ESI-MS şartları.....	36
Çizelge 5.1. B19 ve nükleotidlerin kompleks yapma şekline ve monofosfatın cinsine bağlı olarak oluşan komplekslerin kütleleri.	54
Çizelge 5.2. Nükleotidlerin B19 ilavesi sonrası pH değerleri ve HNO ₃ eklenerek elde edilen pH değerleri ve oluşması beklenen komplekslerin kütle değerleri.	68
Çizelge 5.3 Nükleotidlerin B19 ilavesi sonrası pH değerleri ve oluşması beklenen komplekslerin kütle değerleri.....	71
Çizelge 5.4. Kompleks Oluşumunun Stokiyometrik İncelenmesi amacıyla İnkübasyona sokulan bileşenler ve derişimleri	76
Çizelge 5.5. Cisplatin, B19, B33, B35 moleküllerinin hesaplanan IC ₅₀ değerleri.	150
Çizelge 1. Farklı mol oranı ve inkübasyon süreleri sonucu ESI-MS sistemine göre hesaplanan, kalan B19 miktarı.	159

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kanser tedavisinde kullanılan ve aday olan ilaçların kimyasal yapıları. ...	8
Şekil 2.2. Cisplatinin hücre dışı ve hücre içi formları ve olası etkileşimleri.	10
Şekil 2.3. Aktif CDDP'nin DNA'ya bağlanmasının şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.4. (A) di/oligo atomlu Pt ilaçlar, (B) Yavaş ve kontrollü salım örneği olan ilaçlar; (C) Sağlam ve esnek kollarla başka bir kemoterapik ajanın bağlı olduğu Pt ilaçlar ve (D) Hedefe özgün yönlendirilmiş ilaçlar [44]......	15
Şekil 3.1. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri.	19
Şekil 3.2. Bazı geçiş metalleri ve CDDP'nin teorik kütle spektrumu [99].	20
Şekil 3.3. MALDI-TOF sisteminin şematik gösterimi.....	22
Şekil 3.4. ESI-MS'in şematik gösterimi.....	27
Şekil 3.5. Q-TOF-MS sisteminin şematik diagramı [130]......	28
Şekil 3.7. Antitümör atkivite gösteren (A), (B), (C); pirol benzimidazollerin, (D) , (E), (F); farklı ligandlar içeren benzimidazollerin, (G); quinolinon ligandlı benzimidazolün, (H) ve (I); bisbenzimidazollerin kimyasal yapıları [152]	31
Şekil 3.8. Anti tümör aktivite gösteren (A) Cu ²⁺ , (B) ve (C); Pt ²⁺ , (D) Ag ²⁺ , (E) Cu ²⁺ metallerinin farklı benzimidazol ligandlarla yapmış olduğu komplekslerin kimyasal yapıları [152]......	32
Şekil 5.1. B19 kompleksinin sentez şeması.....	38
Şekil 5.2. B19 molekülünün FT-IR spektrumu [166]	39
Şekil 5.3. B19 molekülünün (A) ¹ H-NMR spektrumu ve (B) ¹ H-NMR aromatik bölge spektrumu [166]......	40
Şekil 5.4. Düşük Cl ⁻ iyonu derişimi içeren sulu çözeltilerde, B19 molekülünden klor ayrılması ile elde edilebilecek yapılar ve gösterimleri.....	41
Şekil 5.5. (A) B19, (B) B19-Cl ve (C) B19-2Cl yapıları için MALDI-TOF MS iyonlaşma mekanizmaları.....	42
Şekil 5.6. B19 molekülünün (A) CHCA,(B) 3-HPA, (C) ATT, (D) DHB ve (E)THAP matriksleriyle elde edilmiş kütle spektrumları (analit/matriks :1/5).....	43
Şekil 5.7. B19 molekülünün farklı matriksler ile elde edilmiş kütle spektrumları. (A) THAP, (B) DHB, (C) CHCA, (D) ATT ve (E) 3-HPA	44
Şekil 5.8. B19 molekülünün çeşitli formlarının iyonlaşması ile elde edilen olası MALDI-TOF MS spektrumları. (A) C ₂₁ N ₅ H ₁₇ Cl ₂ Pt teorik, (B) C ₂₁ N ₅ H ₁₇ ClPt	

teorik, (C) C ₂₁ N ₅ H ₁₇ ClPt deneysel (DHB matriksi ile), (D) C ₂₁ N ₅ H ₁₇ Pt teorik ve (E) C ₂₁ N ₅ H ₁₇ Pt deneysel (DHB matriksi ile).....	45
Şekil 5.9. (A) C ₂₁ N ₅ H ₁₈ Pt teorik ve (B) C ₂₁ N ₅ H ₁₈ Pt deneysel (DHB matriksi ile).	46
Şekil 5.10. [B ₁₉ -2Cl] ⁺ 2 yapısı için MALDI-TOF MS 'te iyonlaşma mekanizması .	47
Şekil 5.11. B ₁₉ molekülünün pozitif iyonlaşma modunda ESI-MS spektrumu, (0.2 mM B ₁₉ kompleks çözeltisinden 2ul enjekte edilmiştir).....	48
Şekil 5.12. B ₁₉ molekülünün pozitif iyonlaşma modunda elde edilmiş, Şekil 5.11'de ok ile gösterilen 529-542 m/z bölgesine ait genişletilmiş ESI-MS spektrumu	48
Şekil 5.13. Herbir nükleotidin DHB matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları. (A) AMP, (B) GMP, (C) CMP, (D)TMP ve (E) UMP.	50
Şekil 5.14. (A) UMP ve (B)TMP 'nin negatif iyonlaşma modunda elde edilmiş ESI-MS spektrumları. (1mM nükleotid den 2ul enjekte edilmiştir).	51
Şekil 5.15. (A) AMP, (B) CMP ve (C) GMP 'nin pozitif iyonlaşma modunda elde edilmiş ESI-MS spektrumları (1mM nükleotid den 2ul enjekte edilmiştir).	52
Şekil 5.16. TMP-B ₁₉ kompleksinin (A) CHCA, (B) ATT, (C) THAP ve (D) DHB matriksleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM TMP:0.33 mM B ₁₉ eşit hacim karışımı).....	55
Şekil 5.17. AMP-B ₁₉ kompleksinin (A) CHCA, (B) ATT, (C) DHB ve (D) THAP matriksleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM AMP:0.33 mM B ₁₉ eşit hacim karışımı).....	56
Şekil 5.18. CMP-B ₁₉ kompleksinin (A) CHCA, (B) DHB ve (C) THAP matriksleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM CMP:0.33 mM B ₁₉ eşit hacim karışımında).	58
Şekil 5.19. GMP-B ₁₉ kompleksinin (A) CHCA, (B) HPA ve (C)ATT matriksleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM GMP:0.33 mM B ₁₉ eşit hacimde karıştırılmıştır).	59
Şekil 5.20. GMP-B ₁₉ kompleksinin (A) DHB ve (B) THAP matriksleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM GMP:0.33 mM B ₁₉ eşit hacimde karıştırılmıştır).	60

Şekil 5.21. UMP-B19 kompleksinin (A) CHCA, (B) ATT, (C) DHB ve (D) THAP matriksleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM GMP:0.33 mM B19 eşit hacimde karıştırılmıştır).....	61
Şekil 5.22. Komplekslere ait kütle spektrumları. (A) GMP-B19 kompleksi (teorik), (B) GMP-B19 kompleksinin (deneysel), (C) AMP-B19 kompleksinin (teorik) ve (D) AMP-B19 kompleksi (deneysel).	62
Şekil 5.23. Komplekslere ait kütle spektrumları. (A) TMP-B19 kompleksi (teorik), (B) TMP-B19 kompleksinin (deneysel), (C) CMP-B19 kompleksinin (teorik), (D) CMP-B19 kompleksi (deneysel), (E) UMP-B19 kompleksinin (teorik) ve (F) UMP-B19 kompleksi (deneysel)	63
Şekil 5.24. B19-nükleotid komplekslerinin iyon seçimli kütle spektrumları. (A) AK,	65
(B) GK, (C) CK, (D) TK ve (E) UK.	65
Şekil 5.25. B19 Molekülünün (A) GMP , (B) AMP, (C) CMP, (D) TMP ve (E) UMP ile inkübasyonu sonucu elde edilen kütle spektrumları (1:1 mol oranında, eşit hacimde karıştırılmışlardır. 37°C de, pH: 7, inkübasyon süresi: 3 saat. 5 mM NaCl. Tampon : Amonyum bikarbonat).	67
Şekil 5.26. B19 Molekülünün (A) AMP , (B) GMP, (C)CMP, (D)TMP, (E)UMP ile inkübasyonu sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu (1:1 mol oranında, eşit hacimde, 37°C de , pH: 7, inkübasyon süresi: 5 saat).	70
Şekil 5.27. B19-AMP kompleksine ait MALDI-TOF MS spektrumu; (A) 25 mM amonyum bikarbonat tamponu,1:1 mol oranı, (B)10 mM amonyum asetat tamponu, 10 mM NaCl , (C) 25 mM amonyum bikarbonat tamponu, (D) 10 mM amonyum asetat tamponu,1:1 mol oranı.	72
Şekil 5.28. B19-MP Kompleksleri. (A) AMP, (B) GMP, (C) CMP, (D) TMP ve (E) UMP ile B19'un inkübasyonu sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumları (10 mM amonyum asetat tamponda,1:1 mol oranı, 10 mM NaCl varlığında).	73
Şekil 5.29. A)1:1 mol oranında ve eşit hacimde; Monofosfat karışımı-B19 inkübasyonu sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (B) Genişletilmiş kütle spektrumu.....	75
Şekil 5.30. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında GMP ile yapmış olduğu kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları. 77	

(A) GK,1:1mol, (B) GK,1:5mol, (C) GK,1:10mol, (D) GK,1:20mol, (E) GK,1:30mol	77
Şekil 5.31. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında CMP ile yapmış olduğu kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları.	78
(A) CK, 1:1mol (B) CK,1:5 mol, (C) CK,1:10 mol, (D) CK, 1:20 mol,	78
(E) CK, 1:30 mol.....	78
Şekil 5.32. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 10'dan 30'a kadar artan mol oranında CMP ile yapmış olduğu kompleksin refletron modunda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları. (A) CK,1:30 mol, (B) CK, 1:20 mol, ...	79
(C) CK, 1:10 mol.....	79
Şekil 5.33. Mol oranı 1:20 ve anlık karıştırılma sonrası oluşan B19 –GMP kompleksinin lineer ve refletron modunda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları.	80
Şekil 5.34. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında AMP ile yapmış olduğu kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları	82
(A) AK, 1:1 mol, (B) AK, 1:5 mol, (C) AK, 1:10 mol, (D) AK, 1:20 mol,.....	82
(E) AK, 1:30 mol	82
Şekil 5.35. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında TMP ile yapmış olduğu kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları.	83
(A) TK, 1:1 mol oranı, (B) TK,1:5 mol oranı, (C) TK, 1:10 mol oranı,	83
(B) (D) TK, 1:20 mol oranı, (E) TK, 1:30 mol oranı.....	83
Şekil 5.36. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında UMP ile yapmış olduğu kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları	84
(A) UK,1:1 mol, (B) UK,1:5 mol, (C) UK, 1:10 mol, (D) UK, 1:20 mol, (E) UK,1:30 mol oranı.....	84
Şekil 5.37. B19 molekülü ile yaptığı kompleksin refletron modunda izlenebildiği minimum mol oranlarına ait MALDI-TOF MS spektrumları (A) AK,1:10 mol, (B) TK, 1:20 mol, (C) UK, 1:30 mol oranı.	85
Şekil 5.38. B19 molekülünün GMP ile yaptığı kompleksin (GK) inkübasyon süresine bağlı olarak (1:20 mol oranında) refletron modunda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumlar (A) anlık, (B) 1 saat, (C) 3saat, (D) 5 saat, (E) 7 saat.....	88

Şekil 5.39. B19 molekülünün TMP ile yaptığı kompleksin (TK) inkübasyon süresine bağlı olarak (1:20 mol oranında) refletron modunda elde edilmiş spektrumlar. İnkübasyon süresi; (A) anlık, (B) 1 saat, (C) 3saat, (D) 5 saat, (E) 7 saat.....	89
Şekil 5.40. B19 molekülünün MP-karışım ile yaptığı komplekslerin inkübasyon süresine bağlı olarak (1:20 mol oranında) linear modda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları (A) anlık, (B) 1 saat, (C) 3saat, (D) 5 saat, (E) 7 saat	90
Şekil 5.41. B19 molekülünün MP-karışım ile yaptığı komplekslerin inkübasyon süresine bağlı olarak (1:20 mol oranında) refletron modunda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları; (A) anlık, (B) 1 saat, (C) 3saat,	91
(D) 5 saat, (E) 7 saat	91
Şekil 5.42. B19 molekülünün (0.002-0.0200) mM derişim aralığındaki kalibrasyon eğrisi.....	93
Şekil 5.43. (A) B19-karışım-1-20-24H inkübasyonuna ait ekstrakte edilmiş iyon kromatogramı, (B) A'da verilen kromatograma ait ESI-MS spektrumu.....	94
Şekil 5.44. GSH molekülünün kimyasal yapısı (C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S).....	95
Şekil 5.45. GSH molekülünün (A) DHB ile alınan MALDI-TOF MS spektrumu,....	96
(B) genişletilmiş kütle spektrumu.....	96
Şekil 5.46. B19-GSH (1) 'in MALDI-TOF MS spektrumları (A) inkübasyon süresi 3 dk, (B) inkübasyon süresi 24 saat (B19-GSH kompleksinin dimer oluşumu izlenmiştir ve yıldız ile gösterilmiştir).	98
Şekil 5.47. B19-GSH (2) 'in MALDI-TOF MS spektrumları (A) inkübasyon süresi 3 dk, (B) inkübasyon süresi 24 saat (B19-GSH kompleksinin dimer oluşumu izlenmiştir ve yıldız ile gösterilmiştir).	99
Şekil 5.48. Oligonükleotid-metal etkileşim bölgeleri [170].....	101
Şekil 5.49. Oligonükleotidlerin MALDI-TOF MS spektrumları (A) ON1, (B) ON2, (C) ON3.....	103
Şekil 5.50. Oligonükleotid-B19 inkübasyonu sonucu elde edilen komplekslerin DHB matriksi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları; (A) ON1-B19, (B) ON2-B19 (kompleksleşmemiş olinonükleotid zincirlerine ait pikler yıldız ile B19' a ait pikler ok ile gösterilmiştir).	105

Şekil 5.51. ON3-B19 kompleksinin DHB matriksi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (kompleksleşmemiş oligonükleotid zincirlerine ait pikler yıldız ile B19' a ait pikler ok ile gösterilmiştir).	106
Şekil 5.52. ON1-B19 kompleksinin yüksek molekül ağırlığındaki MALDI-MS spektrumu.	108
Şekil-5.53. (A) GSH- B19 inkübasyonu (6 saat) sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (B) A'da belirtilen ortama ON1 ilavesi ile 24 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu	110
Şekil 5.54. (A) GSH-ON1 inkübasyonu (6 saat) sonucu elde edilen, (B) A'da sürdürülen inkübasyona B19 ilavesi ile 24 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (C) B'nin düşük bölgede genişletilmiş MALDI-TOF MS spektrumu. (B19-ON1 kompleksi yıldız ile, ON1-2B19 kompleksi kalın ok ile gösterilmiştir).	112
Şekil 5.55. GSH-ON1-B19 yarışmalı inkübasyonu (6 saat) sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (A) B19-ON1 kompleksinin oluşumu, (B) düşük kütle bölgesinde genişletilmiş MALDI-TOF MS spektrumu.....	113
Şekil 5.56. B19:ON1 mol oranının bileşenlerin anlık etkileşimi sonucu oluşan kompleks üzerine etkisi (A)1:1, (B) 1:4, (C)1:8 mol oranı	115
Şekil 5.57. (A) 0.02 mM ON1, (B) GSH yapılarına ait DHB matriksi ile elde edilmiş, (C) B19-ON1, 1:1mol oranında 23 saat inkübe edilen örneğe GSH eldesi sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu (yıldız ile işaretlenen pikler GSH ve dimerini göstermektedir).	117
Şekil 5.58. (A) GSH-B19 kompleksine ait DHB matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu, (B) 1:1mol oranda 23 saat inkübe edilen B19/ON1 kompleksine GSH eldesi sonucu düşük molekül ağırlıklı bölgede elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (C) B'de belirtilen şartlarda B19-ON1 kompleksine ait iyon pikleri yıldız ile gösterilmiştir. İnkübasyon sonunda serbest kalan ON1 oligonükleotidini gösteren pik grubu daire içerisine alınmıştır.	118
Şekil 5.59. ON1- B19 mol oranı 2:1 olan inkübasyon serisinden; (A) anlık, (B) 3.5 saat sonra, (C) 20 saat sonra 10 µl alınarak analiz edilen örneklerin MALDI-TOF MS spektrumları (matriks DHB, analit:matriks:1:5).....	120

Şekil 5.60. (A) Cyt C standardı, (B) B19-Cyt C-3-1-24s, (C) B19-Cyt C-3-1-42s, (D) B19-Cyt C-3-1-92s inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (50 µl SA +10 µl AC+ 10 µl numune karıştırıldı, vorteksledi. Bu karışımdan 1 µl MALDI plakasına damlatıldı).	123
Şekil 5.61. (A) Cyt C standardı, (B) B19-Cyt C-9-1-24s, (C) B19-Cyt C-9-1-42s , (D) B19-Cyt C-9-1-92s inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (50 µl SA +10 µl AC+ 10 µl numune karıştırıldı, vorteksledi. Bu karışımdan 1 µl MALDI plakasına damlatıldı).	124
Şekil 5.62. B19, Cyt C ve B19-Cyt C inkübasyon numunelerine ait toplam iyon kromatogramları.	125
Şekil 5.63. (A) B19, (B) Cyt C çözeltilerinin ve (C) B19-Cyt C inkübasyon numunelerinin t=14.088 dk'da elde edilmiş ESI-MS spektrumları	126
Şekil 5.64. (A) Ubiquitin standardının, (B) B19-Ubiq-3-1-24 saatlik, (C) B19-Ubiq-9-1-24 saatlik inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu	128
Şekil 5.65. (A) Ubiquitin standardının, (B) B19-Ubiq-3-1-42 saatlik, (C) B19-Ubiq-9-1-42 saatlik inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu	129
Şekil 5.66. (A) Ubiquitin standardının, (B) B19-Ubiq-3-1-92s, C) B19-Ubiq-9-1-92s inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu	130
Şekil 5.67. (A) B19, (B) Ubiq ve (C) B19-Ubiq inkübasyon numunelerine ait ESI-MS'de elde edilen toplam iyon kromatogramları.	131
Şekil 5.68. (A) B19, (B) Ubi ve (C) B19-Ubiq inkübasyon numunelerinin t=14.032 dk'da elde edilmiş ESI-MS spektrumları.....	132
Şekil 5.69. (A) Lizozim standardının, (B) B19-liz-3-1-24 saatlik, (C) B19-liz-3-1-42 saatlik , (D) B19-liz-3-1-92 saatlik inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (pI 11.1). Proteinin oligomerleri yıldız ile işaretlenmiştir.....	134
Şekil 5.70. (A) Lizozim standardının, (B) B19-liz-9-1-24 saatlik, (C) B19-liz-9-1-42 saatlik , (D) B19-liz-9-1-92 saatlik inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu, proteinin oligomerleri yıldız ile işaretlenmiştir.	135

Şekil 5.71. (A) B19, (B) Liz ve (C) B19-Liz inkübasyon numunelerine ait ESI-MS ile elde edilen toplam iyon kromatogramları.....	136
Şekil. 5.72. (A) B19, (B) Liz ve (C) B19-Liz inkübasyon numunelerinin t=14.032 dk'da elde edilmiş ESI-MS spektrumları.....	137
Şekil 5.73. Kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II)klorür bileşiğinin yapısı.....	138
Şekil 5.74. Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II) klorür bileşiği (B33) sentez şeması.	139
Şekil 5.75. B33 molekülünün DHB matriksi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu	139
Şekil 5.76. (A) Saf B33 molekülüne ait, (B) AMP, (C) GMP, (D) CMP,..... (E) TMP, (F) UMP ile B33 molekülünün 37°C 'de 12 saat inkübasyonu sonucu elde edilen karışımının DHB matriksi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (inkübasyon mol oranı:1:1)	141
Şekil 5.77. B33-GMP kompleksine ait MALDI-TOF MS spektrumu	142
Şekil 5.78. (A) Saf B33 molekülüne ait, (B) AMP, (C) GMP, (D) CMP, (E) TMP, (F) UMP ile B33 molekülünün 37°C 'de 7 saat inkübasyonu sonucu elde edilen karışımının DHB matriksi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu	143
(inkübasyon mol oranı:1:20). AMP/ GMP- B33 komplekslerinin bulunduğu bölge daire içine alınmıştır.CMP-B33 kompleksleri yıldız işareti ile belirtilmiştir.	143
Şekil 5.79. Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II) klorür, B35.....	144
Şekil 5.80. B35 bileşiğinin (A) DHB matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu, (B) genişletilmiş kütle spektrumu	145
Şekil 5.81. B35 molekülünün (A) B35-Cl+K, teorik, (B) bütün halde, teorik,..... (C) DHB matriksi kullanılarak elde edilen MALDI-TOF MS deneysel spektrumu	146
Şekil 5.82. (A) Saf B35 molekülüne ait, (B) AMP, (C) GMP, (D) CMP, (E) TMP, (F) UMP ile B35 molekülünün 37°C 'de 12 saat inkübasyonu sonucu elde edilen karışımının DHB matriksi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (inkübasyon mol oranı:1:1). Kompleks oluşumu durumunda pik elde edilmesi gereken bölgeler kesikli çizgiler arasına alınarak belirtilmiştir.	148

Şekil 5.83. (A) Saf B35 molekülüne ait , (B) AMP , (C) GMP, (D) CMP, (E) TMP, (F) UMP ile B35 molekülünün 37°C 'de 7 saat inkübasyonu sonucu elde edilen karışımının DHB matriksi kullanılarak elde edilmiş MALDI-MS spektrumu (inkübasyon mol oranı:1:20). Kompleks oluşumu durumunda pik elde edilmesi gereken bölgeler kesikli çizgiler arasına alınarak belirtilmiştir.	149
Şekil 5.84. (A) Kloro-2,6-bis (N-metil-benzimidazol-2-il) piridinplatin(II)klorür; B19, (B) Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)klorür; B33, (C) Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il) piridinpaladyum(II)klorür; B35 moleküllerinin kimyasal yapıları	150
Şekil 5.85. Cisplatin ve türevlerinin (A) PC-3 Prostat kanseri hücre hattı ve (B) Normal prostat hücre hattı PNT1A üzerine etkisi.	151
Şekil 5.86. Cisplatin ve türevlerinin akciğer kanseri hücre hattı A-549 üzerine etkisi.	152
Şekil 1. B19-DNA etkileşimine ait UV spektrumu [166].	158

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikro
mM	Milimolar
mg	Miligram
m/z	Kütle/Yük
Pa	Paskal
nm	Nanometre
Da	Dalton
V	Volt
L	Litre
°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
s	Singlet
m	Multiplet

Kısaltmalar

OP	Okzaliptatin
KP	Karboplatin
DNA	Deoksiribonükleik asit
LC	Sıvı Kromatografisi
CE	Kapiler Elektroforez
MS	Kütle Spektroskopisi
2D-PAGE	İki Boyutlu- Poliakrilamid Jel Elektroforez
ICP-MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi
Q-MS	Kuadrapol-Kütle Spektrometresi
IT-MS	İyon Tuzaklayıcı - Kütle Spektrometresi
Q-TOF/ MS ⁿ	Kuadrapol-Uçuş Zamanlı-Ardışık Kütle Spektrometresi
TQ	Üçlü dört kutuplu analizör
FT-ICR	Fourier Transform İyon Siklotron Rezonans
CDDP	Cisplatin

ESI	Elektro Sprey İyonlaşma
MALDI	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonlaşmalı
FT-IR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi
¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
TOF	Uçuş Zamanlı
SPR	Yüzey Plasmon Rezonans Spektroskopisi
HSA	İnsan Serum Albumin
IgG	İmmunoglobulin G
Tr	Transferin
B19	Kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)klorür
B20	Kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II)klorür
B33	Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridin platin(II) klorür
B35	Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II)klorür
GSH	Glutatiyon
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HILIC	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
SEC	Boyutça Ayırma Kromatografisi
DAD	Diyot Aray Dedektör
LOD	Gözlenebilme Sınırı
UV/VIS	Ultra viyole/ Görünür Bölge
CTR1	Bakır Taşıyıcı-1
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
IR	İnfrared (Kızılötesi)
EI	Elektron iyonlaşma
CE	Kimyasal İyonlaşma
APCI	Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonlaşma
APPI	Atmosferik Basınçta Foto İyonlaşma
DESI	Desorpsiyon Elektrosprey İyonlaşma

FAB	Hızlı Atom Bombardımanı
DIOS	Desorpsiyon İyonlaşma
FWHM	Yarı Yükseklikteki Pik Genişliği
MCP	Çok Kanallı Plaklar
DHB	2,5-Dihidroksibenzoik Asit
CHCA	Alfa-Siyano-4-Hidroksi Sinnamik Asit
ATT	6-Aza-2-Tiyotimin
3-HPA	3-Hidroksipikolinik Asit
SA	Sinapinik asit
THAP	Trihidroksi Asetofenon
TFA	Trifloroasetik Asit
Cyt C	Sitokrom C
BSA	Sığır Serum Albumin
AMP	Adenozin Monofosfat
GMP	Guanozin Monofosfat
CMP	Sitidin Monofosfat
TMP	Timidin Monofosfat
UMP	Uridin Monofosfat
ATCC	American Type Culture Collection
FBS	Fetal Bovine Serum
PNT1A	Sağlıklı Prostat Hücre Hattı
PC-3	Prostat Kanseri Hücre Hattı
A549	Akciğer Kanseri Hücre Hattı
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
MeOH	Metanol
DMF	Dimetilformamid
H ₂ O	Su
FA	Formik Asit
SIM	Seçimli İyon Modu
MP	Monofosfat
IC ₅₀	Maksimum inhibisyonun % 50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu,

1. GİRİŞ

Gen, protein, metabolit ve mineral iyonlar arasındaki fonksiyonel bağlantıyı anlayabilmek pos-genomik çağda biyolojik anlamda en büyük zorluk fakat fırsat olarak kabul edilmektedir. Hücre biyokimyası, hücrenin karakteristik genom ve proteomunun karakterize edilmesine ihtiyaç duyduğu gibi metal ve metaloidlerin farklı türler ve hücre bölümleri arasındaki dağılımının (metalom) aydınlatılmasına da ihtiyaç duyar. Metalogenomiks, metaloproteomiks ve metalomiks gelişmekte olan disiplinler arasında yer almaktadır. Bu dallarda kimyasal türlendirme ve metal-bağlanma koordinasyon bölgeleri hakkındaki bilgi kritik bir şekilde hücre içindeki iz elementlerin boyutsal olarak çözümlenmiş derişim haritalarına (spatially resolved concentration maps) bağlıdır [1].

Metal iyonları ve metal koordinasyon bileşikleri biyokimyasal gelişmelerde anahtar rol oynamaktadır. Hücre bölünmesi, gen baskılaması gibi doğal süreçlerin yanı sıra toksisite, kanserojenite ve antitümör oluşturma kimyası gibi doğal olmayan süreçleri de etkilemektedir [2]. Element rolünün ne olduğunun anlaşılabilmesi için oksidasyon basamağının ne olduğu, metalin bağlandığı organik fonksiyonel grubu ve biyoligandlarla yaptığı komplekslerin izlenebilmesi çok önemlidir. Eser elementlerin hücre içine alımının düzenlenmesi, dolaşıma koyulması, hücre içi dağılımı ve hücreler arası taşınımı organizmanın yaşamını kritik bir şekilde etkilemektedir [1].

Metaloproteinler için genel analiz işlemleri, tanımlama ve miktar tayini çalışmaları için 3 ana bileşenden oluşmaktadır: (i) ayırma teknikleri: sıvı kromatografisi (LC), kapiler elektroforez (CE), iki boyutlu- poliakrilamid jel elektroforez (2D-PAGE) (ii) yüksek hassasiyette elementlerin miktar tayini; indüktif eşleşmiş plazma-Kütle spektrometresi (ICP-MS), (iii) biyomolekülün kesin olarak tanımlanması; Kuadrapol-kütle spektrometresi (Q-MS), İyon tuzaklayıcı - Kütle spektrometresi (IT-MS) ve Kuadrapol-uçuş zamanlı-ardışık kütle spektrometresi (Q-TOF/ MSⁿ) yöntemleri kullanılmaktadır. Bu çoğul analitik yaklaşım elementel ve moleküler detektörleri bir araya getirerek çok düşük derişimlerde dahi analit tayinine olanak sağlar [3].

Mısırlıların bakırı suyun sterilazasyonunda kullanmasıyla metal bileşiklerinin tıp alanında kullanımının izleri 5000 yıl öncesine dayanmaktadır [4]. Metal iyonlarının

koordinasyon oluşturma ve redoks özelliklerinin ileri düzey çalışmalarla ispatlanması metale dayalı ilaçların geliştirilmesini kolaylaştırmıştır [5]. Özellikle cisplatinin anti-tümör aktivitesinin keşfedilmesi bu alandaki çalışmalara hız kazandırmıştır. Platin, galyum ve arsenik kompleksleri kanser tedavisinde, altın kompleksleri anti-artrit ve anti-astım ajanı olarak ve bizmut kompleksleri anti-ülser ajanı olarak tedavilerde başarıyla kullanılmaktadır [6,7,8]. Kanser tedavilerinden biri olan ve ilaçla tedavi etmek anlamına gelen kemoterapi vücutta istenmeyen hücrelerin yok edilmesi veya kontrol altına alınması amacıyla uygulanır. Kemoterapideki önemli nokta sağlıklı hücrelere çok fazla zarar vermeden tümörlü hücrelerin ölmesini sağlamaktır [2]. Yüksek aktiviteye sahip, özellikle metal-içerikli ilaçların kullanımı çeşitli tümör tiplerine bağlı ölümlerin azalmasını etkin bir şekilde sağlamıştır. Bu durum özellikle kötü huylu tümörlere karşı en etkin olduğu bilinen platin içerikli ilaçlarda görölmüştür. Platin komplekslerinin hücre bölünmesini engellediği Roberts tarafından 1960'da keşfedilmiştir [9]. Bu özelliğin kanser tedavisindeki muazzam önemi ilk kez 1965'te Rosenberg ve çalışma arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. O zamandan beri platin içeren kompleksler en aktif ve en azından umut verici antikanser ajanlar olarak kullanılmaktadır [10].

Bu ilaçlardan cisplatin ve karboplatin (KP) testis, rahim, baş ve boyun, mesane ve akciğer kanserinin kemoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır [10]. Platin içerikli ilaçların kanser tedavisinde kullanılması bu tür bileşiklerin anti-tümör olarak kullanılmasına öncülük etmiştir. Otuz yılı aşkın süredir yeni metal komplekslerinin tümör engelleyici özelliklerine yönelik sentez ve testlere ciddi çaba sarf edilmektedir. Özellikle platin, rutenyum ve paladyum içeren bu kompleksler üzerinde yapılan çalışmaların esas amacı yeni antikanser ilaçlar geliştirmek ve var olanları iyileştirmektir. Bu yeni ilaçların cisplatine kıyasla daha yüksek verimli, tümör dokusuna karşı seçiciliğinin daha yüksek olması, geniş spektrumlu olması, toksisitesinin düşük olması, tümör hücresinin ilaca direncinin olmaması ve ağız yolu ile alımı gibi farmakolojik özelliklerinin iyileştirilmiş olması beklenmektedir. Test edilen binlerce metal kompleksine rağmen bunlardan sadece 30 tanesi klinik testlere girebilmiş ve sadece birkaç tane platin ilacı dünya çapında klinik kullanıma uygun görölmüştür [10-12].

Günümüzde damar içi uygulama yoluyla kemoterapi ajanı olarak kullanılan üç platin (II) kompleksi bulunmaktadır. Cisplatin ($\text{cis-[Pt Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$), KP [$\text{Pt (C}_6\text{H}_6\text{O}_4)(\text{NH}_3)_2$] ve Okzaliplatin (OP) [(1*R*,2*R*)-cyclohexane-1,2-diamine] (ethanedionato-*O,O'*)platinum(II) olarak adlandırılan bu ilaçlardan OP, cisplatinin vücutta oluşturduğu direnç mekanizmasına benzer yolla direnç oluşturmaması ve sadece hafif nefrotoksik etki göstermesi nedeniyle umut verici özelliğe sahiptir [13]. Fransa'da kolorektal kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu üç ilacın dışında üretilen ilaçların kanser tedavisinde yöresel kullanımları bulunmaktadır. Nedoplatin, lobaplatin, hepoplatin ticari adlarıyla farklı platin kompleksleri sırasıyla Japonya, Çin ve Güney Afrika'da kullanılmaktadır. Ayrıca 10 tane platin kompleksi de klinik denemelerde test edilmiştir. Bunlardan birisi de ağız yolu ile alınarak tedaviye olanak sağlayan, bir Pt(IV) kompleksi olan satraplatindir [14-17].

Platin-DNA etkileşiminin şekli ilk kez Roberts ve Pascoe tarafından aydınlatılmıştır. Bu etkileşim şekli sadece cisplatin kompleksleri için değil yukarıda bahsedilen tüm metal kompleksleri için de geçerlidir. Bu platin türleri DNA ile koordinasyona girmektedir ve bu etkileşim sonucu DNA'nın yapısında 35-40° 'lik bir bükülme olmaktadır [18-20]. Sonuç olarak, DNA polimeraz ilerlemesi engellenir ve kanserli hücre/doku ölümü gerçekleşir [21-22]. Platin içeren ilaçların hem aktif bir hidrolizasyon ürünü oluşturabilmeleri hem de serum proteinlerine ya da kükürt içeren aminoasit/peptidlerle etkileşime girerek inaktif hale gelmemeleri DNA ile koordinasyon yapabilmeleri açısından çok önemlidir [10]. Hidrolizasyon kinetiği platin'in diğer moleküller ile etkileşiminden negatif yönde etkilendiği için metal içerikli ilaçların kanda bulunan makromoleküllerle etkileşimi çok önemlidir. Yapılan araştırmalarda platin içeren ilacın hidroliz olduktan sonra oluşan türlerinin nasıl bir yol izlediği ya da serum proteinlerine bağlanarak nasıl engellendikleri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Türlendirme analizleri kromatografi ya da kapiler elektroforez (CE) yönteminin sırasıyla ICP-MS ya da ESI-MS yöntemleriyle birlikte kullanılarak aydınlatılmasına dayanır. Sentez sonrası çalışmalar platin-ilacının sulu çözeltideki hidrolizasyon kinetiğinin aydınlatılmasıyla başlar ve protein ve/veya kükürt içeren ligandların bulunduğu bir çözelti ortamı modellemesindeki hidrolizasyon kinetiğinin incelenmesiyle devam eder. İlk basamakta HPLC-ICP-MS [23] ve NMR gibi tekniklerin yanı sıra Nygren ve arkadaşları tarafından yeni geliştiren platin türlendirmesi için kullanılan Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi

(HILIC)- ICP-MS de kullanılmaktadır [24]. Model çözelti ortamındaki etkileşimleri incelemek için Boyutça Ayırma Kromatografisi (SEC, Size Exclusion Chromatography) [25-27] , CE-ICP-MS [28], HPLC-ICP-MS ve ESI-Q-TOF-MS [22] ve NMR [29] teknikleri kullanılmaktadır. Platin ilacının küçük ligandlarla etkileşiminin aydınlatılmasında ise LC-MS [29], CE-DAD [30-33]; nükleotidlerle etkileşimlerinin incelenmesinde ESI-Q-TOF-MS [34] teknikleri ön plana çıkmaktadır. Serum-platin ilacı etkileşimleri genellikle SEC-ICP-MS [35] ve HILIC-ICP-MS ile aydınlatılmaktadır [36]. Bu etkileşimler platin-ilacın yan etkilerini aydınlatmak, ilaç direnci hakkında bilgi edinmek adına çok önemlidir. Ayrıca hastaya uygulanan platin içerikli ilacın ne kadar süre sonra boşaltım sisteminden atıldığı ve ilacın yarı ömrünün belirlenebilmesi için idrarda platinin biyo görüntülenmesi de çok önemlidir. LC-ESI-TOF-MS ve LC-ICP-MS bu amaca yönelik kullanılan teknikler arasında yer almaktadır [37].

Yeni geliştirilen metal içerikli antikanser ilaçların bozulmadan biyolojik moleküllerle etkileşimini incelemek ve fizyolojik şartlarda kimyasal taşınımını izleyebilmek için ileri düzey analitik tekniklere ihtiyaç vardır. En son yapılan çalışmalardan biri olan ve Vacchina ve arkadaşları tarafından yeni sentezlenen BBR3464 kod isimli platin ilacını izleyebilmek için yeni bir katyon değiştirici temeline dayalı HPLC-ICP-MS metodu geliştirilmiştir. Gözlenebilme sınırı (LOD) değeri çok iyi olan bu metodun geçerliliği test edilmiş ve özengınleştirme işlemine de çok uygun olduğu belirlenmiştir [38].

Literatürde metal içerikli antikanser ilaçlara yönelik araştırmalar sadece birkaç tane yeni antikanser ilaç olduğunu göstermektedir. Bu tez kapsamında antikanser ilaç adayı olarak sentezlenmiş olan “Kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il) piridinplatin(II)klorür” molekülünün (B19), ¹H NMR, ESI-QTOF MS ve MALDI-TOF MS teknikleri ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Antikanser ilaçlar için hedef molekül olan DNA ile etkileşimi temsil etmesi açısından *in vivo* ortamı taklit eden *in vitro* ortamda nükleotid-B19 ve oligonükleotid (dekamer)-B19 inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. B19, nükleotid ve oligonükleotid zincirleri için uygun matriks seçimi yapıldıktan sonra, inkübasyon mol oranı, inkübasyon süresi ve klor iyonu derişiminin olası kompleksler üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen inkübasyon çözeltileri hem MALDI-TOF MS hem de ESI-QTOF MS sistemlerinde analiz edilmiştir. Elde edilen spektrumların sadeliği ve pik ayırımı göz önünde

bulundurularak tampon seçimi gerçekleştirilmiştir. Nükleotid karışımı ortamına B19 ilave edilerek yarışmalı inkübasyonda B19 ile en hızlı ve spesifik etkileşen nükleotid belirlenmiştir. Yalnızca GMP ve AMP ile kompleks oluşturduğu belirtilen CDDP'nin aksine (UV-Vis), B19 molekülünün tüm nükleotidler ile oluşturduğu komplekslerin MS sistemleri ile izlenebilmesi B19 molekülünün DNA üzerindeki birden fazla bölgede DNA ile etkileşime girebileceğini göstermiştir. Literatürde cisplatin-DNA zincir içi çapraz bağlanma ürünlerinin %60–65'i zincir içi GpG 1,2 bağlanma ve %20–25'i ApG 1,2 zincir içi bağlanma olduğu bilindiğinden, farklı dizilimlerdeki oligomerler ile B19 molekülünün kompleks oluşum şartları optimize edilmiş, oligomerler ve söz konusu kompleksler MALDI-TOF MS ile analiz edilmiştir. Oligonükleotidlerdeki baz diziliminin kompleks stokiyometrisi üzerine etkisi araştırılmış ve B19 molekülü için etkileşim bölgeleri belirlenmiştir. Yalnızca bir adet ApG içeren oligonükleotid zincirine 2 adet B19 molekülün bağlanması CDDP ve türevlerine ek olarak B19'un farklı bölgelerden de etkileşime girebildiğini göstermiştir. Antikanser ilacın hedef DNA'ya ulaşmadan önce GSH peptidi ile etkileşerek inaktif hale geldiği bilindiğinden, B19-GSH etkileşimleri ve yarışmalı ortamda B19-GSH-oligonükleotid etkileşimleri herhangi bir saflaştırma işlemi yapmaksızın MALDI-TOF MS ile incelenmiştir. İnkübasyon mol oranı ve inkübasyon süresinin GSH-B19 kompleks oluşumu üzerine etkisi MALDI-MS spektrumları ile belirlenmiştir. İlacın taşınımı ve ilaç direnç oluşumu açısından sitokrom C/ lizozim/ubiquitin-B19 inkübasyon çözeltileri MALDI-TOF MS ve ESI MS sistemlerinde analiz edilmiş ve kompleks oluşumları her iki yöntemle de tespit edilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı serum proteinlerden olan ve CDDP ile etkileşime girdiği bilinen HSA/ IgG /transferin yapılarının B19 ile inkübasyon çözeltileri MALDI-TOF MS ile analiz edilerek kompleks oluşumları tespit edilmiştir. B19 ile alınan olumlu sonuçlar göz önünde bulundurularak benzer yapılar olan; Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)klorür (B33) ve Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-l)piridinpaladyum(II)klorür (B35) yapıları nükleotid inkübasyonları gerçekleştirilmiş ve MALDI-TOF MS ile analiz edilmiştir. kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II)klorür (B20) molekülü benzer yapıya sahip olmasına rağmen sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle inkübasyonlarda test edilmemiştir.

Antikanser ilaç adayı olarak sentezlenen B19 molekülün *in vivo* ortamı taklit eden *in vitro* ortamda etkileşime girmesi beklenen yapılar ile oluşturduğu komplekslerin MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile tayini gerçekleştirildikten ve B33/B35 – nükleotid etkileşimleri incelendikten sonra sağlıklı ve kanserli PC3 (prostat kanseri) ve kanserli A541(akciğer kanseri) hücre hatları üzerindeki antitümör etkisinin belirlenmesi için sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda MALDI-TOF MS ve ESI-QTOF-MS sistemlerinin *in vitro* ortamda peptid/protein/oligonükleotid- ilaç etkileşimlerini incelemeye kullanılabileceği tespit edilmiştir. Antikanser ilaç adayı olarak sentezlenen B19 molekülünün ilk kez *in vitro* ortamda etkileşim çalışmaları, sitotoksisite çalışmaları yapılmış ve *in vivo* çalışmalar için umut vaad eden sonuçlar elde edilmiştir. Aynı ligand farklı metale sahip B20-B19 ve B33-B35 çiftlerindeki metal iyonu farkının çözünürlük, sitotoksisite ve kararlılık üzerine etkisi Pt'in Pd' a nazaran üstünlüğünü bir kez daha kanıtlamıştır.

2. ANTİTÜMÖR METAL İÇERİKLİ İLAÇLAR

Tıbbi olarak kontrolsüz ve düzensiz hücre bölünmesi anlamına gelen ve bir çok türü bulunan kanser tedavisinde, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi (ilaçla tedavi) uygulamaları kullanılmaktadır. Kemoterapide kullanılan oldukça aktif ilaçların çeşitli kanser türlerinden kaynaklanan ölüm oranlarını belirgin şekilde düşürdüğü görülmüştür. Bu durum özellikle birçok kötü huylu kanser tedavisinde (testis, yumurtalık, baş ve boyun, mesane gibi) antineoplastik ajan olarak kullanılan platin bazlı ilaçlar için geçerlidir [39] .

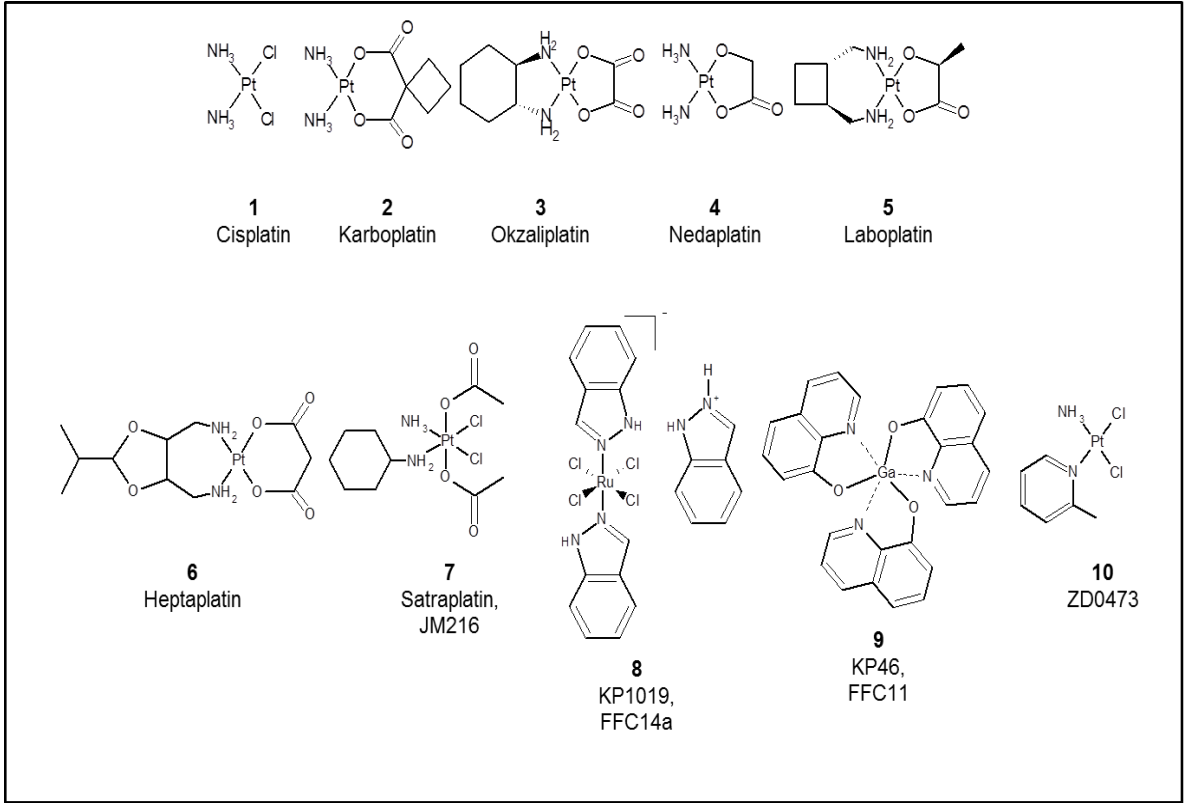
Metal içeren antikanser ilaçların başarılı gelişimi, net olarak cisplatin (CDDP) ile başlar, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], **1**. Bu bileşik ilk olarak 1845'te tanımlanmış olsa da, antikanser özelliği Rosenberg ve ark. tarafından 1964 yılında keşfedilmiştir [40-42]. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda tümörlerde CDDP'ye bağlı olarak gerileme gözlenmesinin üzerine insanlarda katı tümörler üzerinde klinik çalışmalar başlatılmıştır. Faz 1 klinik denemeleri 1971'de başlayan [43] ilaç adayı için 1978'de Food and Drug Administration (FDA) uygunluk vermiş ve Platinol adı ile tıbbi olarak kullanımına başlanmıştır.

Uzun yıllardır, yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi ve uygulaması amaçlı, yeni metal kompleksler sentezlenmiş ve bu komplekslerin tümör engelleyici etkilerinin gösterilmesi için büyük çaba sarf edilmiştir.

Daha sonraki yıllarda cisplatin'e ek olarak, KP [Pt(cbdca)(NH₃)₂], **2**, yumurtalık kanseri tedavisinde ve en son olarak da OP [Pt(1,2-dach)(ox)] (cbdca = 1,1-dicarboxylato-siklobütan; dach = 1,2-diamino-sikloheksan; ox = okzalato (2⁻) , **3**, kolon kanseri tedavisinde dünya çapında, damar içi uygulamada kullanılmaya başlanmıştır. Yöresel anlamda ise Güney Kore, Çin ve Japonya'da diğer türevler olan Nedaplatin, **4**, Labaplatin, **5** ve Heptaplatin, **6**, klinikte kullanılmaktadır [44]. Burada bahsedilen ilaçların kimyasal yapıları Şekil 1'de verilmiştir.

Aynı *cis*-PTX₂ (amin) yapısının türevleri olan bileşikler (X = anyonik ayrılan grup; amin = herhangi bir birincil veya ikincil amin), bazı hücre hatları üzerinde CDDP'ye benzer ya da geliştirilmiş aktivite göstermişlerdir. Ancak şu an bu adaylardan sadece 10-15 tanesi ileri düzey klinik çalışmalara girebilmiştir. Bunların içinde, ağız yolu ile kullanıma aday olan ve 3. faz klinik testlere tabi tutulan Satraplatin de yer almaktadır. Ancak söz konusu bu Pt-içerikli kemoterapi ilaçları yalnızca sınırlı

sayıda tümör üzerinde aktivite göstermektedir. Ayrıca terapinin kendisi belirgin yan etkileri beraberinde getirmektedir. Ayrıca CDDP ve ilgili ilaçlara karşı direnç geliştiren kanser hücreleri bazı tür neoplazmların etkin tedavisini engellemektedir. Son yıllarda daha geniş bir etki alanı sağlamak amacıyla, yan etkileri az olan, çapraz direnç göstermeyen, seçiciliği yüksek olan alternatif metal bileşikleri klinik testlerle denenmektedir. Bunların arasından en umut verici olan ve platin atomu içermeyen tümör engelleyici olan indazolium *trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazole) ruthenate(III)] **8**, (KP1019 or FFC14a) ve tris(quinolinolato)gallium(III),**9**, (KP46 or FFC11) bileşikleridir. Bunların yanı sıra Pt-içerikli ilaçlardan (*SP*-4-3)-amindikloro(2-metilpiridin-*N*)platin(II), **10**, (ZD0473) ve satraplatin, **7**, de en yüksek potansiyeldeki kemoterapi ajanları olarak belirtilmektedir [39,45-48-].



Şekil 2.1. Kanser tedavisinde kullanılan ve aday olan ilaçların kimyasal yapıları.

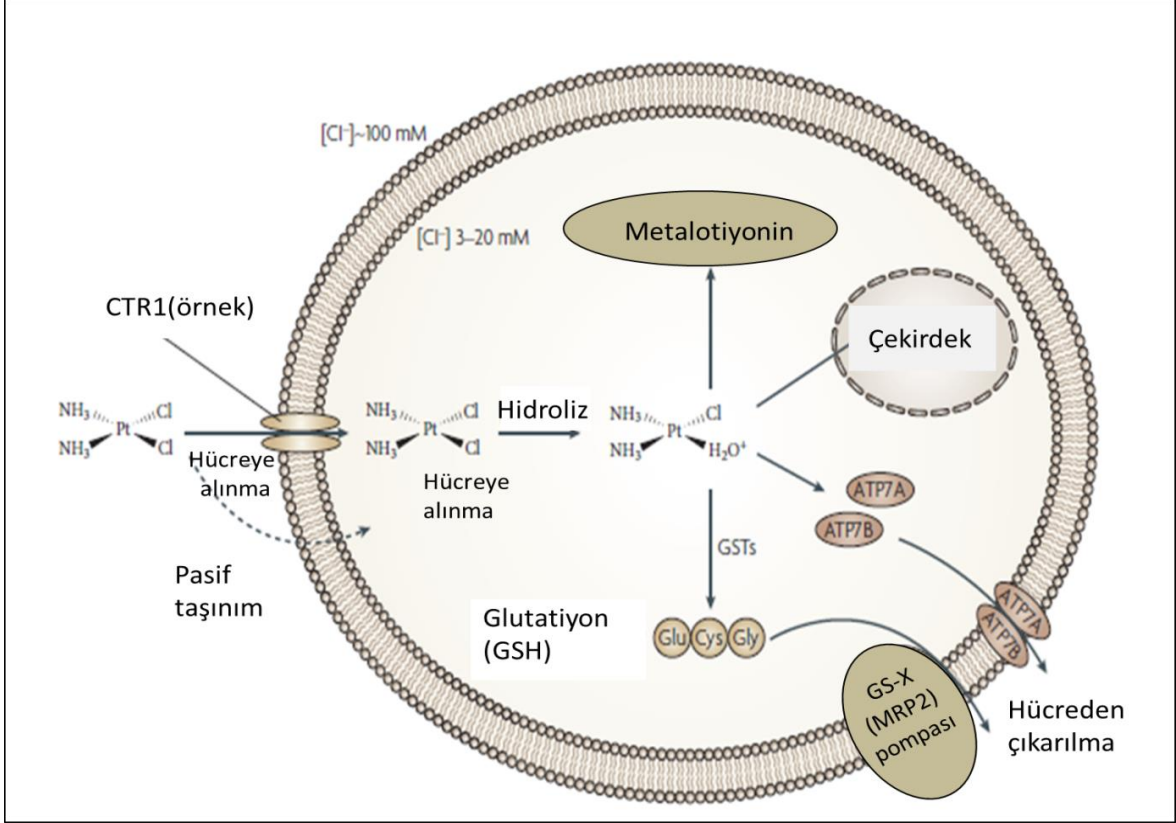
Grup 10 elementlerinin (Ni, Pd) benzer bileşikleri tümöre karşı nadiren verimli aktif bileşikler oluştururlar. Platin içeren bileşiklerin neden en yararlı olduğunu açıklayan en önemli faktör ligand-değişim kinetiğidir. Bu bileşiklerde platin(II) ve ligandlarının birbirinden ayrıldığı düzenlenmenin birkaç saat sürmesi hızlı denge oluşumunu

engeller [44, 40, 49, 50]. Birçok koordinasyon bileşikleri için ligand değişim reaksiyonları mikro-saniye ile saniye aralığında gerçekleşirken Pt(II) kompleksleri için bu sürenin dakika ile günler aralığında sürmesi, Pt(II) içerikli birleşiklerin yüksek kinetik kararlılık göstermesini sağlamıştır. Aynı durum rutenyum koordinasyon bileşikleri için de geçerlidir ve bu kinetik özellik rutenyum içerikli bileşiklerin oldukça faydalı olmasını sağlamıştır. Birkaç rutenyum bileşiğinin hücre hattı çalışmalarında anti-tümör davranış göstermesine rağmen şimdiye kadar sadece bir tanesi klinik denemelere girebilmiştir [40,47, 51-54].

2.1. Cisplatin-DNA Etkileşim Mekanizması

Cisplatinin enjeksiyon yöntemiyle kana karışması sağlanır ve kanda klor iyonu derişimi 100 mM civarındadır. Bu yüksek klor iyonu derişiminde, cisplatin hidrolize olamaz ve nötral halde kalır. Hücrelerde platin birikmesinin sınırlayıcı faktörü cisplatin derişimidir, çünkü cisplatinin hücre içine alımı doygunluğa erişebilen bir işlem değildir [55-58]. Ayrıca hücre içine alımı için optimum pH yoktur ve alım ortamda bulunan diğer yapısal analogların varlığından etkilenmez. Hücre içine taşınımı, taşıyıcı aracılığıyla gerçekleşmez [59]. Bu sonuçlar, taşınımın pasif difüzyon yolu ile gerçekleştiğine işaret etmektedir. Ancak literatürde hücre içine transferinin aktif bir taşınım mekanizması ile olduğunu ispatlayan bazı yayınlar mevcuttur [72]. Hücre içi klor iyonu derişimi 3-20 mM arasındadır ve bu durum cisplatin hücre içine alındıktan sonra onun hidroliz olmasını kolaylaştırır (Şekil 2). Hidroliz olma sonucu, hücredeki hedef moleküllerle kolayca etkileşebilecek olan aktif $[Pt(NH_3)_2(OH)(OH_2)]^+$ iyonları oluşur. RNA, DNA, proteinler, membran fosfolipidleri ve mikrofilamentler gibi birçok hücresel bileşen bu monohidrat yapı ile etkileşime girer. Hücredeki temel hedef molekölül belirlemede elde edilen ilk ipucu cisplatine maruz bırakılan bakterilerdeki ipliksi büyüme şekli olmuştur. Bu durumun UV radyasyonu, iyonlaştırma radyasyonu ve hidroksi üre gibi DNA'ya hasar veren ajanlar varlığında izlenen bir karakteristik gelişim olduğu bilinmektedir [60-62]. Aynı şekilde DNA hasarını gösteren diğer bir işaret bakteriyofaj λ içeren Escherichia coli (E.koli) hücrelerinin liziz olmaları (parçalanmaları, çözülmeleri) durumunun [58], cisplatine maruz bırakılan E.kolilerde de görülmesi, DNA'nın cisplatin molekölünün en önemli hücresel hedef yapısı olduğunu göstermiştir [73]. Platin bağlı-DNA ve (oligo)nükleotid yapıları kapsamlı olarak karakterize edilmiştir [73, 64-68]. Nükleobaz birimleri içinde en yüksek elektron yoğunluğuna sahip olan

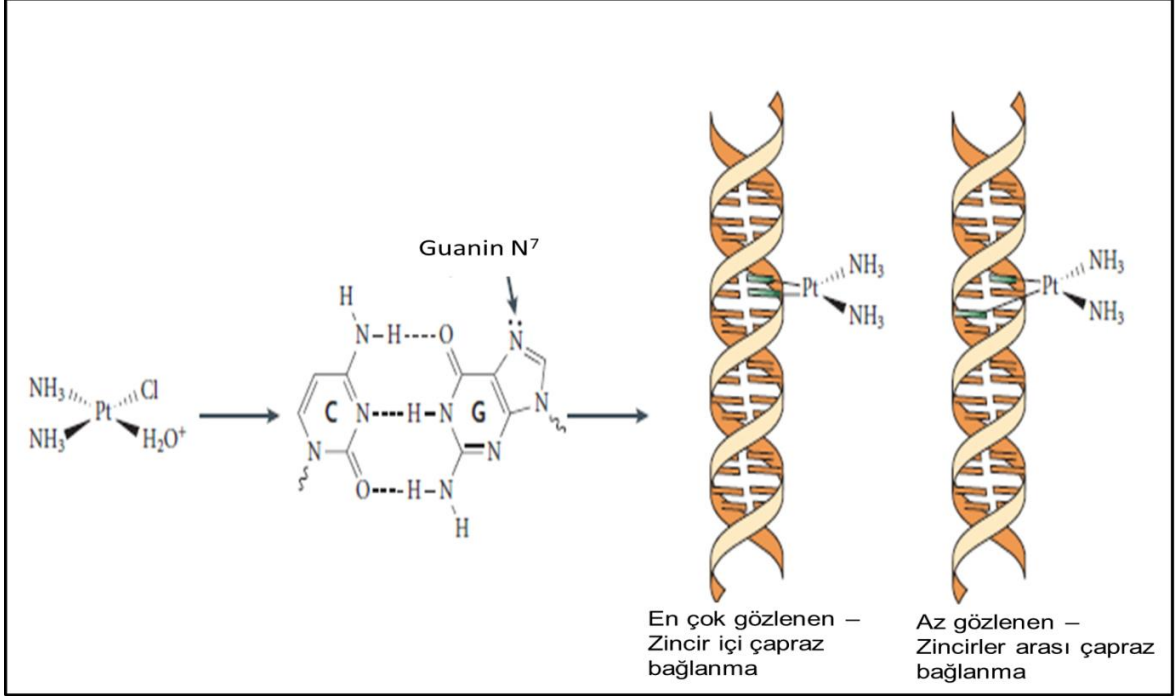
Guanin parçasının, DNA üzerindeki en tercih edilen kısım olduğu tespit edilmiştir. Çoğunlukla, Pt-kompleks ve DNA 'nın GpG, GpA, ve GpNpG pürin baz dizilimine sahip kısımlar arasında zincir içi bağlanmalar olduğu tespit edilmiştir [69-71]. Bu etkileşim mekanizmasının sadece cisplatin için değil Şekil 1'de yapı ve isimleri verilen 2-7 arasındaki tüm Pt kompleksleri için de geçerli olduğu bilinmektedir [74].



Şekil 2.2. Cisplatinin hücre dışı ve hücre içi formları ve olası etkileşimleri.

Hela hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar DNA, RNA ve proteinlerden oluşan hücre içi ortamında DNA'ya bağlanan Pt'nin sayısının diğer rakip moleküllerden fazla olduğunu göstermiştir [75]. Glutatiyon, GSH gibi S donor ligandlara rağmen DNA'ya ulaşabilen cisplatin moleküllerinin 2/3 'sinin, aynı zincir üzerindeki komşu guaninlerle N7 atomu üzerinden etkileşime girerek yapmış olduğu zincir içi bağlanma DNA'da kıvrım oluşmasına sebep olur. Bu kıvrım ve çözülme bazı hücrel proteinler tarafında fark edilir. Sonrasında gerçekleşecek olan reaksiyonlar 2 ihtimal üzerine inşa edilmiştir. Bunlardan ilki, Pt'nin bağlı bulunduğu bölgeden koparılması ve açılan bölgenin yeniden sentezlenmesi ile DNA'nın onarılmasıdır. Kalan Pt, golgi aygıtı [76] ya da bakır taşıyıcı olarak bilinen ATP7A

ve ATP7B proteinleri tarafında hücre dışına atılır [79,80]. İkinci durum ise onarılma olmadan hücrenin apoptoz olması ve hücre ölümüdür [77,78]. DNA'nın onarılması ya da Pt-DNA bağlanmasının tolere edilmesi, hücrede kullanılan ilaca karşı direnç oluşumunu göstermektedir. Onarılma olmadan kalan DNA zincirinin, DNA polimerizasyon sürecinde GpG-Pt bölgesinden bloke edilmiş olması (Şekil 3), tekrarlanabilmeyi ve transkripsiyonu da olumsuz yönde etkiler [81].



Şekil 2.3. Aktif CDDP'nin DNA'ya bağlanmasının şematik gösterimi.

2.2. Hücrede Cisplatin Etkileşimleri ve Direnci

Pt içeren ilaçların DNA ile koordinasyona girmedeki etkinliği, tamamen aktif hidrolizasyon ürünleri oluşturabilmelerine ve serum proteinleri, sülfür içeren peptidler ya da amino asitler tarafından inaktif hale getirilmelerine bağlıdır. Pt-protein komplekslerinin ilaç aktivitesindeki gerçek rolü son yıllarda yapılan çalışmalarla aydınlatılmıştır. Literatürde yer alan eski çalışmalarda Pt-protein bağlanmasının ilacın yan etkilerinin sebebi olabileceği vurgulanmışken [82], son yıllarda yapılan çalışmalarda Pt-protein komplekslerinin oluşumunun, sitotoksik Pt-DNA doku bozulmalarının oluşumu ile etkin bir şekilde yarıştığı ve Pt-antitümör ajanın etkinliğini azalttığı bulunmuştur [83].

2.2.1 CDDP ve Platin İçerikli İlaçlara Karşı Direnç Oluşumu

Bazı hücrelerin cisplatin dahil tüm test edilen antitümörlere direnç göstermesinin temel olarak iki nedeni vardır. Bunlardan birincisi, Pt-içerikli ilacın hedef DNA'ya ulaşmadaki yetersizliğidir. İlacın hücre içine alımında rol oynadığı bilinen CTR1 (bakır taşıyıcı-1) miktarındaki azalma [84], sitoplazmada bulunan kükürt içeriği yüksek olan ve metiyonin/sistein aminoasitlerini içeren peptidlerin, aktif ilaç formu ile etkileşime girmesi ve Pt'in ATP7A/ATP7B proteinleri (bakırı hücre dışına taşıyan proteinler) [85] ve GS-X (CDDP-glutatiyon komplekslerini hücre dışına atılımı sağlayan yapı; glutatiyon S- conjugatını taşıyan) ile hücre dışına alınmasının CDDP direncine sebep olduğu tespit edilmiştir [86]. İlaç direncinin temel nedenlerinden ikincisi ise DNA-Pt kompleksi oluşuktan sonra hücre ölümünün gerçekleşmemesidir. DNA-Pt etkileşim bölgesindeki bazların kesilerek DNA'dan uzaklaştırılması, söz konusu bu bölgeden Pt'nin uzaklaştırılması ve DNA polimerizasyon işleminin Pt bağlı olan bölge devreden çıkarılarak alternatif yollar üzerinden yürütülmesi ile Pt bağlanmasının tolere edilmesi gibi onarım yollarının bulunması hücre ölümünü engelleyerek ilaç direncine sebep olmaktadır [87].

2.2.2. CDDP Yan Etkileri ve CDDP Türevlerinin Sentezi

Enjeksiyon ile vücuda verilen cisplatinin sınırlı sayıda tümör hücresinde olumlu yanıt vermesi ve bulantı, kulak hasarı, kusma, ellerde his kaybı, böbrek toksisitesi gibi şiddetli yan etkilerinin bulunması araştırmacıları yeni ilaç tasarımlarına zorlamıştır. Ayrıca bu yan etkiler özel ilaç dozu ayarlama protokollerinin oluşturulması, koruyucu ve yardımcı ajanların sentezlenmesi/kullanılması gibi açılımları beraberinde getirmiştir [88]. Söz konusu yan etkiler nedeniyle CDDP'nin kullanım şekli 100 mg/gün/ardışık 5 gün olarak ayarlanmış ve nefrotoksik etkisi hidrasyon/idrar atışı artırılması yolu ile azaltılmıştır.

Yan etkilerin giderilmesi amacıyla ilaç direncinin giderilmesine yönelik yapılan çalışmalar, CDDP türevi ilaçların sentezlenmesi ile devam etmiştir. Ayrılan grubun değiştirilmesi CDDP'deki klor atomları yerine farklı grupların olması ile elde edilen ve 2. nesil ilaçlar olarak adlandırılan ilaçlardan KP, CDDP'ye nazaran daha az toksik etki göstermiştir ancak CDDP'nin direnç gösterdiği hücrelerde antitümör etki gösterememiştir (cross resistance) [89]. Birlikte terapilerde kullanıma uygunluğu ve

düşük toksik etkisinden dolayı uygulanabilir dozunun yüksekliği KP'nin özellikle yumurtalık kanserinde kullanımını artırmıştır [90]. Hücre hatları kullanılarak, ilaçlara direnç gösteren tümör çeşitlerini hızlı bir şekilde belirlenebilmesi anti-kanser ilaç çalışmalarına ivme kazandırmıştır. Son 20 yıl içerisinde klasik cis-amin-2 ayrılan grup yapısında olmayan ve farklı amin grupları içeren bileşikler geliştirilmiştir [91-93]. Üçüncü nesil ilaçlar olarak adlandırılan bu yapılardan OP ilk olarak Fransa'da kolon kanseri tedavisinde kullanılmıştır. CDDP dirençli hücrelerde ilaç direnci oluşturmaması ve nefrotoksik etkisinin çok az olması kullanımını yaygınlaştırmıştır [74].

2.3. Yapı-Aktivite-İlaç Direnci İlişkisi

CDDP (*cis*-diaminplatin(II)) sitotoksik özelliğe sahipken *trans*-diaminplatin(II) bileşiğinin sitotoksik etki göstermemesi yapı-aktivite ilişkisinin öneminin ilk işareti olmuştur. Bu izomerlerin toksik etkisinin farklılığı, *trans*-izomerin, yapısı gereği birbirine 180° 'lik açıda bulunan ve ayrılabilen klor gruplarının, 1,2-GpG zincir içi bağlanmasını sağlayamamasına dayandırılmaktadır. Bu iki izomerden *trans*-izomer apolardır ve hidroliz kinetiği farklıdır [73]. Aynı durum KP ve izomeri için de geçerlidir [83]. KP'nin CDDP'ye nazaran yan etkilerinin daha az olması ancak tümör hücrelerinde çapraz direnç göstermesi, CDDP ve KP'nin aksine; DNA-OP yapısının tanıma proteinleri (mismatch repair, MMR) tarafından fark edilmemesi [94], OP'nin 1,2-zincir içi DNA çapraz bağlanmasındaki farklılıklar [95] ve CDDP dirençli hücrelerde aktivite göstermesi [96], kimyasal yapı-aktivite-yan etkilerin birbirine bağlılığına işaret etmektedir.

2.4 Yeni Tasarım İlaçlar

Geliştirilen ve yeni tasarlanan moleküllerin yukarıda belirtilen cisplatin direnci kaynaklı problemlerin üstesinden gelmesi ve cisplatine hassas olmayan tümörlerde etkili olması hedeflenmektedir. Bu gerekliliğin NH₃ içermeyen ligandlarla, 2-3 metal merkezli yapılarla [97,98] ve *trans* geometrili moleküllerle [99-102] sağlanabildiği tespit edilmiştir. *Trans*-geometrili iminlerin bile bu amaçla kullanıldığı belirtilmiştir [103].

Özellikle toksik yan etkileri azaltılmış ve ilaç direncini yenmiş yapıların sentezi için ileri analizler gerçekleştirilmektedir. Ayrıca kontrollü salım ve ilaç hedeflendirme/yönlendirme isteği, araştırmaları yeni platin bileşiklerinin sentezine

yönlendirmiştir. Yapılan çalışmalar metal koordinasyon bileşiklerinde metal-ligand değişim hızının hücre bölünme işlemleri ile yarışabilir nitelikte olması gerektiği genel gerçeğini ortaya çıkarmıştır. Bu niteliğe sahip olan Ru(II) ve Pt(II) bileşiklerinin yüksek aktivitede antikanser özellikte olmaları, çalışmaları bu iki metalin komplekslerine yönlendirmiştir [50,104]. Prensipte olarak, yeni sentezlenecek ilaçlarda aşağıda belirtilen konularda yapılacak olan dikkatli farklılandırmaların faydalı olacağı düşünülmektedir:

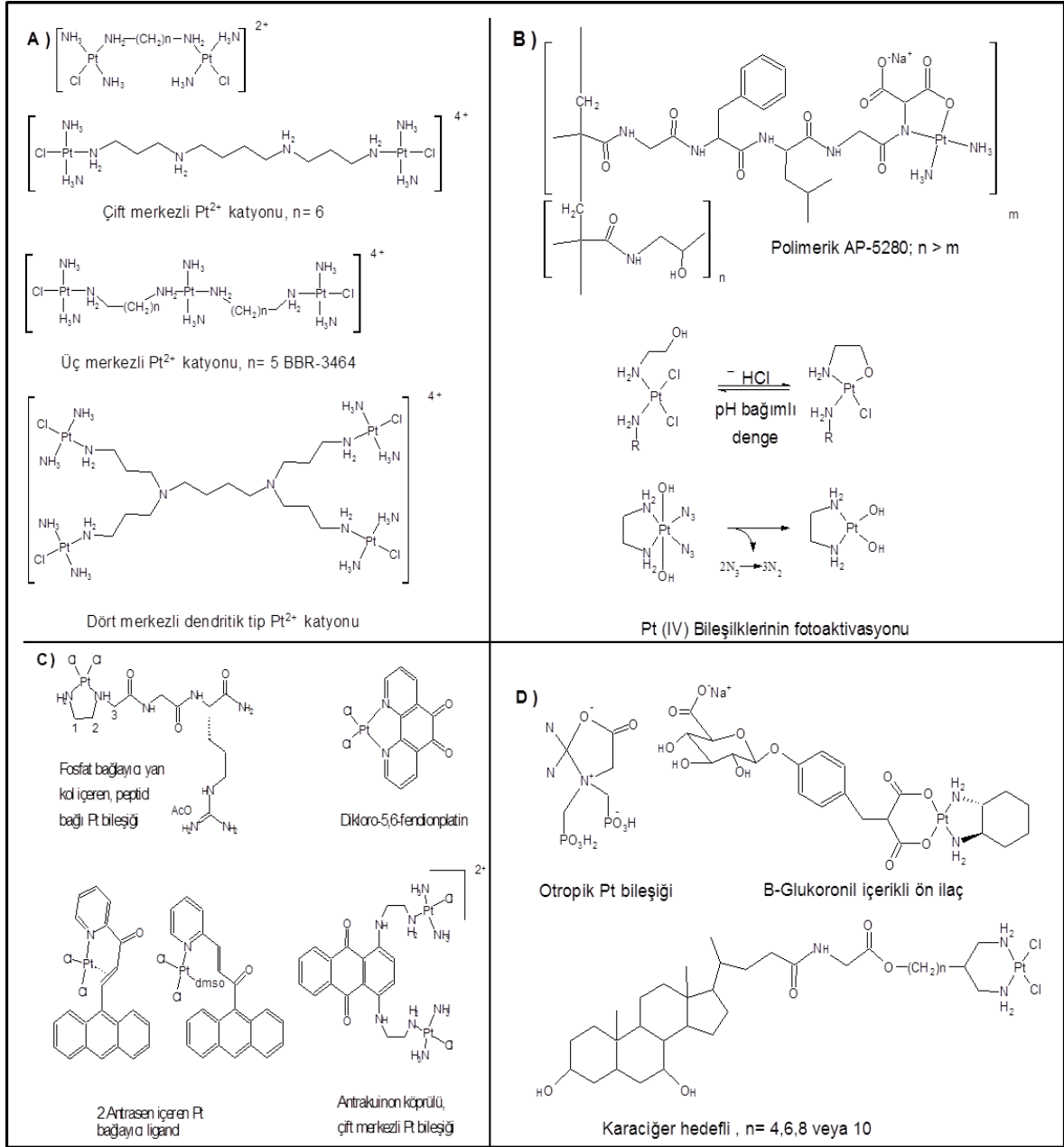
- a) Platine bağlı olan amin ligand: şelat yapıcı olabilir/olmayabilir, H-bağının donör, sterik etkisi olmalı, DNA ile ikincil etkileşime girebilecek yan kolları olmalı, taşıyıcı grup içermeli, aktiveleştirici/yönlendirici grup içermeli,
- b) Platine bağlı olan ayrılan grup: toksik olmamalı, ligan değişim kinetiği en uygun hızda olmalı, ön ilaç olarak davranabilmelidir.

Bu özelliklerin yanı sıra, son yıllarda sentezlenen ve moleküler yapı örnekleri Şekil 4'te verilen en önemli ilaçlarda öne çıkan bazı özellikler şunlardır [44]:

- i. Kontrollü salım: ilaç uygulandıktan bir süre sonra aktif hale gelir, tasarlanan zaman ve hedeflenen bölgeye kadar etkileşime girmeden hareket eder. İlacın derişimini artırmak amaçlı dokuya özgün taşıyıcı ligandlar içerebilir. Salımı tümörlü dokuda kontrollü ve programlı olarak yavaş gerçekleşebilir. İlacın aktiveşmesi kimyasal parçalanma ile (tümörlü dokular makromoleküllere karşı aşırı geçirgenlik gösterdikleri için polimerden [105], endositoz yolu ile hücre içine alınabildikleri için nanopartikülden), pH değişikliği ile, redoks ya da fotokimyasal yolla olabilir. Ayrıca bileşikler yalnızca belli tümör yüzeylerde salınan korumalı taşıyıcı gruplar içerebilirler (antibadi, enzim gibi).
- ii. Bileşikler, diğer kemoterapi ajanları, antikanser aktivite gösteren interkelatörler, biyolojik aktif yardımcı ligandlar gibi moleküllere bağlı olarak tasarlanabilirler ve sinerjik etki oluşturabilirler.
- iii. Esnek ya da sıkı/sağlam köprüler ile birbirine bağlı birden fazla Pt atomu içeren bileşikler tasarlanabilir. Eklenen ikinci metal Pt'den farklı olabilir ve/veya başka bir DNA bağlayıcı grup olabilir.

Yapılan çalışmaların genel bir değerlendirmesi yapılacak olursa, yeni bileşikler cisplatin referans alındığında gerekli kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip ve çok aktif olabilirler ancak DNA ile etkileşimleri zayıf olabilir ya da etkileşimleri

olmayabilir. Platin dışındaki metallerin birçoğu kanser tedavisinde aktif olabilirler ancak öncelikli olarak diğer biyolojik hedeflerle etkileşiyor olabilirler [106,78]. Platin ilaçlarının, tüm farmakolojik ve toksikolojik davranışlarının anlaşılabilmesi ve yeni ilaç tasarımlarının geliştirilebilmesi için, bu moleküller tasarlanırken platin içerikli ilaçlara hücre içi alternatif yollar ve etkileşimler göz önünde bulundurulmalıdır [44].



Şekil 2.4. (A) di/oligo atomlu Pt ilaçlar, (B) Yavaş ve kontrollü salım örneği olan ilaçlar; (C) Sağlam ve esnek kollarla başka bir kemoterapik ajanın bağlı olduğu Pt ilaçlar ve (D) Hedefe özgün yönlendirilmiş ilaçlar [44].

2.5 Platin-Biyomolekül Etkileşimleri

Yapılan çalışmalar sonucunda, Pt komplekslerinin tedavi edici özelliklerini DNA ile etkileşime girip DNA'nın yapısında bir eğilme meydana getirdikleri ve bu eğilmenin DNA polimeraz prosesini engellediği genel kabul gören bir gerçektir. Antikanser adayı olarak tasarlanan moleküllerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra, sentezlendikleri orijinal formunun mu yoksa hidroliz ürünlerinin mi aktif olduğunun belirlenmesi, DNA etkileşim bölgesinin ve kinetiğinin belirlenmesi, DNA-Pt komplekslerinin oluşumunu engelleyen protein-Pt komplekslerinin tür ve miktar analizlerinin gerçekleştirilmesi önem taşımaktadır. Tüm bu analizlerin yapılabilmesi Pt ve/veya Pt-bağlı yapıların türlendirilmesini gerektirmektedir [74]. Ayrıca, önceden tasarlanmış metal içerikli ilaçların etkileşim mekanizmasının aydınlatılması, yeni, daha etkin ve mantıklı tasarımların geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Bu tanımlamaların yapılmasında kullanılacak olan teknikler ilgilenilen geçiş metalinin ve biyomolekülün türüne göre çeşitlilik arz etmektedir. Çeşitli tekniklerin birlikte kullanılması ile elde edilen analiz sonuçlarının çalışmalara yön verdiği görülmektedir.

Kromatografik teknikler (ince tabaka, büyüklükçe ayırma ve sıvı kromatografisi), NMR, mikroskopik yöntemler, elektroforez (kapiler, 2D-jel), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), IR ve UV/Vis spektroskopisi sıklıkla kullanılan teknikler arasındadır. Işığa duyarlı komplekslerin bazıları floresan ve luminesan özellik gösterdikleri için floresans spektroskopisi ve luminesans ölçümlerle de analizleri mümkün olmaktadır [107]. Ayrıca yapısal ve miktar bilgilerin elde edilmesinde Kütle Spektrometrisi ilave bilgiler sağlamaktadır. Birçok MS tekniği, geçiş metal komplekslerinin sentezinden sonra kalite kontrolün bir parçası olarak kullanılsa da, ilgilenilen biyomoleküllerle etkileşimin belirlenmesi amacıyla sık sık karşımıza çıkmaktadır.

2.6 Biyoinorganik Yapıların DNA İle Etkileşim Yolları

DNA büyük ve karmaşık yapısı nedeniyle birçok potansiyel bağlanma bölgesine sahiptir. Bu nedenle koordinasyon bileşikleri iki ana etkileşim modu ile DNA'ya bağlanabilmektedir. Kovalent veya koordine kovalent bağlanmayı içeren tersinmez bağlanma ve moleküller arası etkileşimlerden kaynaklanan tersinir bağlanma etkileşim yollarının temelini oluşturmaktadır. Tersinir bağlanma kendi içinde elektrostatik etkileşimler, yarık bağlayıcılar ve interkalasyon şeklinde gerçekleşir

[181]. UV titrasyon yöntemi, dairesel dikroizm spektroskopisi, DNA erime noktası tayini, vizkozimetri ve agaroz jel elektroforez yöntemleri DNA-metal kompleksi etkileşimlerinin incelenmesinde kullanılan başlıca yöntemlerdir [166].

Cisplatin ile elde edilen Çarpıcı sonuçlar nedeniyle uzun süre, kare geometriye sahip, interkalasyon yapabilen bileşiklerin DNA ile etkileşimin gerçekleştirilmesinde en iyi aday moleküller olduğu düşünülmüştür [181]. DNA baz çiftleri arasında küçük bir ligandın yerleşerek sabit bir sandviç benzeri yapı oluşturduğu İnterkalasyon şeklinde etkileşimin yalnızca kare düzlem yapılarında değil aynı zamanda kiral oktahedral ve düzgün dörtyüzlü kompleks yapıları ile de sağlanabildiği tespit edilmiştir [195-196]. İnterkalasyona yapan moleküller, baz çiftleri arasında boşluk oluşturur ve sarmal yapıyı uzatır. DNA yapısındaki bu değişiklikler translasyon ve transkripsiyon gibi olağan prosesleri engeller [166].

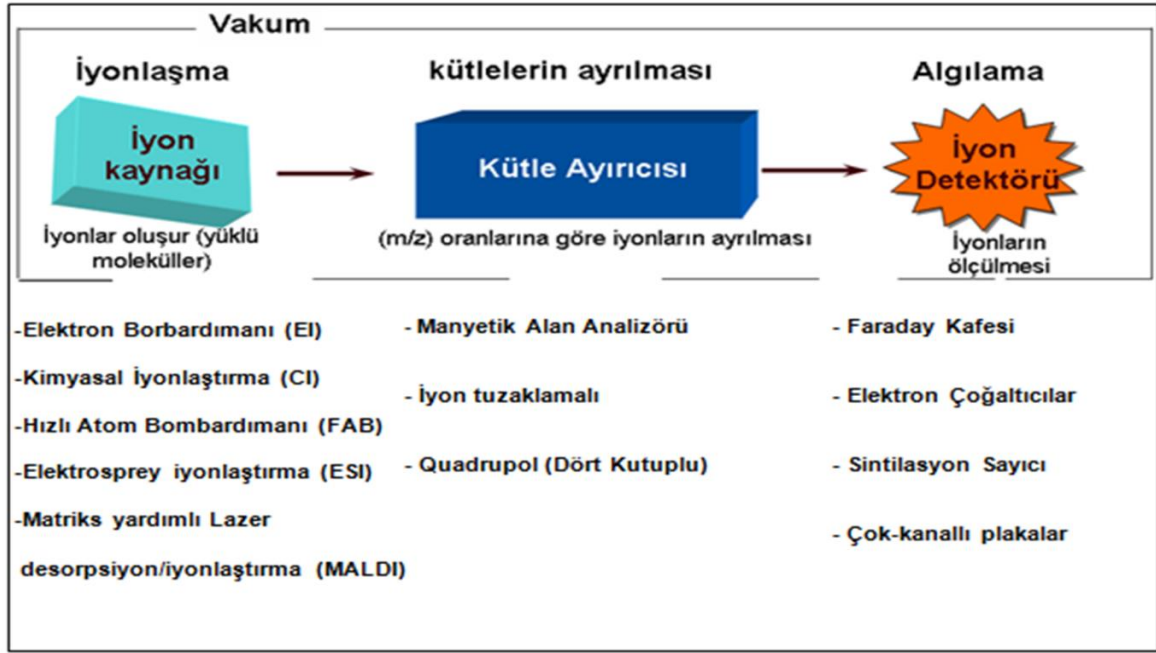
3. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ

Kütle spektrometrisi, protein ve DNA analizlerinde kullanılabilen, yüksek molekül ağırlıklı biyomoleküllerin analizlerini doğru ve hızlı bir şekilde yapmaya olanak sağlayan günümüzün en güçlü araçlarından biridir. Büyük moleküllere ilave olarak, peptitlerdeki aminoasit dizilimleri veya bir oligosakkarit'in şeker dizilimleri gibi dizi analizleri, kısa zamanda, yüksek bir doğrulukla ve biyomoleküllerin yapısından kaynaklanan pek çok sınırlamadan etkilenmeksizin yapılabilmektedir [108]. Kütle spektrometrelerinin, gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi veya kapiler elektroforez gibi ayırma metotlarıyla birleştirilerek çok daha etkin analizlerin yapıldığı bilinmektedir [109]. Kütle spektrometrik şartlarda uçuculukları yok denecek kadar az olan ve düşük kararlılıkta olan moleküllerin (özellikle polimerlerin) Kütle Spektrometrisi ile analizinde 1990'lı yılların başına kadar başarı sağlanamamıştır. Yumuşak iyonlaştırma teknikleri olarak da bilinen; Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı (MALDI, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization) ve Elektrosprey İyonlaşmalı (ESI, Electrospray Ionization) tekniklerinin keşfi ile proteinler ve diğer biyomoleküllerin kütlelerinin, bir bütün halinde (intact), yapıyı bozmadan mükemmel bir doğrulukla ölçülebilmesi başarılmıştır [110].

3.1. Kütle Spektrometrisinin Genel Prensipleri

Temel bileşenleri; iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve veri sistemi olan kütle spektrometrisinde örnek molekülleri, sisteme doğrudan (enjektör, plaka, prob, oto örnekleyici) ya da kromatografik cihazların çıkışı Kütle Spektrometresinin iyon kaynağı girişi ile bir ara yüzey vasıtasıyla birleştirilerek verilir. Sisteme verilen örnek molekülleri iyon kaynağında iyonlaştırılır, gaz fazındaki bu iyonlar daha sonra bir kütle analizöründe kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılır, dedektöre ulaşan iyonların kütle/yük oranları belirlenir ve dedektörden alınan sinyaller bilgisayara aktarılarak spektrum kaydedilir [108]. İyon kaynağından çıktığı andan dedektöre ulaşana kadar tüm süreçlerde gaz fazında olduğu bilinen örnek iyonlarının birbirleri ve hava molekülleri arasındaki muhtemel çarpışmaları engellemek amacıyla sistemin tamamı yüksek vakum altında (en az 1×10^{-5} Pa) çalışmaktadır. İyon kaynağı, kütle ayırıcısı ve dedektör çeşitleri farklı şekilde

tasarlanarak istenilen özellikte Kütle Spektrometresi sistemleri elde edilmektedir. Şekil 3.1'de Kütle Spektrometresinin temel bileşenleri ve çeşitleri verilmiştir.

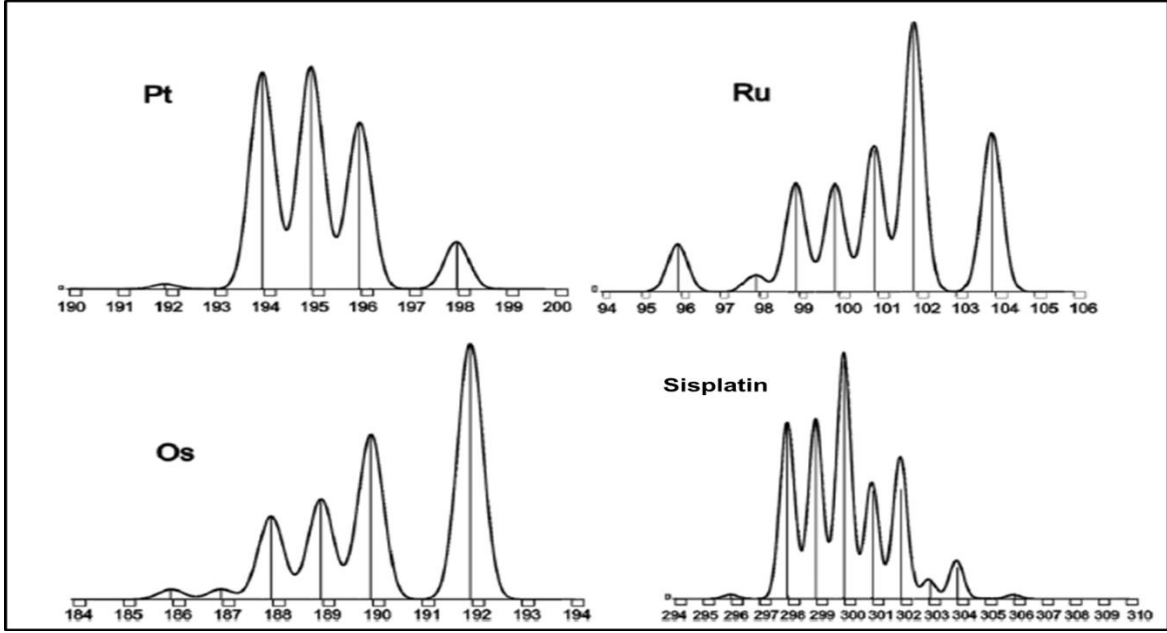


Şekil 3.1. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri.

3.2. Kütle Spektrometresinin Geçiş Metali Kompleksleri-Biyomolekül Etkileşimlerini Belirlemedeki Yeri

İlaç uygulamalarında kullanılan *in vitro* ortamlarda ve klinik numunelerde, özellikle metalin ve bağlı bulunduğu molekülün türlendirme analizlerinde, sırasıyla Kromatografik analiz-İndüktif Eşlenmiş Plazma-Kütle spektrometresi (ICP-MS) ve Kapiler Elektroferez-Elektrosprey İyonlaşmalı-Kütle Spektrometresi (CE-ESI-MS) yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır [74]. Elementel açıdan bakıldığında, geçiş metallerinin fazla sayıda doğal izotop içermeleri ve bu izotopların yüksek ayırıcılık sayesinde Kütle Spektrometresi sistemleri ile izlenebiliyor olması sistemin avantajları arasında yer almaktadır. Platin ve rutenyum gibi metal komplekslerinde ve bunların biyomoleküler ligandlar (özellikle izotopu bulunan element içeren ligandlar) ile etkileşim sonucu oluşan komplekslerde, söz konusu bu izotopların kütle spektrumuna yansımaları karışıklık oluştursa da yapının aydınlatılması açısından önem arz etmektedir [107]. Bu duruma örnek olarak Şekil 3.2'de verilen geçiş metallerin ve CDDP' nin teorik izotopik dağılımı görülmektedir. CDDP'de

platin atomunun yanı sıra iki adet klor atomu bulunmasının spektruma etkisi, iç içe girmiş iki farklı izotopik dağılım olarak spektruma yansımıştır.



Şekil 3.2. Bazı geçiş metalleri ve CDDP'nin teorik kütle spektrumu [99].

Biyomolekül-metal içerikli ilaç arasındaki olası etkileşim, etkinliği test edilen ilacın ortama (oligonükleotid, DNA, protein, peptid) ilave edilmeden önceki ve sonraki kütle spektrumlarının karşılaştırılması ile anlaşılabilir. İlacın ilavesi ile elde edilen kütle spektrumunda görülen temel pikler ile ilacın ilavesinden önceki pikler karşılaştırıldığında elde edilen $\Delta m/z$ değeri, yeni komplekslerin oluşumunu işaret edebilmektedir. Ayrıca, yeni pik oluşumu ya da eski piklerin elde edilememesi; yeni ilave edilen ilacın ortamda bulunan reaktantlarla etkileşime girdiğini ve ürün oluşumunu göstermektedir.

Elektron iyonlaşma (EI), kimyasal iyonlaşma (CE), atmosferik basınçta kimyasal iyonlaşma (APCI), atmosferik basınçta fotoiyonlaşma (APPI), ESI ve son zamanlarda kullanılmaya başlanan desorpsiyon elektrosprey iyonlaşma (DESI) teknikleri kütle spektrometrelerinde gaz fazında iyon elde etmek amacıyla sıkça kullanılan iyonlaşma tekniklerindedir. Bunların yanı sıra, biyomolekül-ilaç arasındaki bağın kararlılığını belirlemede; hızlı atom bombardımanı (FAB) ve daha özgün uygulamalarda MALDI ve silika üzerinde desorpsiyon iyonlaşma (DIOS) teknikleri de kullanılmaktadır. ESI ve MALDI yumuşak iyonlaştırma teknikleri ile

yapılan analizlerde molekülün bütün haline dair iyonlar elde edildiğinden yapısal bilgi gerektiğinde bu teknikler yetersiz kalmaktadır ve parçalanma farklı şekilde sağlanmalı ve ürünlerinin analizi yapılmalıdır. Bu sistemlerin uygulandığı modern ve yeni nesil cihazlar gerekli tüm olanakları bir arada sunmaktadır. Bu yöntemlerin diğer bir avantajı, organik ve inorganik moleküllerde modifikasyona ihtiyaç duyulmadan kolayca analizin gerçekleştirilebiliyor olmasıdır [107].

3.3 Matris Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS)

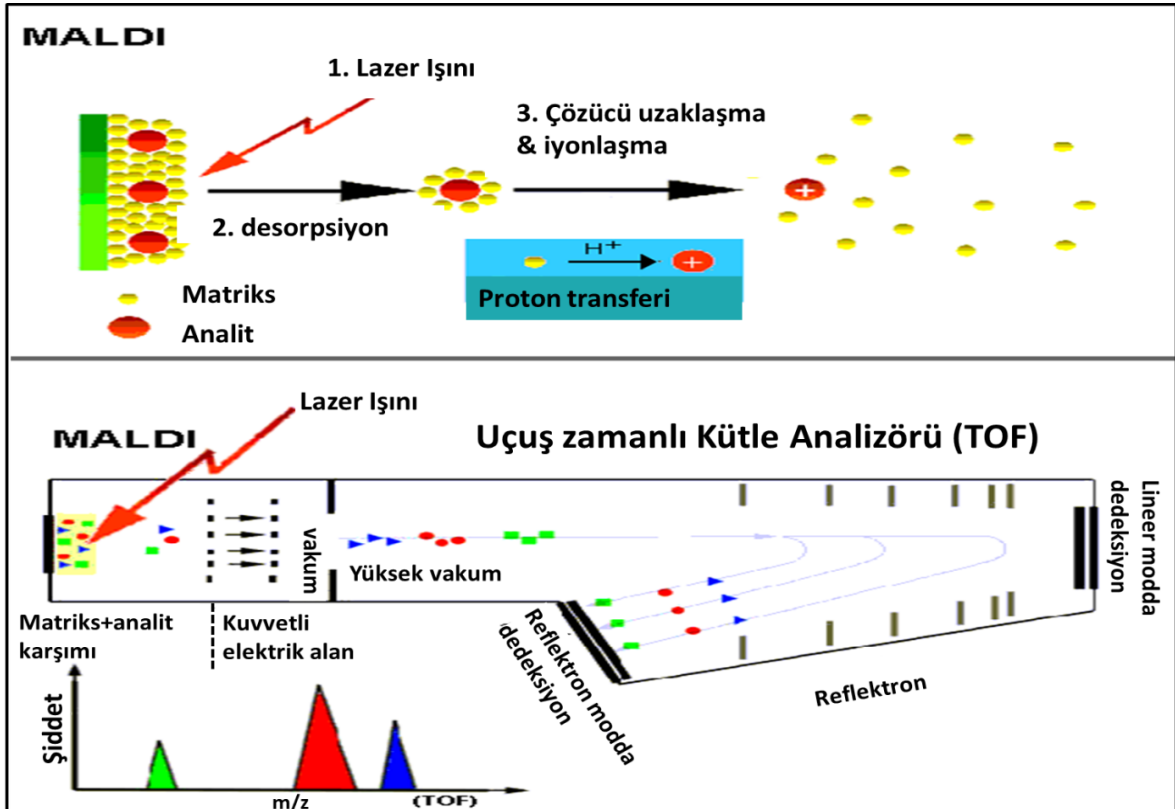
İlk keşfi 1987'ye dayanan, Koichi Tanaka tarafında "lazer desorpsiyonlu yumuşak iyonlaşması" (SLD) olarak adlandırılan bu iyonlaşma tekniği, 1990 ların başında iki Alman bilim adamı Prof. F. Hillenkamp ve Prof. M. Karas tarafından yepyeni bir Kütle Spektrometrik teknik olarak tasarlanmış ve ikiliye American Chemical Society'nin 1995 yılı ödülünü kazandırmıştır. MALDI adı verilen bu iyonlaştırma kaynağı, 2002 yılında Koichi Tanaka'nın Nobel ödülüne layık görülmesine sebep olmuştur.

Duyarlılığı oldukça yüksek olan (akto mol, 1×10^{-15} mol) çalışmaların rahatlıkla yapılabilirdiği sistemde, kesin olarak molekül ağırlığı tespit edildiğinden tür analizleri kolayca gerçekleştirilebilmektedir. MALDI-TOF MS sisteminin en önemli avantajlarından biri de molekül ve zayıf kompleks yapıların yumuşak (soft) iyonlaştırılmasının yapılabilmesi nedeni ile kararsız bileşik ve komplekslerin yapıları, biyopolimerlerin kapalı (folded) yapıları bile bozunmadan gaz fazına geçirilip iyonlaştırıldıktan sonra tayin edilebilmesidir [110].

3.3.1. İyonlaştırma Prensipleri

MALDI iyonlaşmasında, örnek molekülü; uçuculuğu düşük ve analit molekülleri ile kimyasal reaksiyona girmeyecek yapıda, düşük vizkoziteli ve kullanılan lazerin dalgaboyundaki ışını absorplayabilecek moleküller olan matris molekülleri ile karıştırılır. Bu karışım, metal bir örnek tutucu üzerinde birlikte kristallendirilir (kurutulmuş damlacık metodu). Numunenin MALDI kütle spektrometresine girişini sağlayan örnek tutucu ile uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) girişi arasına elektriksel bir alan uygulanır (Şekil 3.3). Daha sonra örnek-matris karışımı, kesikli bir lazer ışınına maruz bırakılır. Lazer kaynağından yayılan fotonlarla, örnek-matris kristalleri bombardıman edildiğinde, matris molekülleri hemen uyarılır ve

enerjisini komşu moleküllere aktarmadan önce örnek molekülleriyle beraber gaz fazına geçer. Bazı analit ve matriks molekülleri bu işlem esnasında iyonlaşır. Gaz fazındaki iyonlar, elektriksel bir alan uygulanarak, uçuş zamanlı kütle analizörüne (TOF) doğru hızlandırılırlar. Matriks molekülleri ile analit molekülleri arasındaki proton transferi sayesinde iyonlaşma enerjisi analit moleküllerine transfer edilir. Genelde elde edilen analit iyonları $[M-H]^-$ veya $[M+H]^+$ molekül iyonları olduğu gibi, tampon çözeltilerinden gelen alkali metal iyonlarının katılımıyla $[M+Na/K]^+$ iyonları da olabilir. Ayrıca çok yüklü moleküler iyonlar da oluşabilir. Analit türüne göre matriks seçimi ve örnek hazırlama şekli çok önemlidir. Matriks kullanılmadığı takdirde analitler yüksek enerjide yalnızca desorbe olurlar ve bu da analit moleküllerinin parçalanmasına sebep olur. Azot lazerleri 337 nm dalga boyunda ışınım yaparlar ve UV-bölgede absorpsiyon yapan matriksler için en yaygın kullanılan lazer kaynağıdır. IR-lazerleri, UV-lazerlerine göre daha yumuşaktır ancak IR bölgesinde absorpsiyon yapabilecek matriks sayısı azdır. En sık kullanılan IR Lazer türleri; Er-YAG lazerleri ve CO₂ lazerleridir.



Şekil 3.3. MALDI-TOF sisteminin şematik gösterimi.

3.3.2. Uçuş Zamanlı Analizörde Kütle Analizi

Lineer ve refletron modu olmak üzere iki farklı modu bulunan TOF kütle analizörleri MALDI'de en sık kullanılan kütle analizörüdür. Büyük molekül ağırlıklı türler için bile, yüksek ayırıcılık ve doğrulukla kütlelerin belirlenmesini sağlamaktadır. Lazer ışını tarafından desorbe edilen ve elektriksel alan içerisinde belli bir kinetik enerjiyle hızlandırılan iyonlar, elektriksel alan uygulanmayan bir tüp içerisine girerler ve burada kütle/yük oranlarına göre farklı hızlarda hareket ederler. Tüpün sonunda, iyonlar dedektöre çarparlar ve uçuş zamanları yüksek bir doğrulukla elektronik olarak ölçülür. Tipik olarak yaklaşık iki metre uzunluğunda uçuş tüpleri içeren TOF sistemlerinin diğer analizörlerle kıyaslandığında, duyarlılığı çok yüksektir. Bu yüksek duyarlılığın sebebi uçuş zamanlı analizör içerisinde ön ayırmadan geçen bütün iyonların dedektöre ulaşmasıdır [109]. Şekil 3.3'de şematik olarak verilen Lineer uçuş zamanlı kütle analizöründe aynı kütleyle sahip iyonlar eşit kinetik enerji yüklenseler dahi, aynı zaman ve aynı bölgede desorbe olamamalarından dolayı farklı hızlara sahip olabilirler ve dedektöre farklı zamanlarda ulaşabilirler. Bu durum piklerin genişlemesine, ayırıcılığın zayıflamasına neden olur. Kütle analizörlerinde; küçük kütle farklarına sahip iyonların birbirinden ayrılabilmesini sağlama yeteneği olarak tanımlanan ayırıcılık; TOF analizörleri için, yarı yükseklikteki pik genişliği ifadesiyle (FWHM) tanımlanır. Herhangi bir pikin maksimum yüksekliğinin yarısındaki toplam genişliğinden ve o pikin tam ortasına gelen kütle değerinden hesaplanabilir [112]. TOF analizörleri, yansıtıcı (Reflektron) mod da kullanılarak ayırıcılık problemi önemli ölçüde giderilebilir [111]. Reflektron modun da, TOF analizöründe uçuş tüpünün sonuna iyonların yönünü değiştirecek bir kuvvet uygulanmaktadır. Karşı bir elektriksel alan uygulanarak, eşit kütleli fakat daha yüksek kinetik enerjili (hızı yüksek) iyonlar, karşı elektriksel alan içinde daha derinlere girerler ve yönlerini değiştirmek için daha uzun süre harcarlar. Bu sayede uçuş alanında hızları daha düşük olan iyonlara yetişirler. Lineer mod TOF ile yüksek molekül ağırlıklarına (100-900 kDa) çıkılabilir ancak kütle arttıkça ayırıcılık azalır. Reflektron mod TOF ise düşük molekül ağırlıklarıyla (10-90 kDa) sınırlıdır ve ayırıcılık çok iyidir (10000 civarında) [111].

3.3.3. İyonların Belirlenmesi

MALDI kütle spektrometresinde dedektör olarak genelde çok kanallı plaklar (MCP) kullanılır. Bu plaklar, fiber optik özellikli, kurşun içeren cam materyallerden yapılmış silindirik birçok kanal içerir. Bu plakalara çarpan iyonların enerjileri, dedektör yüzeyinde elektriksel enerjiye dönüştürülür. Oluşturulan elektron sinyali yükseltilir ve toplanır. Cihazın dizaynına bağlı olarak bu dedektörler tek başına da kullanılabileceği gibi, duyarlılığı artırmak için iki veya üç tanesinin kombinasyonu şeklinde de kullanılabilir.

3.4. Biyomolekül-Metal İçerikli İlaç Etkileşimlerinin MALDI-TOF MS ile İncelenmesi

3.4.1. MALDI-TOF MS ve Geçiş Metali Kompleksleri

MALDI ile geçiş metal içerikli ilaçlarının analizindeki en önemli problem, çoğu geçiş metal komplekslerinin kullanılan matriks moleküllerinde çözünmemesi ve matriks ile karışmamasından kaynaklanmaktadır. Bazen matriks molekülleri bu yapılar ile yığılaşmalar oluşturur. Bunun yanı sıra birçok geçiş metal kompleksi ışığa duyarlıdır ve bu durumun MALDI 'yi söz konusu analizlerde yetersiz kıldığını düşündürmektedir. Literatürde; 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) [114,116], sinapinik asit [118] ve α -siyano-4-hidroksi sinnamik asit (CHCA) [113, 115] gibi klasik matriksler kullanılarak metal komplekslerinin izlenebildiği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra flavanoidler [107] gibi yeni matrikslerin bulunması ile bu analizlerin MALDI ile kolay ve güvenilir bir şekilde yapılmasına olanak sağlamıştır.

3.4.2 Metal-İlaç-Oligonükleotid Komplekslerinin Analizinde MALDI-TOF MS

Nükleik asitlerin MALDI-TOF MS ile analizi hem negatif hem de pozitif iyonlaşma modunda yürütülebilmektedir. Bu moleküllerin negatif yük yoğunlukları fazla olmasına rağmen negatif iyonlaşma modunda izlenmeleri daha kolay olmaktadır. Analizlerde en yaygın olarak kullanılan matriksler 3-hidroksipikolinik asit ve 2,4,6-trihidroksi asetofenondur. Yeni sentezlenen oligonükleotidlerin kütlelerini kontrol etmek ve DNA modifikasyonlarını izlemenin yanısıra [119,120], yeni sentezlenen antikanser ilaç-DNA etkileşimlerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Garcia ve ark. tarafından yürütülen çalışmada rutenyum komplekslerinin DNA'ya bağlanma şekli belirlenmiştir [121]. Başka bir çalışma da ise sentezlenen platin kompleksinin hidrolize olmuş halinin guanozinmonofosfat (GMP) nükleotidi ile etkileşimi sonrası reaksiyon ürünleri tayin edilmiştir [121,122]. Işığa duyarlı bileşenlerin analizinde

MALDI'nin reaksiyonu tetikleme ve analiz etme işlemlerini tek basamakta gerçekleştirdiği görülmüştür [123].

3.4.3. Metal-İlaç-Protein Komplekslerinin Analizinde MALDI-TOF MS

Proteinleri MALDI-TOF MS spektrumları genellikle $m/1$, $m/2$ ve $m/3$ tek ve çok yüklü iyonlarının aynı sırayla azalan şiddetteki iyonlarından oluşmaktadır. Hücrede yaşamsal proseslerin düzenlenmesinde ve sinyal aktarımında rol alan yüksek molekül ağırlıklı proteinler, fonksiyonlarını gerçekleştirmek amacıyla çeşitli modifikasyonlara uğradıkları için homojen yapıda değildirler ve sahip oldukları amino asitlerden hangisi aracılığı ile ilaçlarla etkileşimlerinin kesin olarak tespit edilmesinde MALDI-TOF MS yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, özgün aminoasit-ilaç etkileşimini tespit etmek için; söz konusu ilaçlarla etkileşimi sağlanan proteinler, inkübasyon sonrası enzimatik parçalanmaya tabi tutulurlar ve ardışık MS (MS/MS) sistemleri kullanılarak analiz edilirler. Yapılan çalışmalar protein ve peptidlerin yüzeyinde bulunan aminoasitlerden sistein, metionin ve histidin amino asitlerinin metal içerikli ilaçlarla etkileşimlerde en güçlü etkileşim bölgesi adaylarıdır.

3.5. Elektrosprey İyonlaşmalı-Kütle Spektrometrisi (ESI-MS)

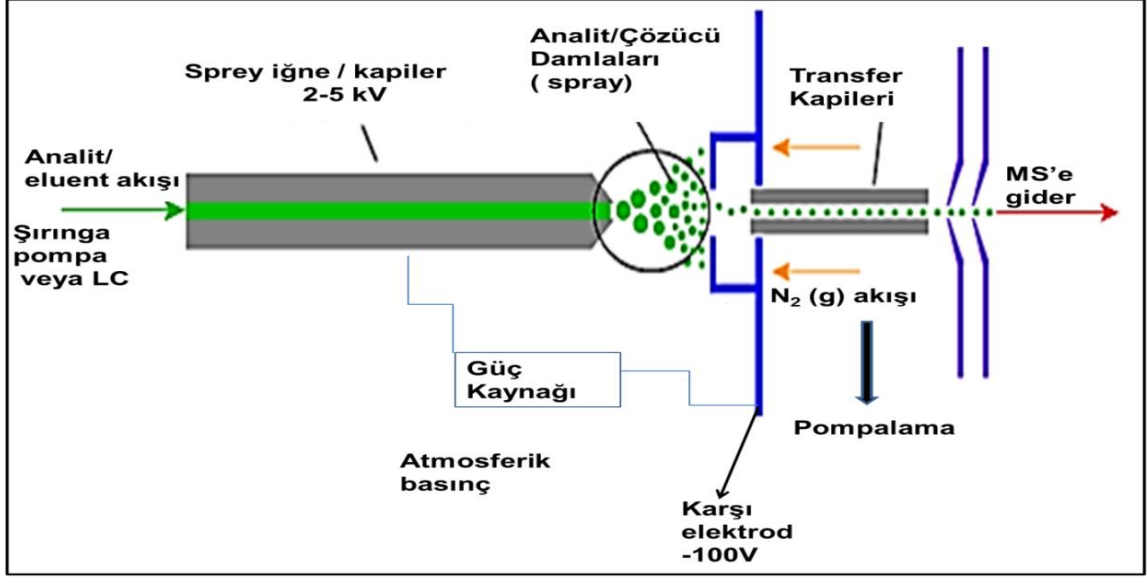
ESI iyonlaştırma tekniği, 1970'li yıllarda Dole ve arkadaşları tarafından icat edilmiştir [129]. Fenn ve arkadaşları, kimyasal türleri bir bütün olarak, parçalanma olmaksızın analize imkan sağlayan bu yöntemi, yüksek molekül ağırlıklı ve biyolojik önem taşıyan bileşiklerin ilk kez Kütle spektrometrisi ile analizinde kullanarak 2002 Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür.

ESI'da iyonların birden fazla hem pozitif hem de negatif yüklü olarak oluşturulabilmesi, ona desorpsiyon/iyonlaştırmalı yöntemlere göre bazı durumlarda daha fazla avantaj sağlamaktadır. Zayıf etkileşimle bağlanmış komplekslerin tayinine ve özgün komplekslerin sitokiyometrilerinin direkt olarak ölçülebilmesine olanak sağlanması, sıvı fazda gerçekleşen etkileşimleri bozmadan gaz fazına aktarabilmesi, ESI-MS sisteminin peptit, protein, aminoasit, polimer, oligosakkarit ve sentetik organik moleküllerin analizinde sıklıkla kullanılmasını sağlamıştır. Tipik bir ESI kütle spektrumu çok yüklü iyonların dağılımını gösterir. Çoklu yüklenmenin bir avantajı ise büyük moleküllerin, kütle/yük oranı küçük olan bir kütle ayırıcısı

(örğ; dört kutuplu) ile tayin edilebilmelerini sağlamaktır. ESI ile kromatografik yöntemler kolaylıkla birleştirilerek analiz yapılabilmektedir.

3.5.1. İyonlaşma

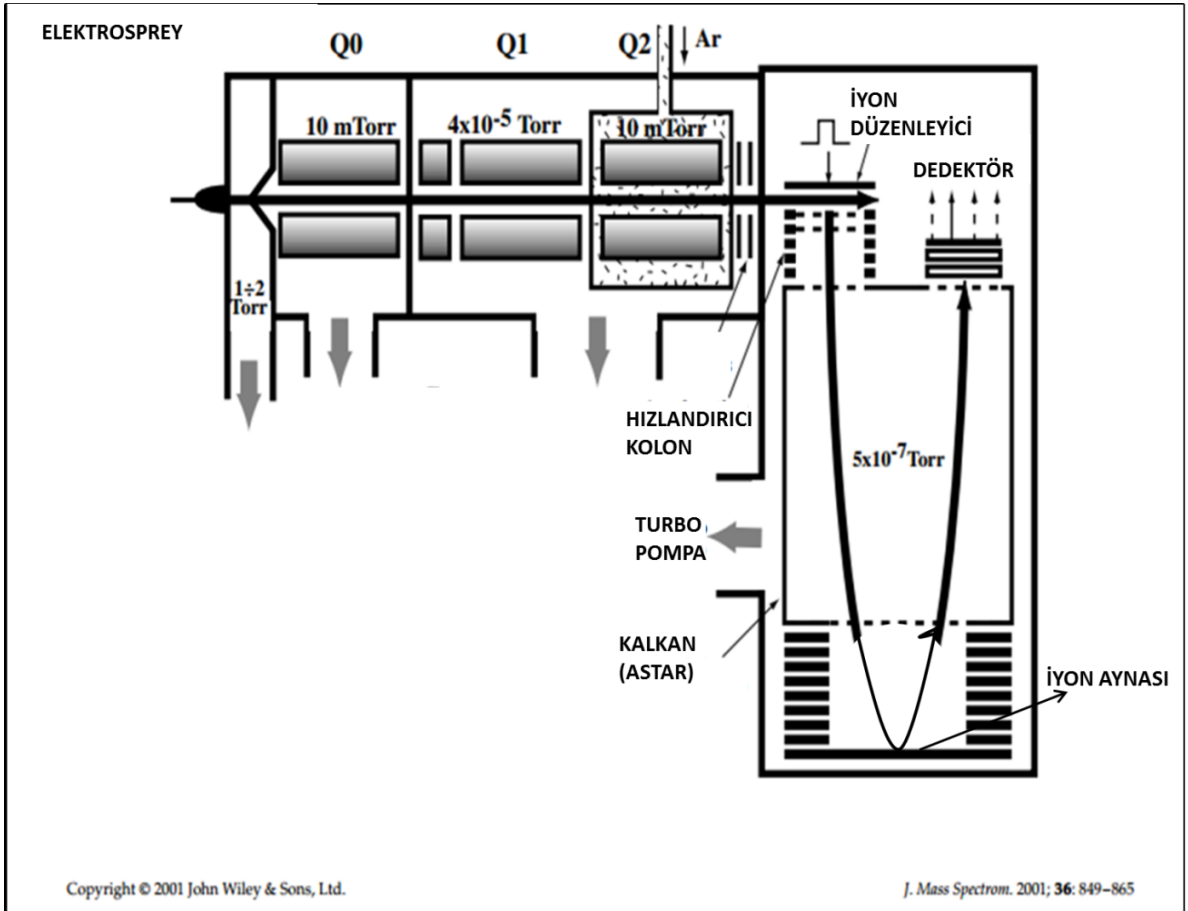
ESI'da örnek, kuvvetli bir elektriksel alan yardımıyla direkt olarak çözeltilerden püskürtülür [124,125]. Elektrosprey iyonlaşmada çözeltiler halinde bulunan örnek, akış hızı ayarlanabilen (nanolitre mertebesine kadar) bir şırınga ile cihaz içerisine pompalanır. Bu sırada çözeltilerde bulunan analit moleküllerinin yüklenmesini sağlamak amacıyla iğne şeklindeki bir kapillerin ucuna elektrik potansiyeli uygulanır ve örnek buradan püskürtülür. [126]. Püskürtme işlemi sonrasında yüklenmiş olan damlacıklar, kapillerin sonunda bulunan ancak daha düşük potansiyel uygulanan karşı elektroda doğru yönelirler. Damlacıkların bu yolculuğu esnasında analit moleküllerinin etrafını saran veya oluşan bu damlacıkların içerisinde bulunan çözücü moleküllerini buharlaştırarak uzaklaştırmak için kurutucu gaz gönderilir veya ısıtma işlemi yapılır. Bu işlem sonucunda oluşan çözeltiler damlacıklarında bulunan analit molekülleri, yükleri dolayısıyla birbirlerine karşı itme kuvveti uygularlar. Bu itmeler ile kulombik patlamalar oluşur ve aynı türlerin farklı yüklü iyonları oluşur [127]. Dolayısıyla, birden fazla fonksiyonel grup içeren büyük moleküller, çoklu yük taşıyan iyonlar haline dönüşebilirler. Şekil 3.4'de ESI'nın şematik olarak gösterimi verilmiştir. ESI'da iyonlaşan türler kütle/yük oranlarına göre ayrılmaları için kütle ayırıcısına gönderilirler. Kütle Spektrometrisi sistemlerinde kütle ayırıcısı olarak en sık kullanılan sistemler TOF, dört kutuplu (Quadrupol, Q), iyon tuzaklamalı (IT) ve manyetik alanlı analizörleridir. Bunun yanı sıra art arda dizilen kütle spektrometrisinden oluşan ardışık kütle spektrometresi sistemlerinde (Tandem, MS^n) ise TQ (ardışık dört kutuplu analizör, QQQ), Q-TOF, Q-IT, Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance (FT-ICR) en sık kullanılan MS-MS kombinasyonlarıdır.



Şekil 3.4. ESI-MS'in şematik gösterimi.

3.5.2. MS Analizlerinde Kütle Ayırıcısı Olarak Q-TOF

Genellikle MS² analizlerinde kullanılan quadrapol ve TOF analizörün hassasiyetini birleştiren bir sistem olan Q-TOF analizörlerinde; oluşan iyonlar Q0, Q1, Q2 olmak üzere üç kuadrapol (bazı firmalar Hekzapol kullanmaktadır) ve bir TOF analizöründen geçtikten sonra detektöre ulaşmaktadırlar. Q1 kütle ayırıcısının tek MS kullanımdaki görevi yalnızca iyonların taşınımını sağlamaktır. Bu görevi Radyo Frekans değerini sabit tutarak gerçekleştirir. Asıl kütle ayırıcısı görevini doğruluk ve kesinliği yüksek olan TOF bileşeni gerçekleştirir. Q0 bileşeni, yüksek atmosferik basınçta iyonlaşan moleküllerin soğutulması ve yönlendirilerek Q1 sistemine girmesini sağlamaktır [130, 131]. Q1'den Q2'ye iletilen iyonların tek MS'de parçalanması istenmediğinden 10 eV gibi düşük enerjili nötral Ar gazı ile çarpışmaları sağlanmaktadır. Q2'den çıkan enerji dağılımı homojenize olmuş iyonlar lensler yardımıyla hızlandırılarak TOF bileşenine yönlendirilirler ve iyonların m/z değerlerine göre ayırımı gerçekleşir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Q-TOF-MS sisteminin şematik diagramı [130].

Kütle ayırıcısında m/z değerine göre birbirinden ayrılan iyonlar dedektöre yönlendirilirler. Dedektör olarak ise array dedektörler, Faraday kafesi ve elektron çoğaltıcılar kullanılmaktadır.

3.6. Biyomolekül-Metal İçerikli İlaç Etkileşimlerinin ESI-MS ile İncelenmesi

3.6.1. ESI-MS ve Geçiş Metali Kompleksleri

Kütle spektrometresi ile yapılan geçiş metal komplekslerinin analizlerine yönelik çalışmalara bakıldığında ESI-MS tekniği kullanılarak gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarının sayısının diğer tekniklerden belirgin şekilde fazla olduğu dikkat çekmektedir. MALDI 'ye göre daha yumuşak iyonlaştırma özelliğine sahip olması geçiş metal kompleksi ürünlerinde analiz sırasında daha az parçalanma olmasını ve metal-ligand bağının korunmasını sağlamaktadır. Özellikle düşük molekül ağırlıklı yapıların analizinde ESI-MS de kullanılan taşıyıcının spektrumda izlenmemesi büyük avantaj sağlamakta ve daha basit spektrumların elde edilmesine sebep olmaktadır. Analiz için gereken numune

hacminin MALDI'ye göre daha fazla olması ve bir seferde yalnızca bir numunenin analizine imkan sağlaması dezavantajları olarak bilinse de sıvı kromatografisi ile sürekli sistemde (on-line) geçiş metal komplekslerinin analizine olanak sağlaması belirgin avantaj sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar komplekste yer alan geçiş metalinin türüne ve sayısına bağlı olarak farklı davranış ve parçalanma özelliği sergilendiği, hem pozitif hem de negatif mod da spektrumlar elde edilebildiği için ESI-MS'in rutin olarak koordinasyon kimyasında kullanılabileceğini göstermiştir [132]. ESI-MS analizlerinde tek sınırlayıcı etken geçiş metal kompleksinin iyonlaşma ortamında kararlı olmaması ve çözünmemesidir. Komplekslerin karakterizasyonunun yanı sıra çözelti ortamında kompleksin reaksiyonun takibine ve ortam değişkenlerinin reaksiyon üzerine etkisini incelemeye de olanak sağlamaktadır (pH, iyon konsantrasyonu v.b) [133]. Ayrıca, cihaz üzerindeki analiz metod parametrelerinin değişime bağlı olarak oluşan parçalanma ürünlerinin karşılaştırılmasıyla komplekslerin bağlı olarak kararlılıkları belirlenebilmektedir [128, 134].

3.6.2. Metal-İlaç-Oligonükleotid Komplekslerinin Analizinde ESI-MS

ESI-MS tekniğinin yumuşak iyonlaşma sağlıyor olması nükleik asit, oligonükleotid ve bunların geçiş metalleri ile yapmış oldukları komplekslerinin analizinde sıkça kullanılmasını mümkün kılmıştır. Oligonükleotidler, özellikle negatif iyonlaşma modun da her hangi bir iyonlaştırıcı gerektirmeksizin analiz edilebilmektedirler. Oligonükleotidlerin Kütle Spektrometrisi ile analizindeki en temel sınırlayıcı faktör Na^+ ve K^+ iyonlarının varlığıdır. ESI-MS ile analiz öncesi ters faz ve iyon değişimsıvı kromatografisi ile ayırım söz konusu tuz problemini engelleyebilmektedir. İyon çiftleştirici ajanların (triethylamonyum asetat gibi) kullanılması da iyon oluşumunu baskılayarak hassasiyeti arttırmaktadır. Ayrıca organik çözücü kullanımı ve uçucu baz kullanımının iyon oluşumuna katkısı olduğu da bilinmektedir [135].

3.6.3. Metal-İlaç-Protein Komplekslerinin Analizinde ESI-MS

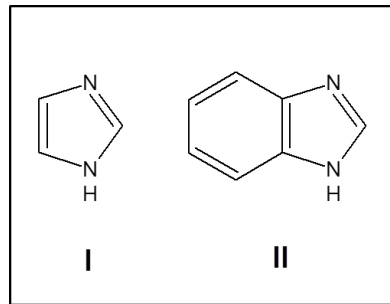
ESI iyonlaşma tekniği, proteinlerin ayrılmasında genellikle elektroforetik yöntemlerle birlikte kullanılmaktadır. Özellikle CDDP dirençli ve duyarlı ovaryum hücre hatlarının proteom analizlerinde doğrulama ESI-Q-MS ile yapılmaktadır. Bu analizler, sisplatin direnci mekanizmasına ışık tutmaktadır [136]. Proteinlerin bütün halinde analizinin mümkün olmadığı bu teknikte tripsin ile enzimatik parçalama

sonrası oluşan yavru iyonlar tanımlanarak yapı hakkında bilgi edinilmektedir. Molekül ağırlığı 100 kDa'dan büyük olan proteinler için tespit limitinin femtomolar düzeyde olması tekniğin üstünlüğüne dikkat çekmektedir [137]. Kovalent olmayan etkileşimleri izlemekte kullanılabilen ESI iyonlaşması özellikle peptit/protein-metal etkileşimlerinin tayininde özellikle bağlanma bölgesinin belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır. Bu tür analizlerdeki sınırlayıcı etmen protein-metal etkileşiminin iyonlaşma şartlarında kararlı kalma zorunluluğudur [107].

UV-Vis Absorpsiyon, Floresans ve NMR spektroskopisi gibi konsantrasyona bağlı olarak sinyal elde edilen tüm yöntemlerin termodinamik ve kinetik içerikli çalışmalarda, biyomolekül etkileşimlerinin izlenmesinde kullanımına sıkça rastlanmaktadır. Kimyasal kayma (NMR), sinyal şiddeti, radyoaktivite ve kırılma indeksindeki değişimler etkileşimlerin tespitinde önemli rol oynamaktadır. Bunların yanısıra herhangi bir işaretleme tekniği gerektirmeksizin etkileşimlerin anında ve sürekli analizine imkan sağlayan Yüzey Plasmon Rezonans Spektroskopisi (Surface Plasmon Resonance, SPR) özellikle protein-ligand etkileşimlerinde bağlanma ve ayrılmanın tayininde önemli bir yere sahiptir. Uygulanabilmesi için tek şartın analitin altın yada gümüş yüzeye bağlanabilmesi olduğu bu teknik uygulama alanının genişliği ve yüksek hassasiyetiyle biyolojik sistemlerin incelenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [138].

3.7. Benzimidazoller ve Anti Tümör Özellikleri

İmidazol ve benzimidazol (sırasıyla Şekil 3.6 I ve II) çekirdekler ilaç tasarımında önemli farmakoforlar olarak kullanılmaktadır [139]. Anti-enflamatuar [140], antioksidan [141], gastroprotektif [142], antitümör ve antiparazit gibi çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahip oldukları bilinen bu yapıların ilaçlarda kullanımı oldukça yaygındır.

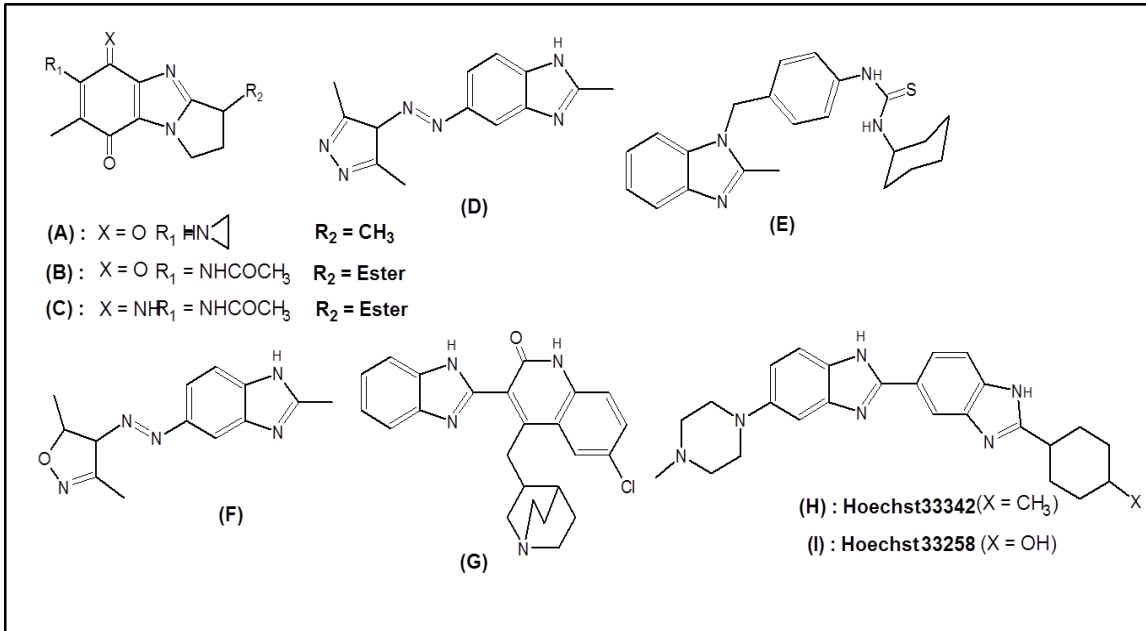


Şekil 3.6. İmidazol(I) ve benzimidazol (II) yapıları

Heteroaromatik yapıdaki benzimidazoller, biyomoleküllerin biyoizosterleri oldukları için biyolojik uygunluğa sahiptirler. İmidazollerin protein yapısındaki sisteinil kısım ile benzer özellikleri taşımaları, benzimidazollerin guanin yapısının biyobenzeri olması gibi özellikler bu yapıların ilaç sentezinde kullanımını artırmıştır [143].

Antikanser ajan olarak bilinen ilk gruptan olan Piro[1,2-a]benzimidazoller (Şekil 3.7 A-C), G ve A bazları üzerinden etki sağlayarak DNA'nın indirgeyici alkilasyonunu sağlamaktadır [144-148]. Farklı dallanmalara sahip olan benzimidazol türevlerinin (Şekil 3.7 D-F) akciğer ve göğüs kanserine karşı sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir [149,150]. Ni ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Şekil 3.7 G'de kiyasal yapısı verilen 2-(dallanmış quinolinon-3-il)benzimidazol molekülünün nano molardan düşük IC₅₀ (maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu, half maximal inhibitory concentration) değerine sahip olması yapıyı potansiyel antitümör kılmaktadır [151-152].

Bisbenzimidazol türevleri DNA zincirindeki küçük oluklarla etkileştikleri bilinen moleküller arasında yer alırlar. Kimyasal yapıları Şekil 3.7 H ve I'da verilen, sırasıyla Hoechst-33342 [153,154] ve Hoechst-33258 [155,156] olarak adlandırılan moleküller bisbenzimidazollerin antitümör davranışının ilk temsilcileridir.

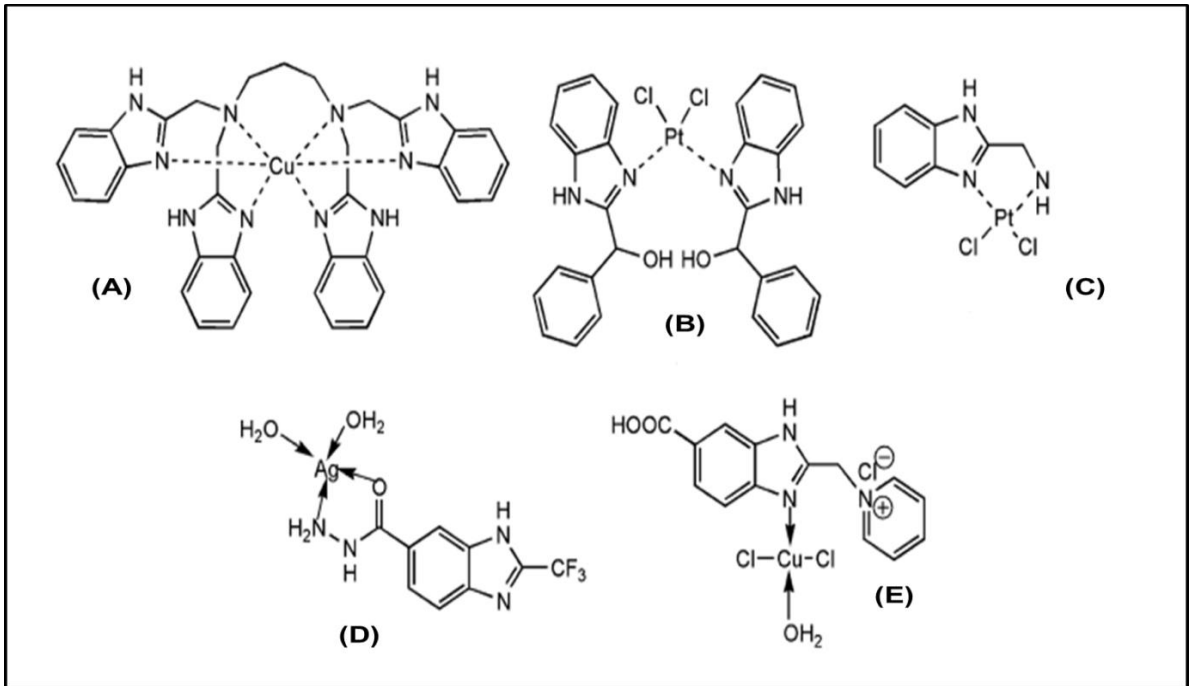


Şekil 3.7. Antitümör aktivite gösteren (A), (B), (C); pirol benzimidazollerin, (D), (E), (F); farklı ligandlar içeren benzimidazollerin, (G); quinolinon ligandlı benzimidazolün, (H) ve (I); bisbenzimidazollerin kimyasal yapıları [152]

Benzimidazol liganda sahip geçiş metal komplekslerinin de antitümör aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [152]. Benzimidazol-il-metil-1,3-diaminopropan-Cu²⁺ kompleksinin çift sarmal DNA'ya interkalasyon ile etkileşebildiği tespit edilmiştir (Şekil 3.8 A) [157].

Şekil 3.8B'de verilen Pt(II) komplekslerinin (Şekil 3B-C) insan göğüs kanser hücre hatlarından MCF-7 ve HeLa rahim ağzı kanser hücre hatları üzerindeki antiproliferatif (çoğalmaya karşı) etkisi değerlendirildiğinde potansiyel antitümör oldukları belirtilmiştir [158-163-].

Bakır, gümüş, demir ve mangan metallerinin 2-metilbenzimidazol-5-karboksilik asit hidrazin ile yapmış oldukları komplekslerden gümüş metaline ait olan kompleksin (Şekil 3.8 D) iki tür insan kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olduğu bulunmuştur (IC₅₀ değeri 2 µM) [164]. 2-piridinilbenzimidazol-5-karboksilik asit yapısının Cu²⁺ ile yapmış olduğu kompleksin (Şekil 3.8 E) topoizomeraz inhibitörü olarak işlev gördüğü tespit edilmiştir [165].



Şekil 3.8. Anti tümör aktivite gösteren (A) Cu²⁺, (B) ve (C); Pt²⁺, (D) Ag²⁺, (E) Cu²⁺ metallerinin farklı benzimidazol ligandlarla yapmış olduğu komplekslerin kimyasal yapıları [152].

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. Kimyasallar

Kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)klorür, (B19) molekülü ile nükleotidlerin etkileşimlerini incelemek için kullanılan AMP (adenozin monofosfat), GMP (guanozin monofosfat), CMP (sitidin monofosfat), TMP (timidin monofosfat) ve UMP (Uridin Monofosfat) nükleotidleri, ≥99 % saflık derecesi ile Sigma (USA) firmasından temin edilmiştir.

B19-oligonükleotid etkileşimlerini incelemek amacıyla, baz dizilimi tarafımızca belirlenen 5'-G-A-T-G-S-A-T-G-A-G-3', 5'-G-S-A-T-S-G-G-G-A-S-3' ve 5'-S-T-A-A-A-G-A-G-S-T-3' oligonükleotidleri Sigma (USA) firması tarafından sentezlenmiştir.

MALDI-TOF MS analizlerinde örnek hazırlamada kullanılan alfa-siyano-4-hidroksi sinamik asit (CHCA), 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB), 6-aza-2-tiyotimin (ATT), matriksleri Fluka (USA) firmasından, 3-hidroksipikolinik asit (3-HPA) matriksi Sigma (Aldrich, Almanya) firmasından ve sinapinikasit (SA) matriksi Acros (USA) firmasından, temin edilmiştir.

Trifloroasetik asit (TFA) Riedel-de Haen (Seelze, Almanya) firmalarından sağlanmıştır.

B19-peptit/protein etkileşimleri incelemek için kullanılan kimyasallardan L-GSH peptidi Sigma-Aldrich (USA), lizozim (tavuk yumurtası) proteinleri Sigma (USA), Ubiquitin (sığır) proteini Fluka (İsviçre) firmalarından temin edilmiştir.

İnkübasyon ortamı için tampon çözelti hazırlamada kullanılan amonyum bikarbonat Fluka (Almanya) ve amonyum asetat Fluka (İsviçre) firmalarından temin edilmiştir. *In vivo/vitro* ortamdaki klorür iyonunun istenen derişimini sağlamak amacıyla kullanılan sodyum klorür tuzu Sigma (USA) firmasından sağlanmıştır.

Tüm deneysel çalışmalarda hazırlanan sulu çözeltilerde 18.2 M.Ω.cm dirence sahip deiyonize su kullanılmıştır (Puris Expe-Ultrapure Water System, Mirae St Co. Ltd., Kore).

4.2. Kullanılan Cihazlar

4.2.1. pH Metre

Analizler öncesi gerekli tüm pH ayarlamaları küçük hacimler (mikrolitre) kullanılması nedeniyle mikro pH metre olan Mettler Toledo-Seven Multi pH metre (Mettler Toledo, İsveç) cihazı ile yapılmıştır.

4.2.2. Vorteks

Deneyler sırasında gerekli olan karıştırma işlemleri Heidolph-Reax Cotrol Vortex (Heidolph, Almanya) cihazı ile yapılmıştır.

4.2.3. MALDI Kütle Spektrometresi

Analizler sırasında tüm kütle spektrumları, Voyager-DE™ PRO MALDI-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS, Applied Biosystems, Amerika) ile alınmıştır. Sistemde 337 nm dalga boyunda azot lazeri (Spectra Physics, USA) kullanılmıştır. Karakterizasyonu gerçekleştirilen tüm analitleri (ilaç, oligo/nükleotid, peptid, protein, kompleks), yapıları bozulmadan bütün halde tayin edebilmek amacıyla kullanılan analit ve matriks türüne göre düzgün bir iyonlaşma için analiz sırasında lazer şiddetinin optimum değerleri tespit edilmiştir. Analizler süresince kütle spektrometresi içindeki vakum yaklaşık 5×10^{-8} torr civarında tutulmuş ve iyonların hızlandırılması için 20-25 kV potansiyel uygulanmıştır. Doğrusal modda alınan spektrumlar 100 lazer vuruşu, refletron mod da alınan spektrumlar 300 lazer vuruşu sonucunda elde edilmiştir. Kütle hatalarını engellemek için kütle spektrometresi anjiyotensin (1296.5 g/mol), insulin (5733.5 g/mol) ve BSA (66,423 g/mol) ile kalibre edilmiştir. Tüm yapılar hem pozitif hem negatif iyonlaşma modunda analiz edilmiş ve en uygun iyon verimi elde edilen şartlarda çalışmalara devam edilmiştir. Tüm veriler bilgisayara kaydedilmiştir.

4.2.4. ESI Kütle Spektrometresi

Yapılan çalışmalarda tüm analizler Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF-MS (Palo Alto, ABD) cihazı kullanılarak yürütülmüştür. B19 molekülü, GMP, AMP, CMP nükleotidleri ve B19 molekülünün tüm nükleotid çeşitleriyle yapmış olduğu komplekslerin analizleri sırasında uygulanan kütle spektrometresi değişkenleri Çizelge 4.1'de, UMP ve TMP nükleotidlerinin analizleri sırasında uygulanan kütle spektrometresi değişkenleri ise Çizelge 4.2'te verilmiştir. Analizler Goldman

şırınga pompası (Goldman Syringe Pump) kullanılarak doğrudan enjeksiyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. B19 molekülü, GMP, AMP, CMP ve nükleotidleri-B19 komplekslerinin analizi için uygulanan ESI-MS metodundaki değişkenlerin değerleri.

İyonlaşma Modu	Pozitif
Gaz Sıcaklığı	350 °C
Kurutucu Gaz	11 L/min
Nebilözör Gaz	50 psi
Kapiler Voltaj	4000 V
Parçalayıcı Voltajı	175 V
Nozzel Voltaj	300 V
Skimmer Voltaj	65 V
Enjeksiyon Hacmi	3 µl

Çizelge 4.2. TMP ve UMP nükleotidlerinin ESI-MS analizleri için uygulanan ESI-MS metodundaki değişkenlerin değerleri.

İyonlaşma Modu	Negatif
Gaz Sıcaklığı	350 °C
Kurutucu Gaz	12 L/min
Nebilözör Gaz	60 psi
Kapiler Voltaj	4000 V
Parçalayıcı Voltajı	300 V
Nozzel Voltaj	300 V
Skimmer Voltaj	65 V
Enjeksiyon Hacmi	3 µl

Sitokrom C, lizozim ve ubiquitin proteinleri ve bu proteinlerin B19 molekülü ile inkübasyonları sonucu elde edilen çözeltiler Agilent 1200 LC sistemi kullanılarak ESI-MS'e gönderilmiştir. İzokrotik çalışmanın gerçekleştirildiği LC'de kullanılan mobil faz ve oranları ile kütle spektrometresi çalışma şartları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Cyt C, lizozim ve ubiquitin proteinleri ve bu proteinlerin B19 molekülü ile inkübasyonu sonucu elde edilen çözeltilerin analizlerinde kullanılan LC-ESI-MS şartları.

LC Parametreleri	
Mobil Faz A	Su/ACN/FA
% Mobil Faz A	97 /3 /0.1
Mobil Faz B	Su/ACN/FA
% Mobil Faz A	3 /97 /0.1
Akış Hızı	0.3 mL/dk
ESI-MS Değişkenleri	
İyonlaşma Modu	Pozitif
Gaz Sıcaklığı	350 °C
Kurutucu Gaz Akışı	12 L/min
Nebilözör Gaz Basıncı	60 psi
Kapiler Voltajı	4000 V
Parçalayıcı Voltajı	200 V
Nozzel Voltajı	300 V
Skimmer Voltajı	65 V
Enjeksiyon Hacmi	3 µl

4.2.5. Hücre Hatları ve Büyüme Ortamlarının Hazırlanması

Prostat kanser hücrelerinden androjen reseptörüne bağımlı sağlıklı ve tümörlü PC-3 hücre hatları ve Akciğer kanseri Hücre hattı A-549; ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) firmasından satın alınmıştır. Bu üç hücre hattının büyümesi için aynı işlemle farklı ortamlar hazırlanarak, bağımsız çalışmalar yürütülmüştür. Hücre hatları, 10% FBS (fetal sığır serumu) ve 1% glutamin içeren Ham's F-32 büyüme ortamını içerisinde 37 °C ve 5 % CO₂ de büyütülmüştür. Bu büyüme ortamları aynı zamanda kullanılacak olan CDDP, B19, B33 ve B35'in de seyreltilmesinde kullanılmıştır. Liyofilize halde gelen hücre hatları büyüme ortamı yardımıyla sulandırıldıktan sonra T-25 büyüme kabına alınmış ve hücrelerin belirli bir sayıya ulaşabilmeleri için bir gece 37 °C ve 5 % CO₂' de inkübe edilmişlerdir. Büyüyen hücreler daha fazla hücre elde etmek amacıyla T-75

büyüme kaplarına transfer edilmişlerdir. Çoğalan hücreler 10 mM fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra hücreler 2 mL tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak büyüme kaplarından ayrılmış ve 24 kuyucuklu büyüme plakalarına aktarılmışlardır.

4.2.6. Hücre Proliferasyon Çalışmaları

PNT1A sağlıklı ve PC-3 tümörlü prostat kanser hücre hatları ile akciğer kanseri hücre hattı A549, büyüme ortamları içerisinde büyütüldükten sonra hücre proliferasyonunu gözlemek amacı ile tripsin-EDTA çözeltisi yardımıyla T-75 büyüme kaplarından alınarak 24 kuyucuklu büyüme plaklarına her kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde aktarılmış olup 24 saatlik bir inkübasyondan sonra hücrelerin bulunduğu kuyucuklara farklı derişimlerde CDDP veya aktivitesi ölçülecek ilaç adayı eklenmiştir. CDDP ve diğer ilaç adaylarının 250 μM 'lık stok derişimi uygun miktardaki bileşimin hücre büyüme ortamı içerisinde çözülmesiyle elde edilmiş olup, 24 kuyucuklu büyüme ortamı içerisine dörütlü tekrarlar halinde sırasıyla 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM ve 250 μM olacak şekilde PC-3 hücre hattı üzerine eklenmiştir

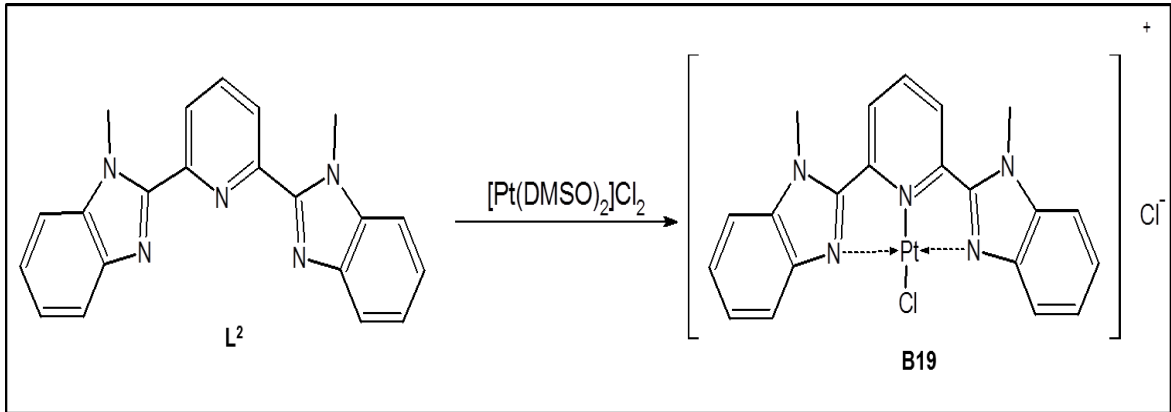
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, aktif ilaç etkisi gösterebileceği düşünülerek sentezlenen metal komplekslerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve *in vitro* ortamı taklit eden *in vitro* ortamda söz konusu komplekslerin biyomoleküllerle etkileşimi MALDI-TOF MS ve ESI-QTOF MS yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

5.1. Kloro-2,6-bis (N-metil-benzimidazol-2-il) piridinplatin(II)klorür, [Pt(L²)Cl]Cl Molekülünün (B19) Karakterizasyonu

Metal komplekslerin sentezlerinin doğru olarak gerçekleştirilip gerçekleştirilemediği ve saflıklarının belirlenmesi amacıyla değişik analiz yöntemleri kullanılarak karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve saflık durumları tespit edilmeye çalışılmıştır.

5.1.1. IR ve H-NMR ile Karakterizasyonu



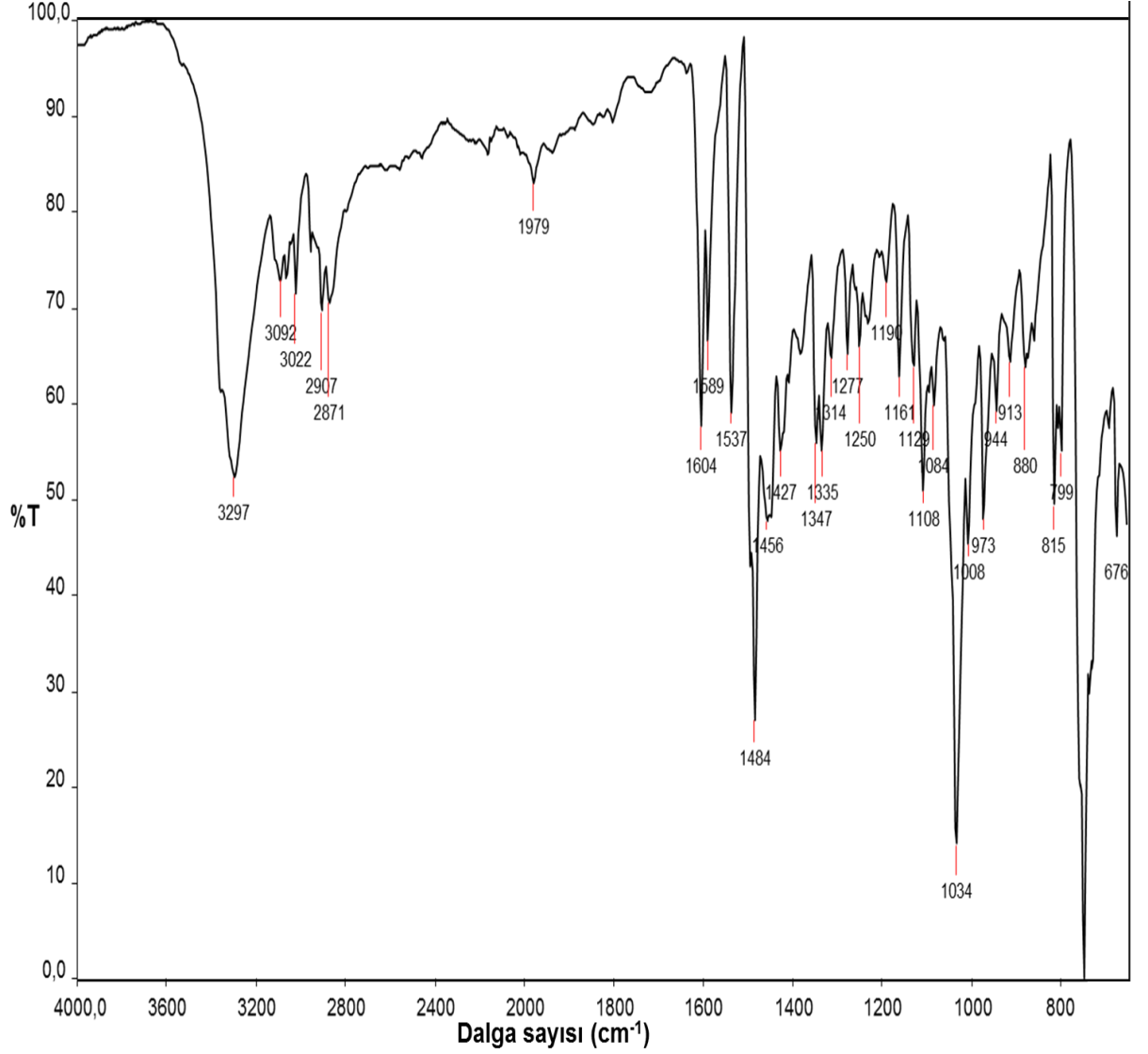
Şekil 5.1. B19 kompleksinin sentez şeması

Şekil 5.2'deki IR spektrumunda (C-H) aromatik, (C-H) alifatik, (C=C) aromatik, ve (C=N) gerilimleri için sırasıyla 3090–3022 cm⁻¹, 2907–2871 cm⁻¹, 1537–1456 cm⁻¹ ve 1604–1589 cm⁻¹ dalgaboylarında pik gözlenmiştir. 3297 cm⁻¹'de gözlenen kuvvetli pik yapının hidrat suyu ve N-H bağı içerdiğini göstermiştir.

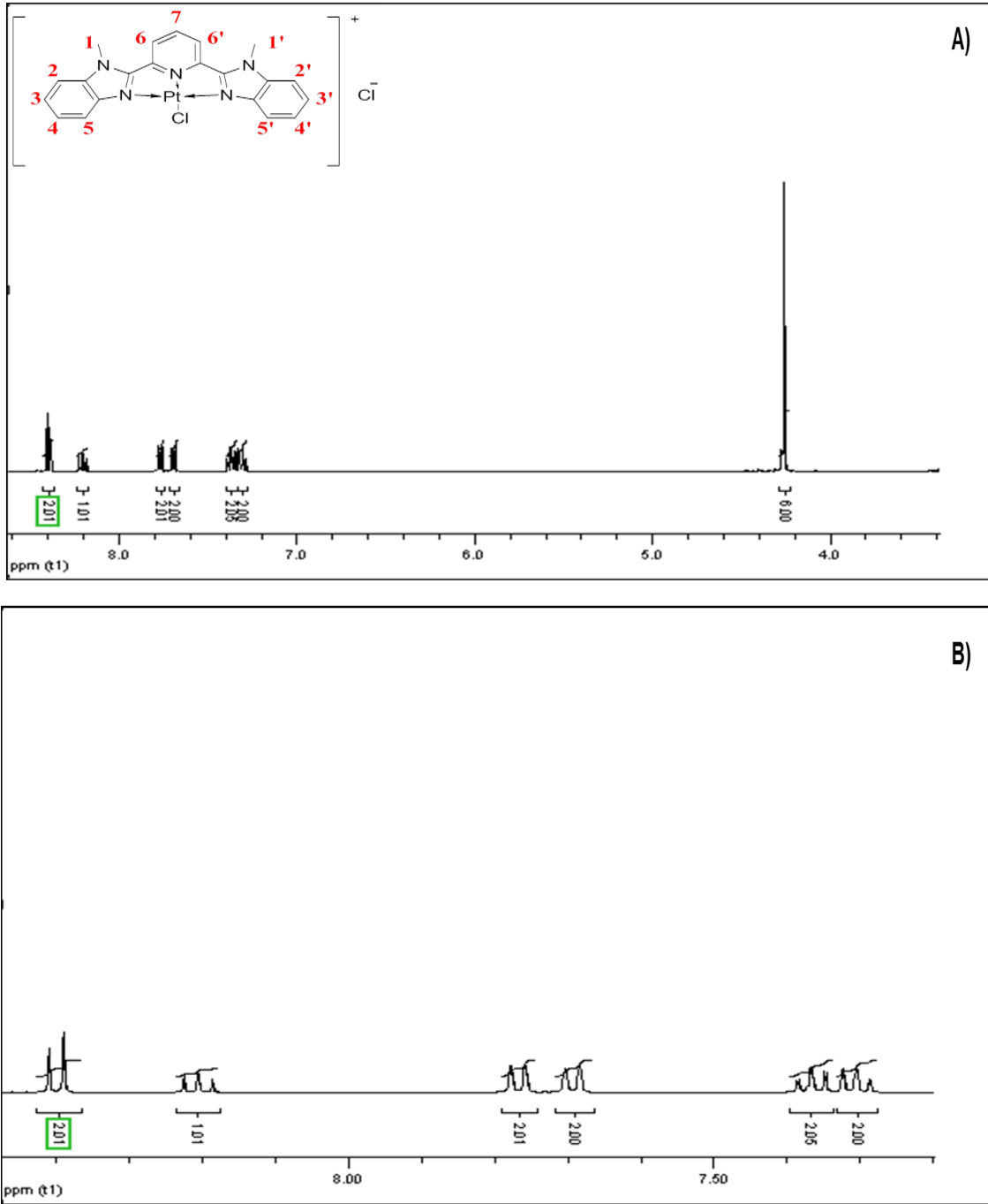
¹H-NMR spektrumunda (Şekil 5.3 ve 5.4) imino azotuna bağlı olan -CH₃ protonu (1 numaralı) 4.26 ppm'de singlet, benzimidazol halkası üzerindeki 2 ve 5 numaralı protonlar sırasıyla 7.69 ve 7.76 ppm'de dublet, 3 ve 4 numaralı protonlar sırasıyla 7.36 ve 7.30 ppm'de multiyet, piridin halkası üzerindeki 6 numaralı proton 8.29 ppm'de dublet ve 7 numaralı proton 8.20 ppm'de multiyet olarak görülmüştür. ¹H-

NMR spektrumunda gözlenen 17 proton, elde edilmek istenen yapıdaki proton sayısı ile tam bir uyum içindedir. Bu da sentezlenen yapıyı doğrulamaktadır.

$^1\text{H-NMR}$ (dms o - d_6 , δ_{ppm}): 8.29 (2H, d, $J = 7.83$), 8.20 (1H, m), 7.76 (2H, d, $J = 7.71$), 7.69 (2H, d, $J = 7.88$), 7.36 (2H, m), 7.30 (2H, m), 4.26 (6H, s)



Şekil 5.2. B19 molekülünün FT-IR spektrumu [166]

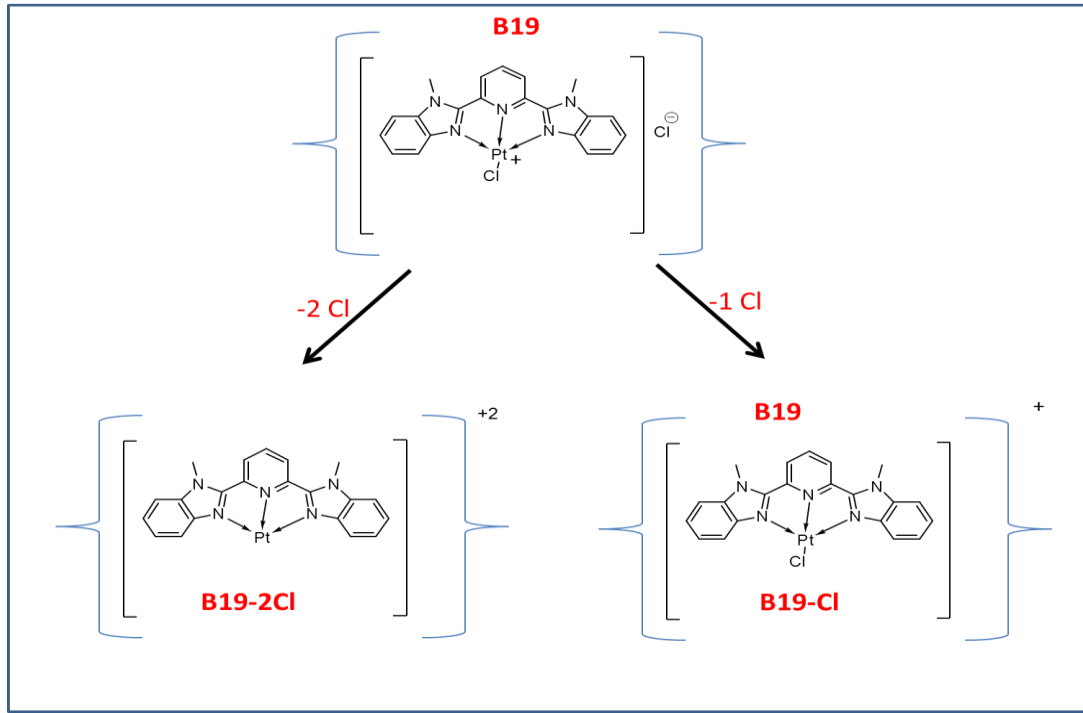


Şekil 5.3. B19 molekülünün (A) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ve (B) $^1\text{H-NMR}$ aromatik bölge spektrumu [166]

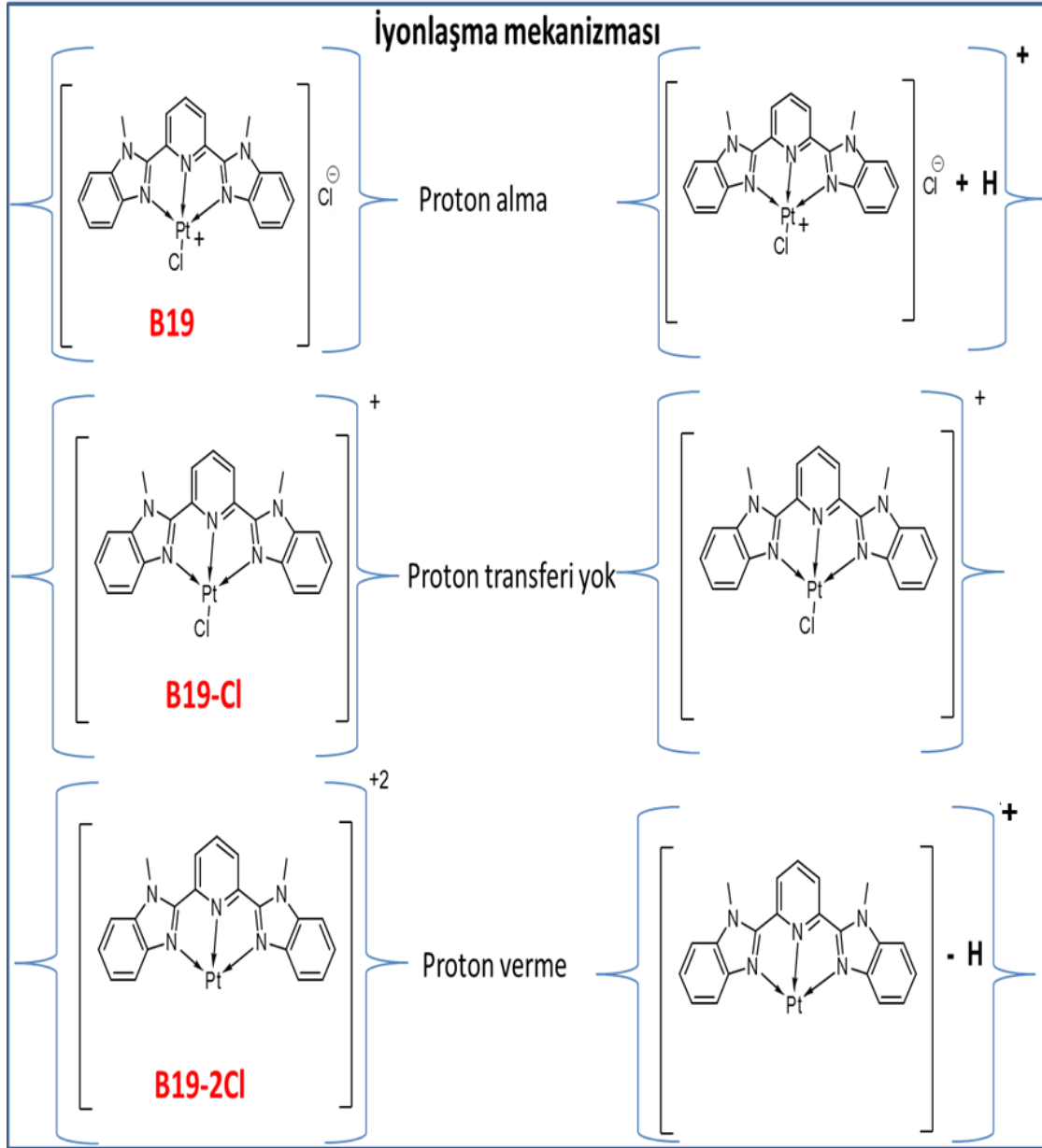
5.1.2. B19 molekülünün MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile Karakterizasyonu

B19 kompleksinin kütle spektrometrik analizlerinden önce, B19 molekülünün farklı çözücülerdeki çözünürlüğü test edilmiştir. Bu kompleksin MeOH, DMF ve H_2O ' da iyi çözüldüğü saptanmıştır. Antikanser olarak kullanılacak yapının en önemli özelliklerinden birinin suda çözünmesi zorunluluğu olduğu göz önünde bulundurulmuş, su çözücü olarak seçilmiştir. MALDI-TOF MS analizlerinde

öncelikli olarak B19 molekülünü tanımlamak için denemeler yapılmış ve TFA kullanılmadan hazırlanan DHB ve CHCA matriksleri ile elde edilen spektrumlarda TFA kullanılarak elde edilenlere nazaran sinyal:gürültü oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle daha sonraki denemelerde bu matrikslere asit ilavesi yapılmadan çalışmalar sürdürülmüştür. Deneysel kısımda ifade edilen beş farklı matriksle çalışılarak B19 molekülünün karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. İyonik klor ile birlikte B19 yapısının molekül ağırlığı 605.38 g/mol olarak hesaplanmıştır. Şekil 5.4'te B19 molekülünün deiyonize suda oluşturması beklenen iyonik yapılar verilmiştir. Yapının suda iyi çözündüğü ve sudaki Cl⁻ iyonu derişiminin düşük olduğu göz önünde bulundurularak olası iyonlaşma mekanizmaları Şekil 5.5'te verilmiştir.

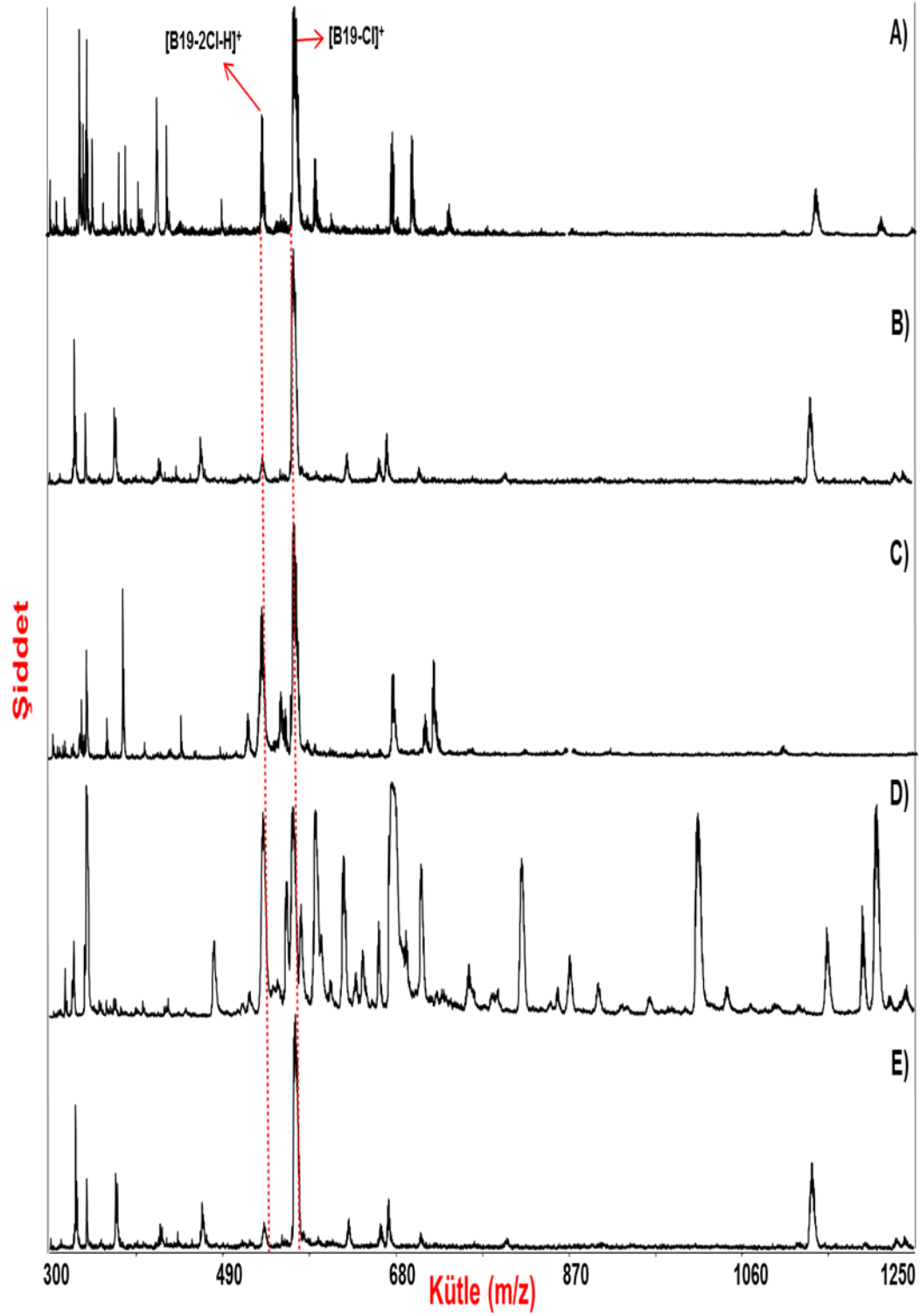


Şekil 5.4. Düşük Cl⁻ iyonu derişimi içeren sulu çözeltilerde, B19 molekülünden klor ayrılması ile elde edilebilecek yapılar ve gösterimleri.



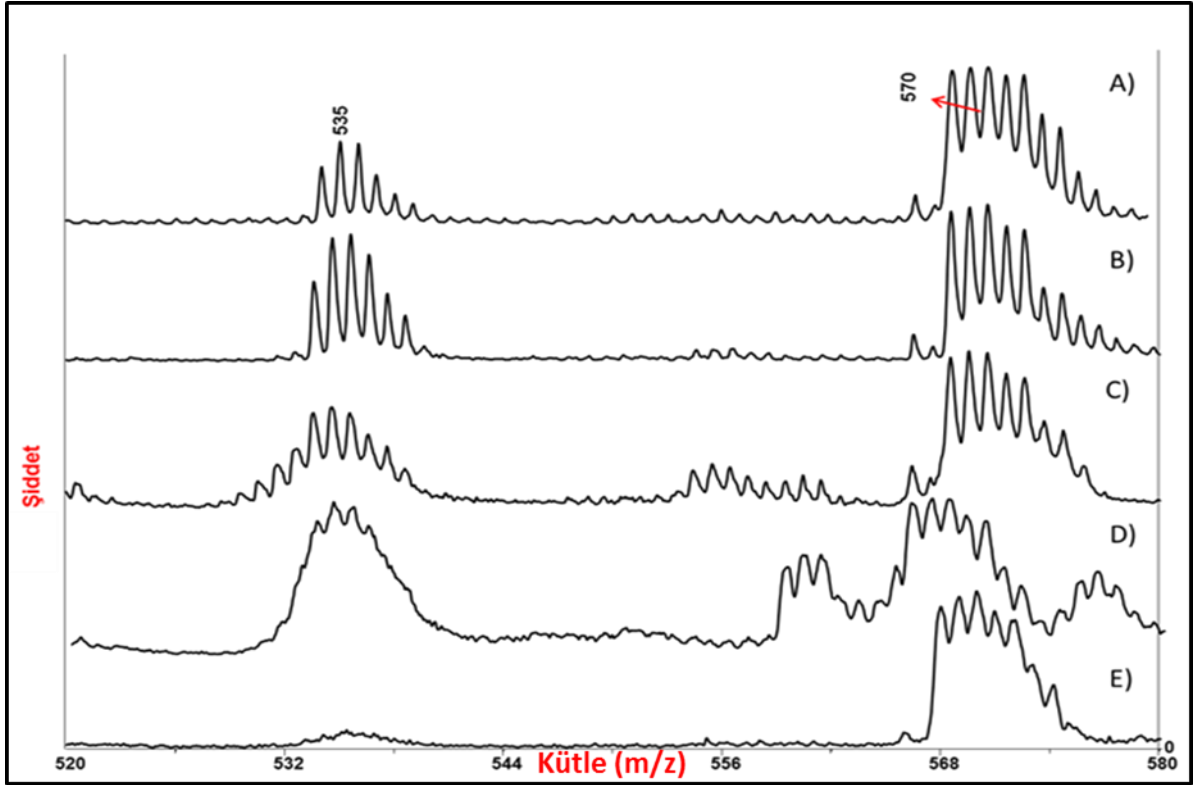
Şekil 5.5. (A) B19, (B) B19-Cl ve (C) B19-2Cl yapıları için MALDI-TOF MS iyonlaşma mekanizmaları.

Şekil 5.6'da TFA kullanılmadan hazırlanan THAP, DHB, ATT, CHCA, 3-HPA matriksleri ile elde edilen kütle spektrumları verilmiştir. Spektrumlar, uygun matriks seçimi yönünden değerlendirildiğinde, kullanılan beş matriks ile de B19 kompleks yapısının analiz edilebildiği görülmüştür.



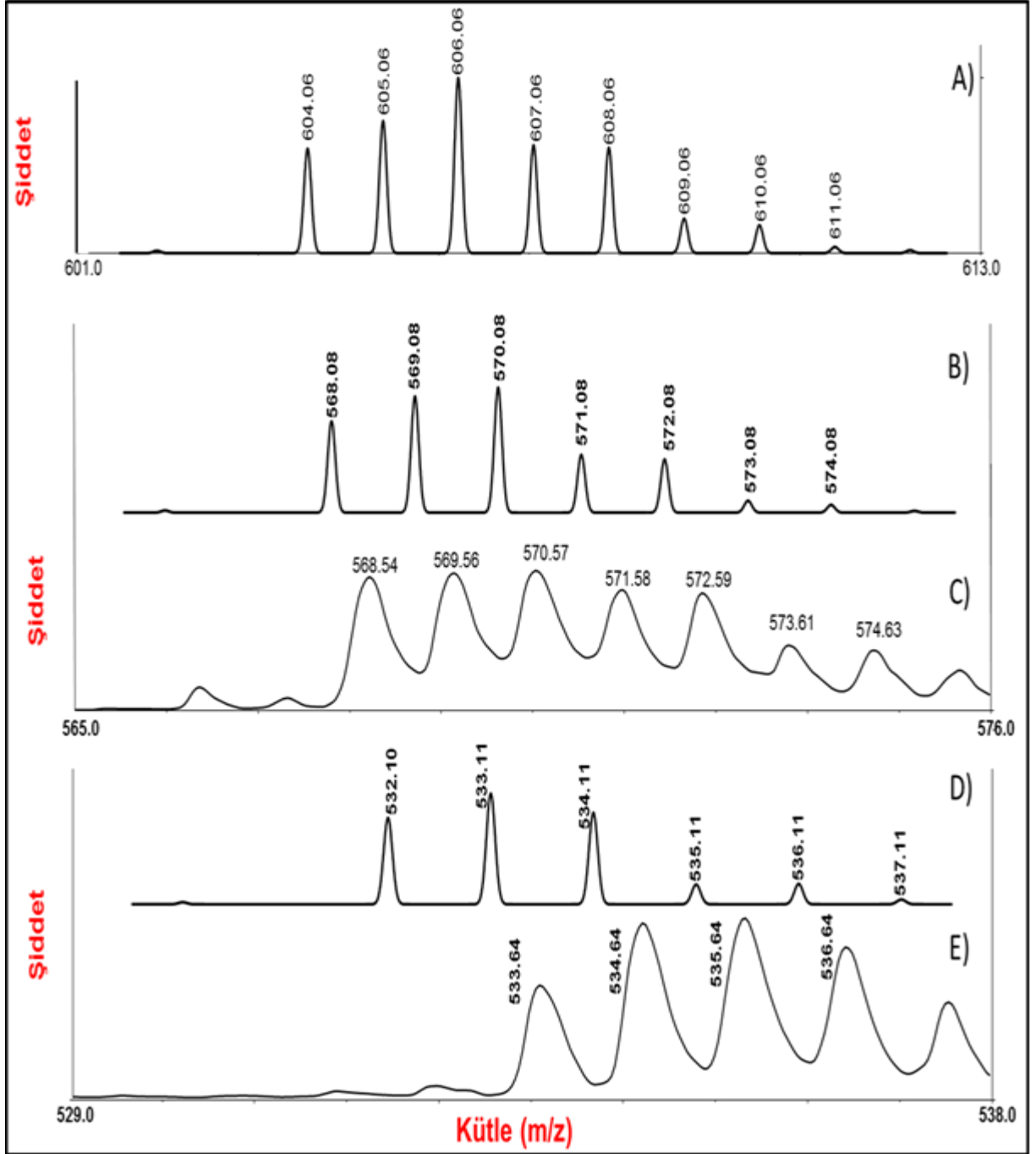
Şekil 5.6. B19 molekülünün (A) CHCA,(B) 3-HPA, (C) ATT, (D) DHB ve (E)THAP matrisleriyle elde edilmiş kütle spektrumları (analit/matriks :1/5)

Şekil 5.7’de ise Şekil 5.6’da verilen spektrumların 520-580 Da aralığında genişletilmiş kütle spektrumları verilmiştir. DHB matrisi ile elde edilen spektrumun (Şekil 5.7 B) kütle ayırımı ve S/N oranı yönünden en iyi sonucu verdiği görülmüştür. İki farklı pik grubunun izlendiği spektrumlarda, gerek yapıya iyonik halde bağlı bulunan klorür iyonunun, gerekse Pt’ne doğrudan bağlı bulunan klor atomunun yapıdan ayrıldığı tespit edilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucu 569-575 Da aralığındaki izotopik dağılımın B19 yapısından iyonik halde bulunan klor atomunun ayrılması sonucu oluştuğu ($[B19-Cl]^+$), 534-539 Da aralığındaki izotopik dağılımın ise B19’dan iki klor atomu ayrılması ve kalan yapıdan bir hidrojen kopması sonucu oluştuğu düşünülmüştür ($[B19-2Cl-H]^+$). Bu yapıların kapalı formülleri kullanılarak izotopik dağılımları cihazın orijinal yazılımında bulunan izotop hesaplayıcısına aktarılmış ve söz konusu bu iyonlara ait MALDI-TOF MS spektrumları çizdirilmiştir.



Şekil 5.7. B19 molekülünün farklı matrisler ile elde edilmiş kütle spektrumları. (A) THAP, (B) DHB, (C) CHCA, (D) ATT ve (E) 3-HPA .

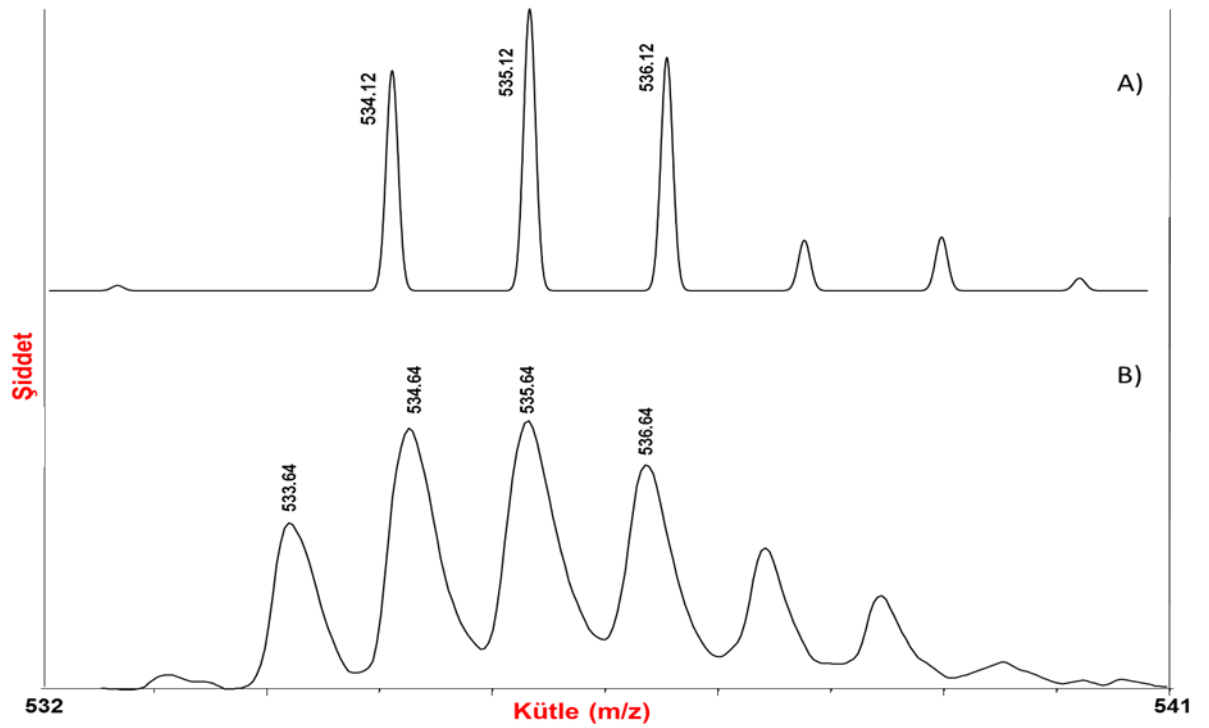
Şekil 5.8'de cihaz yazılımı tarafından verilen; $C_{21}N_5H_{17}Cl_2Pt$, $C_{21}N_5H_{17}ClPt$, $C_{21}N_5H_{17}Pt$ kapalı formülleri ile gösterilen ve sırasıyla; $[B19+H]^+$, $[B19-Cl]^+$, $[B19-2Cl-H]^+$ iyonlarını temsil eden yapıların teorik spektrumları verilmiştir.



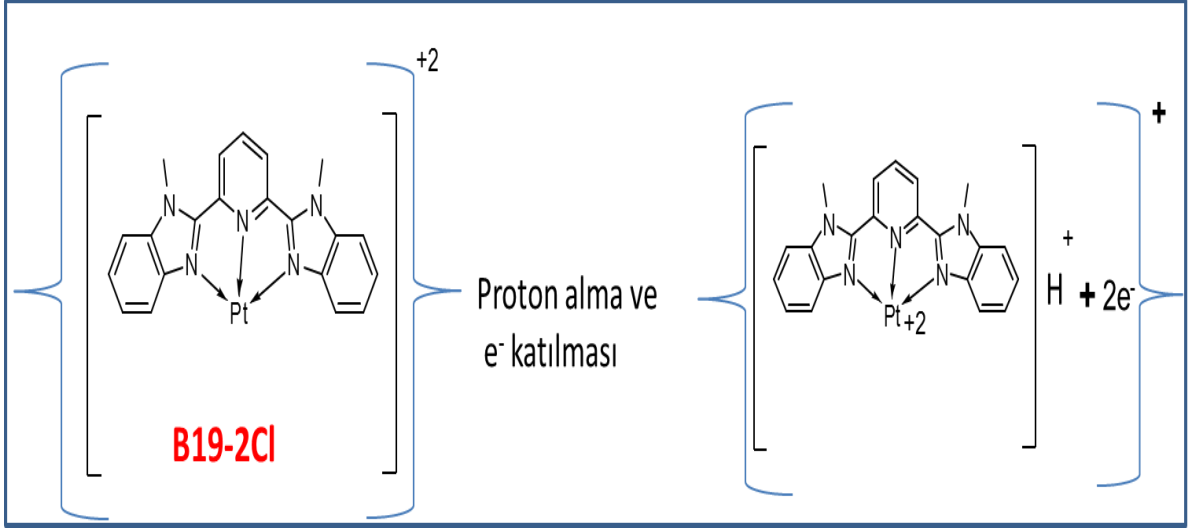
Şekil 5.8. B19 molekülünün çeşitli formlarının iyonlaşması ile elde edilen olası MALDI-TOF MS spektrumları. (A) $C_{21}N_5H_{17}Cl_2Pt$ teorik, (B) $C_{21}N_5H_{17}ClPt$ teorik, (C) $C_{21}N_5H_{17}ClPt$ deneysel (DHB matrisi ile), (D) $C_{21}N_5H_{17}Pt$ teorik ve (E) $C_{21}N_5H_{17}Pt$ deneysel (DHB matrisi ile)

Şekil 5.8 A'da B19 molekülünün moleküler halde ve protonlanarak iyonlaştığı durumda elde edilmesi gereken teorik spektrum verilmiştir. Yapılan analizlerde 601-613 m/z aralığında pik görülmemiştir. Bu durum molekülün bu hali ile kararsız olduğunu ifade etmektedir. Şekil 5.8 B ve 5.8 C'de verilen, [B19-Cl]⁺ yapısının sırasıyla, teorik ve deneysel spektrumlarına bakıldığında Şekil 5.5'de önerilen iyonlaşma mekanizmasının deneysel sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak, [B19-2Cl-H]⁺ iyonlaşmasına ait verilerde yaklaşık 1,5 Da m/z farkının görülmesi, Şekil 5.5'de bu yapı için önerilen iyonlaşma mekanizmasını doğrulamadığını göstermiştir.

Cihaz üzerinde teorik olarak farklı iyonlaşma şekillerine yönelik elde edilen spektrumlar ile analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. En uygun teorik spektrumun, deneysel spektrum ile karşılaştırılması Şekil 5.9'da, muhtemel iyonlaşma mekanizması ise Şekil 5.10'da verilmiştir. İnce bir organik madde ile üzeri sıvanmış olan metaller, UV ışımaya tabi tutulunca foto elektron yayarlar ve elektronlar, elektron ilgisi yüksek olan moleküller tarafından çekilirler [167]. [B19-2Cl]²⁺ iyonuna DHB matriksinden H⁺ transferi ve MALDI tabakası-matriks ara yüzeyinden 2e⁻ katılımı ile tek yüklü iyon oluşumu gerçekleştiği düşünülmüştür.



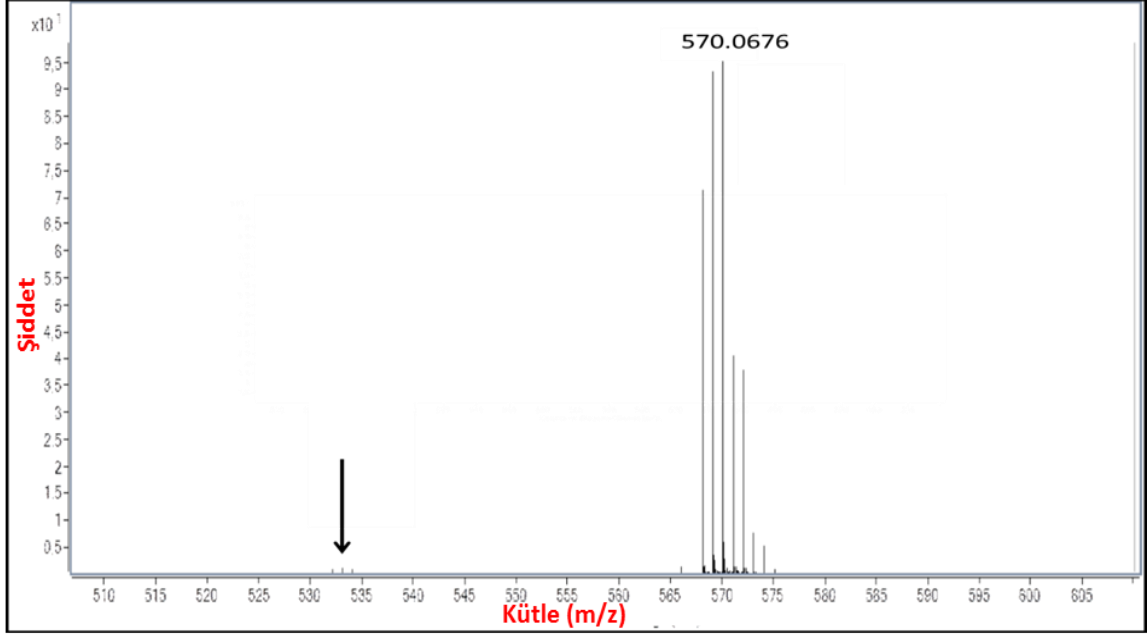
Şekil 5.9. (A) C₂₁N₅H₁₈Pt teorik ve (B) C₂₁N₅H₁₈Pt deneysel (DHB matriksi ile).



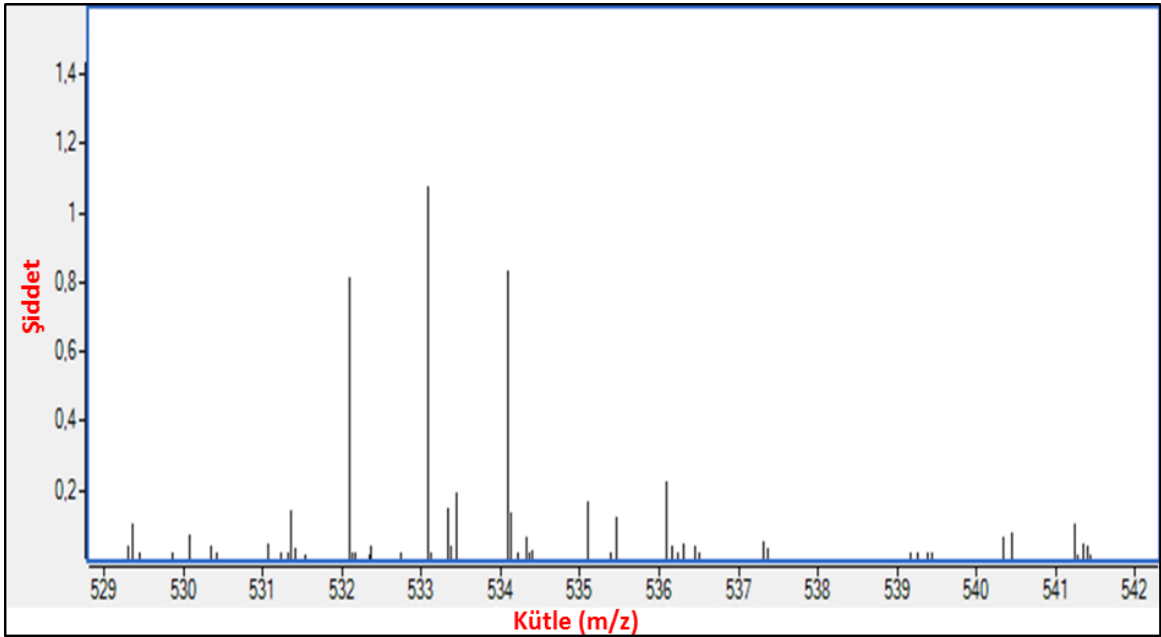
Şekil 5.10. [B19-2Cl]⁺² yapısı için MALDI-TOF MS 'te iyonlaşma mekanizması

B19 molekülünün ESI-QTOF-MS ile karakterizasyonunda Şekil 5.11'de görülen kütle spektrumu elde edilmiştir. MALDI iyonlaşma tekniği ile elde edilen spektrumlarda [B19-2Cl]⁺² molekülünün iyonlaşması belirgin şekilde izlenebilirken ESI iyonlaşması ile elde edilen kütle spektrumunda bu yapının şiddetinde belirgin azalma olduğu görülmüştür (okla gösterilmiştir). 529-542 m/z aralığı genişletilerek incelendiğinde, izotopik dağılımındaki m/z değerlerinin MALDI-TOF MS' ten 1 Da eksik olduğu görülmüştür (Şekil 5.12). ESI ve MALDI sistemlerinde iyonlaşma mekanizmalarının farklılık göstermesinin, 1 Da kütle farkının sebebi olabileceği düşünülmüştür. Şekil 5.5'te [B19-2Cl]⁺² yapısının MALDI-TOF MS'te önerilen proton vererek iyonlaşma mekanizmasının ESI sistemi için geçerli olduğu görülmüştür. Yapıya ait pikin iyon şiddetinin düşük olmasının sebebinin ise oluşan iyonun kararsızlığını ve buna bağlı olarak oluşma verimindeki düşüklüğü göstermektedir.

MALDI-TOF MS ve LC-ESI-MS sistemleri ile yapılan analizlerde, B19 yapısından klor atomlarının ayrılabilir olması, B19 molekülünün oligonükleotidlerle etkileşebilmesinin mümkün olacağı bir yol olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.11. B19 molekülünün pozitif iyonlaşma modunda ESI-MS spektrumu, (0.2 mM B19 kompleks çözeltisinden 2ul enjekte edilmiştir).



Şekil 5.12. B19 molekülünün pozitif iyonlaşma modunda elde edilmiş, Şekil 5.11'de ok ile gösterilen 529-542 m/z bölgesine ait genişletilmiş ESI-MS spektrumu

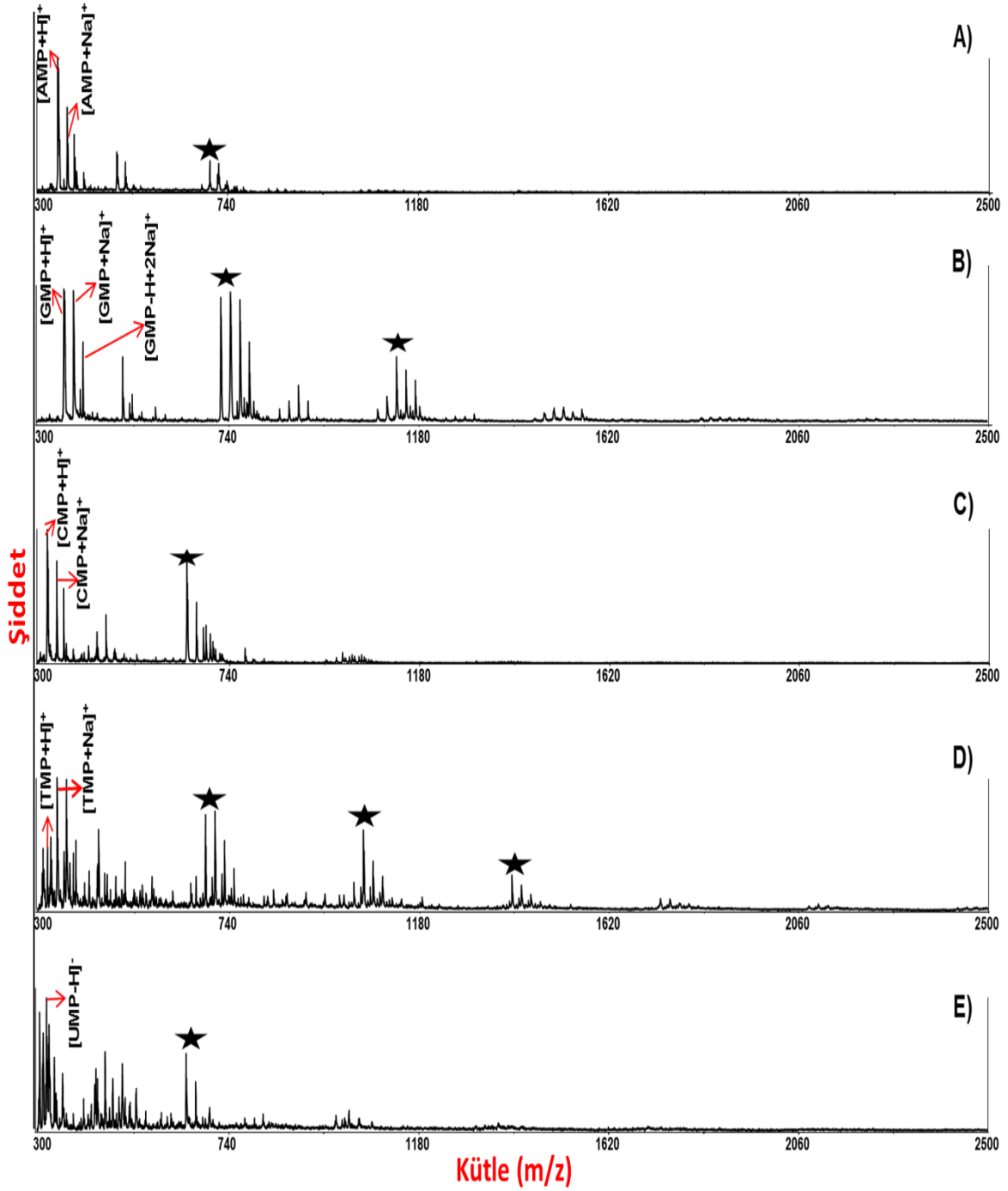
5.2. Nükleotidlerin MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile İzlenmesi

B19 molekülünün ESI-QTOF-MS ve MALDI-TOF MS ile analizleri tamamlandıktan sonra, B19 ile etkileşimi incelenecek olan nükleotidlerin söz konusu MS sistemleri ile analizi gerçekleştirilmiştir.

5.2.1. MALDI-TOF MS

AMP (347.22 g/mol), GMP (363.22 g/mol), CMP (323.20g /mol), UMP (324.18 g/mol) ve TMP (320.19 g/mol) nükleotidlerinin MALDI-TOF MS ile analizi için uygun matriks seçimi denemeleri yapılmıştır. Her bir nükleotid molekülünün analizi için 5 farklı matriks türü denenmiştir. Yalnızca DHB matriksi ile yapılan analizlere ait spektrumlar verilmiştir. CMP 'nin analizinde, tüm matriksler ile pozitif iyonlaşma modunda $[CMP+H]^+$ iyonuna ait sinyal gözlenebilmiştir. 3-HPA ile $[CMP+H]^+$ molekülünün yanı sıra $[7CMP+H]^+$ 'ya kadar olan sitidin oligonükleotidleri de izlenmiştir. DHB ve THAP matriksleri ile sadece $[2\text{ CMP}+H]^+$ yapısı gözlenebilmiştir.

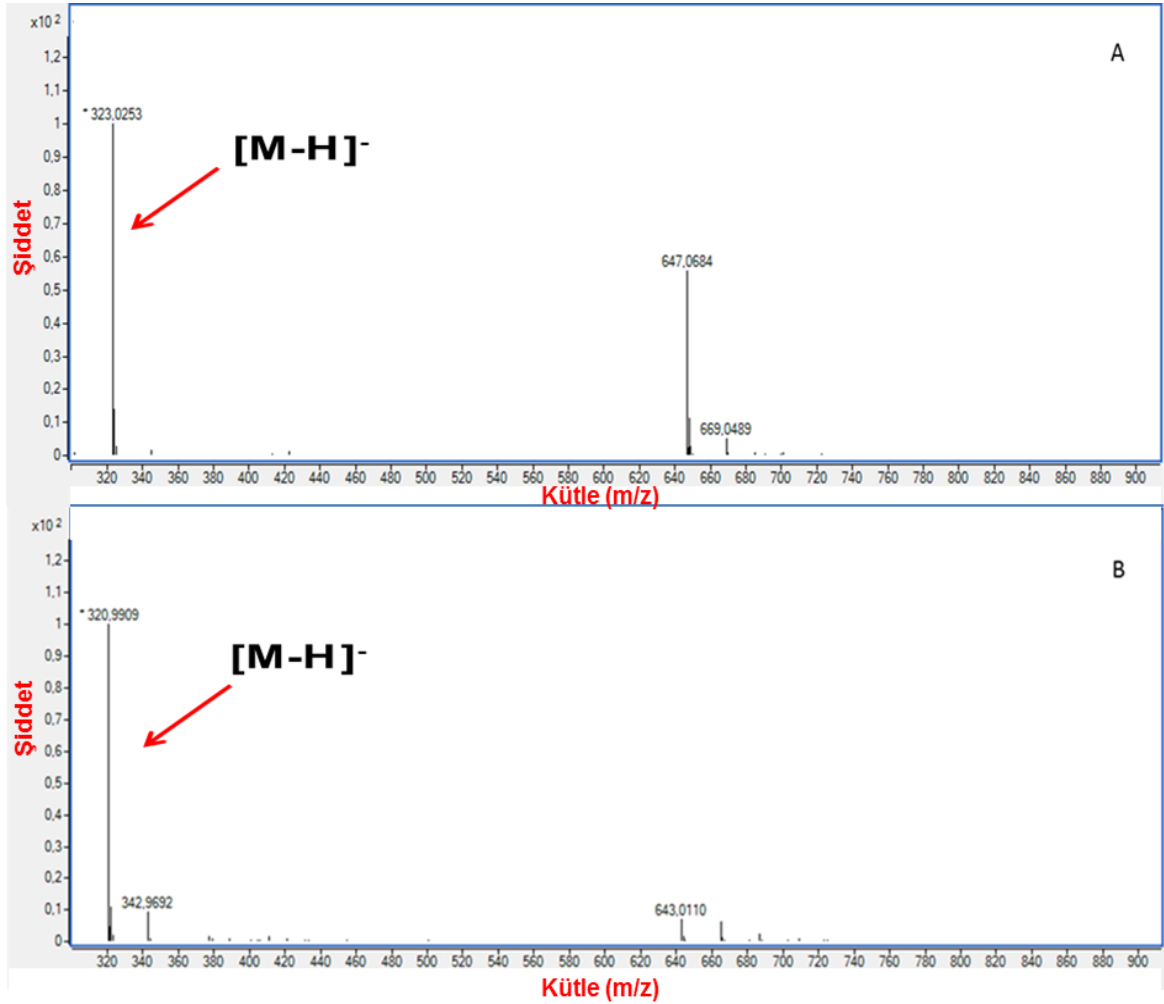
GMP için beş farklı matriks türü denemesi sonucu elde edilen spektrumlar incelenmiş ve tüm matriksler ile pozitif iyonlaşma modunda $[GMP+H]^+$ iyonuna ait sinyal gözlenmiştir. 3-HPA ve DHB ile elde edilen spektrumlarda yapının hem protonlanarak hem de katyonize olarak iyonlaşabildiği izlenmiştir, ($[GMP+Na]^+$). GMP 'nin yapısında bulunan $-OH$ gruplarının hem DHB matriksinden gelen hem de GMP'nin kendi standardının yapısında bulunan sodyum tuzundan ötürü Na^+ katılımıyla ($-O^-Na^+$), yapıya birden fazla sodyum katıldığını göstermektedir. Ayrıca 3-HPA ve DHB ile oligomerler de izlenebilmiştir (Şekil 5.13, yıldızla işaretlenmiş pikler). AMP 'nin analizinde ise tüm matrikslerle yapı protonlanarak izlenirken CHCA matriksi ile $[AMP+Na]^+$ piki sinyalinin protone olduğu durumdakine yakın şiddette olduğu görülmüştür. UMP molekülü pozitif iyonlaşma modunda değil negatif iyonlaşma modunda analiz edilebilmiştir. Yalnızca DHB matriksi ile her iki iyonlaşma modunda da sinyal elde edilebilmişken, CHCA matriksi ile yapı analiz edilememiştir. TMP'nin 3-HPA ile protonlanarak, DHB ve THAP matriksleri ile ise katyonize olarak analiz edilebilirken, CHCA ve ATT matriksleri ile uygun spektrum elde edilemediği tespit edilmiştir.



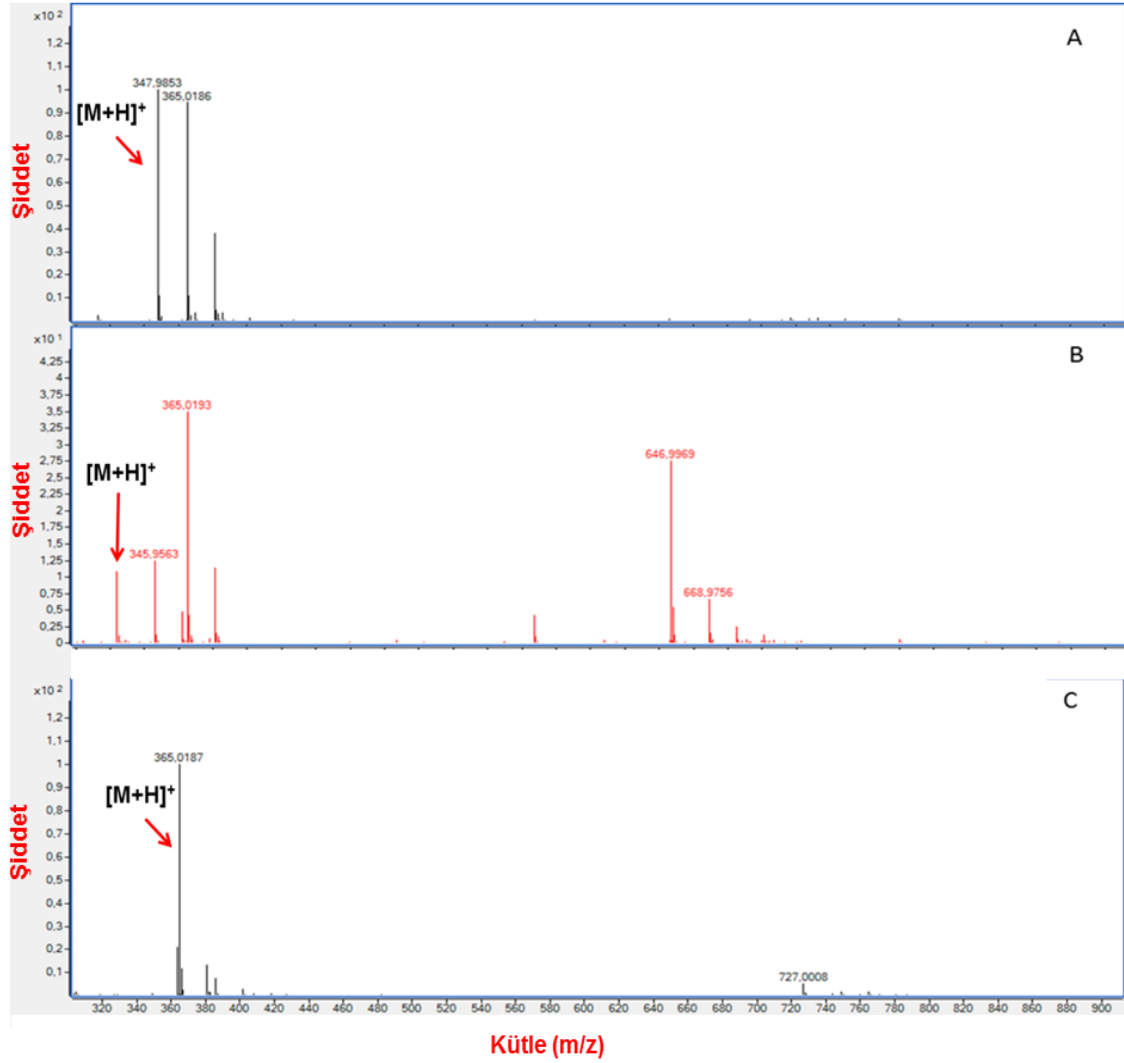
Şekil 5.13. Herbir nükleotidin DHB matrisi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları. (A) AMP, (B) GMP, (C) CMP, (D)TMP ve (E) UMP.

5.2.2. ESI-QTOF-MS

ESI-MS Analizleri için şartlar optimize edilmiş ve parçalama voltaj değeri nükleotidler ve B19 yapısı için 175 V, akış hızı 0.5 µl /dk olarak belirlenmiştir. Gerek pozitif gerekse negatif iyonlaşma modunda taramalar gerçekleştirilmiştir. Asidik yapıda olmaları UMP ve TMP 'nin negatif modda iyonlaşmalarını kolaylaştırdığı düşünülmüştür. Analiz edilen kimyasal yapılara ait spektrumlar Şekil 5.14'te verilmiştir. Moleküler iyon pikleri, $[M-H]^-$, ok ile gösterilmiştir. Her iki yapının da dimerine ait iyon pikleri izlenmiştir. AMP, GMP ve CMP yapıları pozitif iyonlaşma modunda analiz edilebilmiş ve AMP hariç dimer oluşumları da gözlenmiştir.



Şekil 5.14. (A) UMP ve (B)TMP 'nin negatif iyonlaşma modunda elde edilmiş ESI-MS spektrumları. (1mM nükleotid den 2ul enjekte edilmiştir).



Şekil 5.15. (A) AMP, (B) CMP ve (C) GMP 'nin pozitif iyonlaşma modunda elde edilmiş ESI-MS spektrumları (1mM nükleotid den 2ul enjekte edilmiştir).

5.3. Komplekslerin MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile İzlenmesi

Yapılan uzun araştırmalar sonrasında, tedavide kullanılan Pt içerikli ilaçların, birçok Pt-bağlantısı oluşturduğu ve bu nedenle DNA'ya bağlanacak Pt-içerikli ilacın farmokinetiğinin iyi araştırılması, kullanılacak olan Pt-ilacın miktarının optimize edilmesi gerektiği görülmüştür [74]. Pt içerikli ilaca bağlanan moleküllerin tanımlanmasının yanı sıra kantitatif analizlerinin de yapılması gerekmektedir. Bu nedenle Cisplatin ve bağlandığı yapılara yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Nükleotid ve oligonükleotidler ile yapılan çalışmalar sonucunda, Pt-amin bileşiklerinin özellikle Guanin nükleotidine bağlandıklarını ve 3' ucundaki ardışık

G-G bağlanmasını tercih ettiği bulunmuştur. Nükleotid monofosfat-cisplatin komplekslerinin UV-spektrofotomere kullanılarak yapılan çalışmalarda, cisplatinin GMP ve AMP' ye bağlandığı ancak CMP ve TMP bağlanmasının izlenemediği görülmüştür [168].

Sisplatin-DNA zincir içi çapraz bağlanma ürünlerinin %60–65'i zincir içi GpG 1,2 bağlanma ve %20–25'i ApG 1,2 zincir içi bağlanma olarak adlandırılır. Aynı zincir üzerinde gerçekleşen diğer bir bağlanma da Pt- bağlı guaninler arasında farklı bir bazın bulunduğu GpXpG 1,3 zincirler arası bağlanmasıdır ve %2 oranında izlenmiştir. Ayrıca guanin üzerinden tekli bağlanma olduğu görülmüştür (%2). Diğer bir bağlanma şekli olan zincirler arası bağlanmanın karşılıklı guaninler arasında gerçekleştiği görülmüş (%2) ve G-G zincirler arası çapraz bağlanma olarak adlandırılmıştır. Söz konusu bu Siplatin –DNA bağlanmalarının tümünde taşıyıcı ligandların yapıdan ayrılmadığı görülmüştür [87]. Tek zincirli DNA ya da RNA parçalarında sitozinin N3 atomu ve adeninin N1 atomu üzerinden de ağır metal bağlanması olabileceği belirtilmiştir [44].

Pt-DNA etkileşimlerini izlemek adına gerçekleştirilen önceki yapısal çalışmalarda NMR ve X-ışınları kristalografisi yöntemleri kullanılarak Sisplatin bağlı tek zincirli DNA parçalarını izlenmiştir. [169] Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise analitik teknikler birleştirilerek Pt-DNA yapılarının türlendirilmesinin yanı sıra kantitatif analizlerle de söz konusu bağlanmaların miktarları tespit edilmiştir [170]. ESI-Q-TOF MS, ve HPLC-ICP-MS ve MALDI-TOF MS teknikleri bu amaçla ileri analizlerde kullanılmıştır [171], [172].

Söz konusu bu etkileşimin Pt içerikli ilaçlardaki kimyasal çevreye yani liganda göre değişebileceği düşünüldüğü için B19-nükleotidlerinin B19 ile etkileşimi incelenmiştir.

5.3.1. B19-Nükleotid Etkileşmelerinin Kütle Spektrometrik İncelenmesi

B19 ve nükleotidlerin MALDI-TOF MS ve ESI-MS ile analizleri tamamlandıktan sonra, B19-nükleotid etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanan nükleotidlerin her biri ile B19 molekülü ayrı ayrı, hacimce 1:1 oranında karıştırılarak (90 µL nükleotid+ 90 µL B19) 37°C' de su banyosunda pH: 7' de (25 mM amonyum bikarbonat) 24 saat ve 46 saat inkübe edilmiştir. Alınan inkübasyon örnekleri analiz edilene kadar +4°C de saklanmıştır.

Nükleotidlerin, B19 molekülünün ve inkübasyon sonrası (24 ve 46 saat) oluştuğu kabul edilen Nükleotid-B19 komplekslerinin MALDI-TOF MS ile analizi gerçekleştirilmiştir.

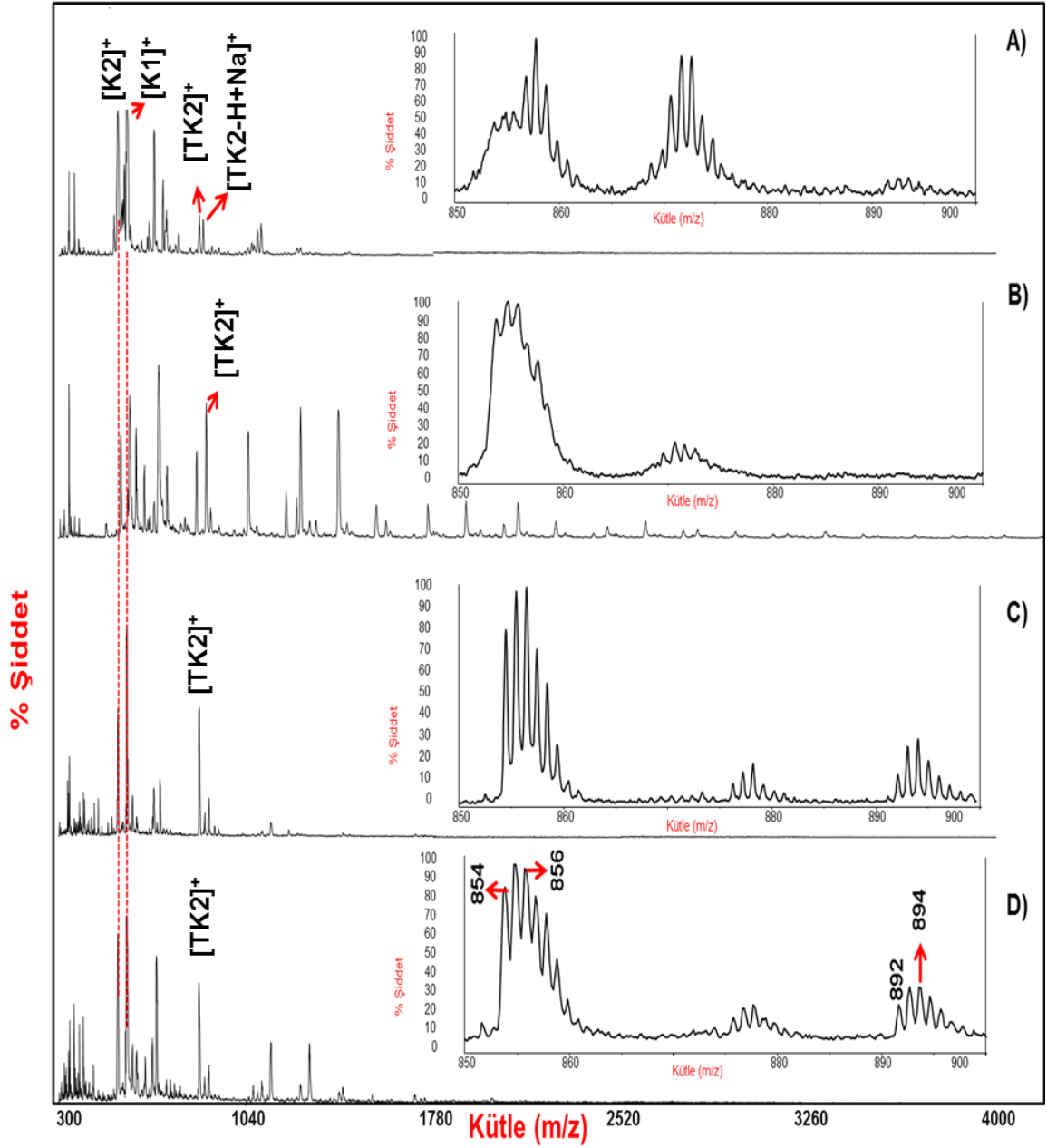
Çizelge 5.1’de nükleotidler, B19 ve olası kompleks yapılarına ait kısaltmalar ve oluşan kompleksin nominal kütleleri verilmiştir. B19, nükleotid ve oluşması beklenen komplekslerin iyonlaşma modu ve iyi izlenebildiği matrikslerin farklı olabileceği düşünülerek 5 farklı matriks türü ile inkübasyon sonrası örnekler analiz edilmiştir. İnkübasyonun süresi uzun tutulmuş ve kalitatif olarak kompleks oluşumuna etkisi izlenmiştir. Birinci ve ikinci İnkübasyon çözeltilerinin MALDI-TOF MS ile analizi gerçekleştirilmiştir. Şekiller 5.16- 5.21’de verilen spektrumların hepsi 46 saatlik inkübasyon çözeltilerinin spektrumlarını ifade etmektedir. 24 saatlik ve 46 saatlik çözeltilerin spektrumları incelenmiş, 24 saatte kompleks oluşumunun tamamlandığı, inkübasyon süresinin 46 saate uzatılmasının kalitatif bir etkisi olmadığı gibi, kütle spektrumunda gözlenen sinyallerin şiddetinde de artış gözlemlenmemiştir (spektrum gösterilmemiştir).

Çizelge 5.1. B19 ve nükleotidlerin kompleks yapma şekline ve monofosfatın cinsine bağlı olarak oluşan komplekslerin kütleleri.

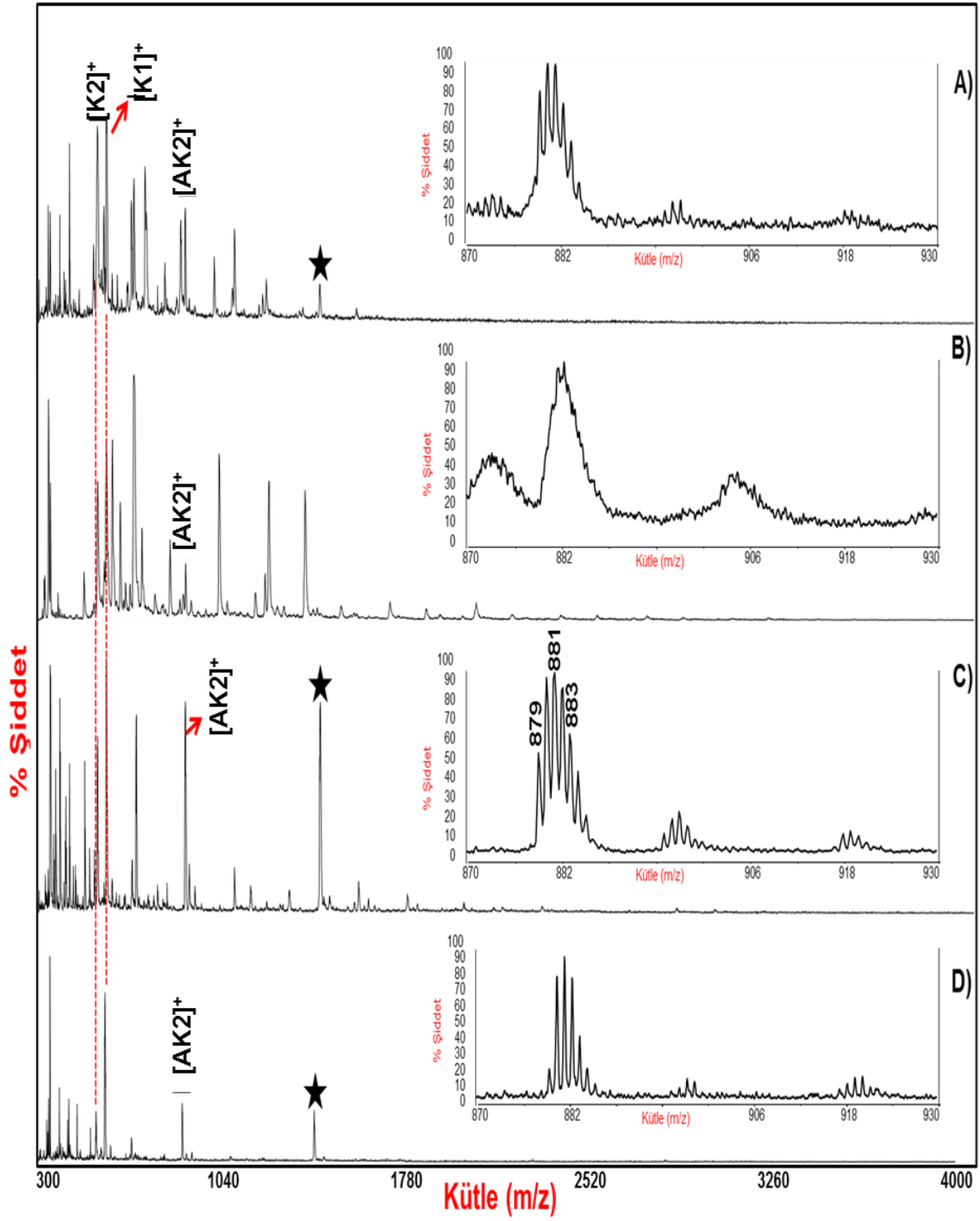
	GMP KOMPLEKSİ (Da)	AMP KOMPLEKSİ (Da)	CMP KOMPLEKSİ (Da)	TMP KOMPLEKSİ (Da)	UMP KOMPLEKSİ (Da)
[B19-Cl] = K1 MW=570 Da	GK1=931	AK1=915	CK1=891	TK1=888	UK1=894
B19-2Cl= K2 MW=535 Da	GK2=896	AK2=880	CK2=856	TK2=855	UK2=857

Şekil 5.16’da verilen spektrumlar incelenmiş ve B19 molekülünün TMP ile kompleks yapabildiği gözlemlenmiştir. 856 ve 894 m/z bölgelerinde bulunan pik grupları sırasıyla, [B19+TMP]⁺ ve [B19+TMP-H+K]⁺ iyonuna aittir. Oluşan komplekslerin matriks molekülüne göre izlenebilirliğinin değiştiği, TK2 kompleksinin 3-HPA ile izlenemediği tespit edilmiştir. B19 molekülünün AMP ile oluşturduğu gözlenen, Şekil 5.17’de [AK2]⁺ ile gösterilen 1:1 kompleksin dışında (m/z 881 bölgesi), m/z 1414’te izlenen ve 2:1 oranında oluştuğu belirlenen, [2B19+AMP-2H]⁺ iyonuna ait pik; THAP, DHB ve ATT matrikslerinde gözlemlenmiştir (yıldız ile işaretlenmiştir).

Hem TMP hem AMP ile yapılan inkübasyonlar sonrası spektrumlarında reaksiyona girmeyen B19 molekülü görülmüştür. Reaksiyona girmeden kalan $[K1]^+$ ve $[K2-H]^+$ iyonları kesikli çizgilerle gösterilmiştir.



Şekil 5.16. TMP-B19 kompleksinin (A) CHCA, (B) ATT, (C) THAP ve (D) DHB matrisleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM TMP:0.33 mM B19 eşit hacim karışımı).



Şekil 5.17. AMP-B19 kompleksinin (A) CHCA, (B) ATT, (C) DHB ve (D) THAP matrisleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM AMP:0.33 mM B19 eşit hacim karışımı).

Şekil 5.18'de B19 molekülünün CMP ile K2 formu üzerinden kompleks yapabildiği ve bu kompleksin mol oranınının 1:1 olduğu durumda oluşması beklenen m/z 857 'deki pik grubunun en belirgin şekilde DHB matriksi ile izlenebildiği görülmüştür. m/z 1387'de, 2:1 mol oranında oluşan, $[2B19+CMP-2H]^+$ iyonuna ait olduğu düşünülen sinyal elde edilmiştir (yıldız ile işaretlenmiştir). ATT ve 3-HPA matriksleri ile spektrum alınamamıştır.

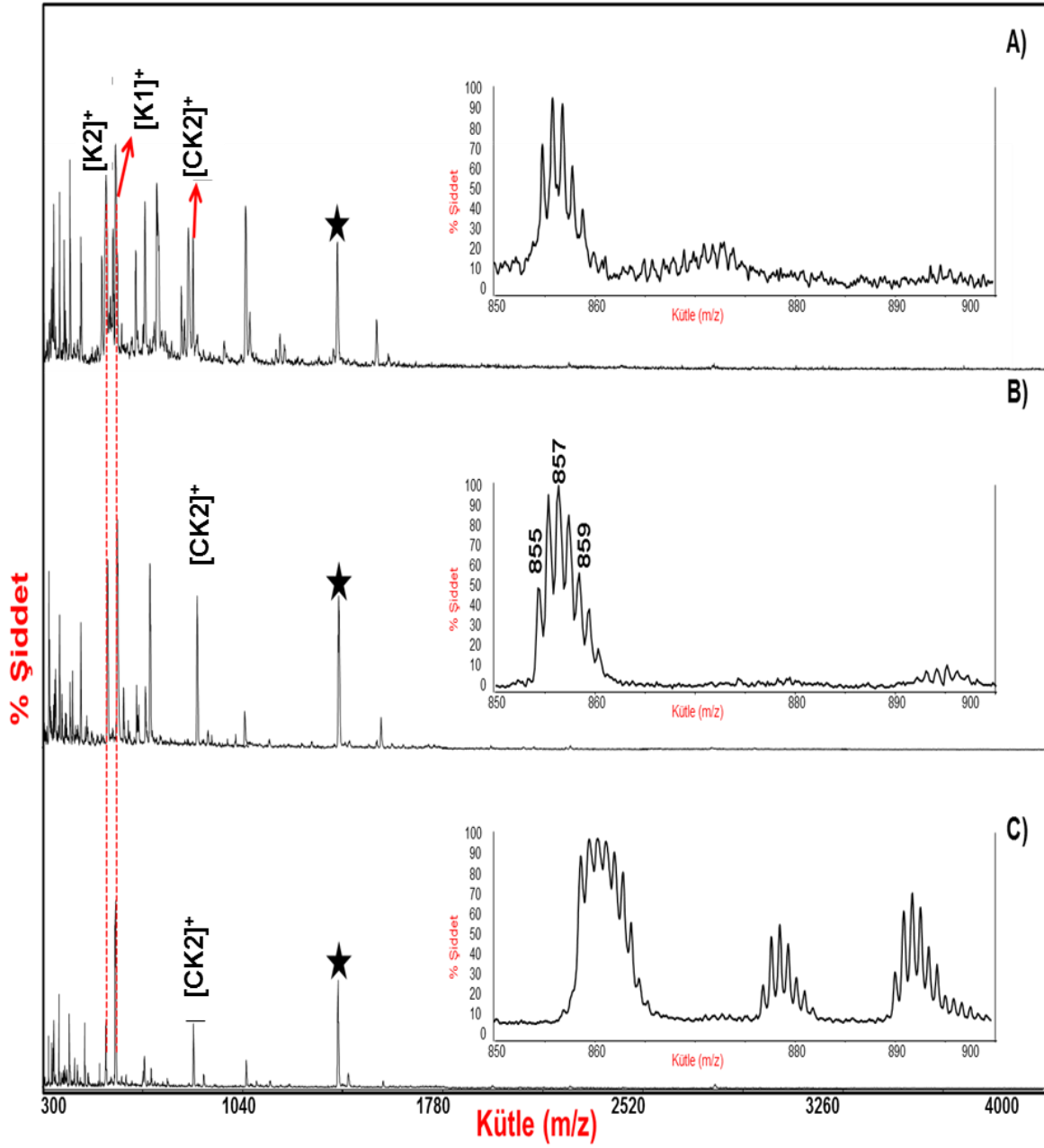
Şekil 5.19 ve 5.20'de B19' un GMP ile yapmış olduğu kompleksler yer almaktadır. B19 molekülünün GMP ile 1:1, 1:2 (okla gösterilmiş), 2:1 (kare ile gösterilmiş), 2:2 (yıldız ile gösterilmiş) gibi farklı şekillerde kompleks oluşturduğu izlenmiştir.

K2 formundaki kompleksler tüm matrikslerle analiz edilebilmiştir. Ayrıca UMP negatif iyonlaşma modunda izlenebilirken B19 ile yapmış olduğu kompleks pozitif iyonlaşma modunda elde edilmiştir. B19 un UMP ile yapmış olduğu komplekslerde THAP matriksi kullanılarak 3:3 etkileştikleri izlenebilmiştir.

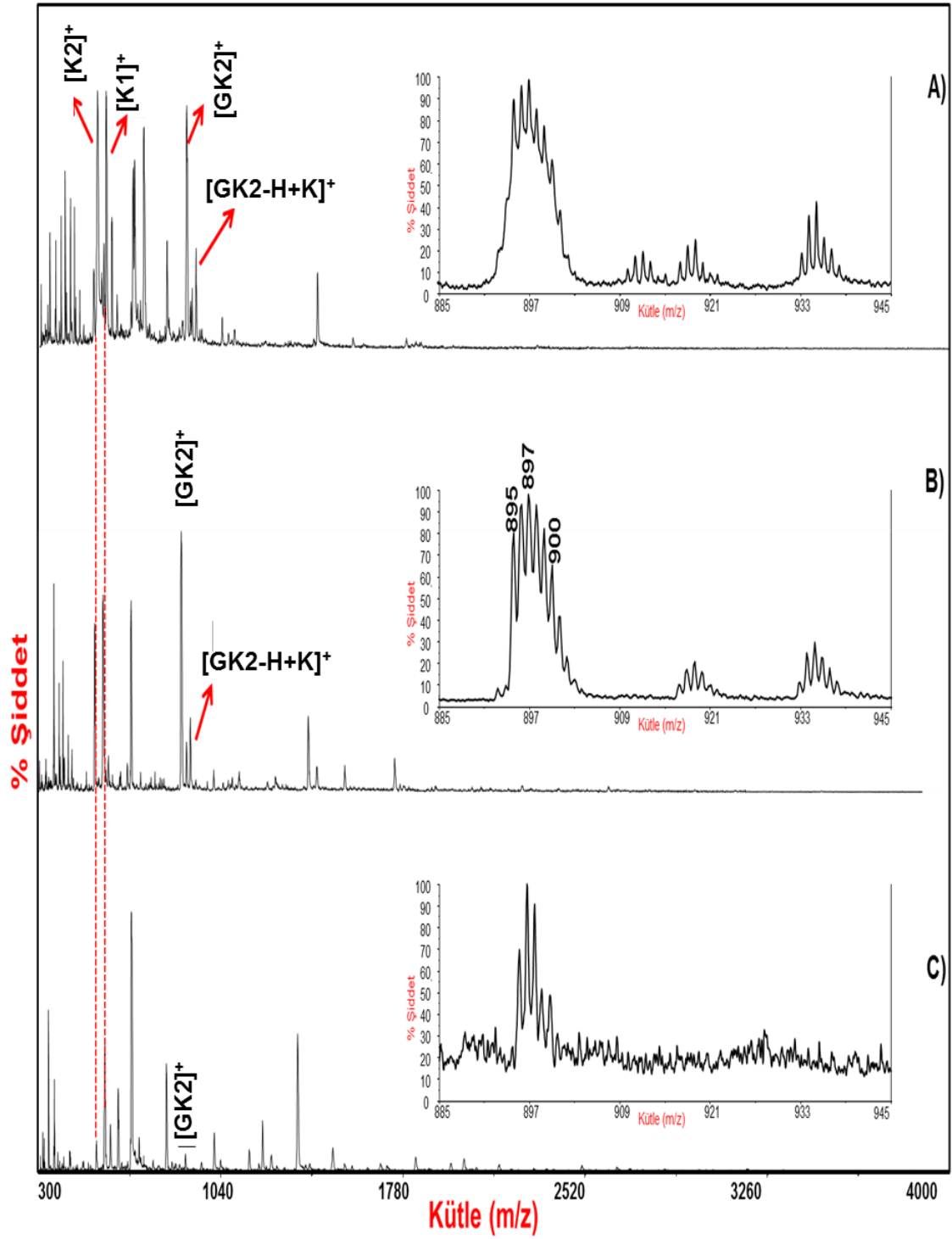
Yapılan tüm matriks denemeleri göz önüne alındığında, B19, oligonükleotid ve komplekslerin analizinde DHB matriksinin bundan sonraki analizlerde kullanılacak ortak ve tek matriks olması gerektiğine karar verilmiştir.

Sonuç olarak B19 molekülü iki klor atomu kaybettikten sonra tüm nükleotidlerle etkileşime girmiştir.

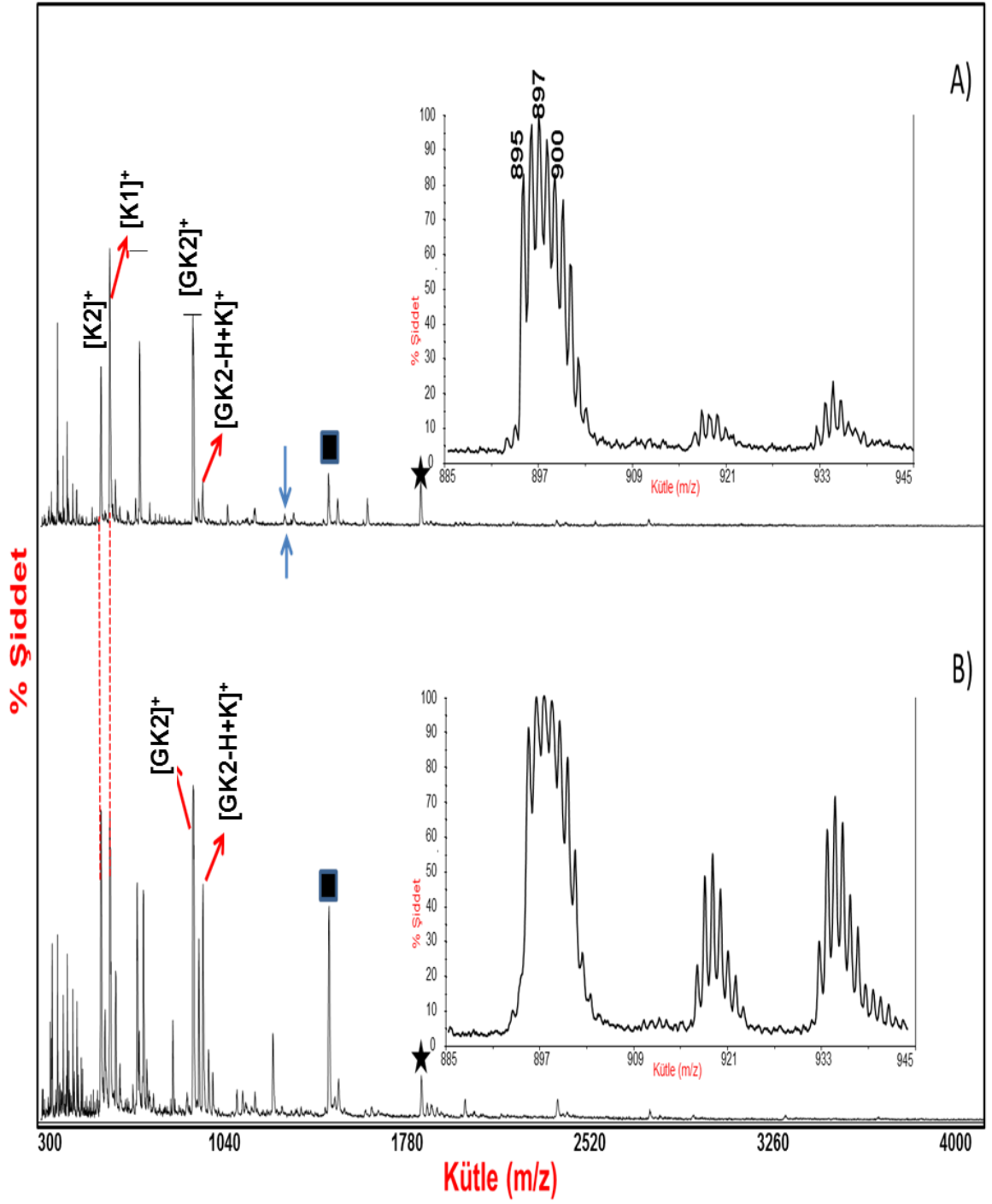
Farklı mol oranlarındaki kompleksleri yansıtan B19-nükleotid etkileşimleri DHB matriksi kullanılarak MALDI-TOF MS ile izlenmiştir.



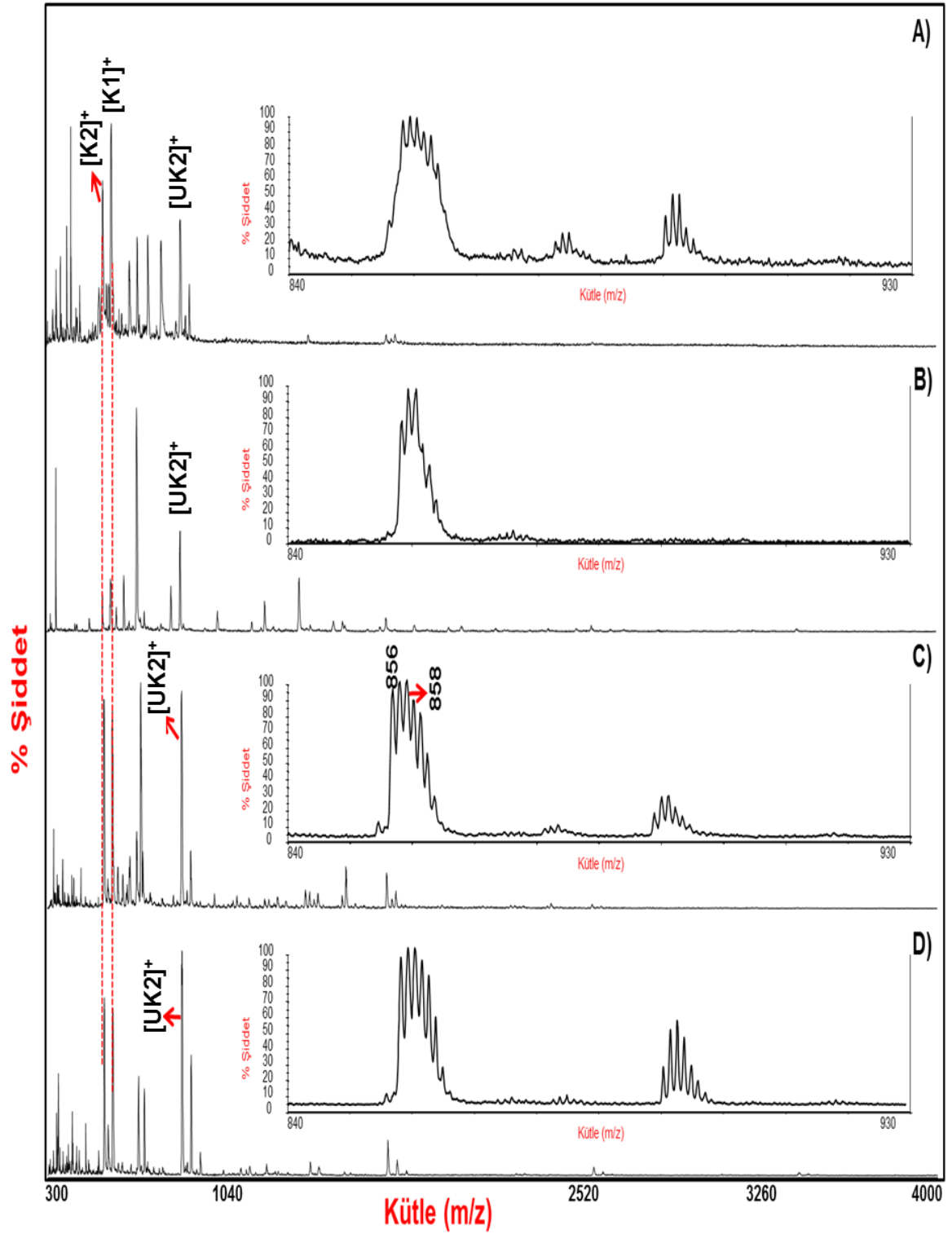
Şekil 5.18. CMP-B19 kompleksinin (A) CHCA, (B) DHB ve (C) THAP matrisleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM CMP:0.33 mM B19 eşit hacim karışımında).



Şekil 5.19. GMP-B19 kompleksinin (A) CHCA, (B) HPA ve (C) ATT matrisleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM GMP:0.33 mM B19 eşit hacimde karıştırılmıştır).

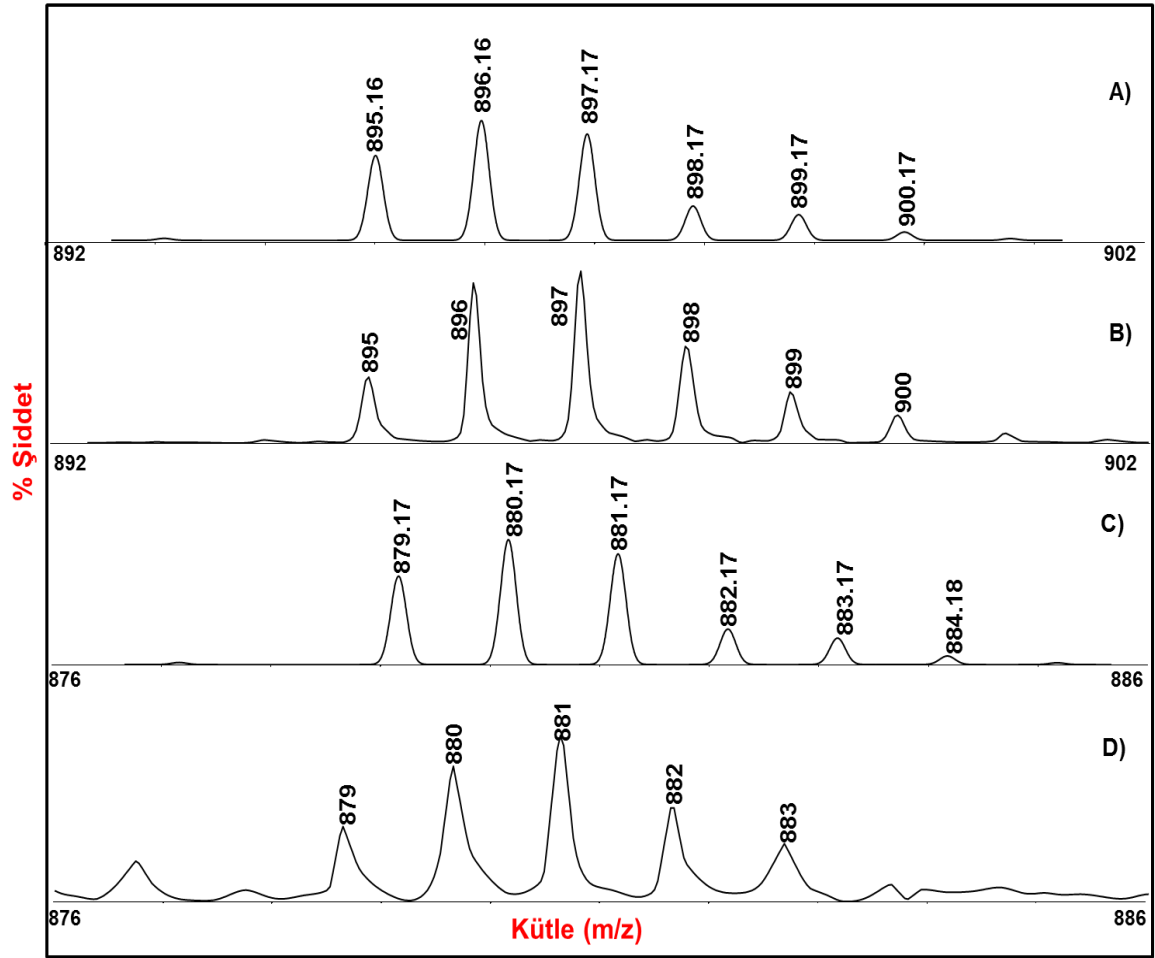


Şekil 5.20. GMP-B19 kompleksinin (A) DHB ve (B) THAP matrisleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM GMP:0.33 mM B19 eşit hacimde karıştırılmıştır).

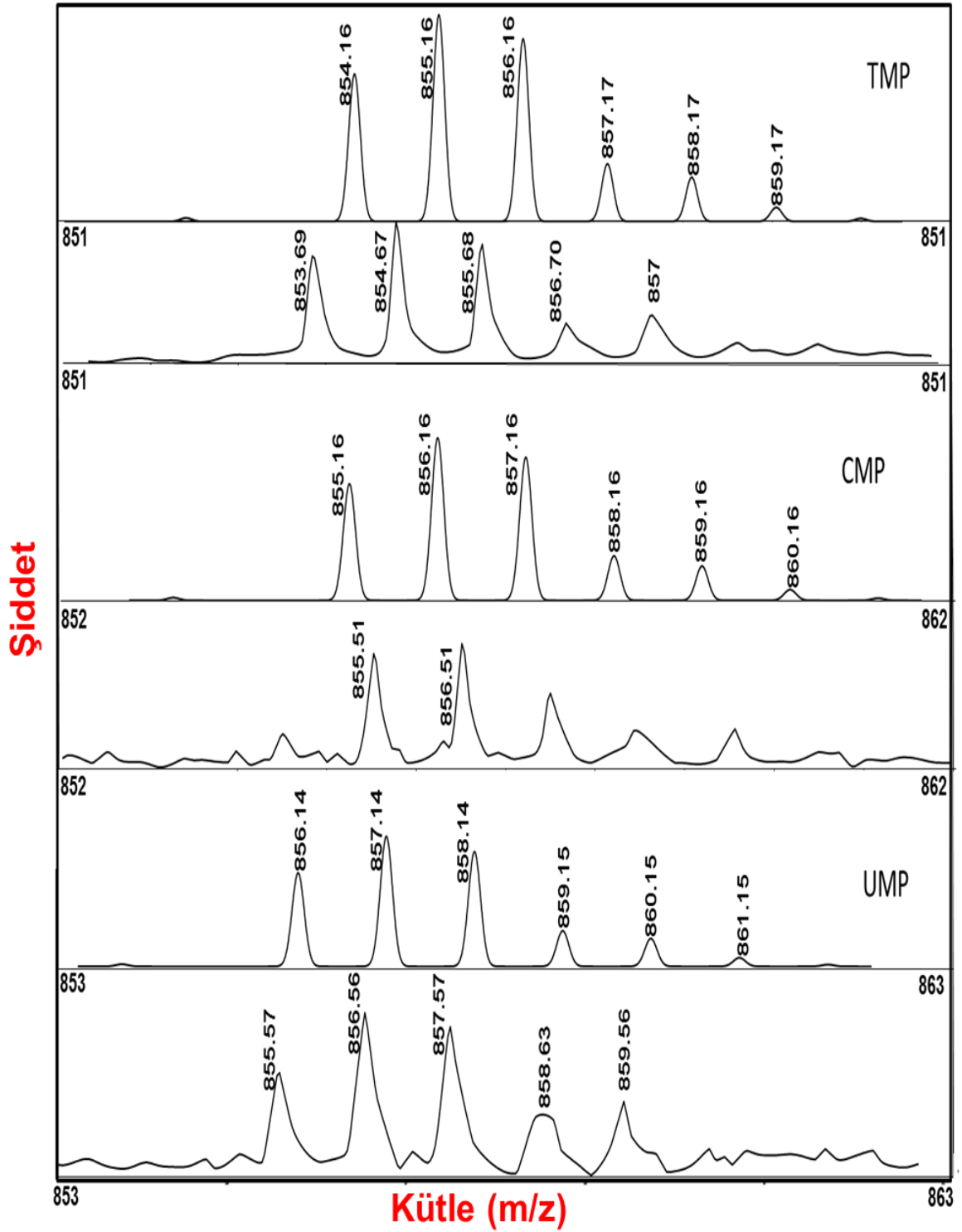


Şekil 5.21. UMP-B19 kompleksinin (A) CHCA, (B) ATT, (C) DHB ve (D) THAP matrisleri ile elde edilmiş kütle spektrumları (10 mM GMP:0.33 mM B19 eşit hacimde karıştırılmıştır).

Tüm komplekslerin MALDI-TOF MS e ait izotopik kütle dağılımı ve teorik spektrumları ile deneysel sonuçlar karşılaştırmalı olarak GK ve AK kompleksleri için Şekil 5.22’de, TK, CK ve UK kompleksleri için Şekil 5.23 ‘de verilmiştir. Kütle spektrumunda teorik olarak hesaplanan izotopik dağılımda negatif yüklü nükleotidler ile [B19-2Cl]⁺² yüklü molekülün etkileşimi ile oluşan pozitif yüklü kompleksin, herhangi bir H⁺ transferine gerek olmadan, doğrudan iyonlaştığı düşünülmüştür. Teorik sonuçlar ile deneysel sonuçların uyumlu olması oluşan kompleksin iyonlaşma şeklinin önerildiği gibi olduğunu doğrulamaktadır. Kütle/yük değerlerinde görülen kaymalar cihazın kalibrasyonu sırasında kullanılan yapının çalışılan yapının molekül ağırlığı ile aynı olmamasından kaynaklanmaktadır ve kabul edilebilir sınırlar içerisinde.



Şekil 5.22. Komplekslere ait kütle spektrumları. (A) GMP-B19 kompleksi (teorik), (B) GMP-B19 kompleksinin (deneysel), (C) AMP-B19 kompleksinin (teorik) ve (D) AMP-B19 kompleksi (deneysel).

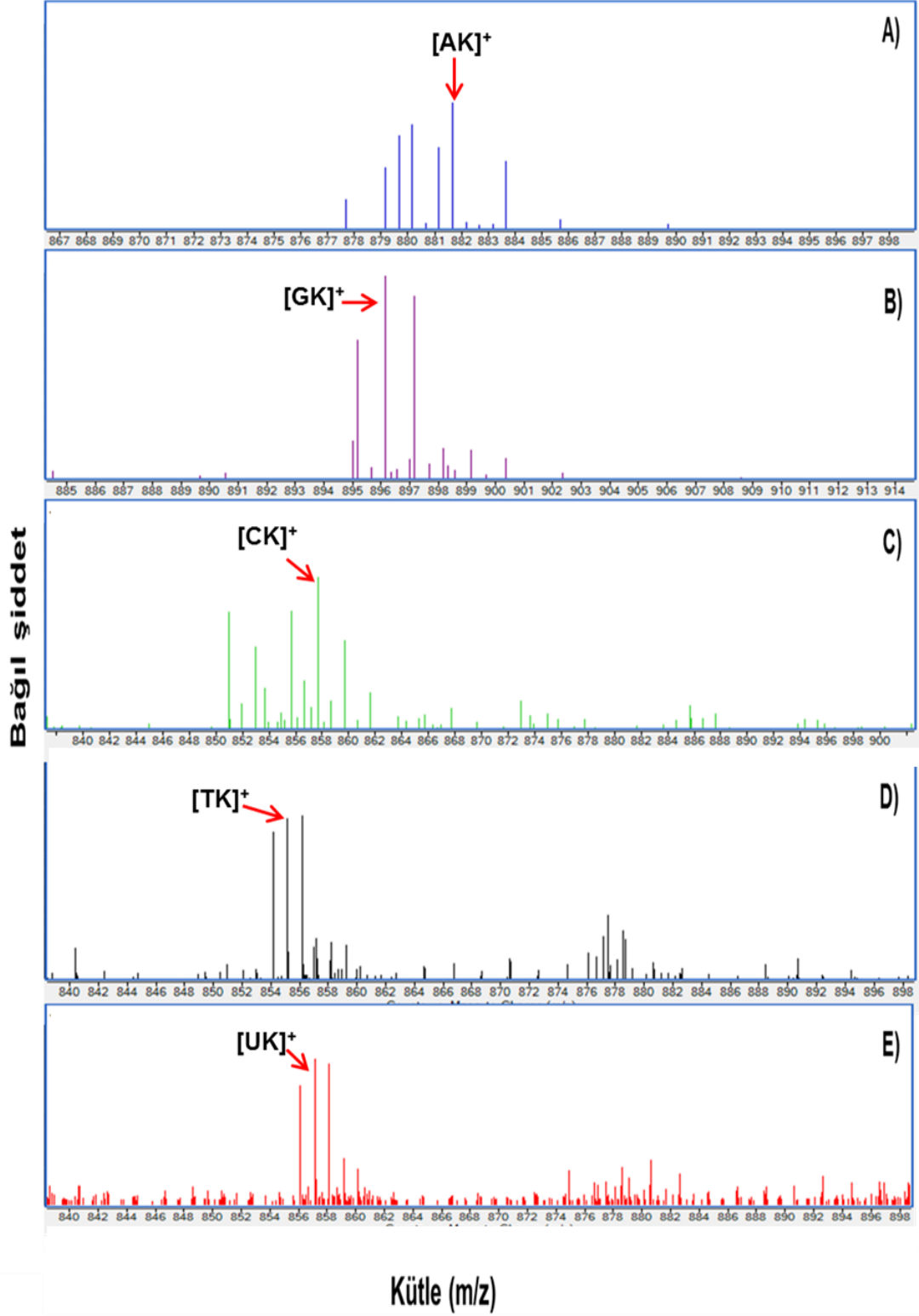


Şekil 5.23. Komplekslere ait kütle spektrumları. (A) TMP-B19 kompleksi (teorik), (B) TMP-B19 kompleksinin (deneysel), (C) CMP-B19 kompleksinin (teorik), (D) CMP-B19 kompleksinin (deneysel), (E) UMP-B19 kompleksinin (teorik) ve (F) UMP-B19 kompleksinin (deneysel)

Yapılan MALDI-TOF MS analizleri sonucunda B19 'un tüm baz birimleriyle etkileştiği ve bu etkileşimin MALDI-TOF MS ile izlenebildiği görülmüştür. Kompleks oluşumunun B19 molekülün K2 formu üzerinden gerçekleştiği tespit edilmiş ve bundan sonra B19 komplekslerinin "K" ile gösterilmesine karar verilmiştir. Hücre ortamını taklit eden *in vitro* ortamlarda tüm baz birimleri bir arada bulanacağı için B19 molekülünü, 5 nükleotidi ve komplekslerini en iyi şekilde analize olanak sağlayan matrikslerin DHB ve THAP, kütle ayırımının en iyi gerçekleştiği matriksin DHB olduğu tespit edilmiştir.

En uygun matriks olarak DHB'nin seçilmesi ve pozitif iyonlaşma modunda düşük lazer şiddeti ile sinyal alınabilmesi Dohta ve arkadaşları [6] tarafından Sisplatin-olinükleotid etkileşimi incelemek amaçlı yapılan çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

B19:nükleotid mol oranı 1:30 olan çözeltiler 24 saat inkübe edildikten sonra, inkübasyon çözeltilerinin ESI-MS ile analizi sonrası elde edilen spektrumlar Şekil 5.24'te verilmiştir. Beklenen kompleks iyonlarına ait sinyaller toplam iyon kromatogramına ait tarama (scan) spektrumunda net izlenemediği için seçimli iyon modundaki (SIM) spektrumlar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen spektrumlar sentezlenmiş olan B19 molekülünün antikanser ilaç aday olma şartlarından en önemlisi olan DNA baz birimleriyle etkileşime girme şartlarını sağladığını göstermiştir.

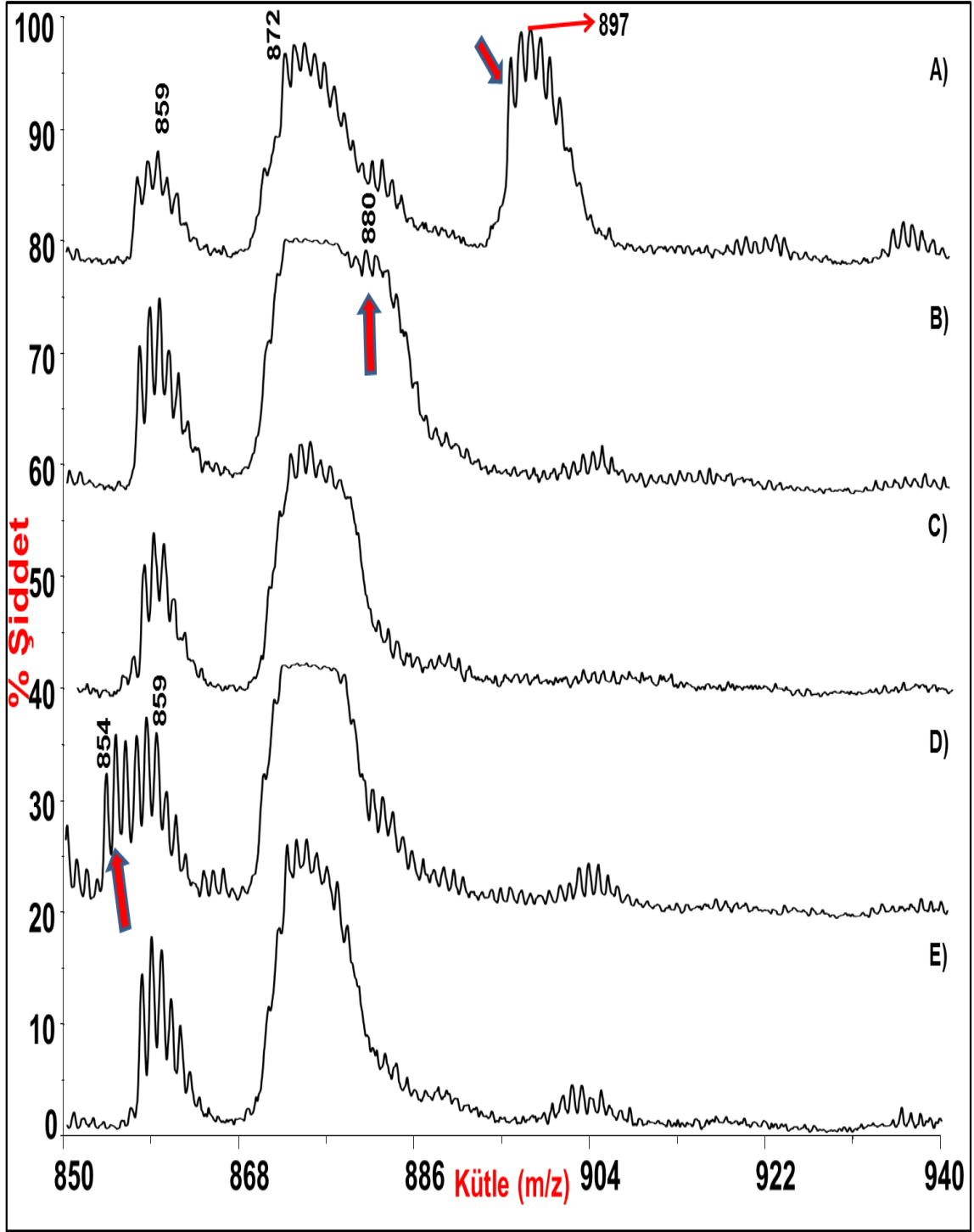


Şekil 5.24. B19-nükleotid komplekslerinin iyon seçimli kütle spektrumları. (A) AK, (B) GK, (C) CK, (D) TK ve (E) UK.

5.3.2. Özgün Etkileşimin Araştırılması

In vivo hücre ortamını taklit etmek amacıyla, inkübasyon ortamına 5 mM NaCl ilave edilmiş, mol oranı 1:1 de sabit tutularak, özgün etkileşimlerin varlığı incelenmiştir. Bu amaçla 0.33 mM, 600 µl MP 'ler ile 0.33 mM, 600 µl B19 molekülü amonyum bikarbonat tampon ortamında (pH: 7) 5 mM NaCl varlığında inkübe edilmiştir. 3 saat ve 24 saat inkübasyon süreleri test edilmiştir.

Üç saat ve 24 saatlik örnekler incelendiğinde inkübasyon sürelerinin oluşan komplekse belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Şekil 5.25'te verilen tüm kütle spektrumlarına bakıldığında m/z: 859 ve 872 değerlerinde pik grupları izlenmiştir. Bu piklerin B19 molekülünün kütle spektrumunda bulunması, sentez sırasında oluşan yan ürünlerin varlığını göstermiştir (DHB ve CHCA matrikslerinin her ikisi ile de bu pikler izlenmiştir). Şekil 5.25A 'da m/z:897 'de görülen şiddetli pik grubu, GMP-B19 kompleksinin 1:1 inkübasyon mol oranında oluşabildiğini göstermiştir. 5.25B'de 872 m/z değerinde görülen pikin hemen yanında omuz yaparak düşük ayırıcılıkta m/z 880 'de AK kompleksine ait pik görülmüştür. Diğer üç MP'nin 855-859 m/z değerinde kompleks oluşum piki beklenmesi ve bu pik grubunun B19 molekülünün kendi spektrumunda da var olması kompleksin varlığının izlenmesini zorlaştırmıştır. Ancak 5.25D'de m/z 854'te, TK kompleksinin kütle değerinde ilave bir pik grubu gözlemlenmiştir. CK ve UK komplekslerinin oluşumunun belirlenebilmesi için inkübasyona sokulan CMP ve UMP derişimlerinin değişimi ile 855-859 m/z aralığındaki sinyal şiddetinin değişiminin incelenmesi gerektiği düşünülmüştür. Oluşumu izlenen AK, GK ve TK kompleksleri için de derişim artışı-sinyal şiddeti değişiminin izlenmesi planlanmıştır.



Şekil 5.25. B19 Molekülünün (A) GMP , (B) AMP, (C) CMP, (D) TMP ve (E) UMP ile inkübasyonu sonucu elde edilen kütle spektrumları (1:1 mol oranında, eşit hacimde karıştırılmışlardır. 37°C de, pH: 7, inkübasyon süresi: 3 saat. 5 mM NaCl. Tampon : Amonyum bikarbonat).

5.3.3. Tuz Etkisinin İncelenmesi

B19-nükleotid etkileşimlerini incelemek amacıyla gerçekleştirilen; 10 mM MP'ler ile 0.33 mM B19 molekülünün, tuzsuz ortamda ve amonyum bikarbonat tamponunda, 37°C'de, inkübasyon öncesi pH ayarlanarak (pH:7) yürütülen ilk çalışmada tüm nükleotidlerin B19 ile etkileşime girdiği tespit edilmişti. *In vitro* çalışmalarda hücre içi ortamı taklit eden bu analiz şartlarında olumlu sonuçlar alınması üzerine, hücre dışı ortamı temsil eden 100 mM NaCl ortamında özgün etkileşim kompleks oluşumu incelendi. Bu amaçla; 0.1mM, 600 µl MP'ler, 0.1 mM, 600 µl B19 (1:1 mol oranı) 100 mM NaCl ve amonyum bikarbonat tampon çözeltisi varlığında, pH: 7'de inkübe edildi.

25 mM amonyum bikarbonat tamponu 100 mM, 250 mL NaCl çözeltisinde hazırlandı. İnkübasyon öncesi karışımların pH ayarı 1M HNO₃ kullanılarak yapıldı (Çizelge 5.2). Beş saat ve 32 saat'lik inkübasyon serileri oluşturuldu. İnkübasyon başladıktan 5 saat sonra her bir inkübasyon çözeltisinden 30 µl alındı ve +4 °C 'ye bırakıldı. Geri kalan çözeltinin inkübasyonları devam ettirildi. Otuz iki saat sonra tüm çözeltiler inkübasyondan alındı.

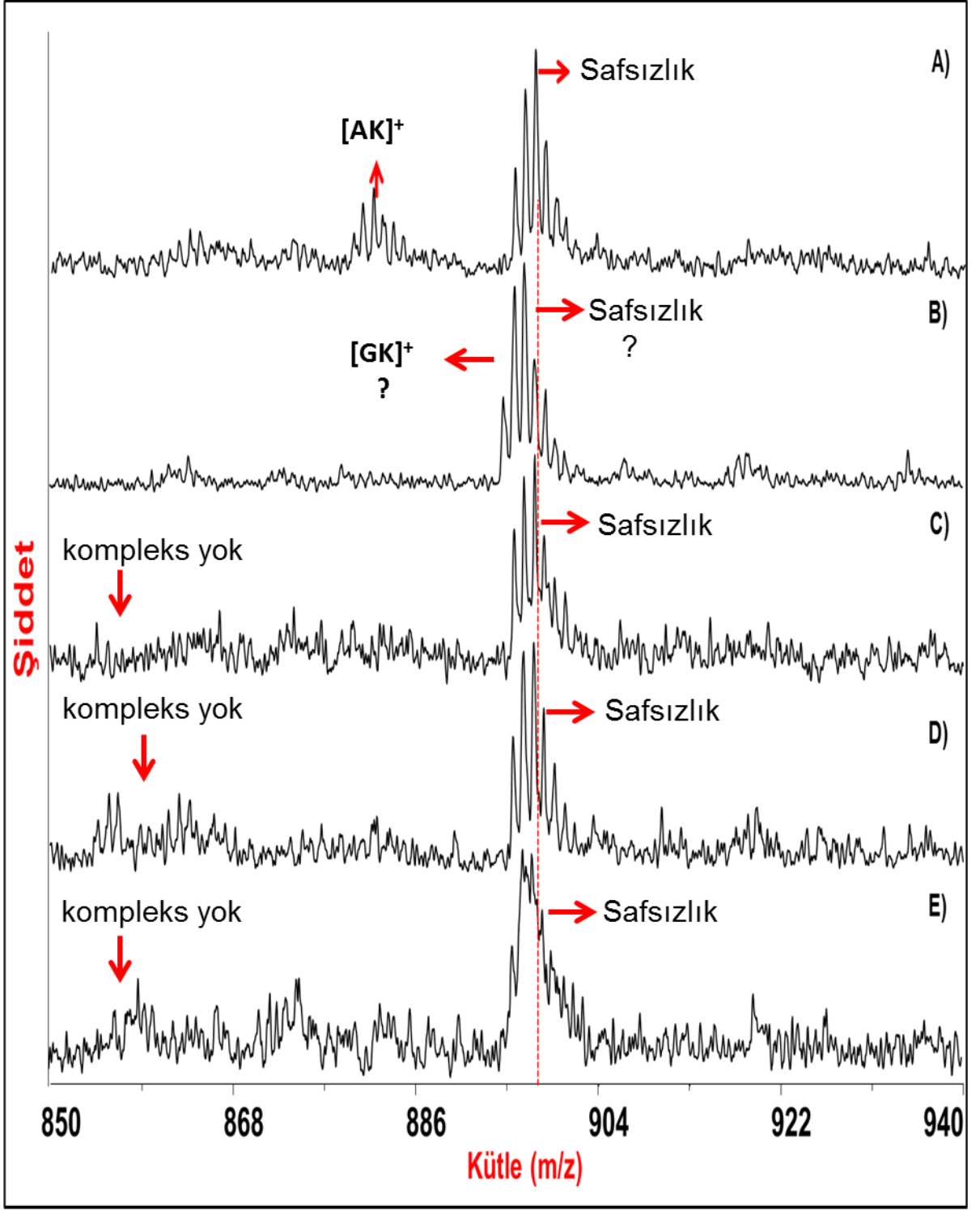
Çizelge 5.2. Nükleotidlerin B19 ilavesi sonrası pH değerleri ve HNO₃ eklenerek elde edilen pH değerleri ve oluşması beklenen komplekslerin kütle değerleri.

Bileşenler	pH	Karışımın pH		HNO ₃ sonrası pH	Beklenen m/z (Da)	
AMP	8.06	AK	8.91	7.05	AK	880
GMP	8.08	GK	8.72	7.02	GK	896
CMP	7.81	CK	8.91	7.07	CK	856
TMP	8.76	TK	8.88	7.06	TK	855
UMP	8.14	UK	8.94	7.04	UK	857
B19	7.35	-		-		
Saf Su	7.22					
Tampon	8.92					

MALDI-TOF MS sisteminde CHCA ve DHB matriksleri kullanılarak inkübasyon sonrası çözeltilerin analizleri gerçekleştirilmiştir. CHCA matriksi kullanılarak 5 saat inkübasyon örnekleri incelenmiş ve iyi sonuç alınamadığı için, 32 saatlik

inkübasyon çözeltileri CHCA matriksi ile analiz edilmemiştir (spektrumlar gösterilmemiştir). İleri çalışmaların tümünde yalnızca DHB matriksi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Çizelge 5.2'de, nükleotid-B19 komplekslerinin hesaplanan m/z değerleri verilmiştir. Yürütülen inkübasyonlarda sadece çok az miktarda AK kompleksi oluşurken (Şekil 5.26 A) diğer nükleotid-B19 inkübasyon çözeltilerinden beklenen m/z değerlerinde sinyal alınamamış olması B19 ile etkileşime girmediğini göstermektedir. AK kompleksinin 881 m/z 'de sinyal vermesi oluşan kompleksin protone olmadan ($[AK]^+ = 881$) izlenebildiğini ve oluşan kompleksin pozitif yüklü olduğunu göstermiştir. Ayrıca 5 saatten fazla inkübasyon süresinin kompleks oluşumuna bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, *in vitro* çalışmalarda, hücre dışı ortam şartlarında, yalnızca AMP'nin B19 molekülü ile özgün olarak etkileşime girdiği tespit edilmiştir. 896-899 kütle bölgesinde, tüm nükleotid inkübasyonlarından elde edilen, kirlilik kaynaklı olduğu düşünülen pik grubu nedeniyle GK kompleksinin bu ortamda oluşup oluşmadığına dair net bir tespit yapılamamıştır.



Şekil 5.26. B19 Molekülünün (A) AMP , (B) GMP, (C)CMP, (D)TMP, (E)UMP ile inkübasyonu sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu (1:1 mol oranında, eşit hacimde, 37°C de , pH: 7, inkübasyon süresi: 5 saat).

5.3.4. Tampon Seçimi (*in vitro*, Hücre İçi Ortam)

Özgün etkileşim ve tuz etkisinin araştırıldığı, 5.3.2 ve 5.3.3. bölümlerde izlenen ve kompleks ile aynı m/z değerinde sinyal veren safsızlıkların tamponla baskılanıp baskılanamayacağını görmek amacıyla, kütle spektrometrik sistemlerle uyumlu olan amonyum asetat tamponu ile inkübasyon setleri oluşturulmuştur. Bu amaçla; 10 mM amonyum asetat tamponu hazırlanmıştır (0.199g amonyum asetat/ 250 mL suda). Bu tampona 10 mM NaCl içerecek şekilde NaCl ilavesi yapılmıştır. pH:7.14 olarak ölçülmüştür.

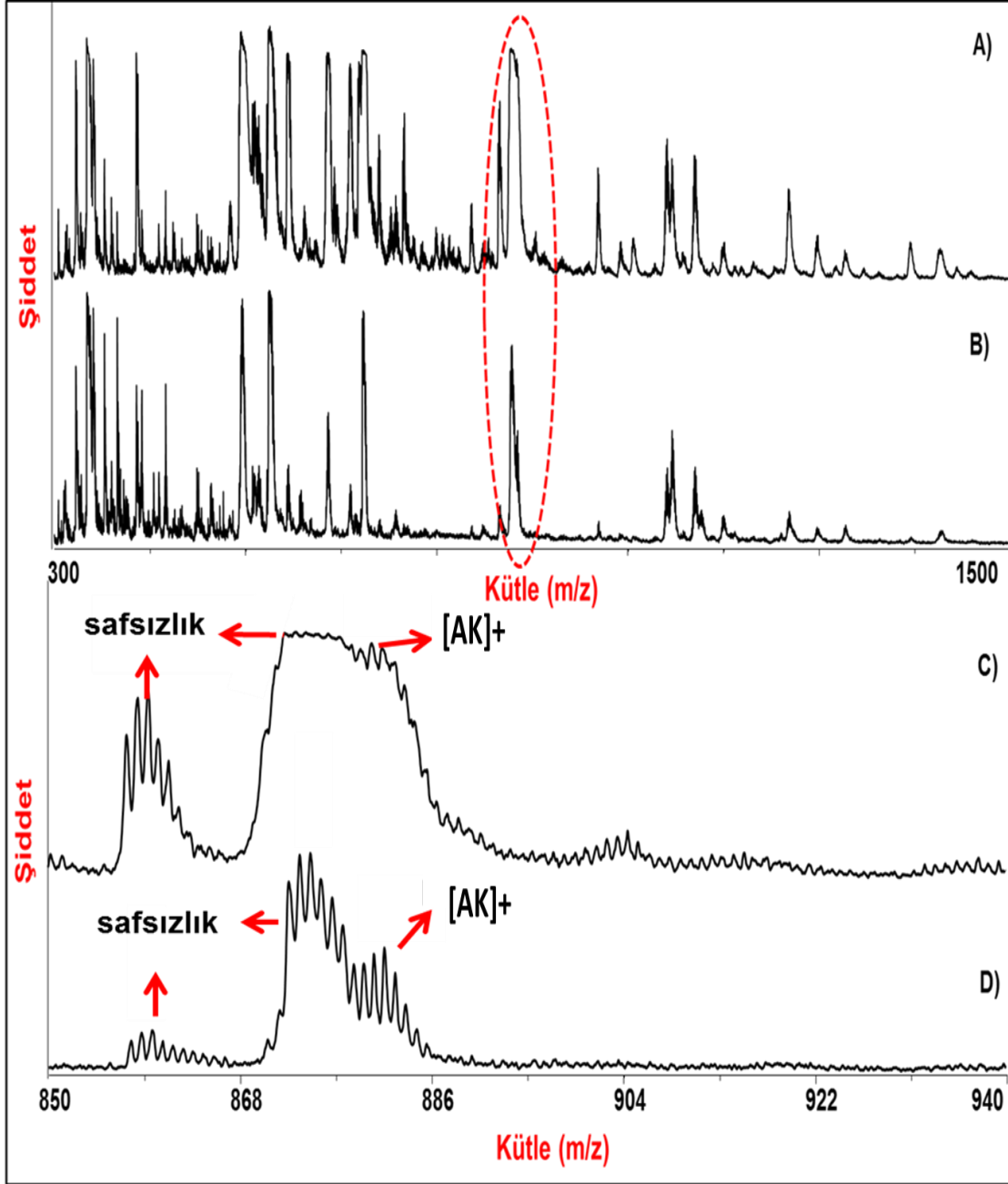
0.33 mM B19 çözeltisinden 0.25 mM B19 çözeltisi hazırlanmış, seyreltme su ile yapılmıştır. 10 ve 5 mM MP stoklarından 0.25 mM çözeltiler hazırlanmış, seyreltmeler hazırlanmış olan amonyum asetat tamponu ile yapılmıştır. Bileşenler karıştırıldıktan sonra pH'ları ölçülmüştür. Ölçülen pH değerlerinin kabul edilebilirliği göz önünde bulundurulmuş ve pH ayarı yapılmadan, doğrudan inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 5.3 Nükleotidlerin B19 ilavesi sonrası pH değerleri ve oluşması beklenen komplekslerin kütle değerleri.

Kompleks	pH	Beklenen m/z (Da)	
AK	6.15	AK	880
GK	6.57	GK	896
CK	6.26	CK	856
TK	6.69	TK	855
UK	6.22	UK	857

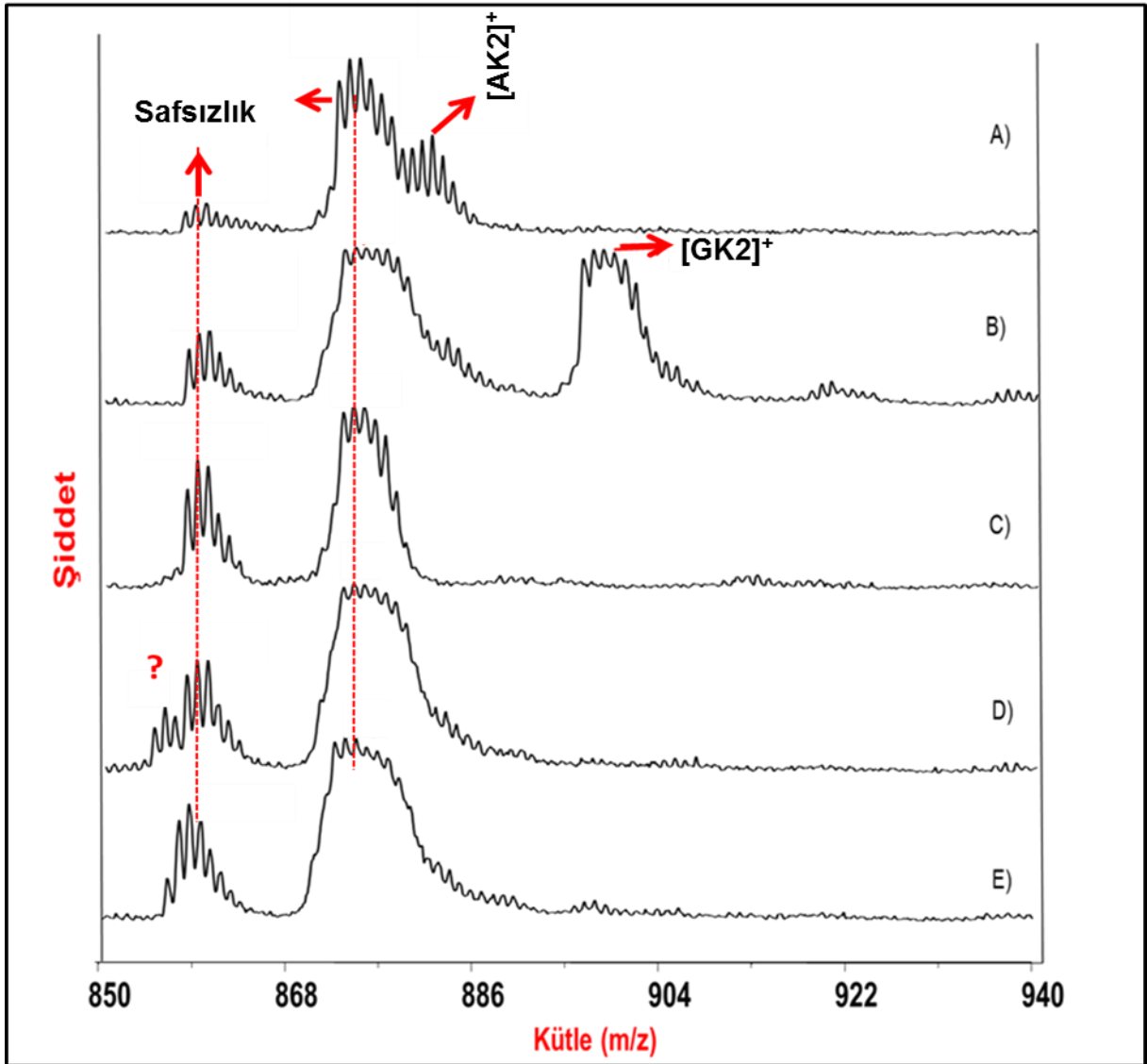
Kullanılan tamponların inkübasyon üzerine etkisini izlemek amacıyla oluşan komplekslerin spektrumları karşılaştırılmıştır. Şekil 5.27'de AMP-B19 kompleksinin her iki tampon ortamındaki davranışları verilmiştir. Amonyum bikarbonat kullanıldığı duruma ait spektrumda kirlilik pikleri yoğun olarak görülmüştür. 857 m/z değerinin bulunduğu bölgede izlenen pik grubunun amonyum asetat kullanıldığı durumda şiddetinin belirgin şekilde azaldığı ve 880 m/z değerinin bulunduğu pik grubunun ayırıcılığının arttığı izlenmiştir. Tüm nükleotid-B19 kompleksleri incelenmiş (veri gösterilmemiştir) ve hem kütle spektrumunda yüksek ayırıcılık

elde etmek hem de istenmeyen pikleri baskılamak için inkübasyon ortamı pH'sının amonyum asetat ile ayarlanmasının uygun olacağına karar verilmiştir. Bundan sonra yürütülen tüm inkübasyonlarda amonyum asetat tamponu kullanılmıştır.



Şekil 5.27. B19-AMP kompleksine ait MALDI-TOF MS spektrumu; (A) 25 mM amonyum bikarbonat tamponu, 1:1 mol oranı, (B) 10 mM amonyum asetat tamponu, 10 mM NaCl, (C) 25 mM amonyum bikarbonat tamponu, (D) 10 mM amonyum asetat tamponu, 1:1 mol oranı.

Uygun tampon seçimi çalışmalarında, B19-MP komplekslerinin 12 saatlik inkübasyon çözeltilerine ait MALDI-TOF MS analizi sonucunda alınmış kütle spektrumları AK, GK komplekslerinin oluştuğunu göstermiştir. TK kompleksinin oluşumuna dair belirtiler Şekil 5.28’de soru işareti bulunan bölge ile işaretlenmiştir. CK ve UK kompleksleri için bölüm 5.3.2’de bahsedilen, farklı nükleotid konsantrasyonlarında belirtilen inkübasyonların yapılması gerekliliği kesinlik kazanmıştır.



Şekil 5.28. B19-MP Kompleksleri. (A) AMP, (B) GMP, (C) CMP, (D) TMP ve (E) UMP ile B19'un inkübasyonu sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumları (10 mM amonyum asetat tamponunda, 1:1 mol oranı, 10 mM NaCl varlığında).

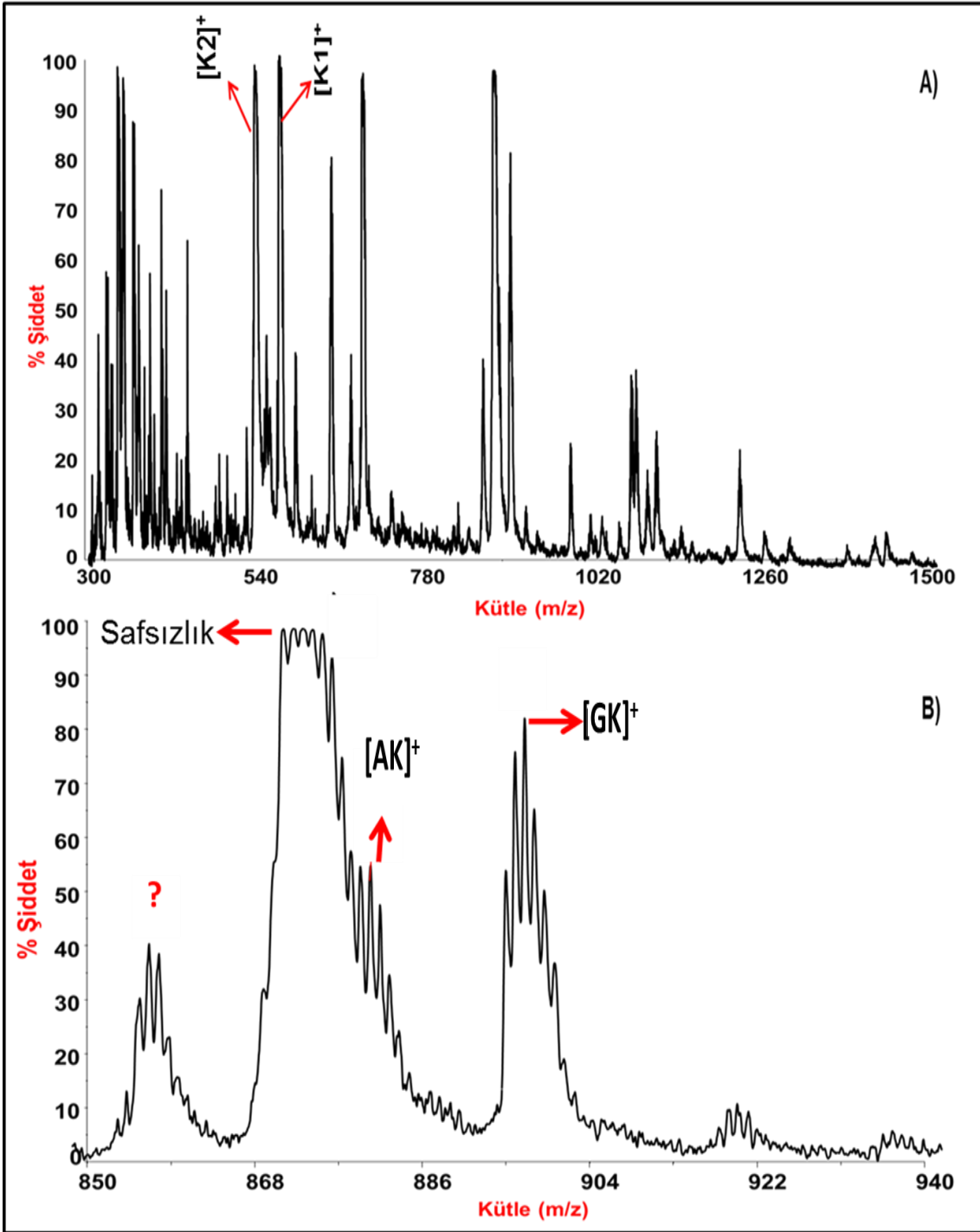
5.3.5. Yarışmalı İnkübasyon

In vitro ortamda, DNA / RNA zinciri üzerinde tüm oligonükleotidler bir arada bulunduğundan, karışım ortamındaki oligonükleotidlerden hangisinin B19 'a ilgisinin fazla olduğunun izlemesinin faydalı olacağı düşünülmüştür.

Bu amaçla; 0.25 mM, 40'ar µl MP; 0.25 mM, 40 µl B19 ile karıştırılmış, pH: 6.21 olarak ölçülüp ayarlama yapılmadan, 37°C de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bölüm 5.3.4'tekine benzer oluşumlar izlenmiştir. GMP (897 m/z' de pik grubu) ve AMP'nin (881 m/z) kompleks oluşumunda etkili olduğu görülmüştür (Şekil 5.29). TK, CK ve UK komplekslerinin varlığı, komplekslerle aynı bölgede görülen kirlilik pikleri nedeniyle net olarak tespit edilememiştir (soru işaretli bölge). AMP ve GMP 'lerin yarışmalı ortamda B19 ile kompleks yapma önceliğinin LC-MS/MS ile belirlenmesi kararlaştırılmıştır.

Angelika ve ark. tarafından yapılan çalışmada KP, *cis*-diamin(2-hidroksimalonato)platin(II) ve *cis*-diamin(malonato)platin(II) moleküllerinin monofosfatlarla hem tek tek hem de yarışmalı inkübasyon sonrasında etkileşimi ¹H-NMR ile incelenmiştir. TMP ve CMP ile etkileşime girmedikleri görülmüştür. Cisplatin türevi olan bu moleküllerin söz konusu bu davranışı, cisplatinin-CMP bağlanmasının yalnızca ortamda başka bir hedef molekül olmadığı durumda izlendiği ya da fazla miktarda ilaç varken gerçekleşebildiğini desteklemiştir [176]. Ayrıca CDDP'nin TMP ile etkileşimi için N3 üzerinden deproton olmasının gerekliliği ve bu durumun fizyolojik şartlarda sağlanmadığı bu 3 yapının etkileşmemesini anlamlı kılmıştır [176].

GMP ve AMP ile etkileşiminin diğerler oligonükleotidler ile olan etkileşimlerden hızlı olması, TMP, UMP ve CMP ile etkileşiminin yavaş da olsa tayin edilebilir ölçüde kompleks oluşturması, [B19-2Cl]²⁺ yapısının bisbenzimidazol dikatyonlarda olduğu gibi [174] farklı etkileşim bölgelerinden DNA'ya bağlanabileceğini düşündürmüştür [175]. Analizde kullanılan MALDI-TOF MS tekniğinin yukarıda belirtilen çalışmalarda kullanılan tekniklerden daha hassas olması TK, CK ve UK komplekslerinin tespit edilmesinde önemli rol oynadığı düşünülmüştür.



Şekil 5.29. A)1:1 mol oranında ve eşit hacimde; Monofosfat karışımı-B19 inkübasyonu sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (B) Genişletilmiş kütle spektrumu.

5.3.6 Kompleks Oluşumunun Stokiyometrik İncelenmesi

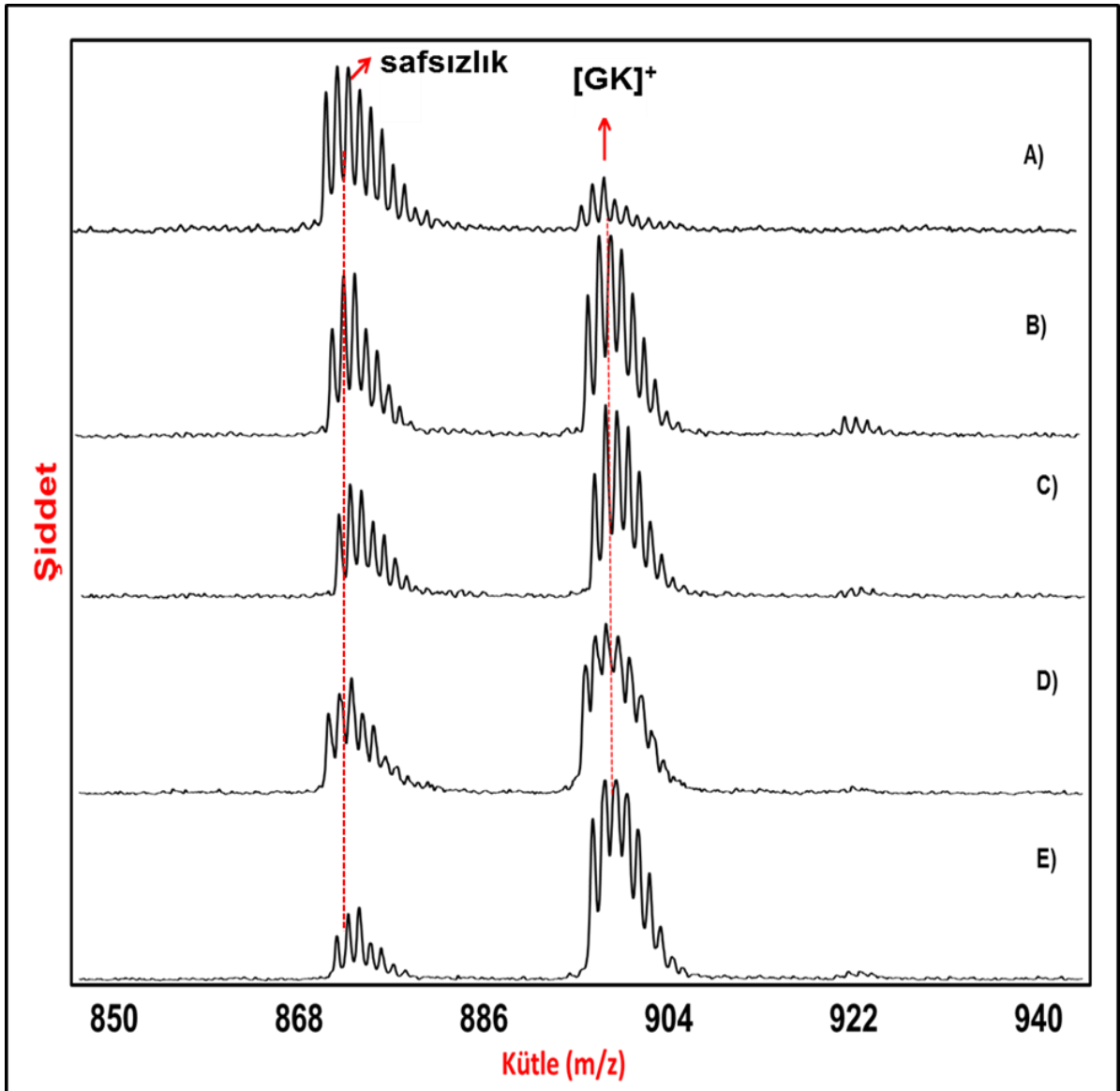
Yapılan seri deneylerin sonunda AMP ve GMP komplekslerinin varlığı net olarak izlenebilmiş ancak CMP, TMP ve UMP-B19 komplekslerinin kütlelerinin bulunduğu bölgede tüm nükleotid-B19 spektrumlarında net olarak kompleks oluşumu gösteren veriler elde edilememiştir. Bu nedenle kompleks oluşup oluşmadığını izlemek için ayrı ayrı 6 saat inkübasyona bırakılan nükleotid:B19 karışımının mol oranları değişiminin kütle spektrumuna etkisi izlenmiştir. B19 mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında nükleotidlerin herbiri ile ayrı ayrı B19, altı saatlik sürelerle inkübasyona bırakılmıştır. 10 mM oligonükleotid stoklarından amonyum asetat kullanılarak gerekli seyreltmeler yapılmış ve Çizelge 5.4'te belirtilen derişimlerde nükleotid çözeltileri hazırlanmıştır.

Çizelge 5.4. Kompleks Oluşumunun Stokiyometrik İncelenmesi amacıyla İnkübasyona sokulan bileşenler ve derişimleri

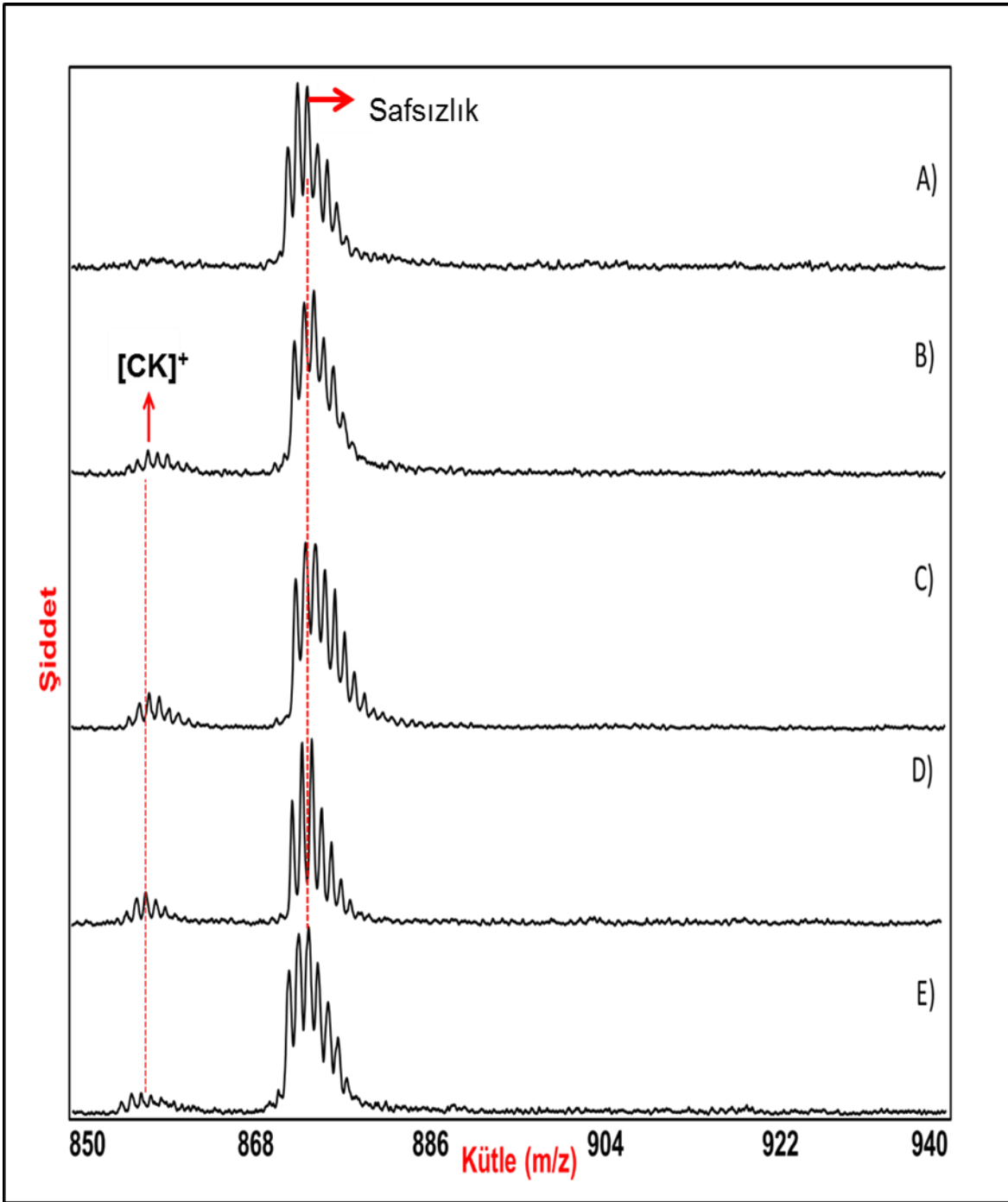
[B19]; (mM), 100 µL	[nükleotid]; (mM), 100 µL
0.02	0.02
0.02	0.10
0.02	0.20
0.02	0.40
0.02	0.60

GK kompleksinin oluşumu 1:1 mol oranından itibaren hem lineer hem de refletron modunda izlenebilmiştir (Şekil 5.30). Kompleks oluşumunun istenilen düzeyde olması için GMP mol sayısının B19 molekülünün mol sayısının 10 katı olması gerektiği saptanmıştır (Şekil 5.30C). Daha fazla GMP bulunmasının kompleks oluşumuna belirgin bir etkisi izlenmemiştir. 1:20 mol oranlı inkübasyon çözeltilisinin anlık etkileşim sonrası elde edilen kütle spektrumu Şekil 5.33'de verilmiştir. Bu mol oranı ile oda sıcaklığında ve anında moleküllerin etkileşime girdiği gözlenmiştir.

CK kompleksinin oluşumu ise 1:10 mol oranından itibaren $m/z = 857$ Da daki pik grubunun varlığı ve 1:20 mol oranına ulaşıldığında söz konusu kütledeki sinyalin şiddetinin artması ile tespit edilmiştir. Reflektron modunda elde edilen spektrumlar incelendiğinde mol oranı $\leq 1:10$ ' da MALDI-TOF MS ile kompleks izlenememiştir (5.32). Lineer modda 1:30 mol oranı ile 1:20 mol oranında elde edilen sinyal şiddetlerinde artış gözlenmemesi, 1:20 mol oranının maksimum bağlanma için yeterli olduğunu göstermiştir (Şekil 5.31 B).

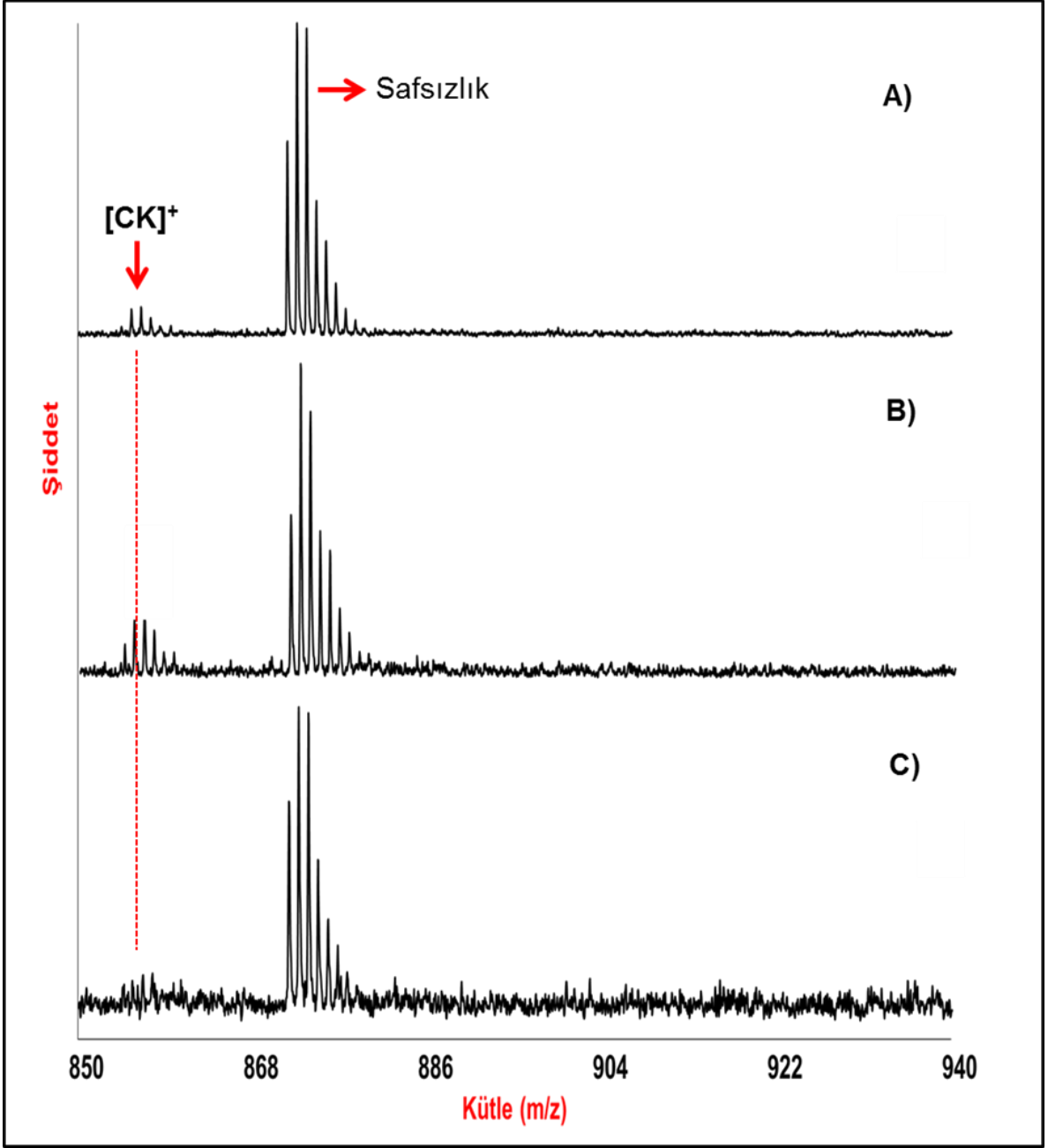


Şekil 5.30. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında GMP ile yapmış olduğu kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları. (A) GK,1:1mol, (B) GK,1:5mol, (C) GK,1:10mol, (D) GK,1:20mol, (E) GK,1:30mol

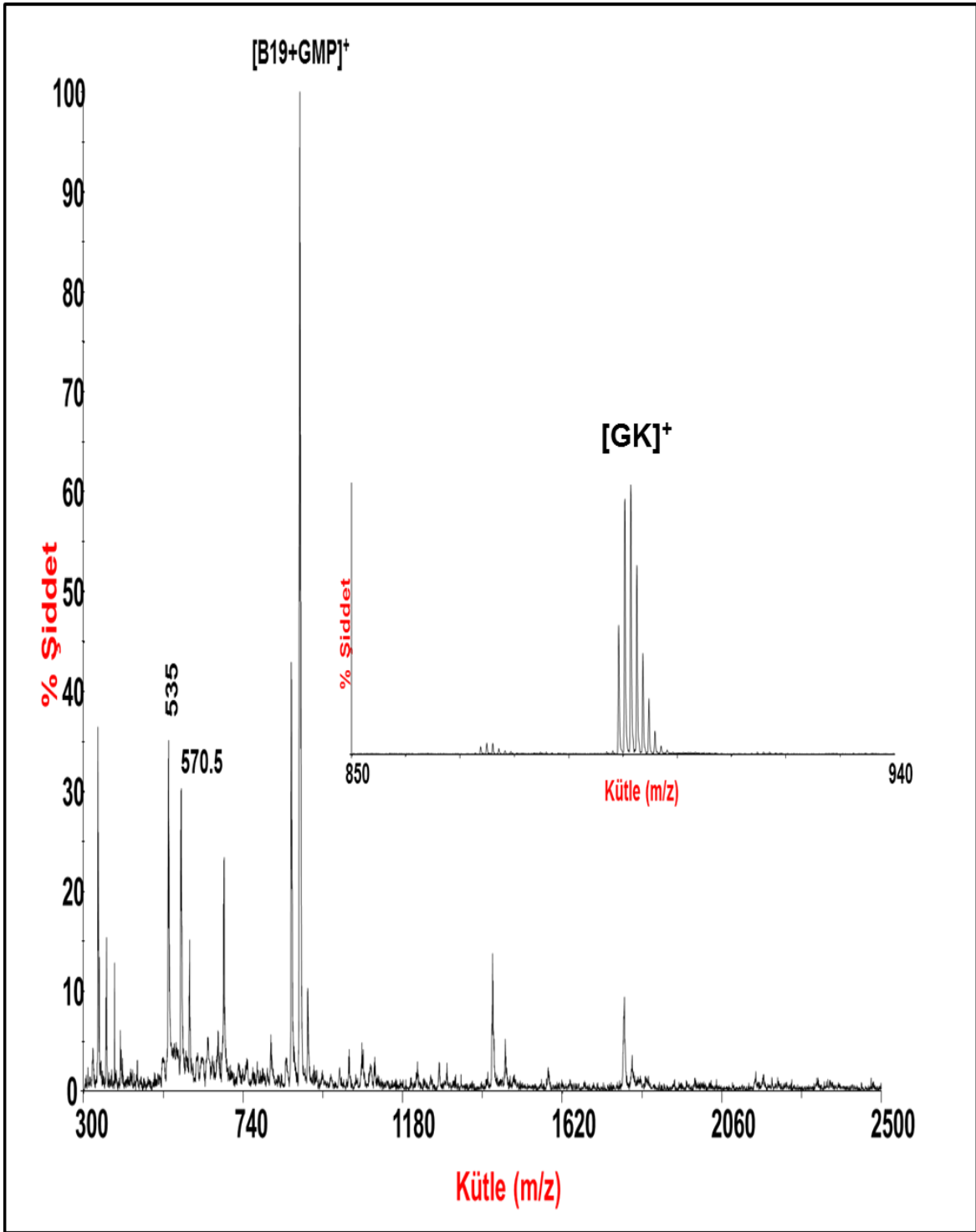


Şekil 5.31. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında CKP ile yapmış olduğu kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları.

(A) CK, 1:1 mol (B) CK, 1:5 mol, (C) CK, 1:10 mol, (D) CK, 1:20 mol, (E) CK, 1:30 mol



Şekil 5.32. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 10'dan 30'a kadar artan mol oranında CMP ile yapmış olduğu kompleksin reflektör modunda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları. (A) CK, 1:30 mol, (B) CK, 1:20 mol, (C) CK, 1:10 mol



Şekil 5.33. Mol oranı 1:20 ve anlık karıştırılma sonrası oluşan B19 –GMP kompleksinin lineer ve reflektör modunda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları.

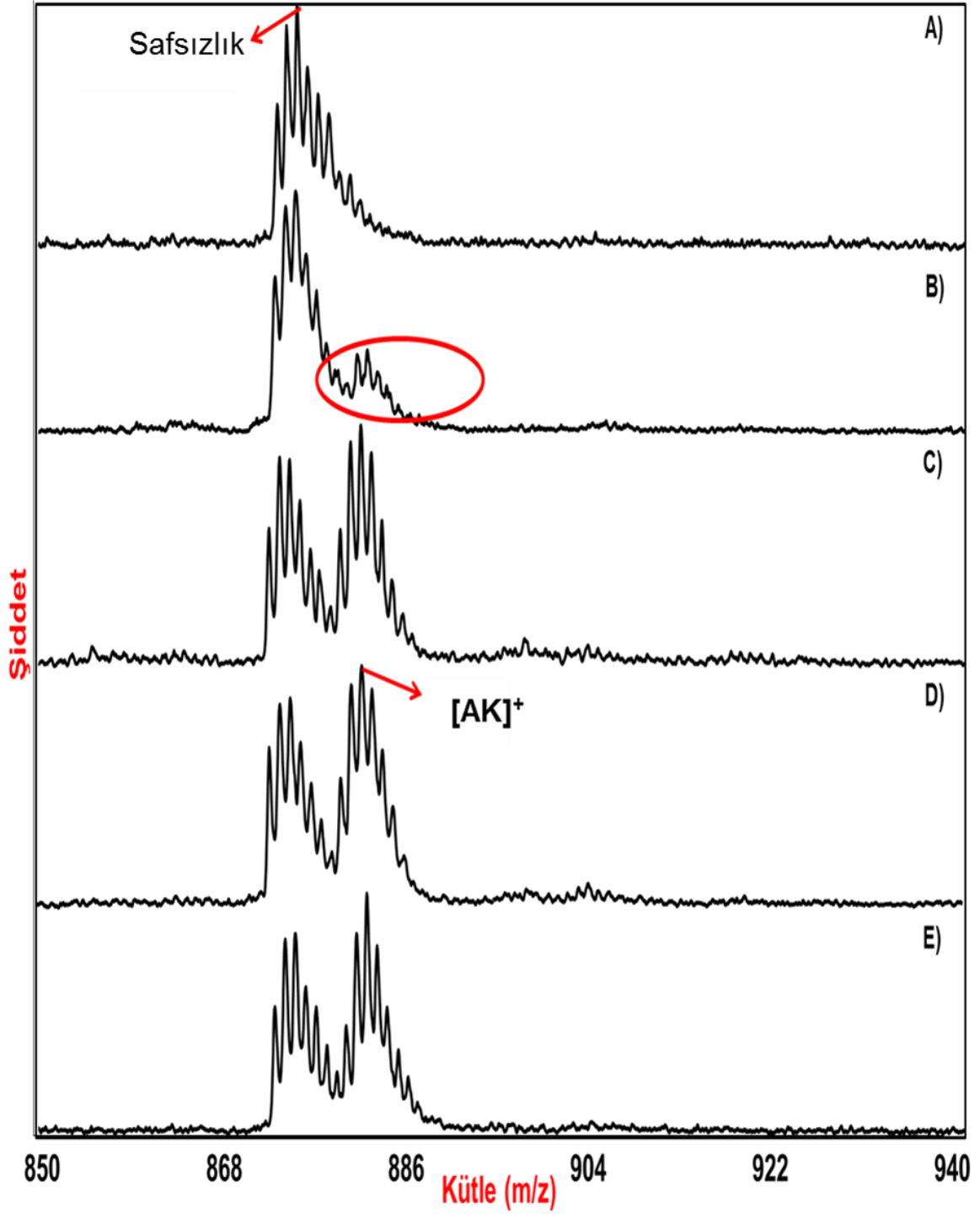
Şekil 5.34' de AMP'nin B19 molekülü ile yaptığı kompleksin, inkübasyon mol oranına bağlılığını yansıtan spektrumlar verilmiştir. 1:1 mol oranlı inkübasyonda [AK]⁺ kompleksine ait olan pik izlenememiştir. 1:5 mol oranında düşük şiddette ve zayıf ayırımla izlenebilmiştir. Kompleks oluşumu için 1:5 oran lineer modda yeterli gibi görülse de refletron modunda minimum 1:10 mol oranında spektrum elde edilebilmiştir. Lineer modda en yüksek pik şiddeti 1:20 mol oranında elde edilmiştir. Ayrıca refletron modunda da en şiddetli pik, 1:20 de elde edilmiştir (Şekil 5.37). Bu nedenle kompleks oluşumu için minimum ve optimum oranlar sırasıyla 1:5 ve 1:20 olarak tespit edilmiştir. Özgün etkileşimlerin araştırıldığı bölüm 5.3.2'de AMP ile 1:1 mol oranında, amonyum bikarbonat tamponu varlığında, 3 saat inkübasyon sonrası B19'un kompleks yaptığı belirlenmişti ancak amonyum asetat ile yapılan bu son çalışmada, 6 saatin sonunda kompleks oluşumu izlenmemesi, bölüm 5.3.2.'de izlenen durumun kirlilik olabileceğini düşündürmüştür.

Diğer taraftan lineer modda 1:5 mol oranlarında komplekslerin gözlenip refletron modda aynı mol oranında gözlenmemesi komplekslerin gaz fazında kararsız olduğunu bir başka deyişle kompleks kararlılık sabitlerinin düşük olduğunu göstermektedir (Bunun nedeni, refletron modda iyonların uçuş sürelerinin daha uzun olmasıdır).

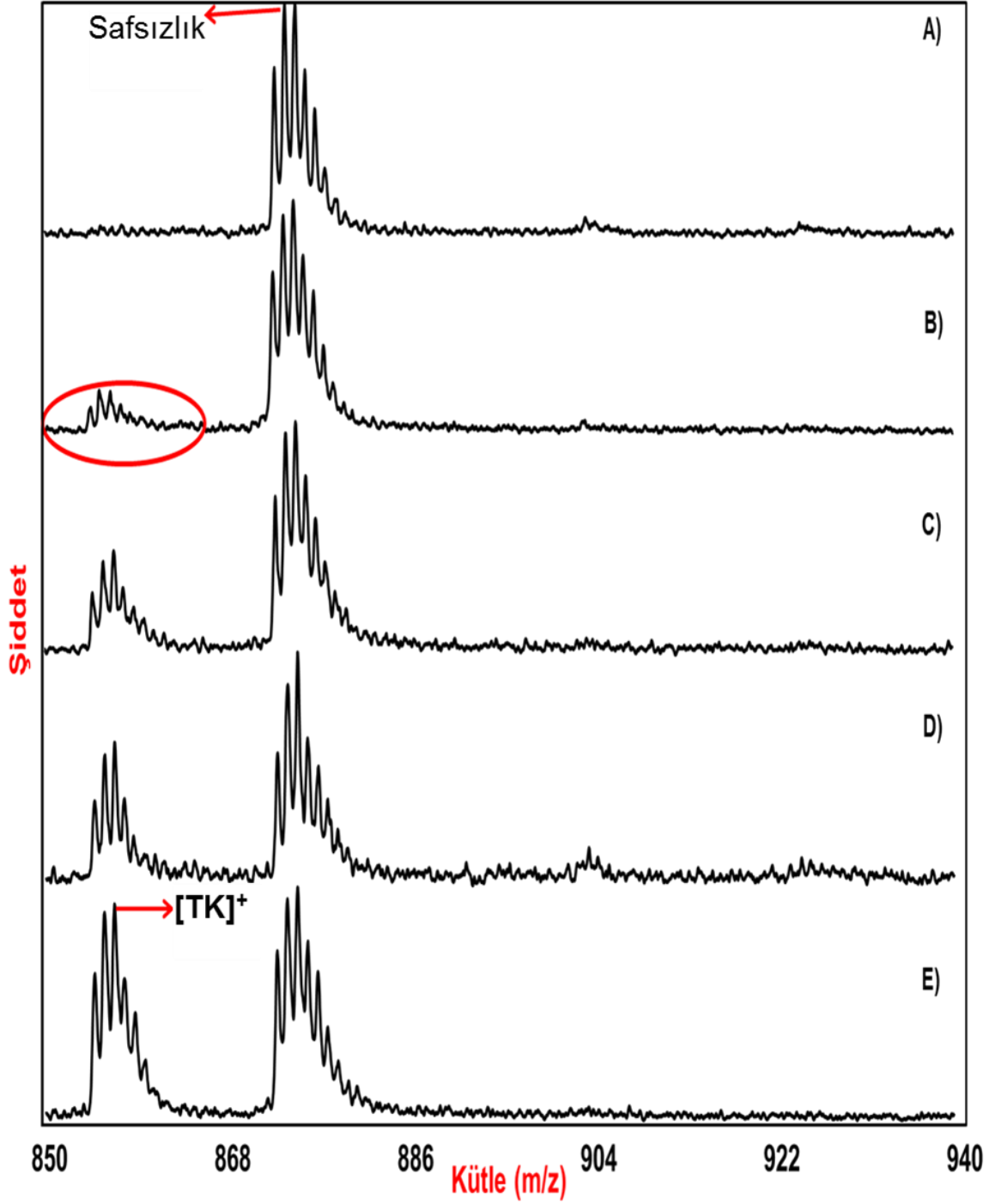
TK kompleksinin oluşumu lineer mod ile 1:5 mol oranında düşük şiddette izlenebilmiştir (Şekil 5.35) ancak refletron modunda kompleks oluşumu minimum 1:20 mol oranında elde edilmiştir (Şekil 5.37). Optimum kompleks oluşumu ise 1:30 mol oranında izlenmiştir. Bu nedenle kompleks oluşumu için minimum ve optimum oranlar sırasıyla 1:5 ve 1:30 olarak tespit edilmiştir.

UK kompleksinin oluşumu lineer mod ile 1:5 mol oranında düşük şiddette izlenebilmiştir ancak refletron modda kompleks oluşumu minimum 1:30 mol oranında elde edilmiştir (Şekil 5.37). Optimum kompleks oluşumu ise yine 1:30 mol oranında izlenmiştir (Şekil 5.36).

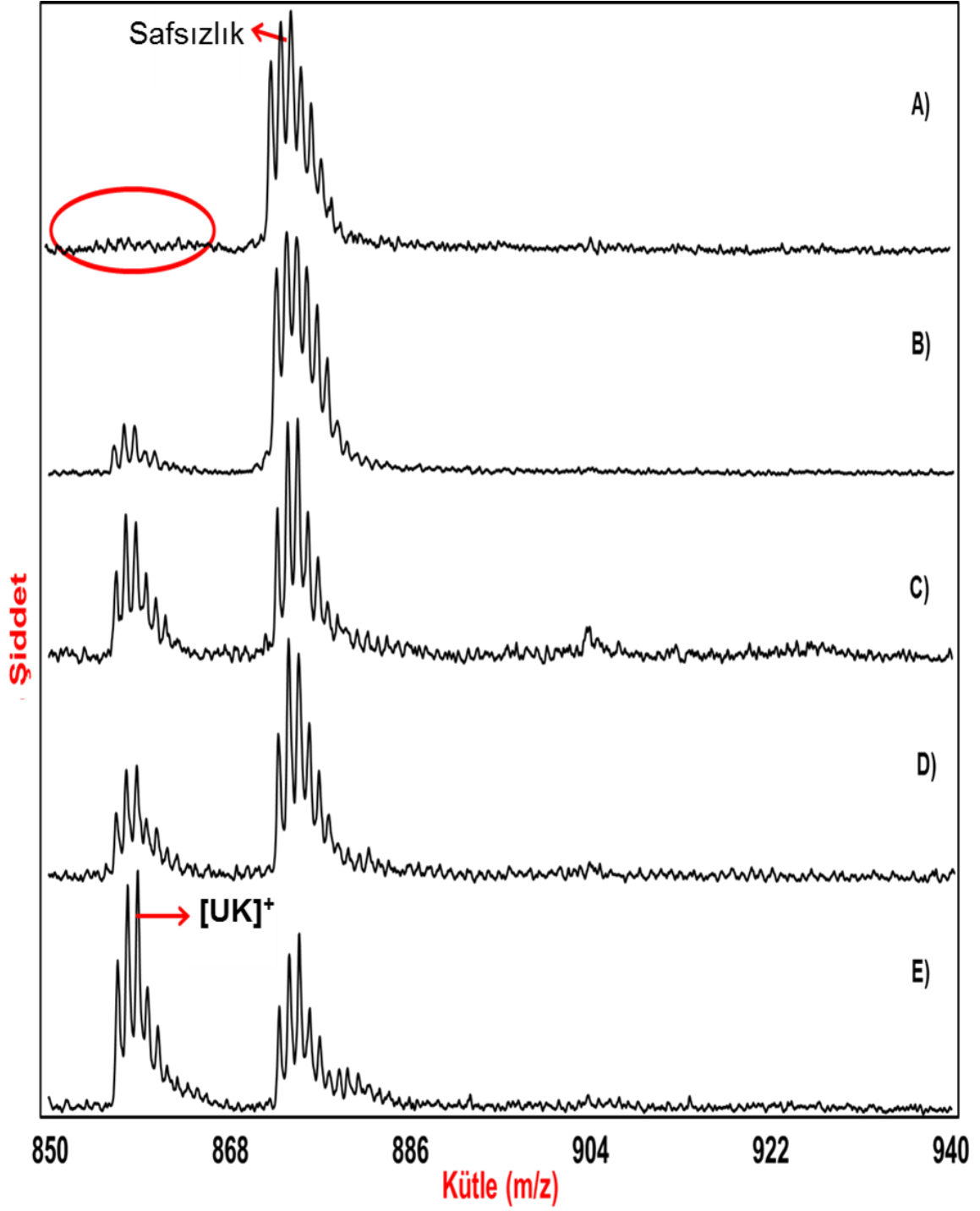
Sonuç olarak B19 ile özgün etkileşime giren ve 1:1 mol oranından itibaren kompleks yapabilen nükleotidin GMP olduğu tespit edilmiştir. Ardından AMP sonra TMP ve UMP geldiği belirlenmiştir. Minimum etkileşimin ise CMP ile olduğu bu çalışmada kütle spektrometrik olarak belirlenmiştir.



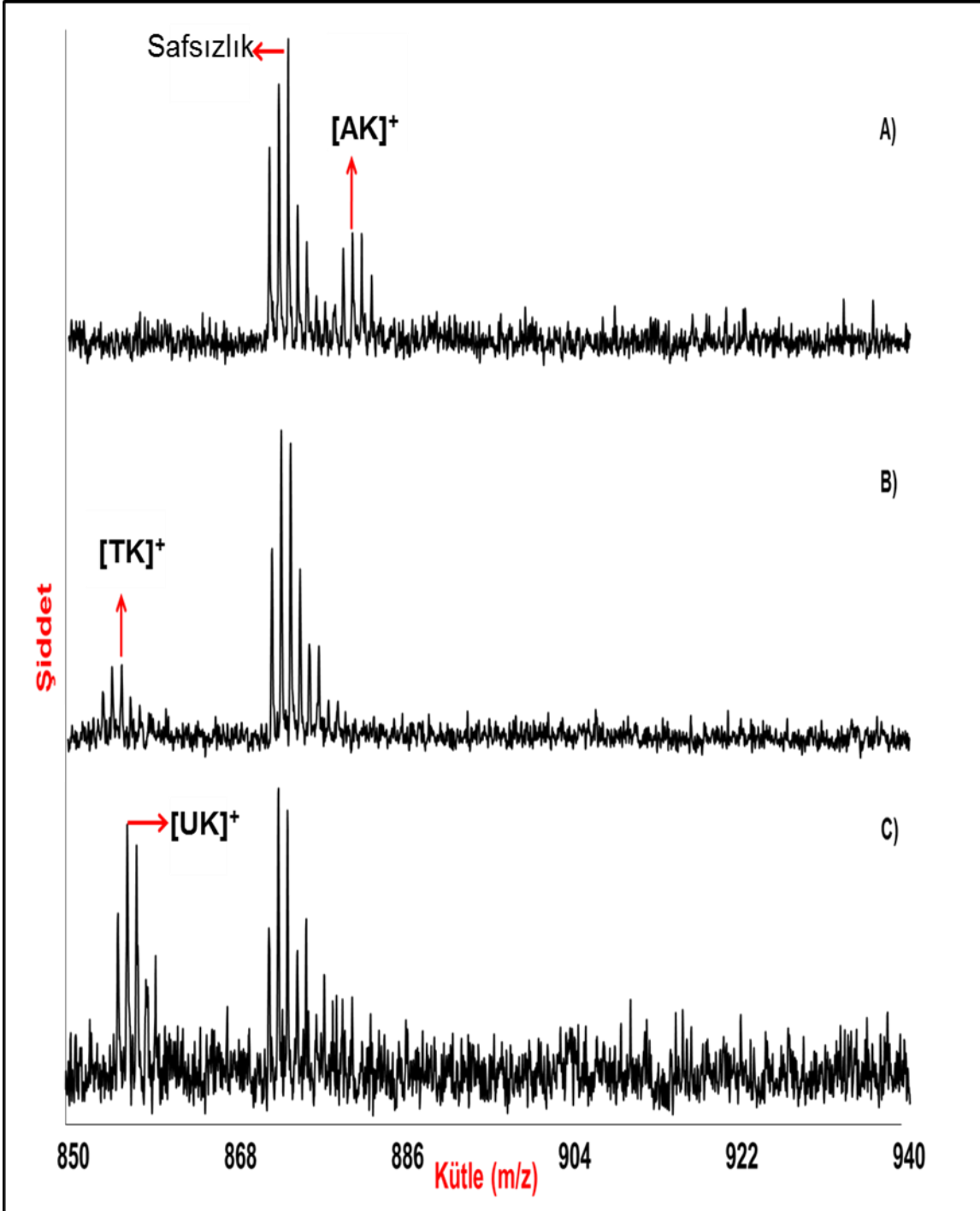
Şekil 5.34. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında AMP ile yaptığı kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları (A) AK, 1:1 mol, (B) AK, 1:5 mol, (C) AK, 1:10 mol, (D) AK, 1:20 mol, (E) AK, 1:30 mol



Şekil 5.35. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında TMP ile yapmış olduğu kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları (A)TK, 1:1 mol oranı, (B) TK,1:5 mol oranı, (C) TK, 1:10 mol oranı, (B)(D) TK, 1:20 mol oranı, (E) TK, 1:30 mol oranı.



Şekil 5.36. B19 molekülünün mol sayısı sabit tutularak 1'den 30'a kadar artan mol oranında UMP ile yapmış olduğu kompleksin MALDI-TOF MS spektrumları (A) UK,1:1 mol, (B) UK,1:5 mol, (C) UK, 1:10 mol, (D) UK, 1:20 mol, (E) UK,1:30 mol oranı.



Şekil 5.37. B19 molekülü ile yaptığı kompleksin reflektör modunda izlenebildiği minimum mol oranlarına ait MALDI-TOF MS spektrumları (A) AK, 1:10 mol, (B) TK, 1:20 mol, (C) UK, 1:30 mol oranı.

5.3.7. Kompleks Oluşumu-İnkübasyon Süresi İlişkisi

Bu çalışmada, B19-nükleotid etkileşimleri için çeşitli inkübasyon süreleri denenmiştir. 1:1 mol oranlı; 3-24 saatlik ve 5-32 saatlik inkübasyonlara ait spektrumlar kendi içlerinde karşılaştırılmış ve inkübasyon süresinin kompleks oluşumuna belirgin bir etkisi olmadığı görülmüştür. GK ve TK komplekslerinin inkübasyon süreleri arasındaki zaman farkı daha kısa tutularak, zamanın kompleks oluşumuna etkisi kısa zaman aralıklarıyla irdelenmiştir. Bu amaçla aşağıda belirtilen çözeltiler hazırlanmış ve inkübasyona bırakılmıştır. TK kompleksinin oluşumunun mol oranına bağlılığı göz önünde bulundurulmuş, B19:oligonükotid oranı 1:40 şeklinde inkübasyonlar hazırlanmıştır.

0.25 mM B19; 10 mM GMP ile eşit hacimde ve 0:25 mM B19; 10 mM TMP ile eşit hacimde karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır.

Ayrıca B19 molekülünün her bir nükleotide mol oranı 1:20 olacak şekilde bir nükleotid karışımı hazırlanmış ve B19 ile inkübe edilmiştir.

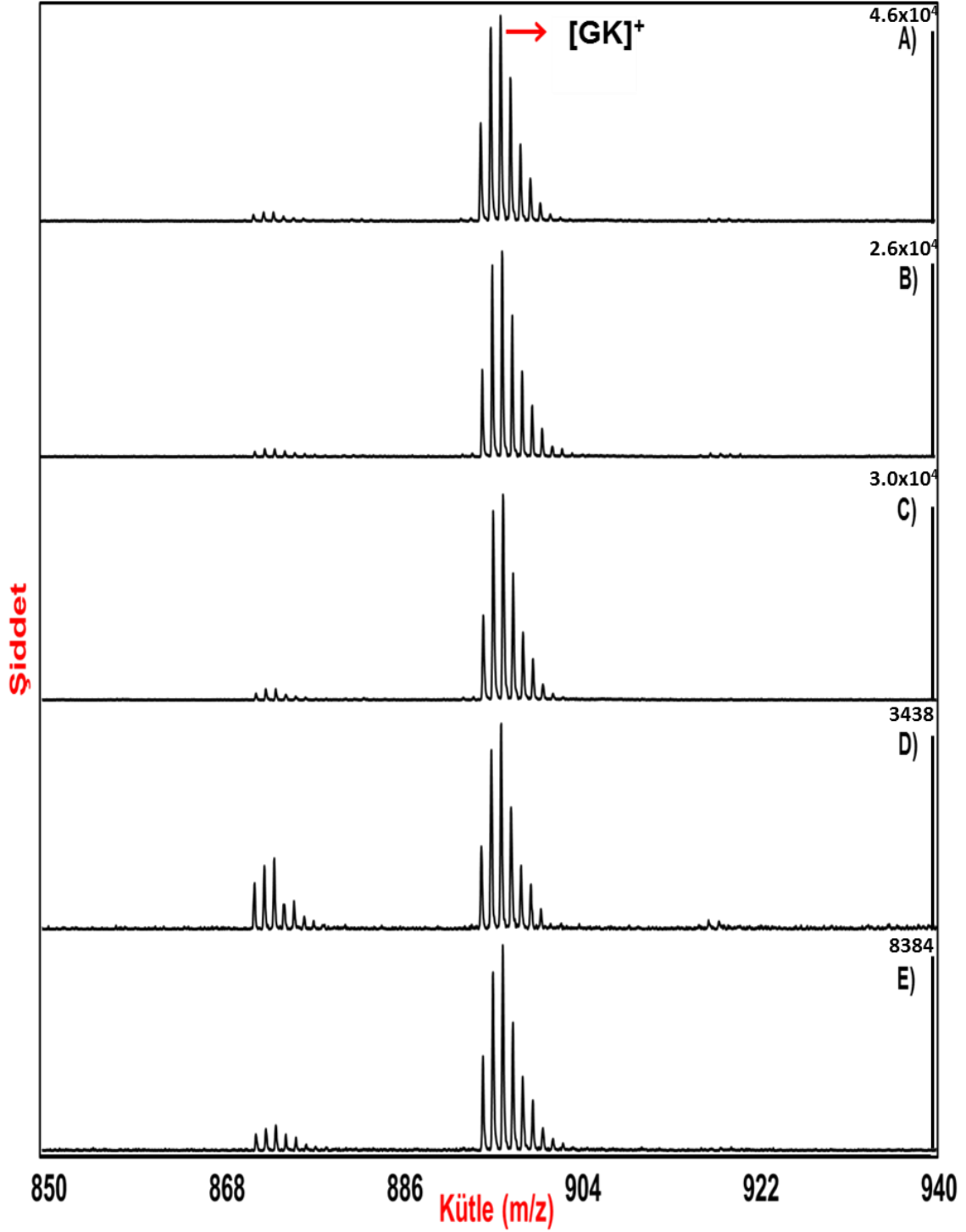
Şekil 5.38'deki spektrumlar incelendiğinde GK kompleksinin, bileşenlerin biraraya gelmesi ile < 2 dk içerisinde oluştuğu ve oluşan kompleksin bağıl olarak şiddetinin zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür. Oluşan kompleksin 7 saat sonunda izlenebiliyor olması kompleksin kararlılığını göstermektedir.

Kararlı ve refletron modunda izlenebilir TK kompleksinin oluşması için beş saatlik inkübasyon süresinin gerekliliği Şekil 5.39'da gösterilmiştir.

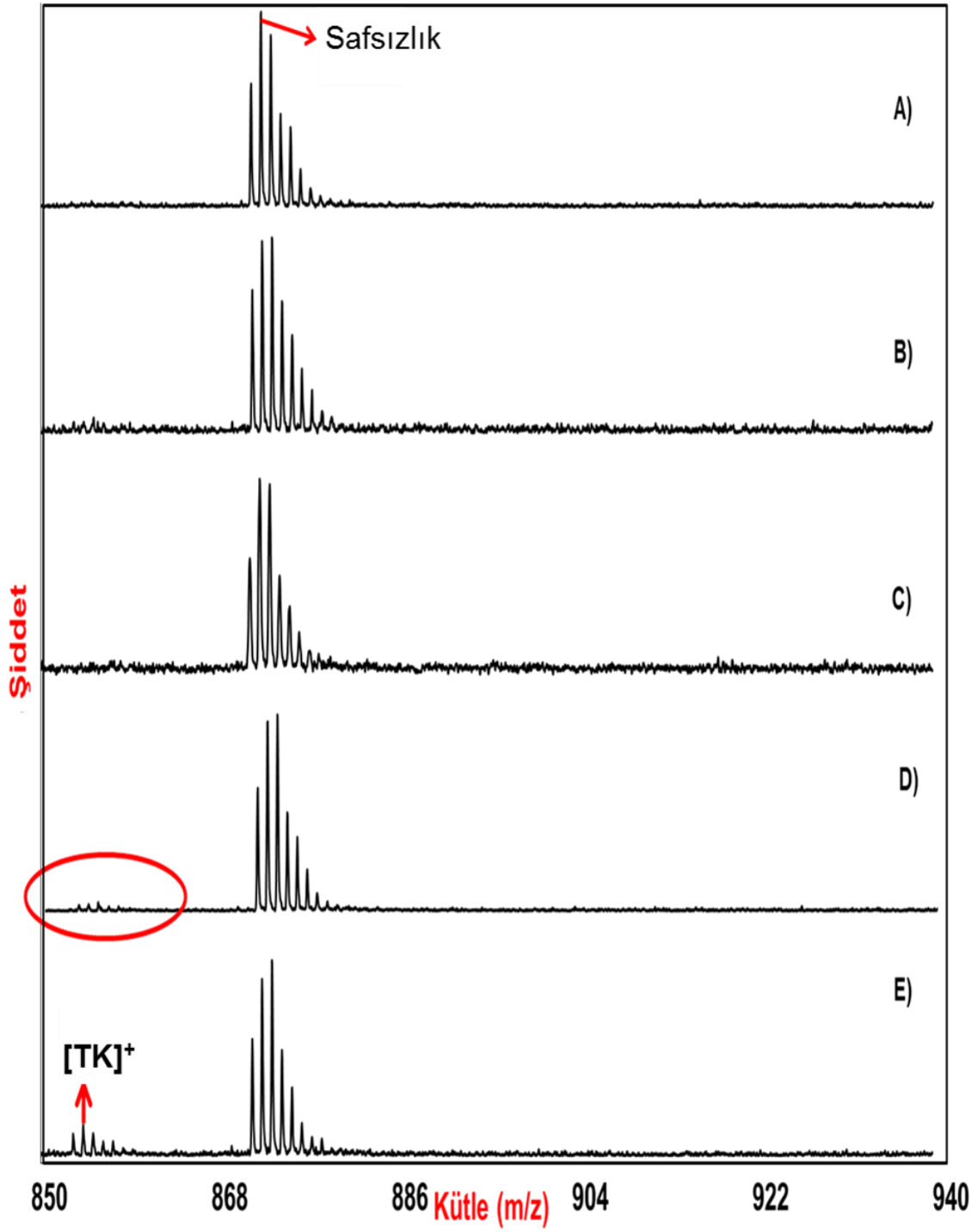
Fizyolojik şartlarda inkübasyon gerçekleştirilmesi ve TMP'nin sisplatin ile bu şartlarda N3 atomu üzerinden etkileşemediğinin bilinmesi, B19 molekülün TMP'ye farklı bir bölgeden bağlanmış olabileceğini düşündürmüştür.

Şekil 5.40'da tüm nükleotidlerin birarada bulunduğu, yarışmalı bağlanma davranışının izlenebileceği inkübasyon ortamındaki davranışları gösterilmiştir. GK ve AK komplekslerin karşılaştırıldıktan hemen sonra, oda şartlarında dahi etkileşime girdikleri tespit edilmiştir. Beş saatlik inkübasyona ait spektrumda m/z 853-858 değerlerinde pik grubunun görülmesi TMP-B19 kompleksinin zamana bağlı oluşumu deneyinin sonuçları ile uyum içerisindedir. Bu pik grubunda TMP-B19 kompleksine ait piklerin yanısıra, CK ve UK piklerinin de katkıda bulunduğu

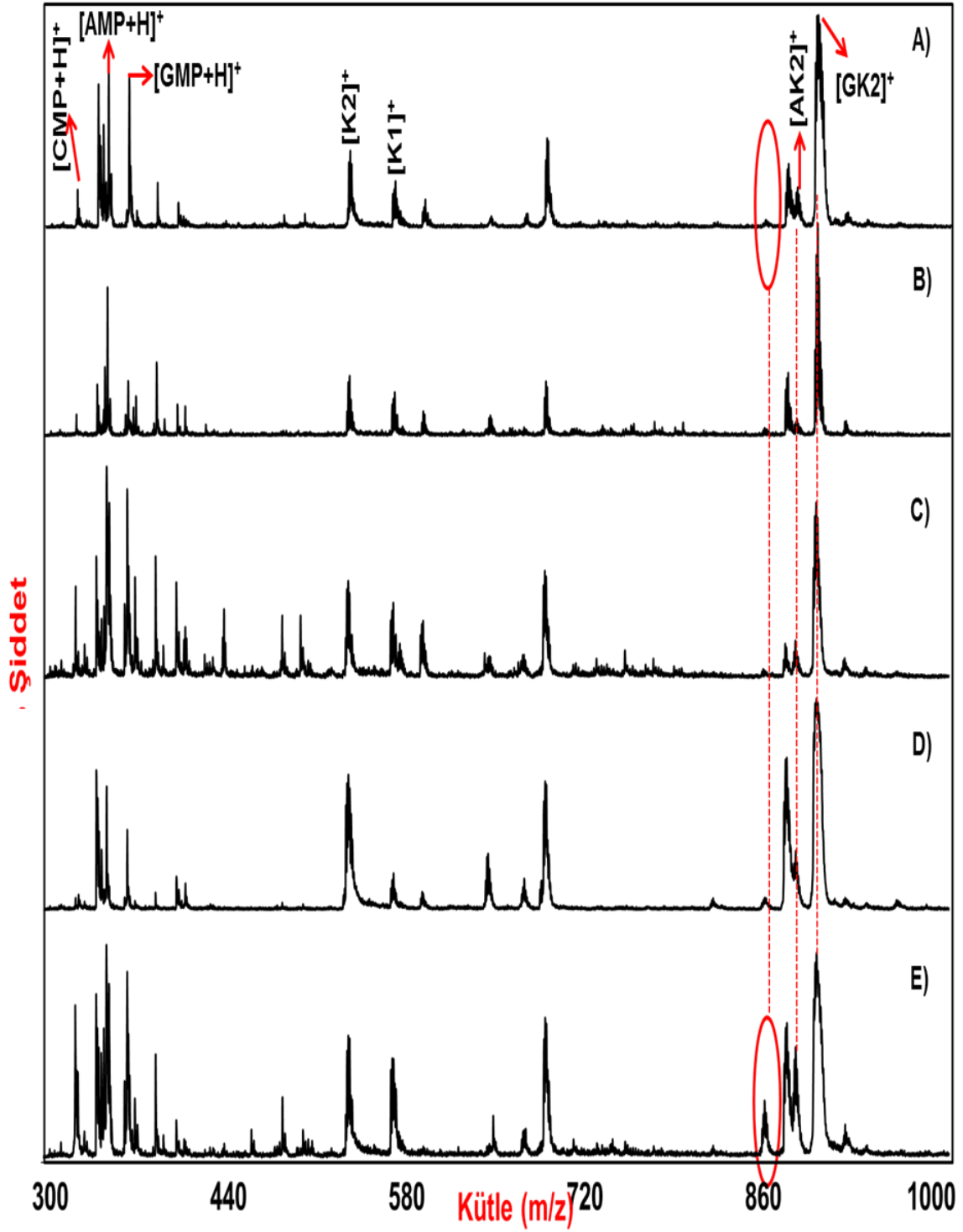
düşünülmüştür. Farklı komplekslerin bu pik grubuna katkısının anlaşılabilmesi için, MALDI-TOF MS analizinden önce komplekslerin uygun ayırma teknikleri ile ayrılması gerekmektedir. Cisplatin ve nükleotid monofosfatlarla yapılan yarışmalı inkübasyon çözeltilerinin kapiler elektroforez ile analiz edildiği bir çalışmada GMP ve AMP bağlanması kantitatif olarak izlenebilmiş ancak TMP ve CMP bağlanması tespit edilmemiştir. Aynı çalışmada inkübasyon tamamlandıktan sonra (42 saat) ortamda hala GMP'nin % 22'sinin serbest halde bulunduğu izlenmiştir [168].



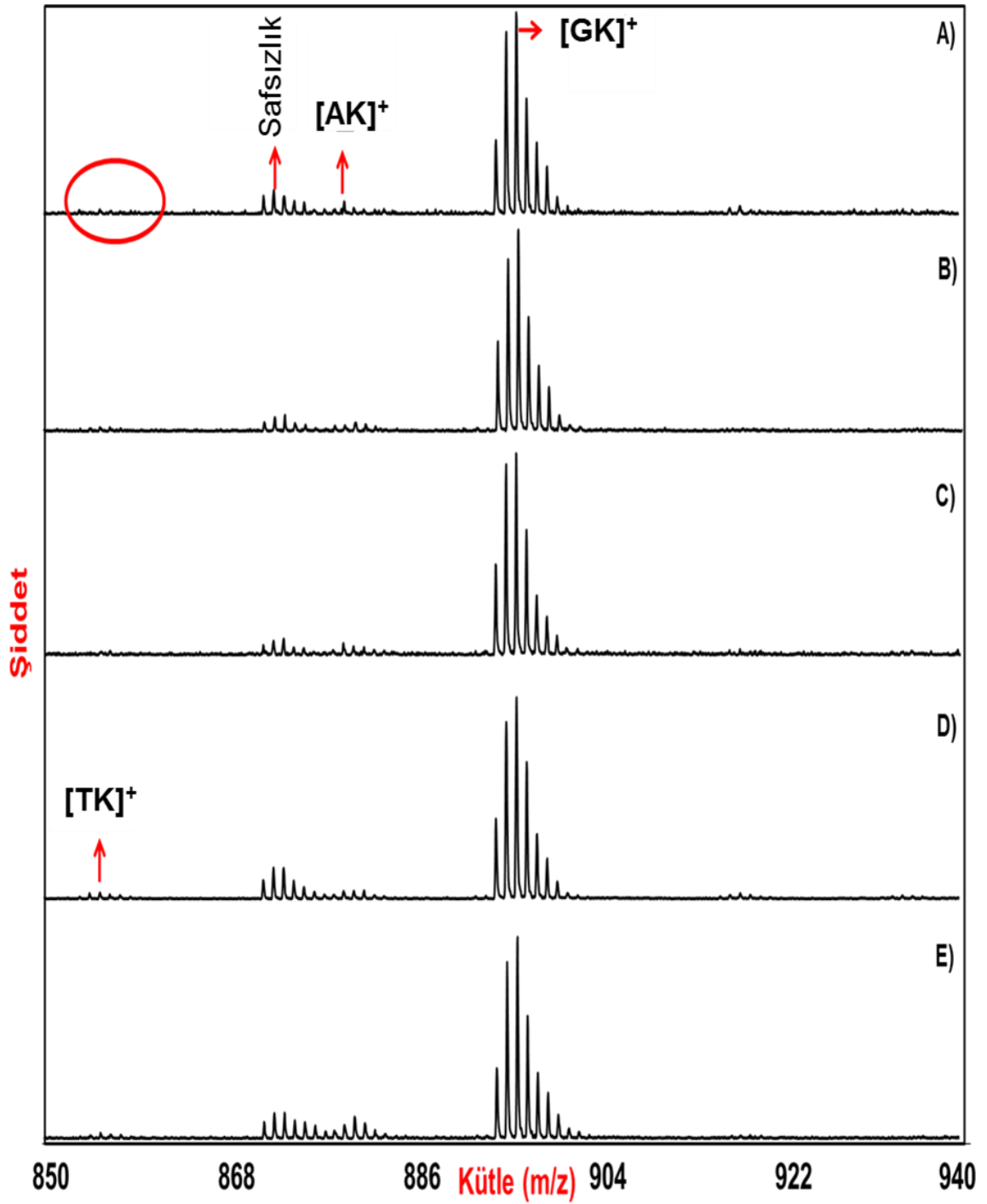
Şekil 5.38. B19 molekülünün GMP ile yaptığı kompleksin (GK) inkübasyon süresine bağlı olarak (1:20 mol oranında) refletron modunda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumlar (A) anlık, (B) 1 saat, (C) 3saat, (D) 5 saat, (E) 7 saat



Şekil 5.39. B19 molekülünün TMP ile yaptığı kompleksin (TK) inkübasyon süresine bağlı olarak (1:20 mol oranında) refletron modunda elde edilmiş spektrumlar. Inkübasyon süresi; (A) anlık, (B) 1 saat, (C) 3saat, (D) 5 saat, (E) 7 saat



Şekil 5.40. B19 molekülünün MP-karışım ile yaptığı komplekslerin inkübasyon süresine bağlı olarak (1:20 mol oranında) linear moda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları (A) anlık, (B) 1 saat, (C) 3saat, (D) 5 saat, (E) 7 saat



Şekil 5.41. B19 molekülünün MP-karışım ile yaptığı komplekslerin inkübasyon süresine bağlı olarak (1:20 mol oranında) reflektör modunda elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları; (A) anlık, (B) 1 saat, (C) 3saat, (D) 5 saat, (E) 7 saat

5.3.8. İnkübasyon Süresi ve Mol Oranının Oluşan B19-Nükleotid Kompleksleri Üzerine Etkisinin ESI-Q-TOF-MS ile İncelenmesi

B19 molekülünün farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır. LC sistemi ESI-TOF-MS sistemine kolonsuz bağlanarak (infüzyon pompasından sürekli örnek vererek) analizler yapılmıştır.

Şekil 5.42'de B19 molekülünün 0.0025 - 0.2 mM derişim aralığındaki kalibrasyon eğrisi verilmiştir (R^2 : 0,99). B19-MP-1-1-4s, B19-MP-1-1-24s, B19-MP-1-20-4s, B19-MP-1-20-24s ve B19-karışım-1-20-4s, B19-karışım-1-20-24s inkübasyonları değerlendirilmiştir (Ek-1, Çizelge 1). Nükleotidlerin dimer oluşumu nedeniyle temel iyonlarındaki azalmaların incelen sonuçları etkileyeceği düşünülerek, yalnızca B19 molekülüne ait ekstrakte edilmiş iyon kromatogramına ait pik alanı değerinin inkübasyon öncesi ve sonrası verdiği sinyal doğrultusunda değerlendirme yapılmıştır.

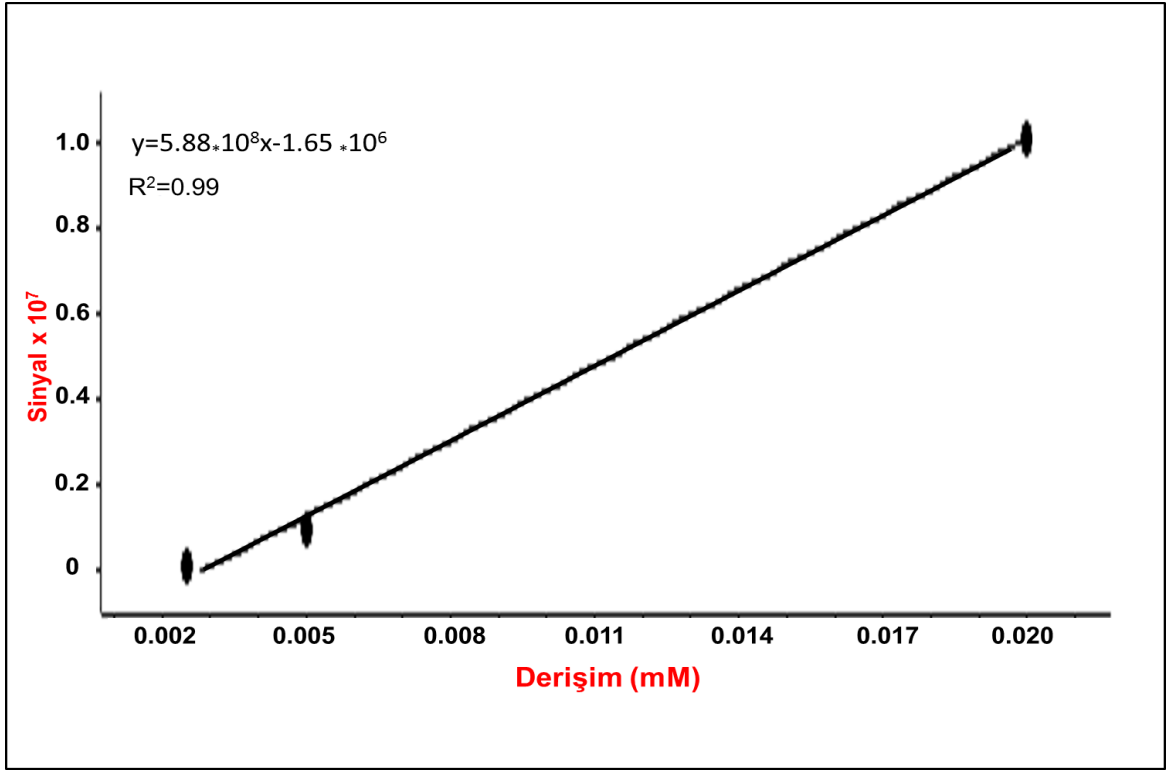
GMP dışında, dört saatlik inkübasyon sonrası hem 1:1 hem de 1:20 mol oranındaki inkübasyonlarda diğer nükleotidlerin miktarında değişim olmaması, dört saatlik inkübasyon süresinin yalnızca B19-GMP kompleksinin oluşumu için yeterli olduğunu göstermiştir. İnkübasyon süresine bağlı oluşumları incelenen GK ve TK kompleksleri için bu durum MALDI-TOF MS verileri ile uyumludur. Mol oranının 1:20 olduğu inkübasyonlarda MALDI-TOF MS ile AK2 kompleksinin anlık etkileşimde tespit edilebilmesi ancak ESI-MS ile tayin edilememesi, AK2 kompleksinin izlenmesinde MALDI-TOF MS tekniğinin tercih edilmesi gerektiğini göstermiştir.

Nükleotidlerin her birinin ve B19 molekülünün son derişimi sırasıyla 0.2 mM ve 0.01 mM olacak şekilde hazırlanan B19-MP-karışım-1-20-24s inkübasyonu sonucu elde edilen, ekstrakte edilmiş iyon kromatogramına ait pik alanı karşılaştırması Şekil 5.43'te verilmiştir. 857-858-859 m/z değerleri sırasıyla TMP, CMP ve UMP'nin B19 molekülü (535) ile yapmış olduğu kompleksi göstermektedir. İzotopik dağılım nedeniyle bu iyonların her üç yapıda da bulunması kromatogramlarını güçlendirmiştir (Şekil 5.43). Reaksiyona girmeden kalan nükleotid değerlerine bakıldığında, kalibrasyon eğrisi kullanılarak yapılan hesaplamalar B19 ile yapılan (1:20 mol oranındaki, 24 saat), birebir ve karışım inkübasyonlarında, etkileşime girme oranının $GMP > AMP > CMP \geq TMP \geq UMP$ olduğunu göstermiştir. Bu durum MALDI-TOF MS verileri ile uyumludur.

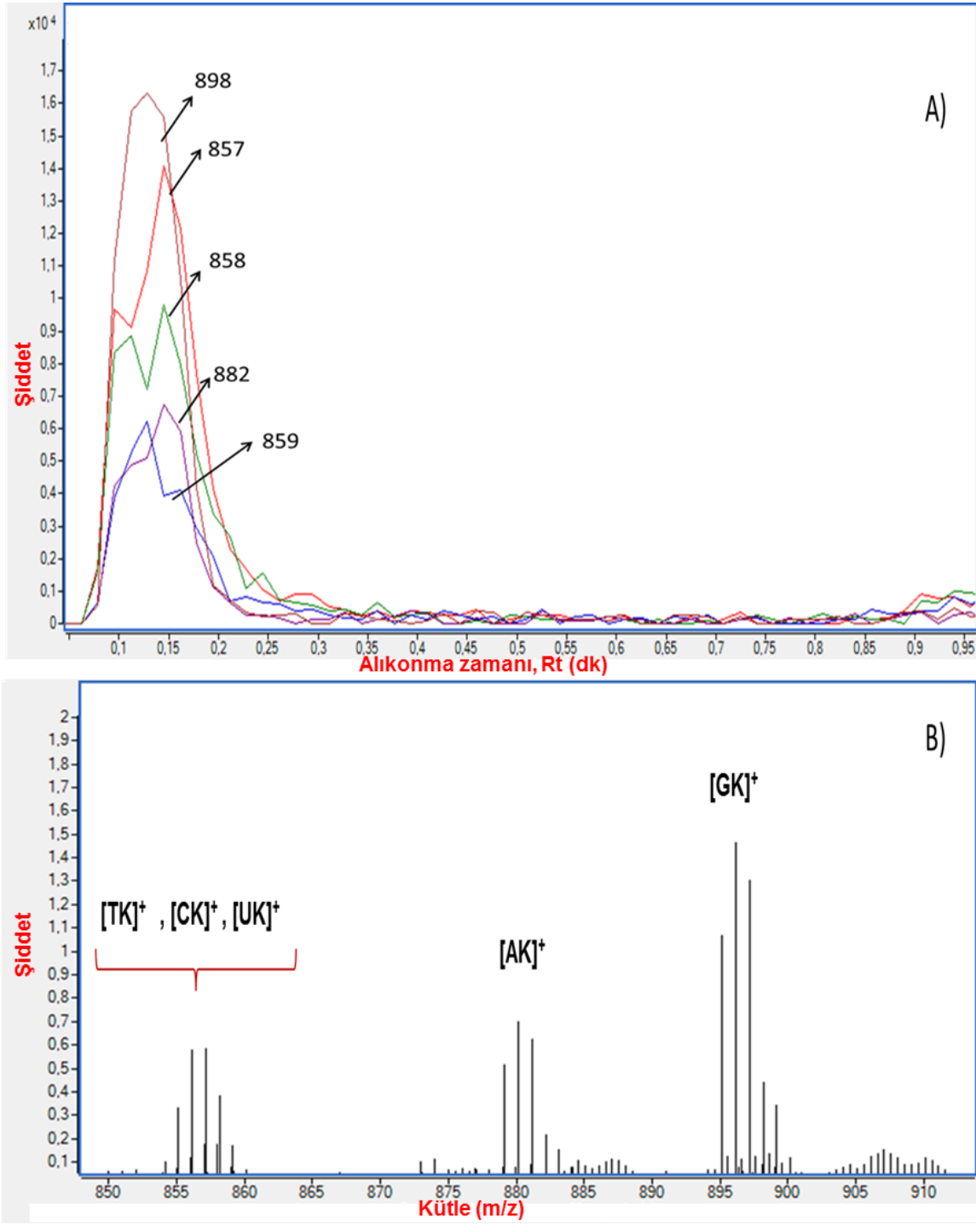
B19-MP-karışım-1-20-24s inkübasyonuna ait ESI-MS spektrumuna bakıldığında, iyon şiddetinin çok düşük olduğu izlenmiştir. Bu durum nükleotid-B19 kompleksinin ESI ile iyonlaşma veriminin düşük olduğunu göstermiştir. MALDI-TOF MS ile yapılan analizlerde 1:10 mol oranına, altı saatlik inkübasyonlarda GMP, AMP, CMP yapılarının B19 ile yapmış olduğu kompleksler lineer modda izlenebilmiştir. Sonuçlardaki bu farklılığın iki temel nedeni olabileceği ön görülmüştür:

1. MALDI-TOF MS'de lazer enerjisinin etkisiyle gaz fazında kompleks oluşumu
2. ESI iyonlaşma yönteminin söz konusu komplekslerin iyonlaşmasına uygun olmaması

İnkübasyon süresi ve mol oranları değiştikçe oluşan komplekslerin izlenebilirliği ve şiddetlerinin de değişmesi 1. durum öngörüsünün geçersiz olduğunu düşündürmüştür.



Şekil 5.42. B19 molekülünün (0.002-0.0200) mM derişim aralığındaki kalibrasyon eğrisi



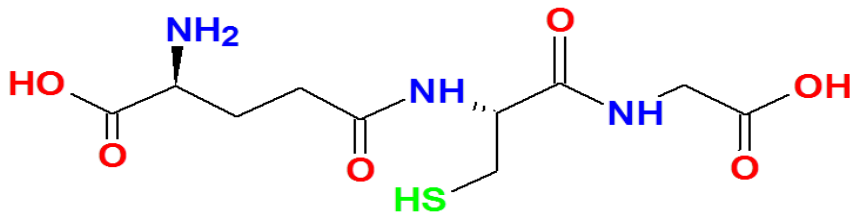
Şekil 5.43. (A) B19-karışım-1-20-24H inkübasyonuna ait ekstrakte edilmiş iyon kromatogramı, (B) A'da verilen kromatograma ait ESI-MS spektrumu.

5.4. GSH Peptidi-B19 Etkileşimi

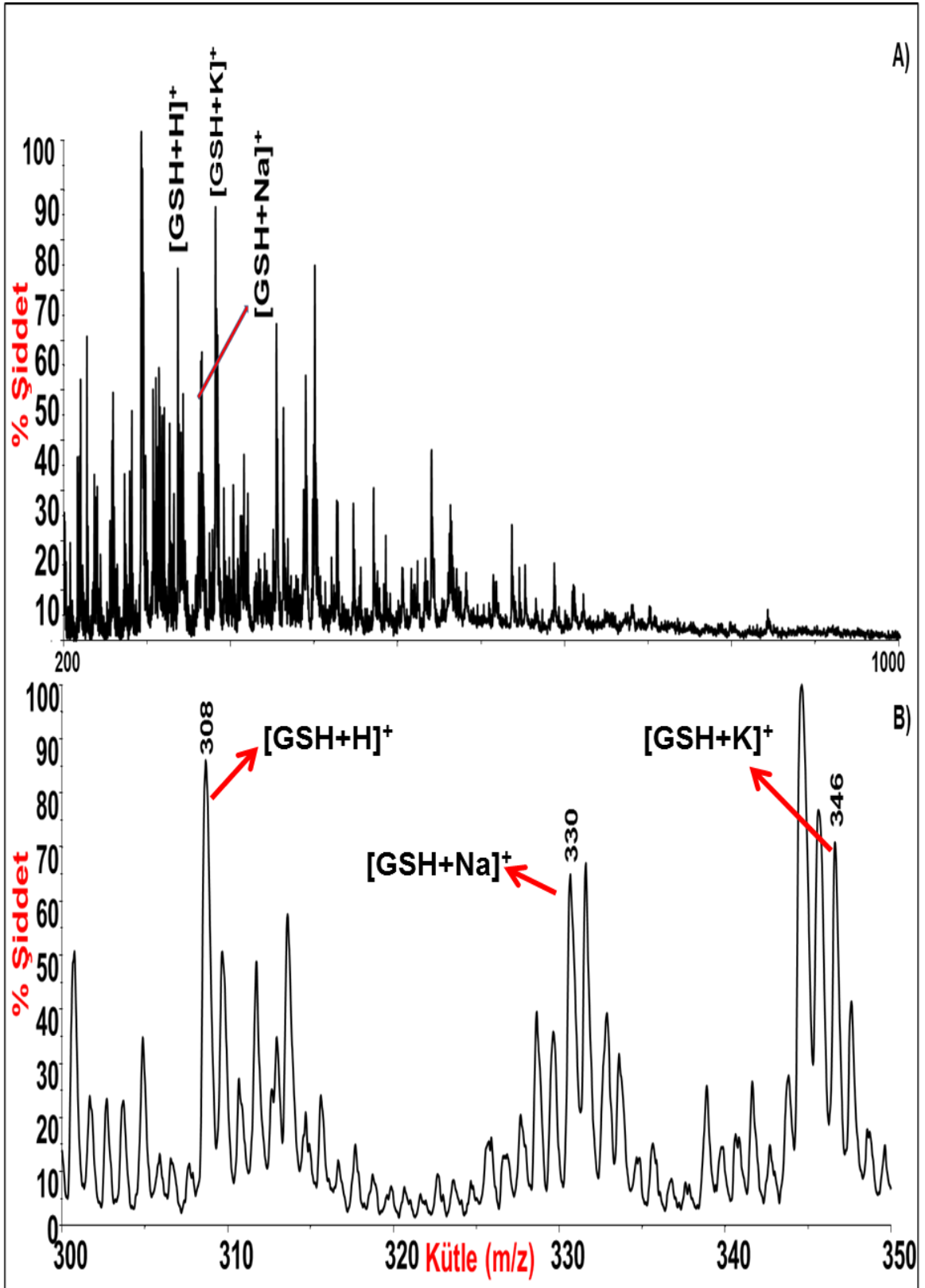
Hücrelerin sisplatine direnç göstermek amacıyla tiyollerinin seviyesini artırdığı ve bu tiyollerin sisplatini inaktif hale getirdiği bilinmektedir. Hücrede en çok bulunan tiol olan GSH ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) molekülünün hücre içi konsantrasyonu 0.5-10 mM'dır. Platin ile kompleks oluşturma eğilimi yüksek olan S donor, 3 aminoasitli bir peptiddir (Şekil 5.44) [73,178]. GSH seviyesindeki artışın farklı kanser hücre hatları üzerindeki etkilerine yönelik yapılan çalışmalarda, GSH seviyesindeki artışın hücre direncini oluşturan faktörlerin arasında bulunduğu ancak bu durumun mutlak gereklilik olmadığı belirtilmiştir [179,180]. GSH ile etkileşen ilacın aktivitesini yitirmesi, DNA'ya ulaşan ilaç miktarı bakımından önem taşımaktadır. Antikanser etkinliği test edilen ilaçların GSH ile etkileşimi incelenmiştir [182]. Bu nedenle B19 molekülünün GSH ile etkileşimi bu tez kapsamında önem taşımaktadır.

Literatürde GSH analizine yönelik yapılan ilk çalışmalarda, spektrofotometre, florimetre ve HPLC kullanılmıştır [184-186]. İlerleyen senelerde EC [24, 187] , HPLC [188], 1H -NMR [189], GC-MS [188] ve LC-MS [190,191] teknikleri kullanılmıştır. Yakın geçmişte, GSH molekülünün doğrudan MALDI-MS ile analiz edilemediği, mikro düzeyde türevlendirme yapıldıktan sonra CHCA matriksi ile analiz edilebildiği belirtilmiştir [177]. Daha sonra yapılan çalışmalarda altın nano partiküller GSH ile karıştırıldıktan sonra Grafenin matriks olarak kullanılması durumunda MALDI-MS ile doğrudan analiz edilebilmiştir [192]. Yapılan diğer bir çalışmada ise GSH molekülü, herhangi bir parçalanma ve indirgenmeye uğramadan DHB ve CHCA matriksleri ile doğrudan analiz edilebilmiştir [183].

Bu tez kapsamında DHB matriksi ile alınan MALDI-TOF MS spektrumu Şekil 5.45'de verilmiştir. Molekül ağırlığı 307.08 g/mol olarak bilinen GSH molekülünün $[M+H]^+$ şeklinde protone olarak (m/z : 308 Da) iyonlaştığı görülmüştür. Ayrıca potasyum katılması ile oluşan, m/z 346'da iyon sinyali alınmıştır.



Şekil 5.44. GSH molekülünün kimyasal yapısı ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$)



Şekil 5.45. GSH molekülünün (A) DHB ile alınan MALDI-TOF MS spektrumu, (B) genişletilmiş kütle spektrumu

GSH molekülünün literatürde hücre içi konsantrasyonu yaklaşık 16 mM olarak verilmiştir. Platin ile etkileşimi test edilen bu yapının kullanılan ilaç adayları ile molarite oranı 32 μ M:16 mM, ilaç:GSH şeklindedir. Bu çalışmada, hem B19 molekülü ile etkileşiminin özgünlüğünü görmek hem de *in vitro* ortamı taklit etmesini sağlamak amacıyla iki farklı derişim oranında inkübasyon setleri düzenlenmiştir. 16 mM GSH stok çözeltisi 4.9 mg/mL su olarak ve 1 mM B19 stoğundan tampon ile seyreltme yaparak 32 μ M B19 çözeltileri hazırlanmıştır.

GSH-B19 (1) şeklinde adlandırılan 1.set çalışmada; 32 μ M B19 (tamponda) çözeltisi eşit hacimdeki 16mM GSH (suda, literatür) çözeltisi ile inkübe edilmiştir (pH:6.21).

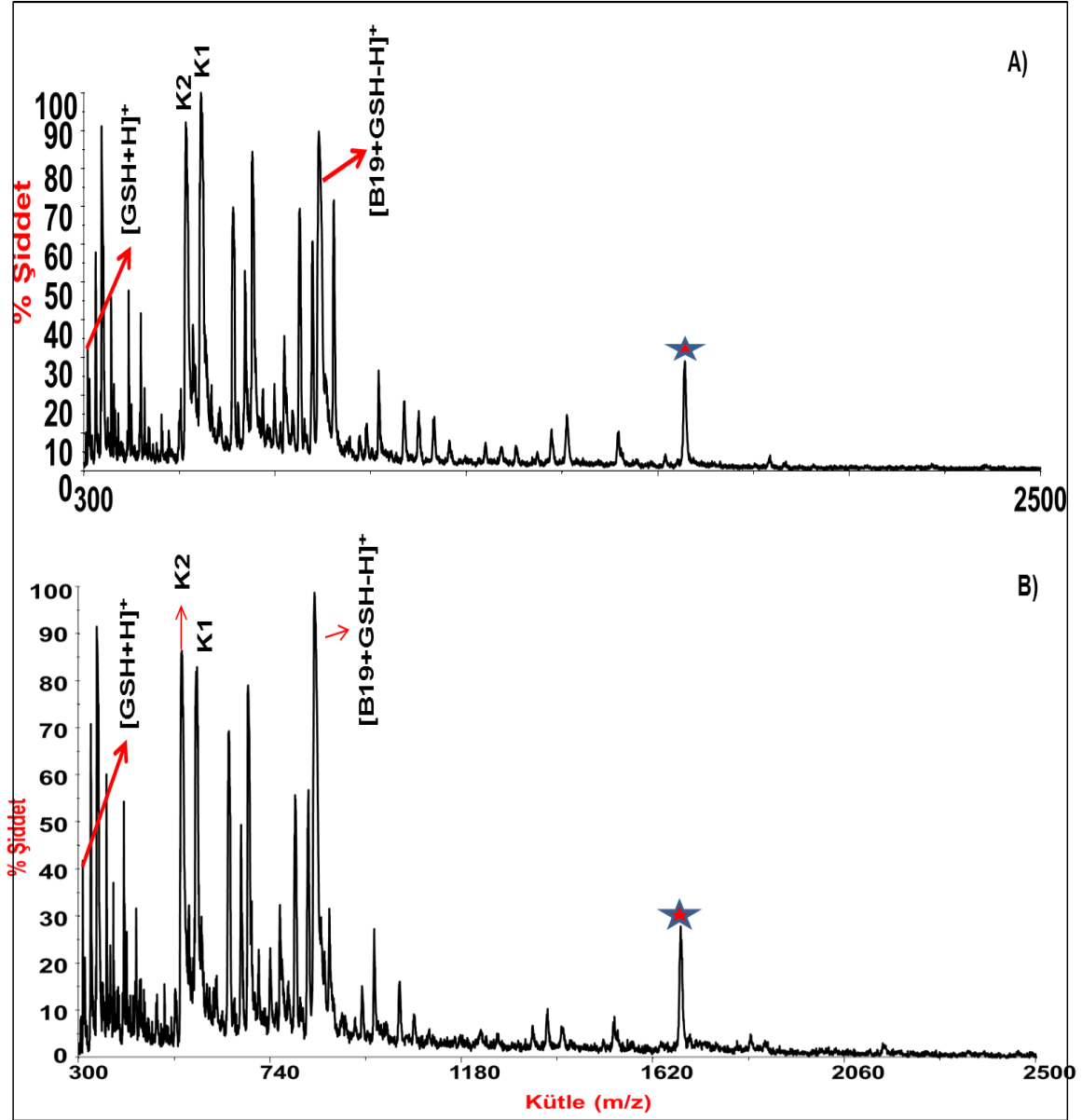
GSH-B19 (2) şeklinde adlandırılan 2.set çalışmada; 0.25 mM b19 (tamponda) çözeltisi eşit hacimdeki 0.25mM GSH (suda) çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Tez kapsamında nükleotidler ile yapılan son çalışmalarda derişim olarak, 0.25 mM madde ile çalışıldığı için bu değer kullanmıştır (pH:3.65).

3, 10, 20 ve 30. dakikalarda ve 1. ile 24. saatin sonunda her iki örnekten de MALDI-TOF MS analizleri için 75 μ L alındı. Her 2 set mol derişimi için kompleks oluşumu ilk olarak 3 dakikanın sonunda gözlenebilmiştir.

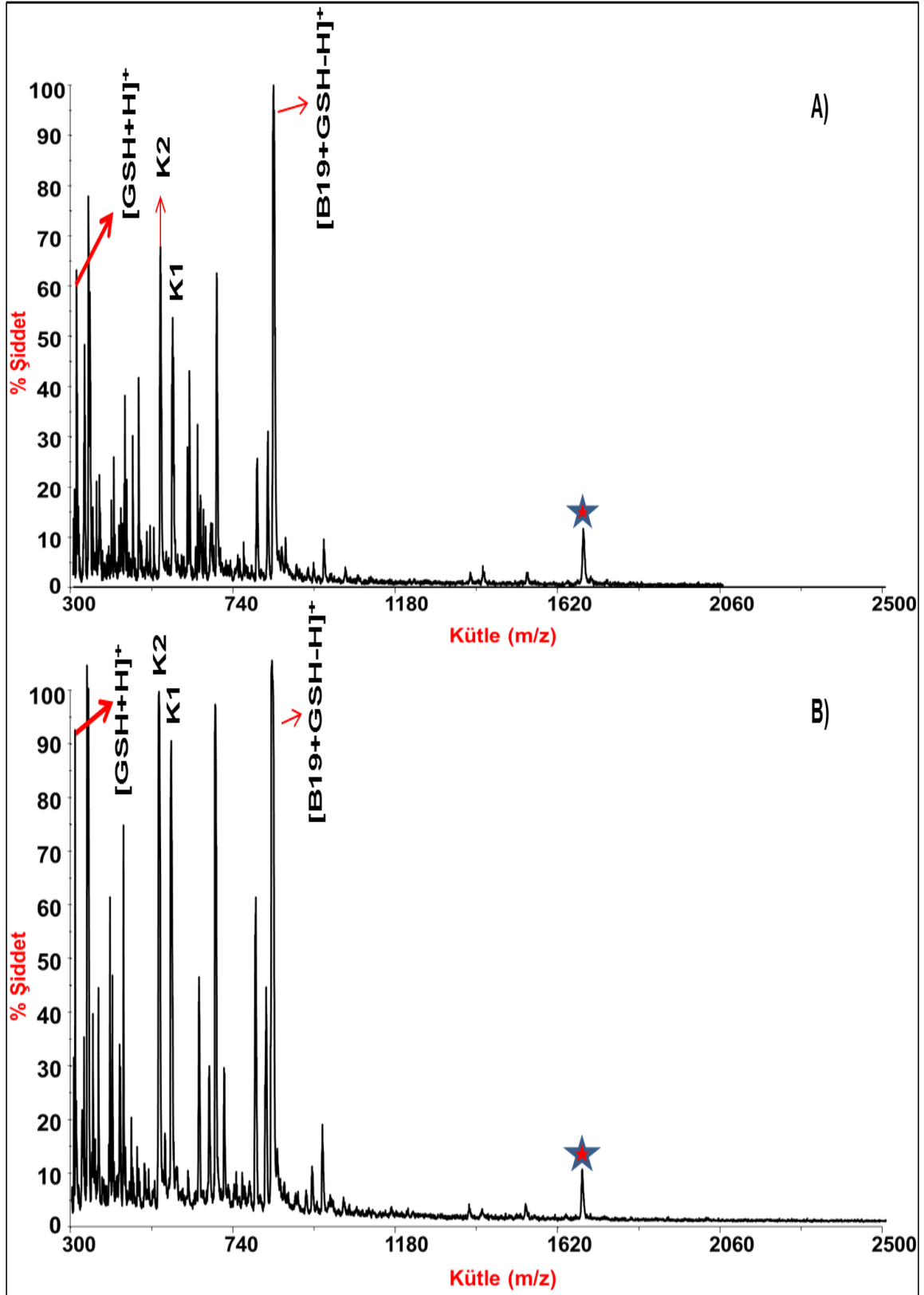
1. set inkübasyona ait kütle spektrumları Şekil 5.46'da verilmiştir. GSH-B19 kompleksinin hesaplanan kütle değeri olan 841 m/z değerinde şiddetli pik görülmüştür. Bu durum oluşan katyonik kompleksin varlığını göstermiştir. 3 dakika - 24 saatlik spektrumlar karşılaştırıldığında inkübasyon süresinin kompleks oluşumuna belirtilen zaman dilimleri aralığında bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar literatürde cisplatin ve analoglarının GSH ile etkileşiminin çok hızlı gerçekleştiğine yönelik bilgilerle benzerlik göstermektedir. Öte yandan, inkübasyona bırakılan B19 miktarı GSH moleküle nazaran neredeyse 1000 kat az olmasına rağmen ortamda hala etkileşime girmemiş B19 (m/z: 535 ve 570) ve GSH (m/z: 308) varlığı, söz konusu bu iki molekülün etkileşimlerinin cisplatin-GSH etkileşimlerine kıyasla zayıf olduğunu göstermiştir (Şekil 5.46). Ayrıca 1682 m/z 'de B19-GSH kompleksinin dimer oluşumu izlenmiştir (yıldız ile gösterilmiştir).

2. set inkübasyona ait kütle spektrumları Şekil 5.47'de verilmiştir. GSH-B19 kompleksine ait pikin şiddetinin B19 molekülüne ait piklerin şiddetine oranı, eşit molaritede inkübasyona bırakılmış örneklerde zamana bağlı olarak değişim

gösterdiği izlenmiştir. Serbest halde bulunan B19'a ait pik sinyalleri 3 dakikalık inkübasyonda minimum iken inkübasyon süresi uzadıkça B19' a ait piklerin şiddetinde artış olduğu gözlenmiştir. Bu durum oluşan B19-GSH kompleksinin zamanla bozulduğunu göstermektedir.



Şekil 5.46. B19-GSH (1) 'in MALDI-TOF MS spektrumları (A) inkübasyon süresi 3 dk, (B) inkübasyon süresi 24 saat (B19-GSH kompleksinin dimer oluşumu izlenmiştir ve yıldız ile gösterilmiştir).



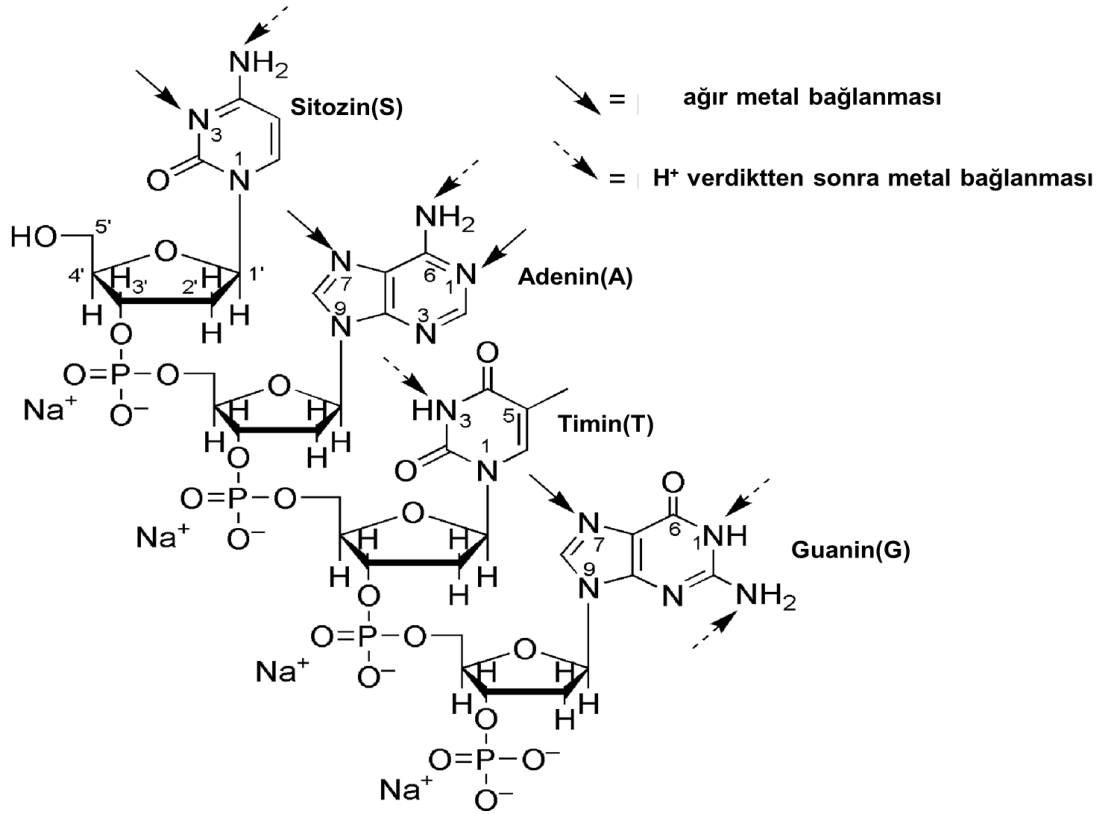
Şekil 5.47. B19-GSH (2) 'in MALDI-TOF MS spektrumları (A) inkübasyon süresi 3 dk, (B) inkübasyon süresi 24 saat (B19-GSH kompleksinin dimer oluşumu izlenmiştir ve yıldız ile gösterilmiştir).

5.5. Oligonükleotid-B19 Etkileşimi

Tutkun ve ark. tarafından yapılan son çalışmada, UV titrasyonunda (Ek-1, Şekil 1) platin kompleksi üzerine artan miktarda DNA eklenmesiyle kompleksin absorpsiyon spektrumunda oluşan değişim gözlenmiştir. DNA eklendikçe absorpsiyonda düşüş gözlenmiştir. Düşüş sabitleninceye kadar DNA eklenmiş kompleksin absorbansında görülen yaklaşık %40'lık azalma (hipokromik etki) molekülün DNA baz çiftleri arasına interkalasyon yapması olarak değerlendirilmiştir [166]. UV titrasyonu çalışması ile elde edilen bu sonuçlar B19 molekülünün DNA'ya bağlandığı göstermiştir. DNA ile etkileşimin baz dizilimine bağlılığını incelemek amacıyla farklı baz dizilimindeki oligonükleotidler ile B19 molekülü inkübe edilmiş ve kompleks oluşumu MALDI-TOF MS sisteminde tayin edilmiştir.

5.5.1. Oligonükleotidlerin MALDI-TOF MS ile Tayini

Platin içeren antikanser ilaçların (CDDP, KP gibi) metabolik olarak işlevlerliğini göstermesi, bu ilaçların DNA nükleobazları ile etkileşime girerek tümörlü hücrelerdeki replikasyon basamağını olumsuz etkileyen, tersinmez, kararlı kompleksler oluşturması ile gerçekleşir. CDDP'nin, en çok tercih ettiği etkileşim yolu DNA'daki guanin ve adenin üzerindeki N7 atomu üzerindedir. Pürin bazlarında bulunan imidazol halkasının güçlü nükleofil özelliğinin bu durum üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir [170].



Şekil 5.48. Oligonükleotid-metal etkileşim bölgeleri [170]

Yeni bir antikanser ilaç adayı olarak sentezlenen B19 molekülünün moleküler düzeyde etkileşim mekanizmasının tespit edilebilmesi için biyolojik anlamda ilgili moleküllerle etkileşiminin irdelenmesi gerekmektedir. DNA-B19 etkileşimi için model teşkil etmesi açısından aşağıda dizilimleri verilen 10 baz birimli oligomerler ile B19 molekülünün etkileşimi incelenmiştir.

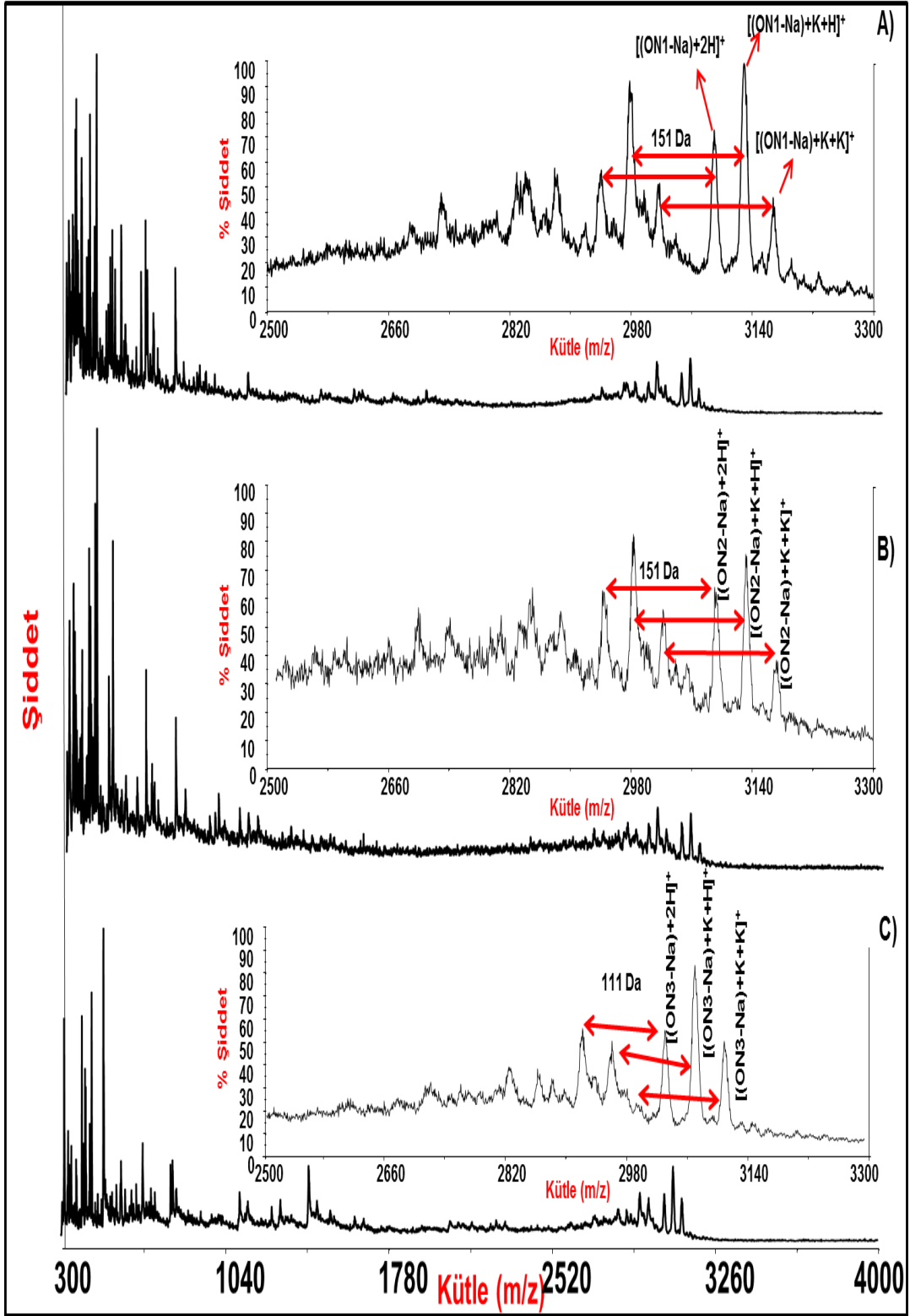
ON1 = 5'-G-A-T-G-S-A-T-G-A-G-3' MWsigma=3115 g/mol-----77.6 nmol

ON2 = 5'-G-S-A-T-S-G-G-G-A-S-3' MWsigma=3116 g/mol-----72.1 nmol

ON3 = 5'-S-T-A-A-A-G-A-G-S-T-3' MWsigma=3079 g/mol-----68.5 nmol

Oligonükleotidler ayrı ayrı 1 mL deiyonize suda çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. 0.02 mM derişimindeki oligomer çözeltileri DHB matriksi ile 1:5 oranda karıştırılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları Şekil 5.49'da gösterilmiştir.

ON1 oligonükleotidine ait spektrumda (Şekil 5.49A), hesaplanan molekül ağırlığı olan 3115 g/mol değerinde pik izlenmemiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda m/z değeri 3090 olan pik için molekül ağırlığının $[(ON1-Na)+2H]^+$ yapısına ait olduğu bulunmuştur. ON1 oligonükleotidinin üretici firma tarafından hesaplanan molekül ağırlığının sodyumlanmış haline ait olduğu belirlenmiştir. Gözlemlenen bu pik, yapıdan bir Na^+ iyonunun koparak yerine $2H^+$ ilavesi ile protone olarak iyonlaştığını göstermektedir. M/z:3129 ve 3168 'de görülen piklerin ise $[(ON1-Na)+K+H]^+$ ve $[((ON1-Na)+K)+K]^+$ yapısına ait olduğunu ifade etmektedir. Benzer durum diğer oligonükleotidler için de geçerlidir. Şekil 5.49B ve 5.49C'de ON2 ve ON3'e ait protonlanmış ve potasyumlanmış iyonlara ait pikler gösterilmiştir. Bu durum her üç oligonükleotid zinciri için de potasyumlanmış halin sodyumlanmış halden daha kararlı ve tercih edilir olduğunu göstermektedir. ON1 ve ON2 oligonükleotidlerine ait MALDI-TOF MS spektrumlarında ardışık pik grupları arasında $\Delta m/z$: 151 olması, oligonükleotidin 5' ucundan guanin kopmasını, ON3'e ait kütle spektrumunda ardışık pik grupları arasında $\Delta m/z$: 111 olması, oligonükleotidin 5' ucundan sitidin kopmasını göstermiştir.

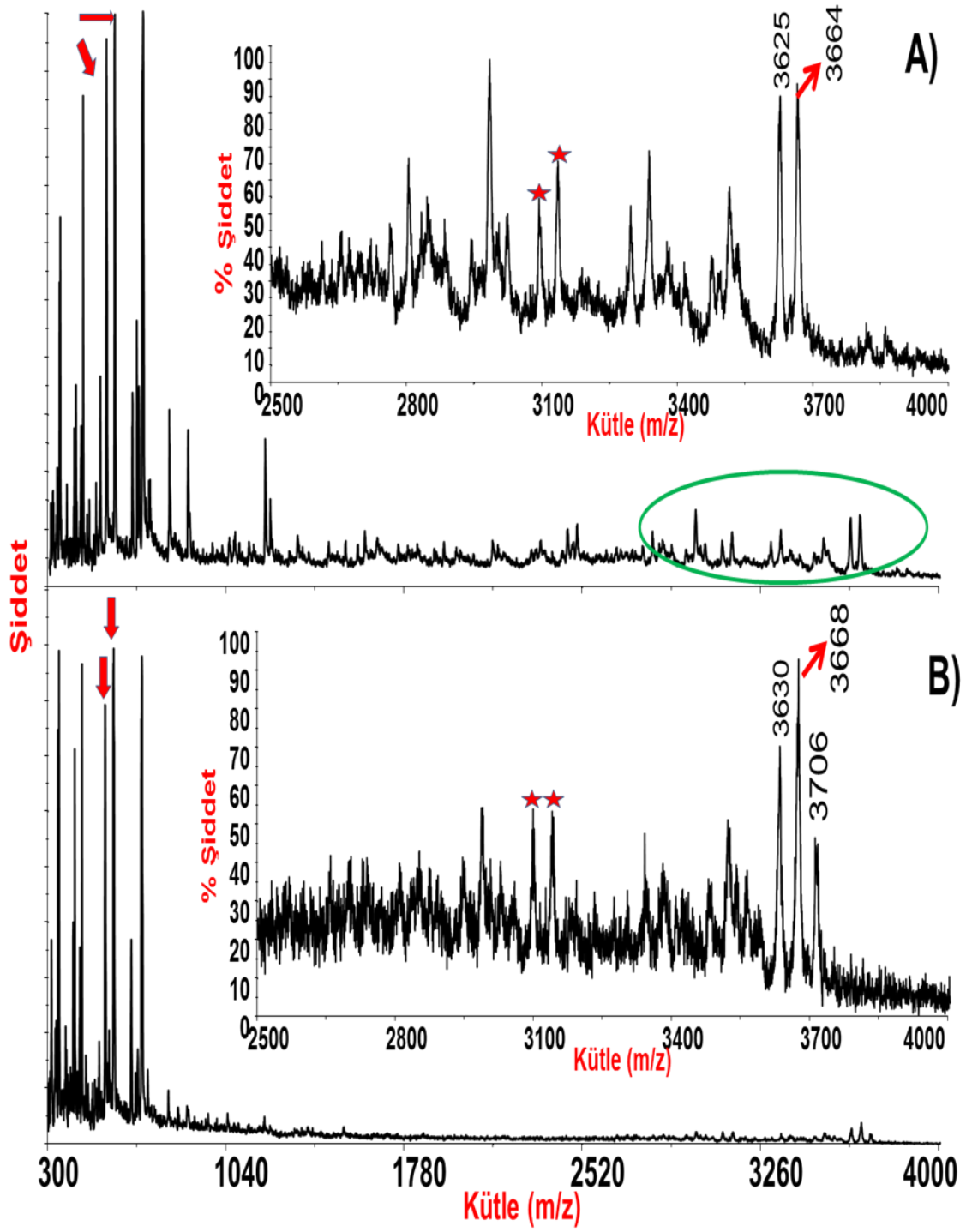


Şekil 5.49. Oligonükleotidlerin MALDI-TOF MS spektrumları (A) ON1, (B) ON2, (C) ON3.

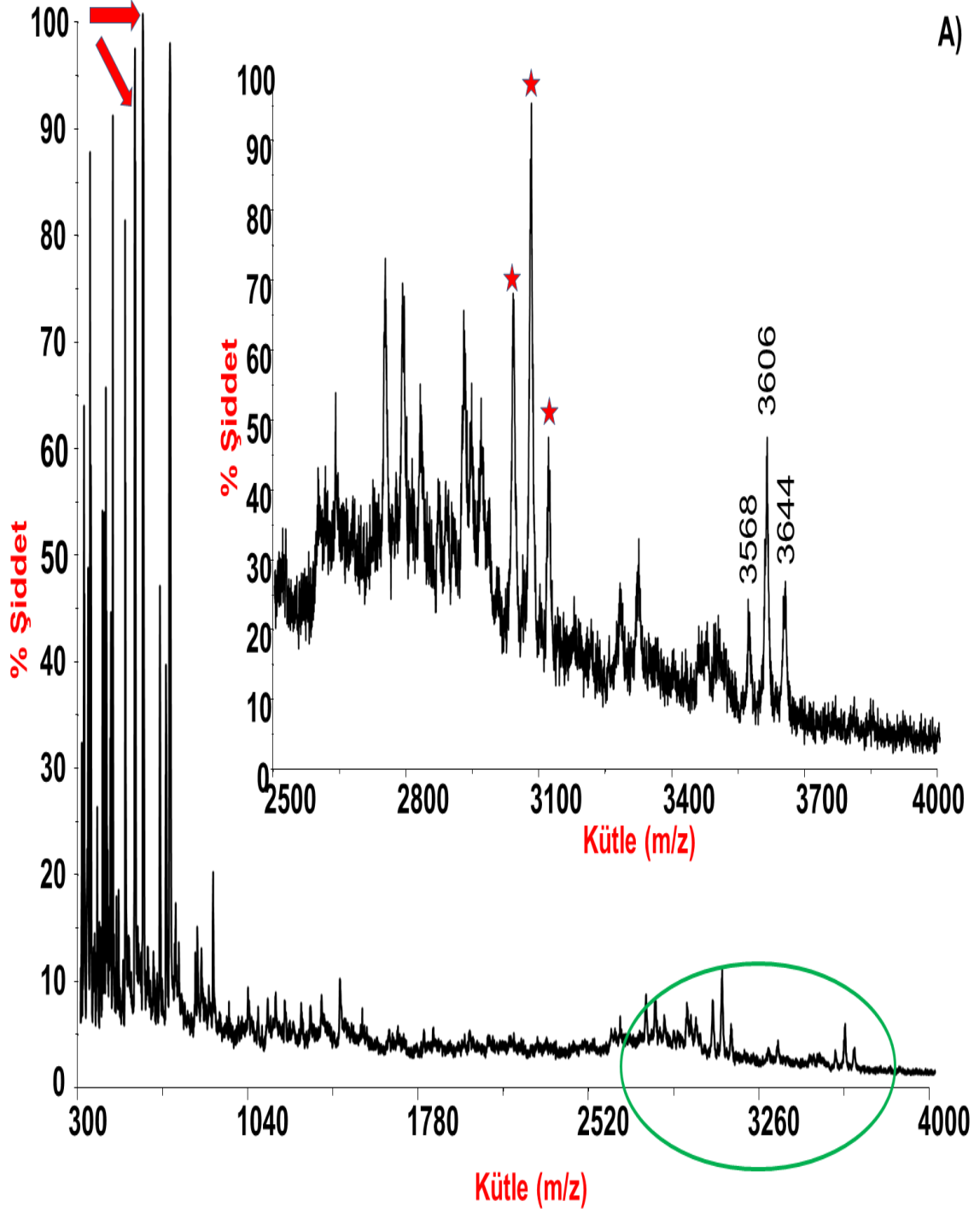
5.5.2. Oligonükleotid-B19 Komplekslerinin MALDI-TOF MS ile Tayini

MALDI-TOF MS ile analizleri gerçekleştirilen oligonükleotidler B19 molekülü ile 37°C'de, 10 mM amonyum asetat tamponunda (10 mM NaCl varlığında), 1:1 mol oranında inkübe edilmiştir ve kompleks oluşumu MALDI-TOF MS ile incelenmiştir. Bu amaçla; 200 µL, 0.02 mM oligonükleotid, 100 µL, 0.025 mM B19 ile inkübe edilmiştir.

Şekil 5.50 ve 5.51'de kompleksleşmemiş oligonükleotid zincirlerine ait pikler yıldız ile işaretlenmiştir. B19 ile kompleks oluşturmaları durumunda hesaplanan kütle değerlerinde MALDI-TOF MS spektrumunda pikler görülmüştür. Bu durum her üç oligonükleotidin de B19 ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Kompleks oluşumuna yönelik tüm spektrumlarda, iyonlaşma şekli gözönünde bulundurulmaksızın kompleksler ONX-B19 şeklinde ifade edilmiştir. (X:1,2,3). Şekil 5.50A'da $[ONX+B19]^+$ kompleksine ait pikler 3625 ve 3664 m/z değerinde elde edilmiş ve hesaplamalar sonucunda bu iyonların sırasıyla $[(ON1+B19)^+]$ ve $[(ON1+B19+K)^+]$ yapılarını temsil ettiği görülmüştür. Şekil 5.50B'de ise 3630,3668, 3705 m/z de elde edilen pikler sırasıyla; $[(ON2+B19)^+]$ ve $[(ON2+B19+K)^+]$ ve $[(ON2+B19+2K)^+]$ yapılarını işaret etmiştir. Şekil 5.51'de izlenen 3630, 3668, 3705 m/z de değerindeki piklerin; sırasıyla $[(ON3+B19)^+]$ ve $[(ON3+B19+K)^+]$ ve $[(ON3+B19+2K)^+]$ yapılarını temsil ettiği bulunmuştur.



Şekil 5.50. Oligonükleotid-B19 inkübasyonu sonucu elde edilen komplekslerin DHB matrisi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumları; (A) ON1-B19, (B) ON2-B19 (kompleksleşmemiş olionükleotid zincirlerine ait pikler yıldız ile B19' a ait pikler ok ile gösterilmiştir).



Şekil 5.51. ON3-B19 kompleksinin DHB matrisi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (kompleksleşmemiş oligonükleotid zincirlerine ait pikler yıldız ile B19' a ait pikler ok ile gösterilmiştir).

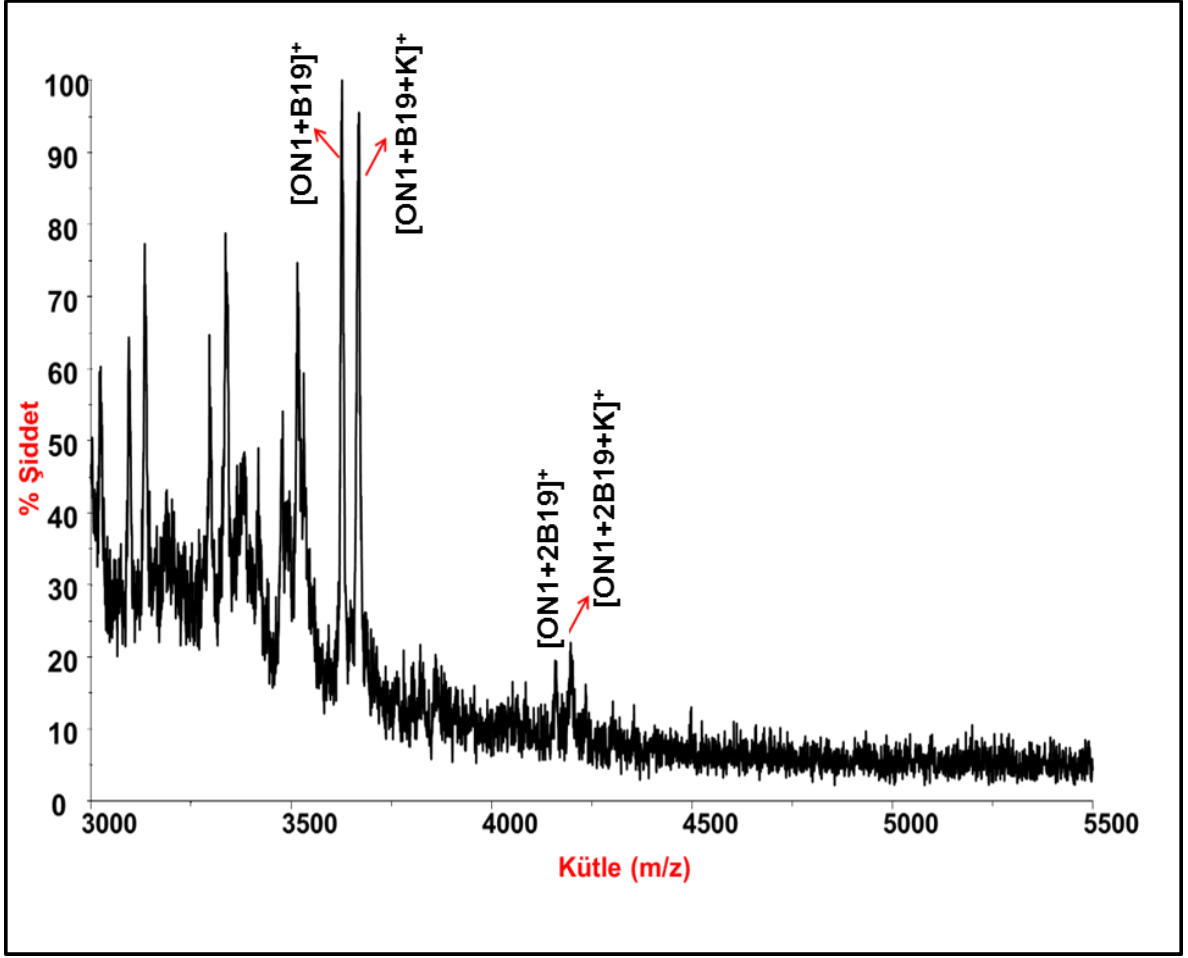
Oligonükleotid-B19 komplekslerine ait spektrumlar geniş m/z aralığında incelendiğinde yalnızca ON1-B19 kompleksine ait kütle spektrumunda iki adet B19 molekülünün oligonükleotidlere bağlı olduğu durumdaki hesaplanan kütle değerlerinde pik olduğu tespit edilmiştir. Şekil 5.52'de $[ON1+2B19+H]^+ = 4158$ m/z değerini ve $[ON1+2B19+K]^+ = 4197$ m/z değerini göstermiştir. Literatürde cisplatin-DNA etkileşimlerinin aynı zincir üzerinde yer alan % 60-65 oranında 1,2 d(G-G), % 20-25 oranda 1,2 d(A-G) üzerinden gerçekleştiği belirtilmiştir. 1,2 d(G-A) üzerinden etkileşime rastlanmamıştır [176].

ON1 = 5'-G-A-**T-G-S**-A-T-G-A-G-3'

ON2 = 5'-G-S-A-T-S-G-G-G-A-S-3'

ON3 = 5'-S-T-A-A-A-G-A-G-S-T-3'

Yukarıda verilen oligonükleotid zincirlerinin dizilimleri incelendiğinde sadece ON2 molekülünde ardışık G-G bulunmasına rağmen, B19 molekülünün her 3 oligonükleotid ile etkileşime girmiş olması, bu etkileşimlerin A-G üzerinden de gerçekleşebileceğini göstermektedir. Ayrıca bir adet A-G dizilimi içeren ON1 oligonükleotidinin 2 tane B19 molekülü ile etkileşmiş olması, B19 molekülünün cisplatin ve türevlerinden farklı bağlanma özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir. Sterik engellemeler ve MP-B19 ile inkübasyon çalışmalarının sonuçları göz önüne alındığında ON1 üzerinde 5' ucunda G-T veya G-S bölgesinde bir etkileşim olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda, tek zincirli DNA yapılarında sitozin N3 ve adenin N1 atomlarının da metal bağlanmaları için elverişli olduğu [176] bilindiğinden ve B19 molekülünün tüm nükleotidlerle etkileştiği bu tez kapsamında tespit edildiğinden, monofonksiyonel olarak ikinci B19 molekülünün de zincire bağlanmış olmasının mümkün olabileceği belirlenmiştir.



Şekil 5.52. ON1-B19 kompleksinin yüksek molekül ağırlığındaki MALDI-MS spektrumu.

5.5.3. Oligonükleotidlerin-B19-GSH Yarışmalı Etkileşimlerinin MALDI-TOF MS ile Tayini

Hücre içerisinde hem DNA hem GSH bulunduğu göz önüne alınarak; B19, GSH ve ON1 oligonükleotidinin herhangi ikisinin inkübasyonu sonrası ortama ilave edilen 3. moleküle karşı kompleks bileşenlerinin reaksiyonu incelenmiştir. Bunun yanısıra hepsi aynı anda karıştırılıp inkübasyona bırakıldığında oluşan kompleksin türü belirlenmiştir. Bu amaçla üç farklı deney yürütülmüştür.

1.deney:

[0.02 mM B19, 75 µL + 0.02 mM GSH, 75 µL]→ inkübasyona bırakıldı. (GB)

Altı saat inkübe edildikten sonra, oluşan kompleksin tanımlanması için 30 µL örnek alındı. Kalan karışıma 75 µL, 0.02 mM ON1 ilave edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı (GBA(2)).

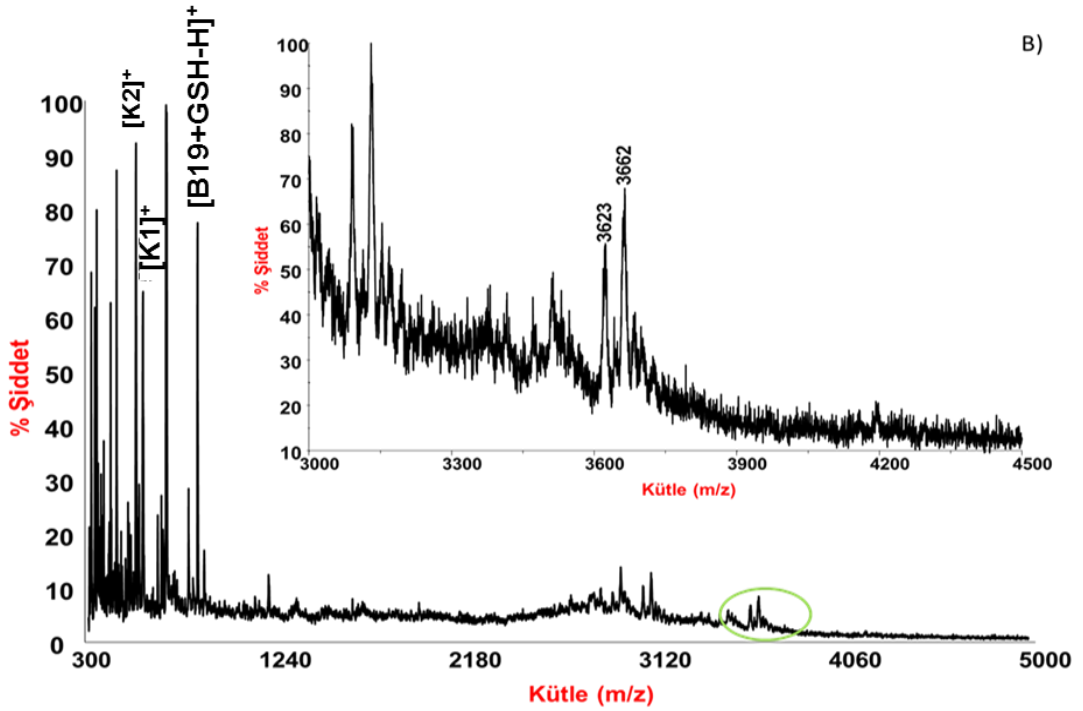
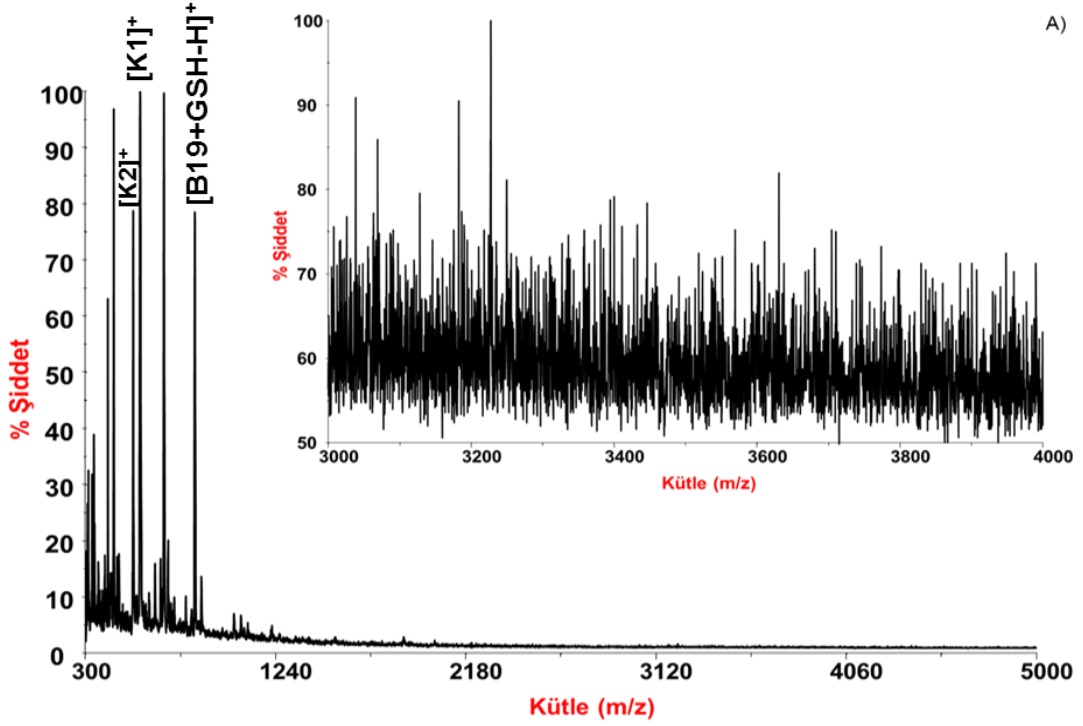
Beklenen olası komplekslerin Molekül ağırlıkları:

GSH-B19: 841 Da

GBA(2) → *1.K: 3628 Da (B19+ON1), *2.K: 3667 Da (B19+ON1),
*3.K: 3400 Da (GSH+ON1), *4.K: 3440 Da (GSH+ON1)

olarak hesaplanmıştır.

Şekil 5.53'de verilen kütle spektrumunda inkübasyonun ilk kısmında beklenen GSH-B19 kompleksinin oluştuğu, daha sonra ortama ilave edilen ON1 oligonükleotidinin yalnızca B19 molekülü ile etkileşime girdiği görülmüştür. GSH-ON1 etkileşimi tespit edilmemiştir.

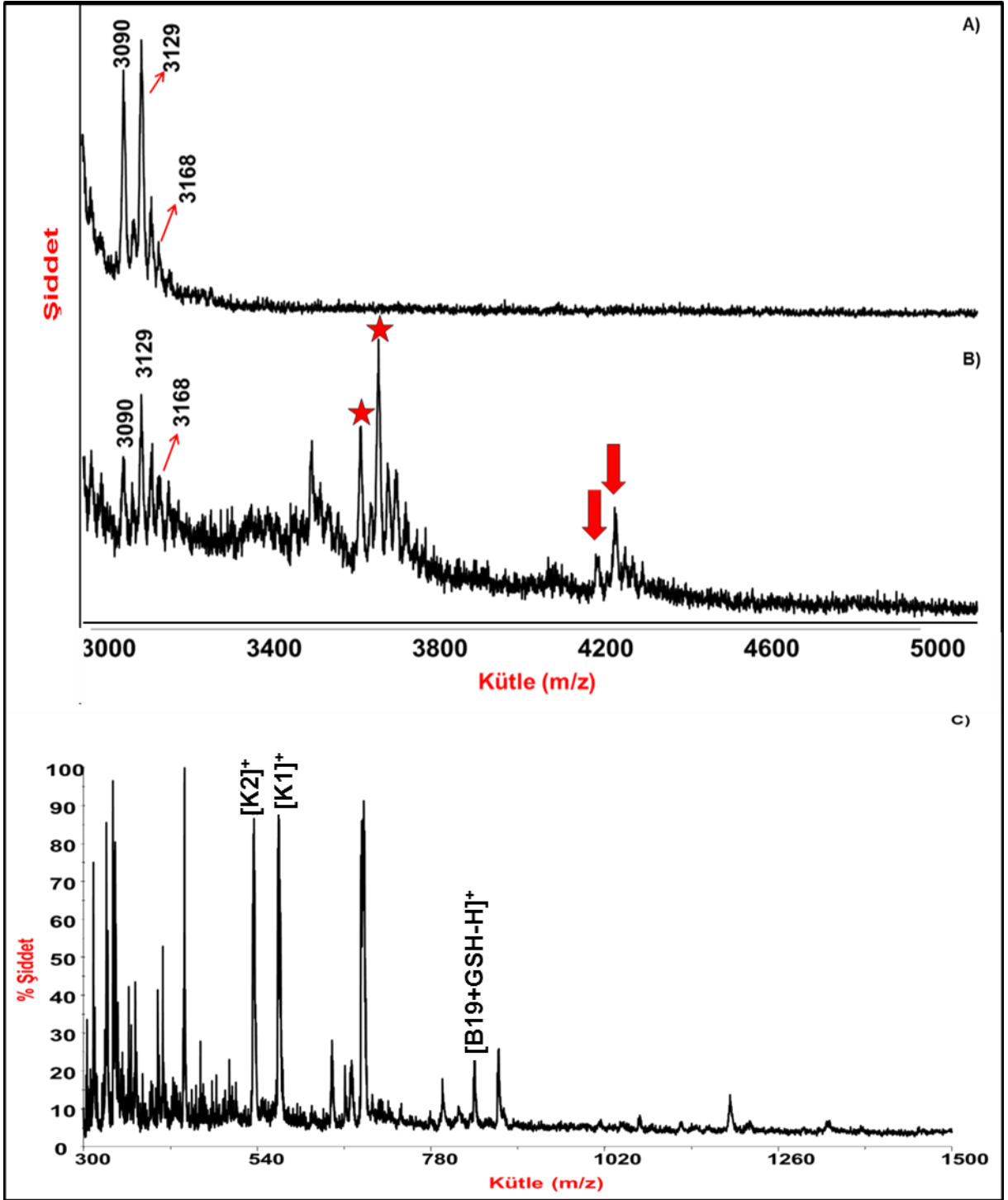


Şekil-5.53. (A) GSH- B19 inkübasyonu (6 saat) sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (B) A'da belirtilen ortama ON1 ilavesi ile 24 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu

2.deney:

[0.02 mM GSH, 50 µL + 0.02 mM ON1, 50 µL]→ inkübasyona bırakıldı. Altı saat inkübe edildikten sonra, oluşan kompleksin tanımlanması için 30 µL örnek alındı. Kalan karışıma 50 µL, 0.02 mM B19 ilave edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Şekil 5.54A ' da GSH-ON1 inkübasyonu sonucu herhangi bir kompleks oluşumu izlenmemiş, ortam bileşenlerinin kendilerine ait pikler gözlemlenmiştir. Bu ortama B19 ilave edilerek sürdürülen inkübasyon sonrasında elde edilen MALDI-TOF MS spektrumunda (Şekil 5.54B) hem B19-ON1 kompleksinin (yıldız ile gösterilmiştir) hem de ON1+2B19 kompleksinin (kalın ok ile gösterilmiştir) oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca ON1 varlığında GSH-B19 etkileşimindeki azalma 841 m/z değerinde gözlenen pik şiddetinin belirgin şekilde azalmasıyla izlenmiştir. Bu duruma ek olarak B19-ON1 kompleksinin şiddetinin GSH varlığında neredeyse hiç etkilenmemiş olduğu tespit edilmiştir. Bu durum her üç molekülün bir arada bulunduğu hücre içi ortamında B19-ON1 etkileşiminin daha olası bir etkileşim olduğunu göstermiştir.

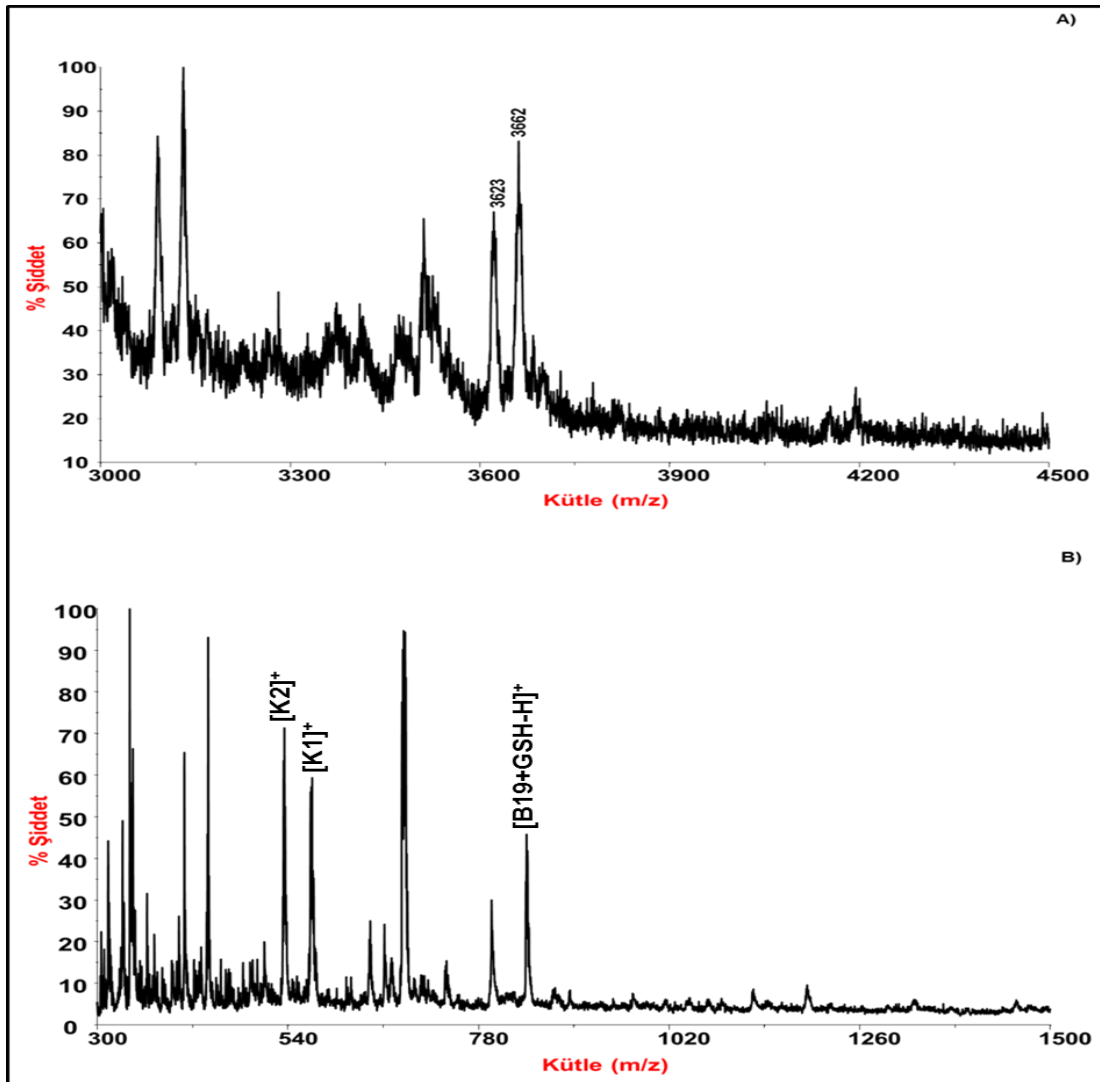


Şekil 5.54. (A) GSH-ON1 inkübasyonu (6 saat) sonucu elde edilen, (B) A'da sürdürülen inkübasyona B19 ilavesi ile 24 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (C) B'nin düşük bölgede genişletilmiş MALDI-TOF MS spektrumu. (B19-ON1 kompleksi yıldız ile, ON1-2B19 kompleksi kalın ok ile gösterilmiştir).

3.Deney:

[0.02 mM GSH, 50 µL + 0.02 mM ON1, 50 µL + 0.02 mM B19, 50 µL]→ inkübasyona bırakıldı (6 saat).

Yarışmalı inkübasyon ortamına ait MALDI-TOF MS spektrumu Şekil 5.55'de verilmiştir. 2. Deney serisinde izlenen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmesi, B19-ON1 kompleksinin GSH varlığından etkilenmediği ancak, GSH-B19 kompleksi oluşumunun ON1 varlığında belirgin şekilde azaldığı düşüncesini güçlendirmiştir.



Şekil 5.55. GSH-ON1-B19 yarışmalı inkübasyonu (6 saat) sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (A) B19-ON1 kompleksinin oluşumu, (B) düşük kütle bölgesinde genişletilmiş MALDI-TOF MS spektrumu

5.5.4. Oligonükleotid-B19 Kompleks Oluşumunun Stokiyometri ve İnkübasyon Süresine Bağımlılığının İncelenmesi

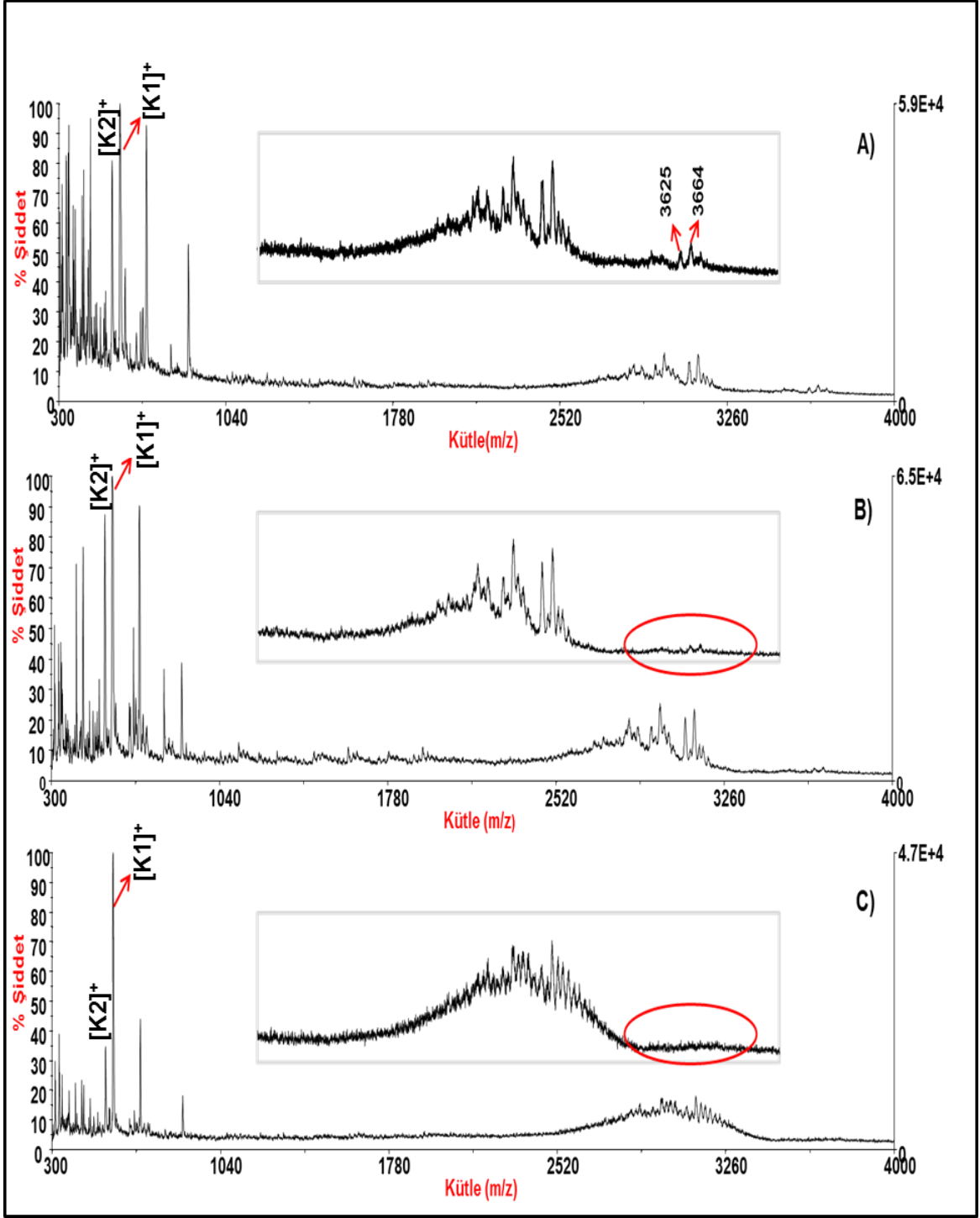
Yapılan çalışmada B19-oligo inkübasyon stokiyometrisinin oluşan kompleks üzerine etkisini incelemek amacıyla sabit B19 mol sayısına karşı artan ON1 oligonükleotidine karşı oluşan kompleksin anlık oluşumu izlendi (Şekil 5.56).

Örnekler karıştırıldıktan hemen sonra her 3 derişim için de 10 µL numune alınıp 50 µL DHB matrisi ile karıştırıldı ve anlık analiz numunesi olarak kullanıldı.

- ✓ [0.02 mM B19, 40 µL + 0.02 mM ON1, 40 µL]→ (1:1)
B19=0.01 mM, ON1=0.01 mM
- ✓ [0.02 mM B19, 100 µL + 0.0776 mM ON1, 100 µL]→ (1:4)
B19=0.01 mM, ON1=0.0388 mM
- ✓ [0.02 mM B19, 100 µL + 0.0776 mM ON1, 200 µL]→ (1:8)
B19=0.0067 mM, ON1=0.052 mM

Bu üç deney serisinin dışında 0.02 mM B19 eşit hacim derişimde ON1 ile 23 saat inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon numunesinden 10 µL alındı ve 0.02 mM GSH eklendi ve tekrar 1 saat inkübasyona bırakıldı (İzlenmesi gereken durum; B19-ON1 kompleksinin şiddetinin azalıp B19-GSH oluşumunun gerçekleşip gerçekleşmeyeceğidir).

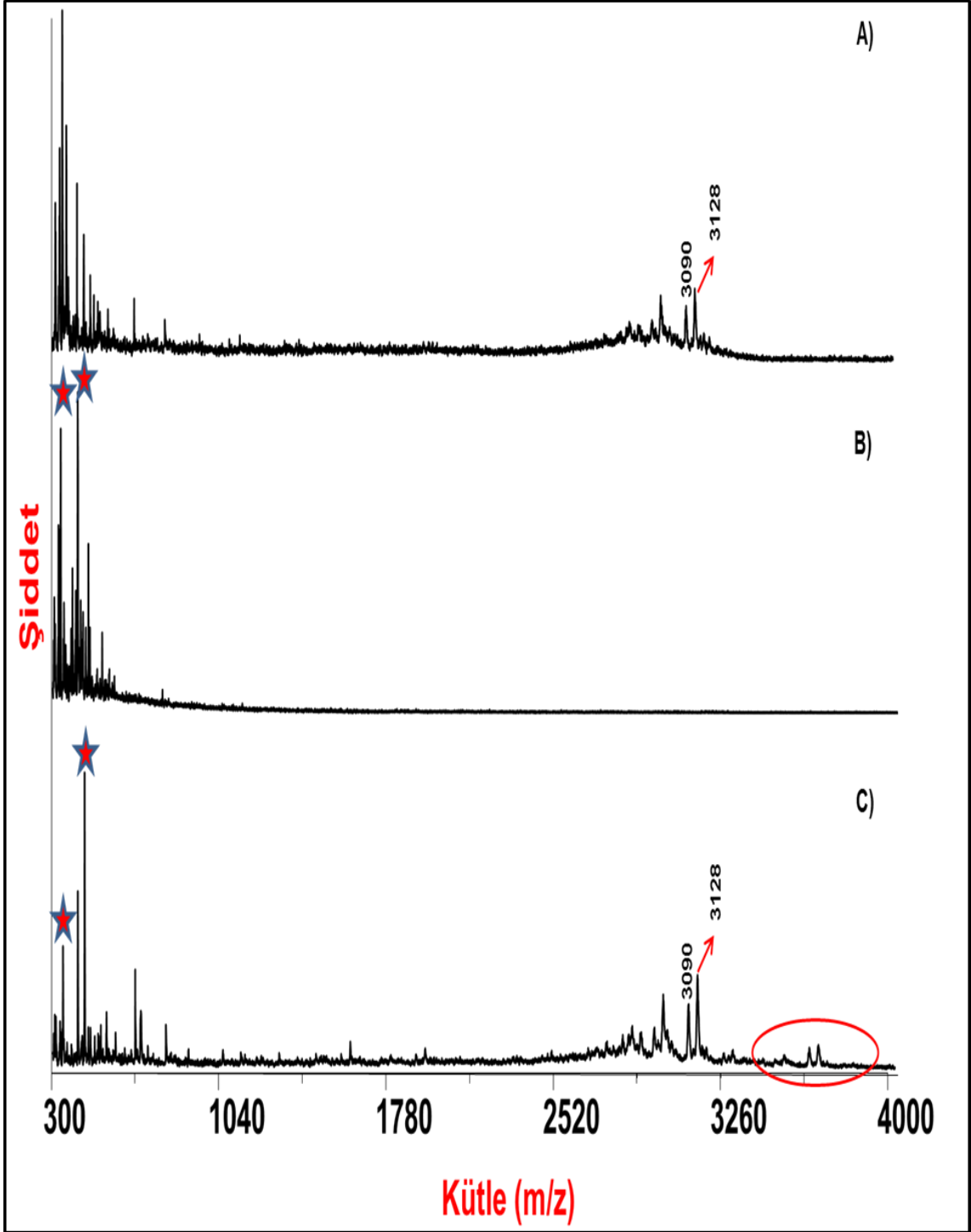
Bölüm 5.5.3'te 6 saat B19-ON1 inkübasyonu sonrasında ortama GSH ilavesi yapılmış, sonuçlar analiz edilmişti. Burada inkübasyon süresi uzun tutularak B19-ON1 etkileşiminin tamamlanması ve sonra GSH ilave edilmesi planlanmıştır.



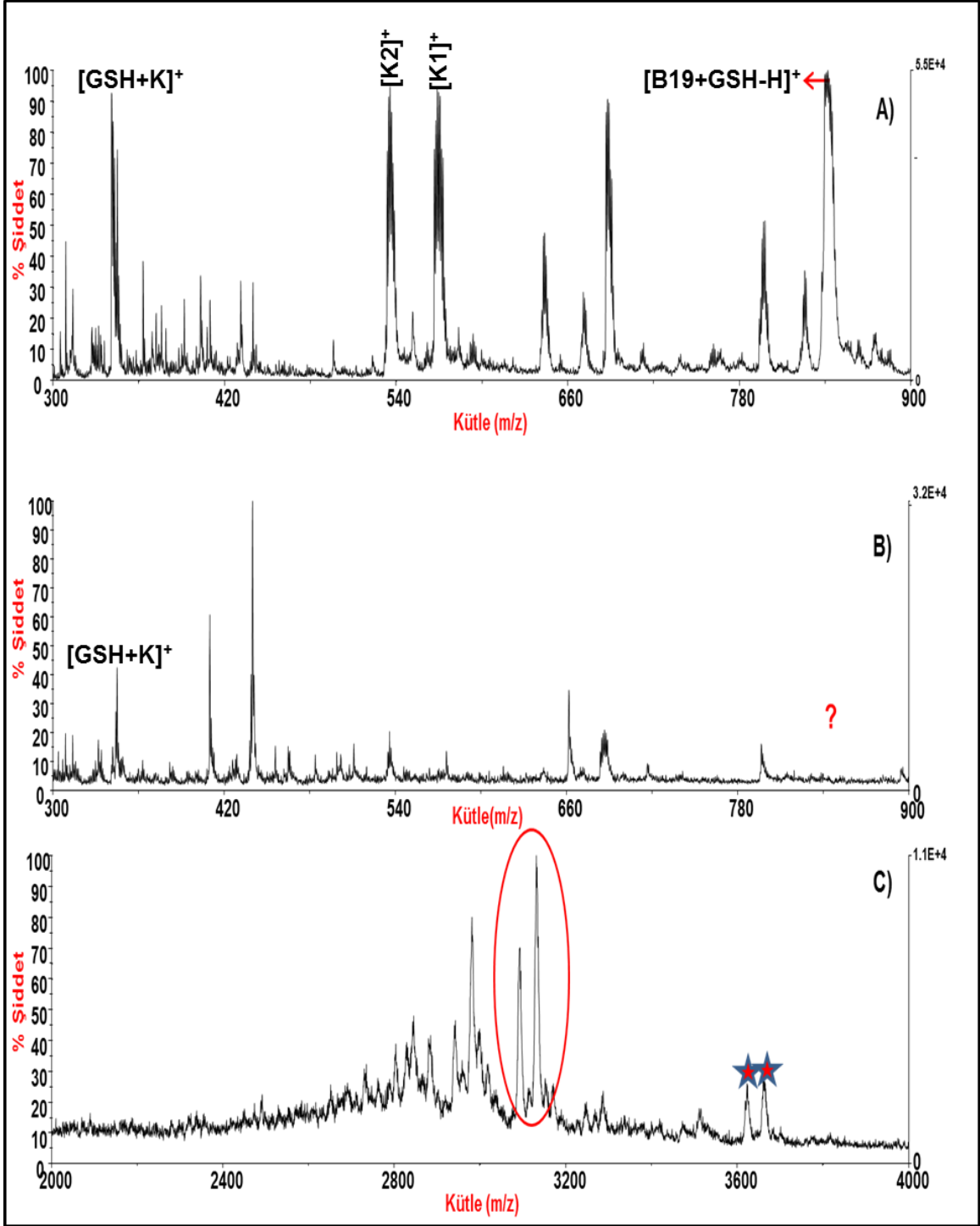
Şekil 5.56. B19:ON1 mol oranının bileşenlerin anlık etkileşimi sonucu oluşan kompleks üzerine etkisi (A)1:1, (B) 1:4, (C)1:8 mol oranı

Sonuç olarak anlık etkileşimde 1:1 mol oranında etkileşim kompleksinin maksimum seviyede oluştuğu ve ON1 mol sayısı arttıkça kompleks oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir. Her 3 mol oranında da ortamda hala reaksiyona girmemiş B19 ve ON1 olduğu görülmüştür. Bu durumun oligonükleotid miktarı arttıkça tuz miktarının da artması ve bu nedenle iyonik etkileşimlerin bozulması ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. B19 ile 1:1 mol oranında, anlık etkileşime girebilen tek nükleotidin GMP olduğu bu tez kapsamında gösterildiğinden, ON1 üzerinde 3' G-A-G etkileşiminin B19 için en yüksek ihtimalli etkileşim olduğu düşünülmüştür.

Şekil 5.57B ve C'de yıldız ile işaretlenen pikler GSH ve dimerini göstermektedir. Yirmiüç saat inkübasyon sonrası edilen ON1-B19 kompleksine GSH ilavesinin belirgin bir etkisi olmadığı B19-GSH kompleksinin oluşmadığı Şekil 5.58B'de gösterilmiştir. Yine Şekil 5.58B'de, 23 saat inkübe edilen örnekte reaksiyona girmemiş B19 molekülü miktarının çok az olduğu görülmektedir. Bu ortama GSH eklenmesi ile B19-GSH kompleksinin oluşmaması, B19 molekülünün GSH varlığında ON1 ile etkileşimini koparmadan sürdürdüğünü, yani ON1 'e ilgisinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Şekil 5.58C'de B19-ON1 kompleksine ait iyon pikleri yıldız ile gösterilmiştir. İnkübasyon sonunda serbest kalan ON1 oligonükleotidini gösteren pik grubu daire içerisinde belirtilmiştir.



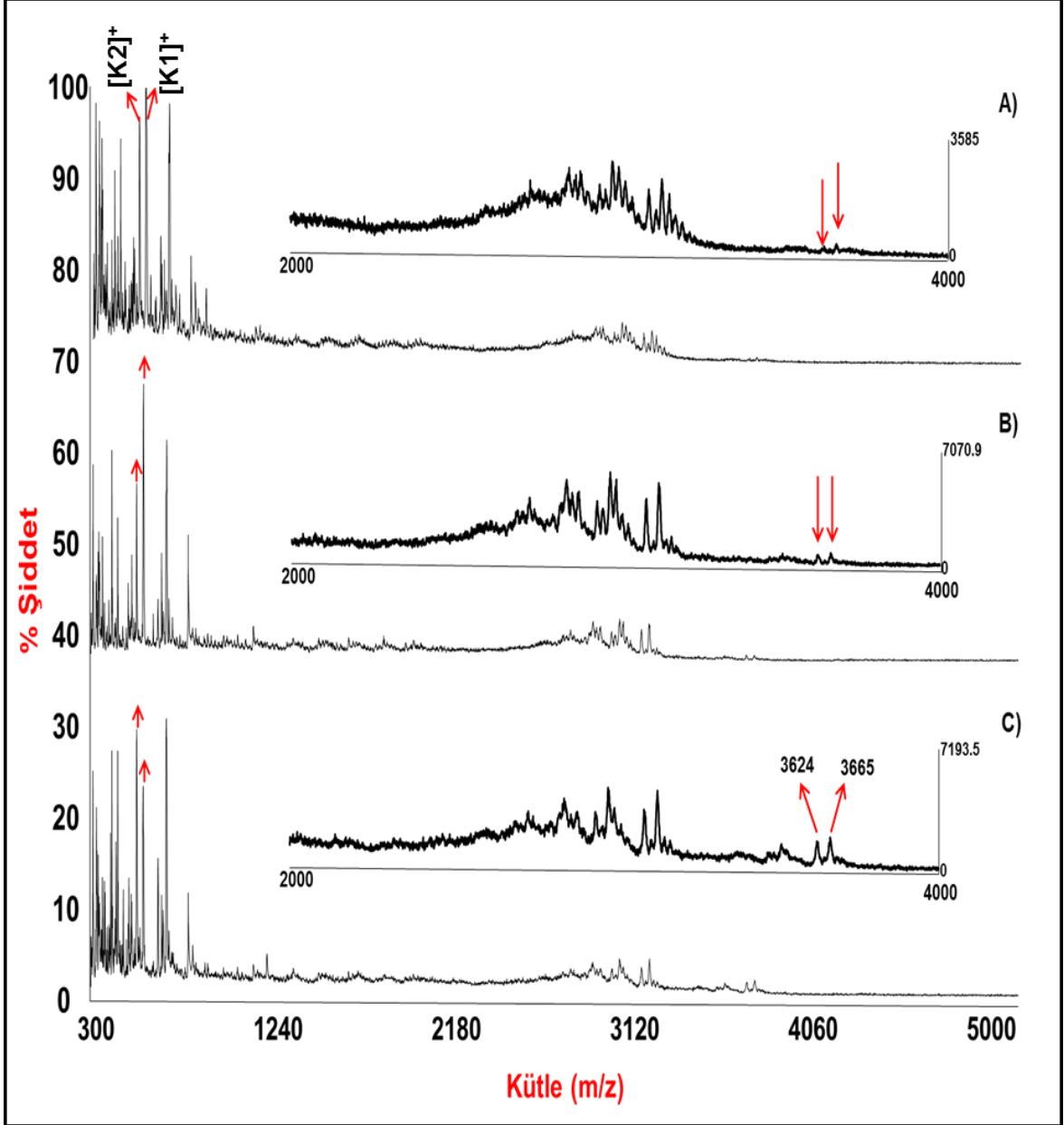
Şekil 5.57. (A) 0.02 mM ON1, (B) GSH yapılarına ait DHB matrisi ile elde edilmiş, (C) B19-ON1, 1:1 mol oranında 23 saat inkübe edilen örneğe GSH eldesi sonucu elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu (yıldız ile işaretlenen pikler GSH ve dimerini göstermektedir).



Şekil 5.58. (A) GSH-B19 kompleksine ait DHB matrisi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu, (B) 1:1mol oranda 23 saat inkübe edilen B19/ON1 kompleksine GSH eldesi sonucu düşük molekül ağırlıklı bölgede elde edilen MALDI-TOF MS spektrumu, (C) B'de belirtilen şartlarda B19-ON1 kompleksine ait iyon pikleri yıldız ile gösterilmiştir. İnkübasyon sonunda serbest kalan ON1 oligonükleotidini gösteren pik grubu daire içerisine alınmıştır.

Diğer bir çalışmada inkübasyon süresinin oluşan kompleks üzerine etkisini incelemek amacıyla sabit ON1:B19 mol oranında (2:1, B19=0.005 mM, ON1=0.01 mM); anlık, 3.5 saat ve 20 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu zaman dilimlerinde inkübe edilen örnekten 10 µl alınarak 50 µl DHB matrisi ile karıştırılmıştır. Hazırlanan örneklerden 1'er µl spotlanarak, aynı lazer şiddetinde spektrumlar kaydedilmiştir.

Şekil 5.59'da ON1 konsantrasyonu; B19 molekülünün konsantrasyonunun 2 kat fazlası olduğu durumdaki inkübasyondan farklı zamanlarda alınan numunelerin MALDI-TOF MS spektrumları görülmektedir. Maddelerin anında etkileşime girdiği (Şekil 5.59A) ve oluşan kompleksin 20. saatin sonuna kadar kararlılığını koruduğu izlenmiştir. Spektrumda izlenen 3624 m/z sinyali [(B19+ON1)+H]⁺ kompleksini, 3665 m/z sinyali ise [(B19+ON1)+K]⁺ şeklinde potasyumlanarak iyonlaşmış kompleksi ifade etmektedir. Ayrıca maksimum kompleks oluşumu 20 saatlik inkübasyon süresinde elde edilmiştir. Bu sürenin sonunda ortamda hala B19 ve ON1 yapılarının bulunması, bu karışım oranında kompleks oluşumunun tamamlanmadığını düşündürmüştür.



Şekil 5.59. ON1- B19 mol oranı 2:1 olan inkübasyon serisinden; (A) anlık, (B) 3.5 saat sonra, (C) 20 saat sonra 10 µl alınarak analiz edilen örneklerin MALDI-TOF MS spektrumları (matriks DHB, analit:matriks:1:5)

5.6. B19 - Protein Etkileşimleri

Pt-ilaçların büyük çoğunluğunun, uygulandıktan kısa bir süre sonra, hücre dışı ve hücre içi proteinlere bağlandığı literatürde yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [74]. Pt-ilaç protein etkileşimlerini tanımlamak ve kinetiğini belirlemek için, bağlanan ve bağlanmayan Pt-ilaç fraksiyonlarının türlendirilmesi gerekmektedir [173].

Bu tez kapsamında, literatürde CDDP ile etkileşimi incelenen proteinlerden olan sitokrom C, Ubiquitin, Lizozim proteinlerinin B19 ile etkileşimi MALDI-TOF MS ve LC-ESI-QTOF-MS ile incelenmiştir.

1.9 mM B19 stok çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak 0.3 ve 0.9 mM B19 standart çözeltileri hazırlandı. *In vitro* hücre içi ortamı taklit etmesi için, Cyt C, Ubiquitin ve Lizozim inkübasyonlarında kullanılan B19 çözeltisi; NaCl konsantrasyonu 10 mM olan 5 mM amonyum asetat (pH:7.4) ile hazırlanmıştır.

Farklı mol oranında yürütülen her iki inkübasyondan 24 saat sonra, 750'şer µl alındı. Buzdolabına kaldırıldı (4°C). Kalan numunelerin inkübasyonu devam ettirildi. Toplam inkübasyon süresi 42 saat olduktan sonra numunelerin herbirinden 500 µl daha alındı. Kalan numunelerin (250 µl) inkübasyonu, toplam inkübasyon süresi 92 saat olana kadar devam ettirildi. 92 saatin sonunda numuneler inkübasyondan alınarak buzdolabına konuldu. Numuneler analiz edilene kadar +4°C'de saklandı.

5.6.1. Sitokrom C ile etkileşimleri

B19-Cyt C-3-1 inkübasyonu için;

- 0.3 mM, 1 mL B19 + 0.1 mM, 1mL Cyt C 37°C'de inkübe edildi.

B19-Cyt C-9-1 inkübasyonu için;

- 0.9 mM, 1 mL B19 + 0.1 mM, 1mL Cyt C 37°C'de inkübe edildi.

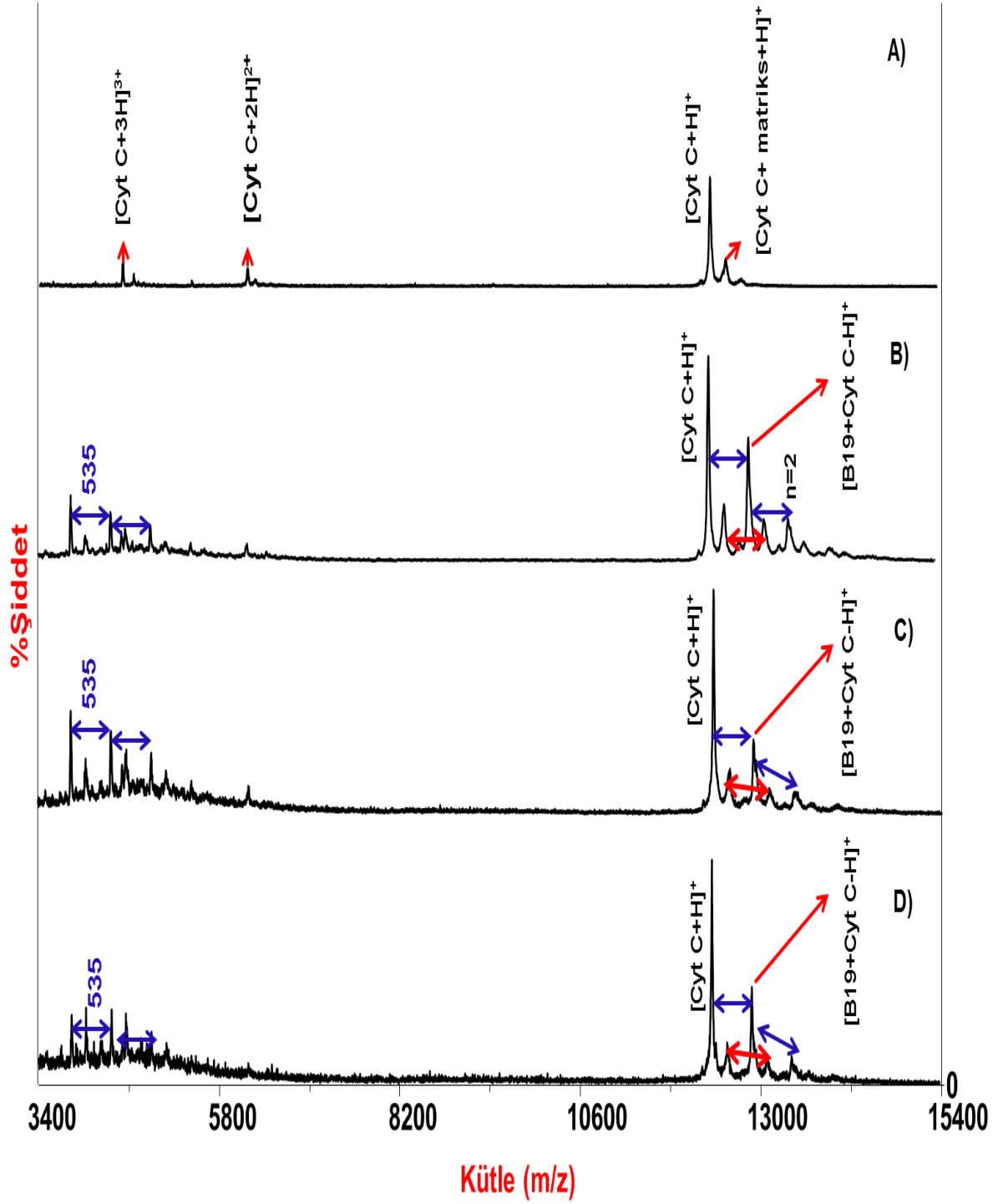
5.6.1.1. MALDI-TOF MS Analizleri

B19 molekülünün kan proteinleri ile etkileşimi DNA'ya ulaşan ilaç miktarı bakımından önem taşımaktadır. Literatürde bu amaçla test edilen başlıca proteinlerden Cyt C'nin (pI~9.9) farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı inkübasyon mol oranlarında, B19 ile etkileşimi incelenmiştir. Şekil 5.60A' da Cyt C standardının saf haldeki kütle spektrumu verilmiştir. Proteine ait 12362 ve 6183 m/z değerindeki pikler, sırasıyla protone olmuş +1 ve +2 yüklü Cyt C molekülünün

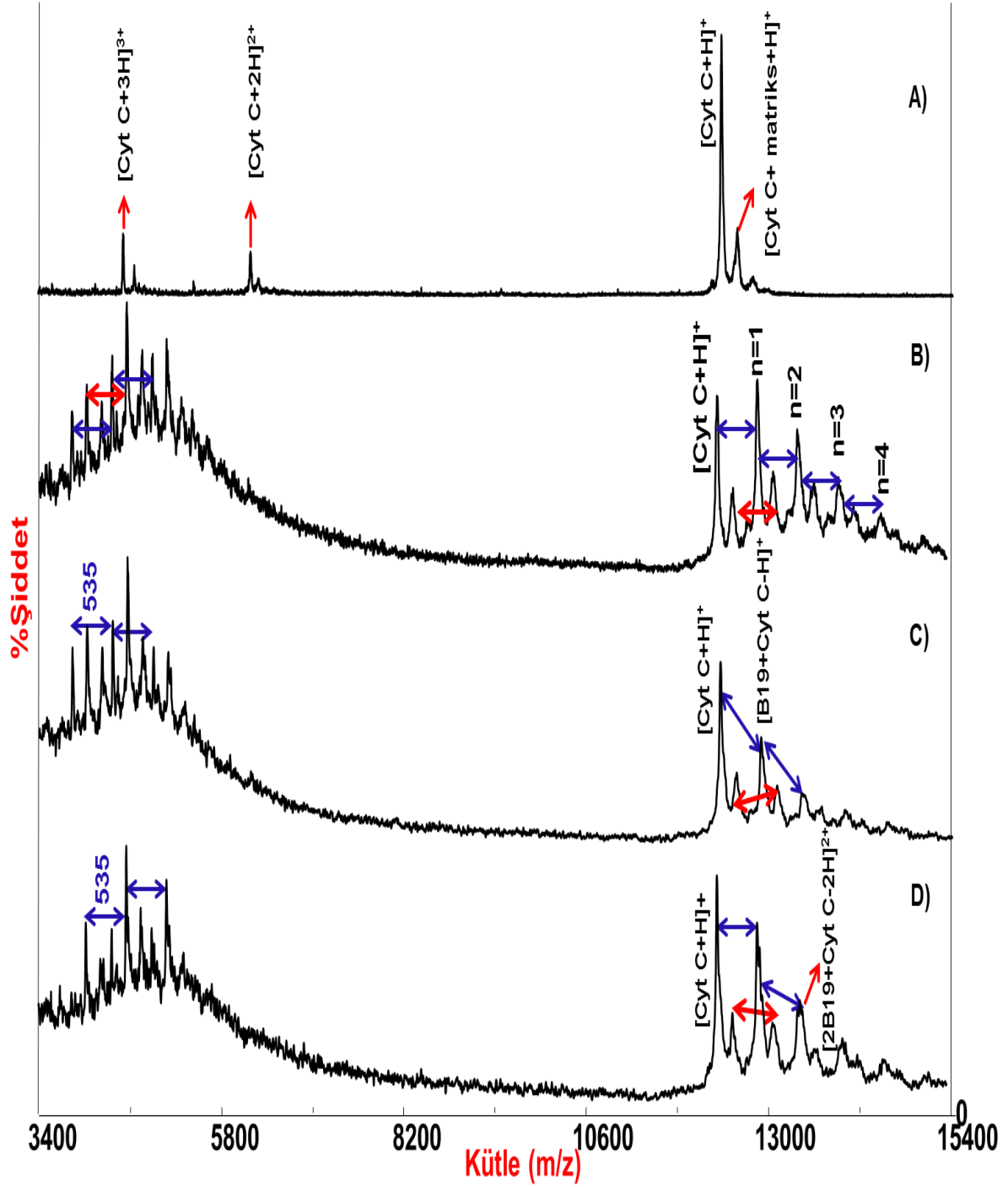
m/z değeri ile uyumludur. Mol oranı 3:1 olacak şekilde inkübe edilen B19-Cyt C karışımına ait spektrumda Şekil 5.60A'da görülen piklere ilave olarak, m/z farkı 535 olan değerlerde pikler bulunmaktadır. 12898 ve 13431 m/z bölgelerindeki pikler sırasıyla; [B19+Cyt C-H]⁺ ve [2B19+Cyt C-3H]⁺ yapılarını temsil etmektedir. Protein ile 24 saat inkübasyona bırakılan B19 miktarının 3 kat artması ile serbest halde bulunan proteini temsil eden sinyal şiddetinin B19 bağlı proteini temsil eden pik şiddetiyle neredeyse aynı olması, B19 miktarı artırıldıkça kompleks oluşumunun arttığını göstermiştir (Şekil 5.60B ve Şekil 5.61B). Ayrıca Cyt C'ye bağlanan B19 sayısında (n) artış görülmüştür.

İnkübasyon süresinin bağlanma üzerine etkisini incelemek amacıyla 3:1 ve 9:1 , B19-Cyt C inkübasyonlarının her ikisi 24, 42 ve 92 saat süreleri bitiminde analiz edilmiştir. Her iki mol oranı için, inkübasyon süresi nin 24 saat olduğu durumda Cyt C'ye bağlanan B19 sayısında (n) artış olduğu izlenmiştir. Özellikle 9:1 mol oranlı inkübasyonda [2B19+Cyt C-3H]⁺ kompleksi şiddetinde inkübasyon süresi 24 saatten 48 saate uzatıldığında görülen azalma ve 48 saatten 92 saate çıkarıldığında görülen artış söz konusu kompleksin oluşum sabitinin orta düzeyde olduğunu göstermiştir.

Optimum etkileşiminin 9:1 mol oranında ve 24 saat inkübasyon sonrası elde edildiği görülmüştür.



Şekil 5.60. (A) Cyt C standardı, (B) B19-Cyt C-3-1-24s, (C) B19-Cyt C-3-1-42s, (D) B19-Cyt C-3-1-92s inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (50 µl SA +10 µl AC+ 10 µl numune karıştırıldı, vortekslendi. Bu karışımdan 1 µl MALDI plakasına damlatıldı).

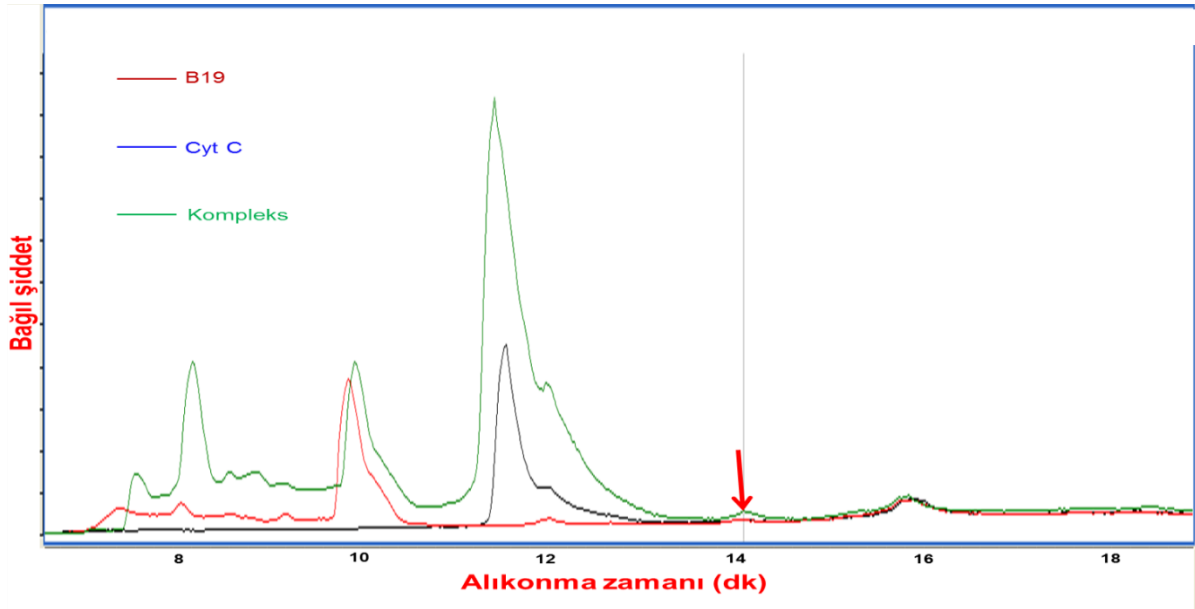


Şekil 5.61. (A) Cyt C standardı, (B) B19-Cyt C-9-1-24s, (C) B19-Cyt C-9-1-42s, (D) B19-Cyt C-9-1-92s inkübasyon numunelerinin SA matrisi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (50 µl SA +10 µl AC+ 10 µl numune karıştırıldı, vorteksledi. Bu karışımdan 1 µl MALDI plakasına damlatıldı).

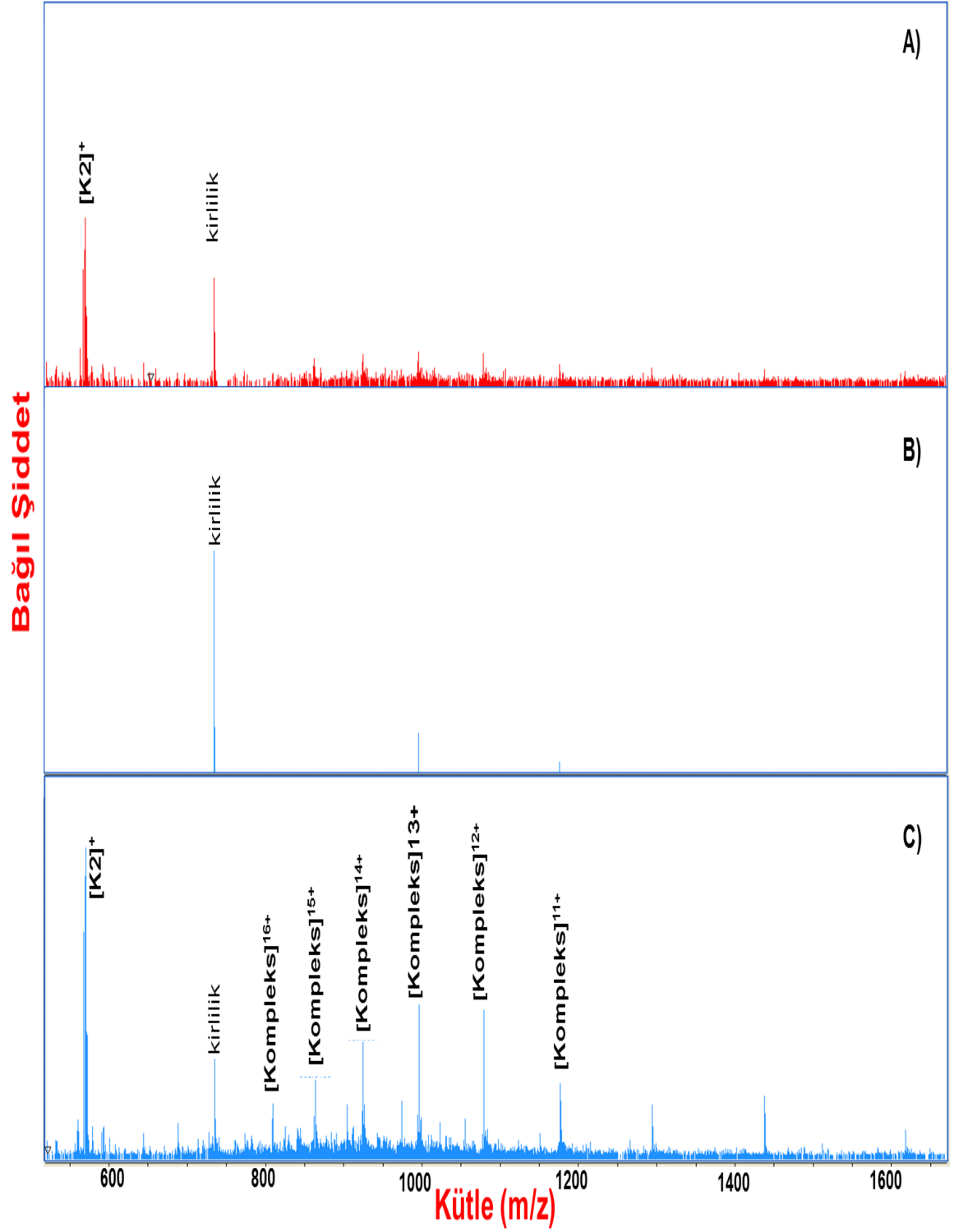
5.6.1.2. LC-ESI-QTOF-MS Analizleri

Cyt C'nin, B19 ile inkübasyonu sonucu oluşan komplekslerin varlığı yapılan MALDI-TOF MS analizleri ile gösterilmiştir. Gaz fazına geçme-iyonlaşma basamaklarının MALDI sisteminde eş zamanlı gerçekleşiyor olması, söz konusu komplekslerin çözelti fazında da var olduklarının gösterilmesini gerekli kılmıştır. Bu nedenle, çözelti fazındaki kovalent olmayan etkileşimleri koruyarak gaz fazına geçişe imkan sağlayan ESI iyonlaşma tekniği kullanılarak inkübasyon örnekleri analiz edilmiştir.

Şekil 5.62'de B19, Cyt C ve İnkübasyon numunesine ait toplam iyon kromatogramları verilmiştir. Komplekse ait kromatogramda, kırmızı okla gösterilen bölgede düşük şiddette pik izlenmiştir. B19 ve Cyt C 'ye ait kromatogramlarda bulunmayan bu sinyalin kompleksi ifade ettiği düşünülmüştür. Kompleks oluşması halinde, komplekse ait kütle spektrumunda bulunması gereken iyonlara ait m/ z değerleri hesaplanmıştır. Bu iyonlardan birine ait kütle, komplekse ait TIC'dan ekstrakte edilmiş ve söz konusu iyonun alıkonma zamanı belirlenmiştir. Şekil 5.63'te Rt:14.080 dk'da elde edilmiş kütle spektrumunda, etkileşime girmeden kalan $[K1]^+$ ve $[Cyt C+K2]^{+n}$ (n:11-16) iyonlarına ait pikler gösterilmiştir. Bu durum, Cyt C-K2 kompleksinin çözelti fazında oluştuğunu göstermiştir.



Şekil 5.62. B19, Cyt C ve B19-Cyt C inkübasyon numunelerine ait toplam iyon kromatogramları.



Şekil 5.63. (A) B19, (B) Cyt C çözeltilerinin ve (C) B19-Cyt C inkübasyon numunelerinin t=14.088 dk'da elde edilmiş ESI-MS spektrumları

5.6.2. Ubiquitin ile Etkileşimleri

B19-Ubiq -3-1 inkübasyonu için;

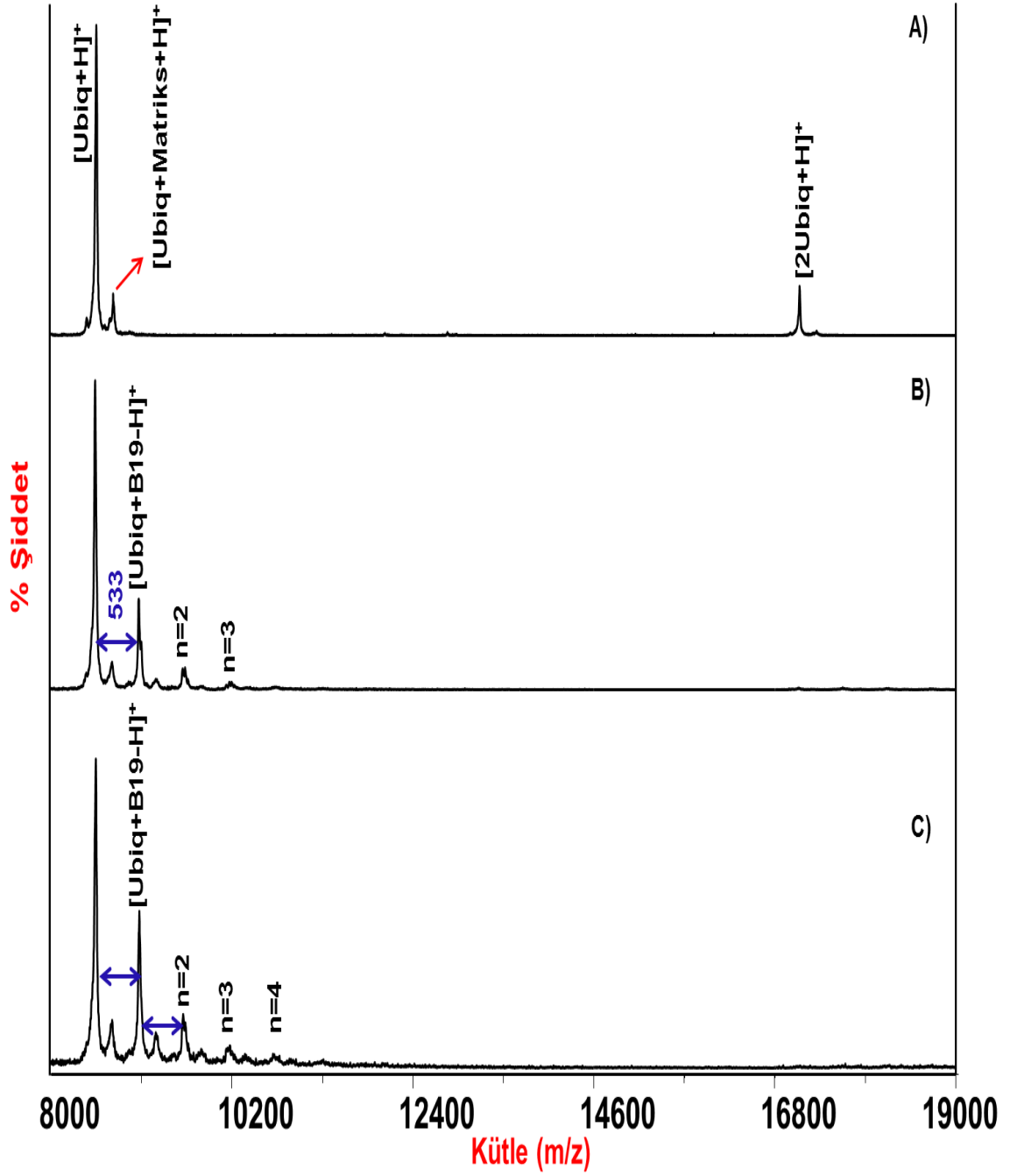
- 0.3 mM, 1 mL B19 + 0.1 mM, 1 mL Ubiq 37°C'de inkübe edildi.

B19-Ubiq-9-1 inkübasyonu için;

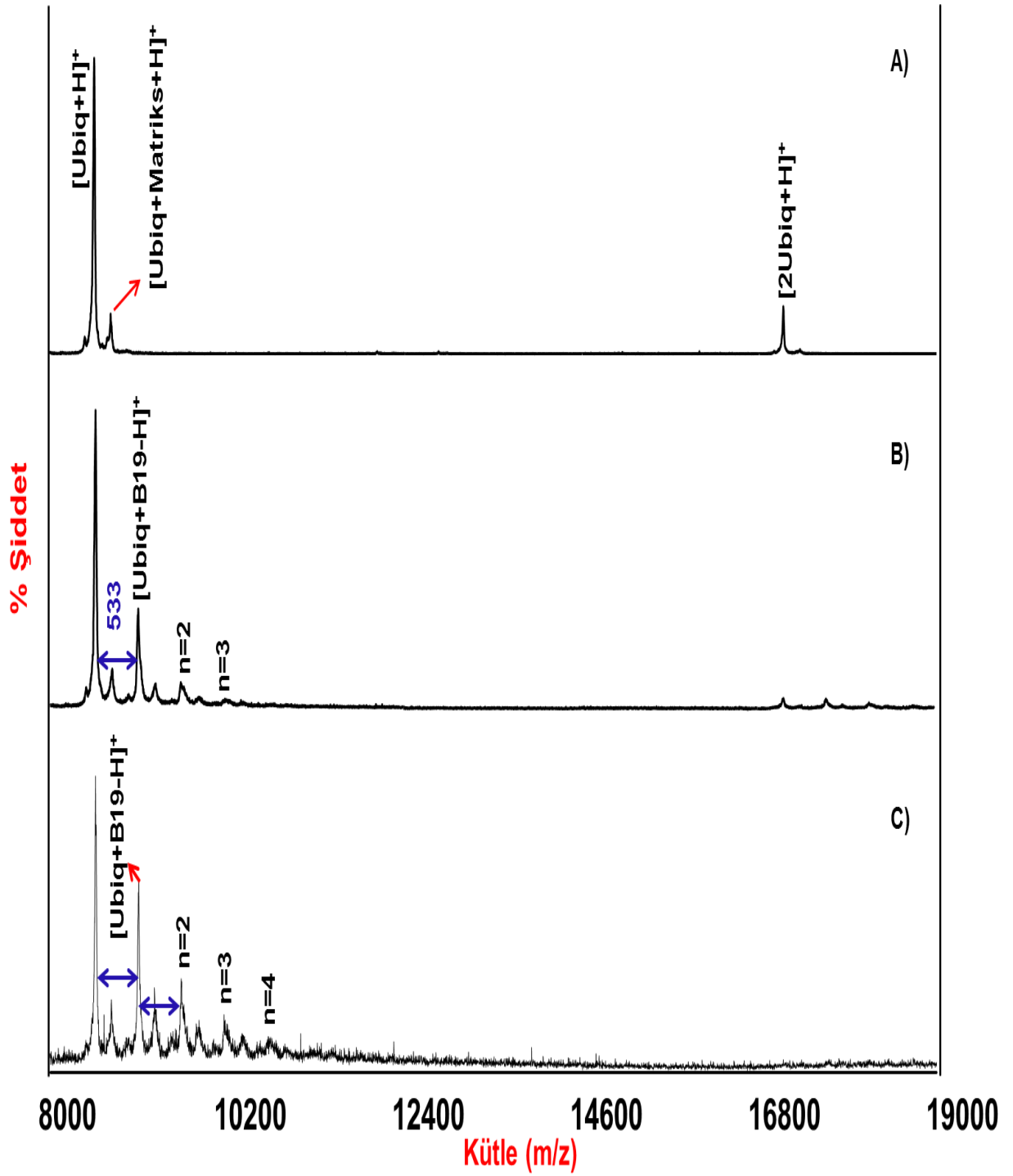
- 0.9 mM, 1 mL B19 + 0.1 mM, 1 mL Ubiq 37°C'de inkübe edildi.

5.6.2.1 MALDI-TOF MS Analizleri

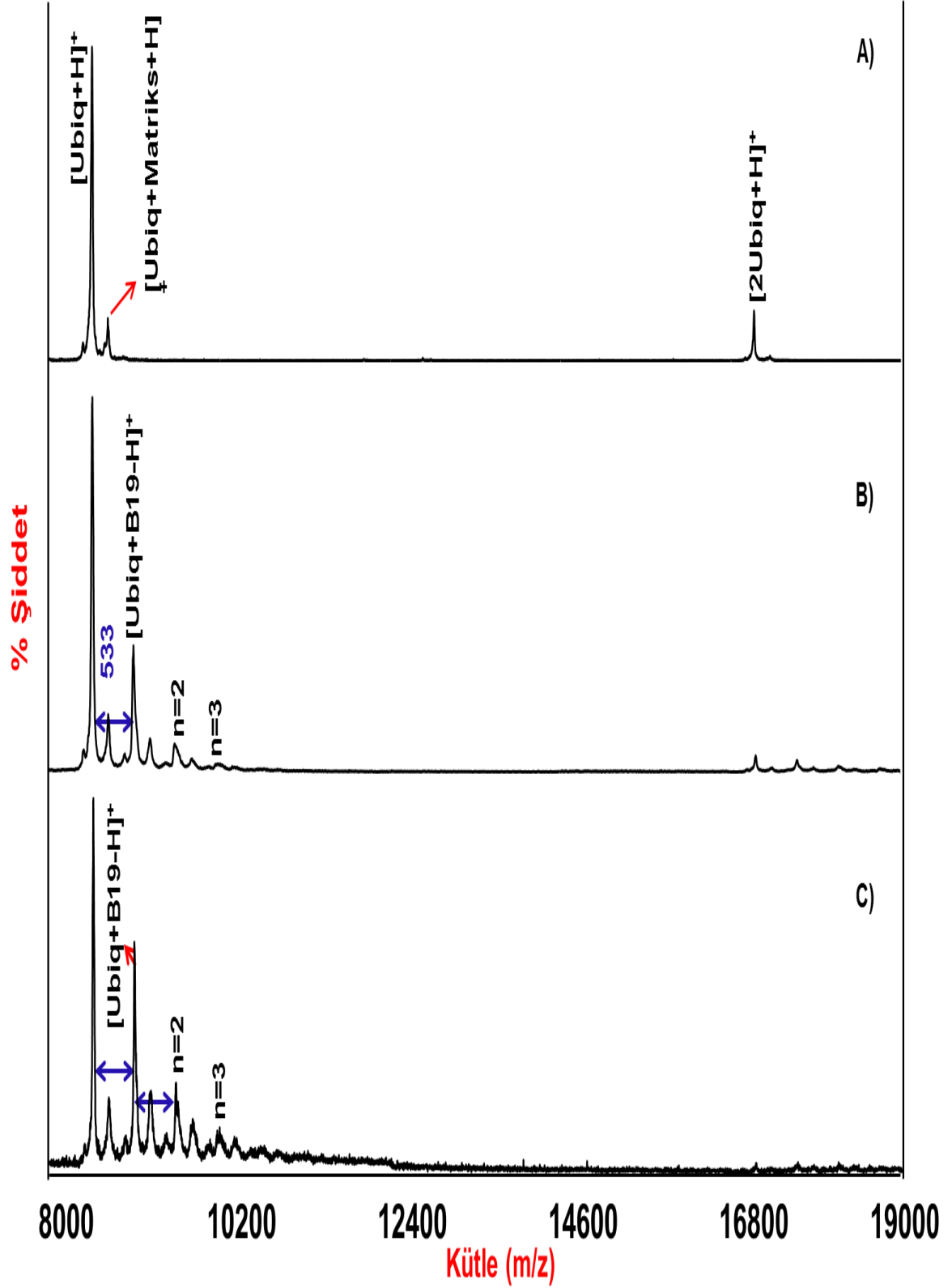
Düşük molekül ağırlıklı bir serum proteini olan Ubiquitin ($pI < 7$) ile B19 molekülünün etkileşimi incelenmiştir. Saf ubiquitin proteininin, SA matriksi ile elde edilmiş kütle spektrumu Şekil 5.64A'da gösterilmiştir. Proteinin, protonlanarak iyonlaştığı +1 yüklü iyon ve bu yapının dimerine ait pikler 8546 ve 17091 m/z 'de izlenmektedir. 3:1 inkübasyon mol oranında, proteinin dimerinin de B19 molekülü ile etkileşime girdiği görülmüştür. 9:1 inkübasyon mol oranında ise proteine bağlanan B19 sayısının (n) arttığı ve bununla beraber bağlı protein /serbest protein oranının arttığı izlenmiştir (Şekil 5.64 ve 5.65B ve C). İnkübasyon süresinin etkileşim üzerine belirgin bir etkisi olmadığı Şekil 5.64'de verilen 92 saatlik inkübasyon süresi sonucu elde edilen spektrumda izlenmiştir. İnkübasyon süresinin 24, 42 ve 92 saat olduğu numunelerin spektrumları arasında fark olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 5.64. (A) Ubiquitin standardının, (B) B19-Ubiq-3-1-24 saatlik, (C) B19-Ubiq-9-1-24 saatlik inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu



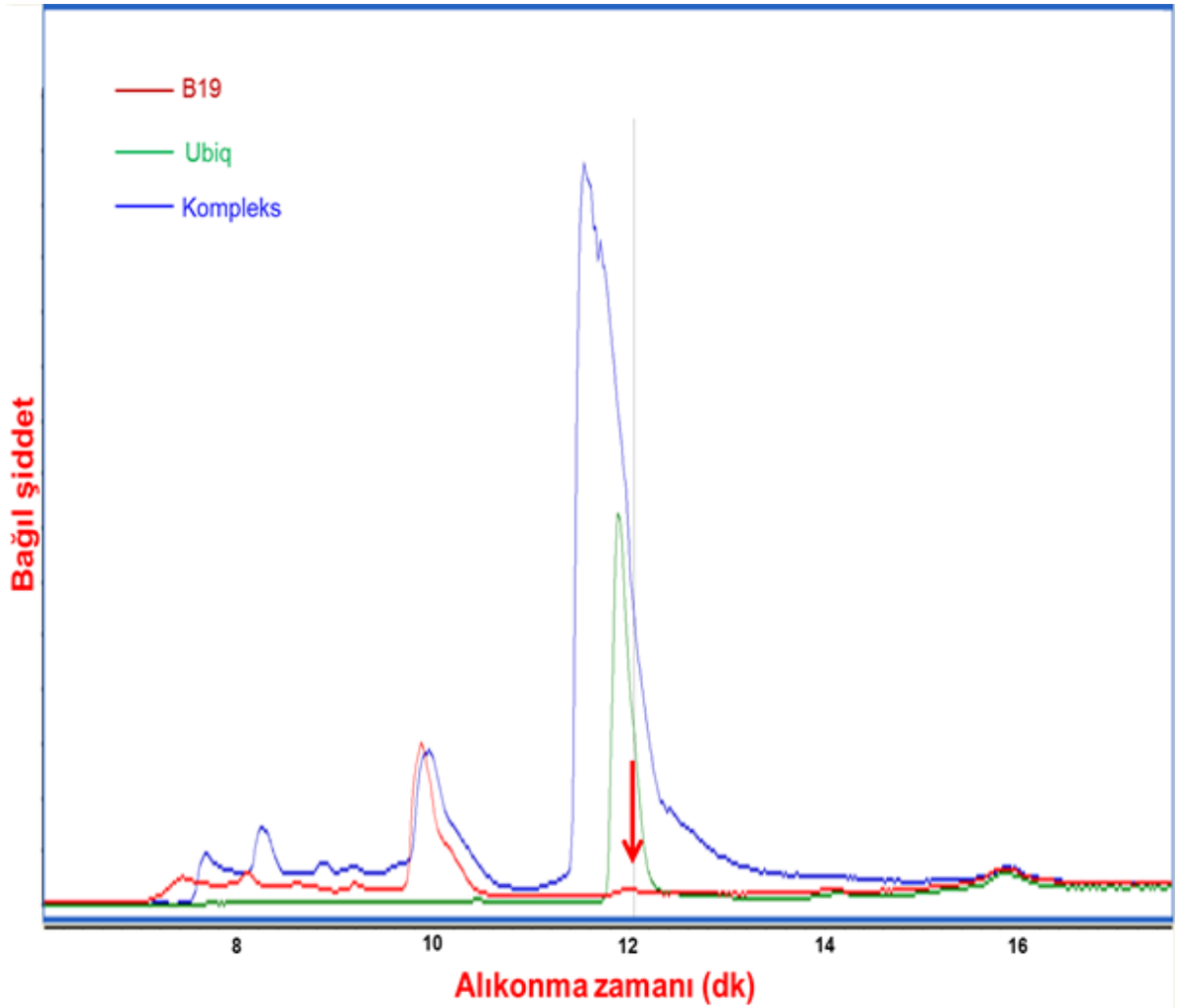
Şekil 5.65. (A) Ubiquitin standardının, (B) B19-Ubiq-3-1-42 saatlik, (C) B19-Ubiq-9-1-42 saatlik inkübasyon numunelerinin SA matrisi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu



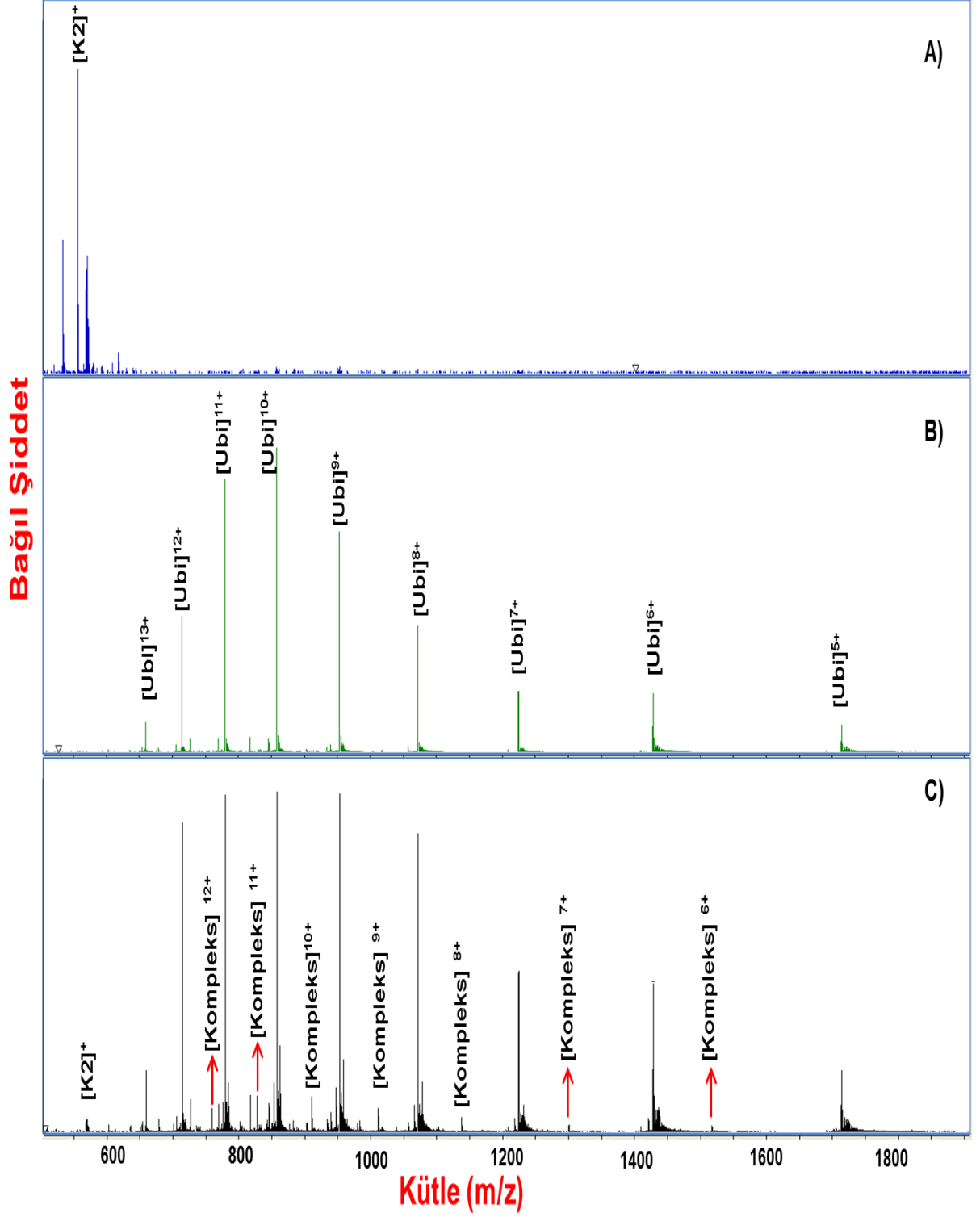
Şekil 5.66. (A) Ubiquitin standardının, (B) B19-Ubiq-3-1-92s, C) B19-Ubiq-9-1-92s inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu

5.6.2.2. ESI-QTOF-MS Analizleri

B19-Ubiq etkileşimine ait elde edilen kromatogramlar üst üste konularak Şekil 5.69'da verilmiştir. Komplekse ait toplam iyon kromatogramına bakıldığında, protein ve B19 ile yapmış olduğu kompleksin iyi ayrılmadığı gösterilmiştir. Okla gösterilen bölgede, alıkonma süresi= 12.032 dk'da B19, Ubiq ve komplekse ait kromatogramın kütle spektrumlarında farklılıklar olduğu görülmüştür (Şekil 5.70). Şekil 5.70C'de belirtilen piklerin B19 ve Ubiq standardına ait kütle spektrumunda görülmemesi ve kütlesi hesaplanan $[Ubiq+K2]^{+n}$ kompleksinde (n:7-12) beklenen kütlede izlenmeleri kompleks oluştuğunu göstermiştir.



Şekil 5.67. (A) B19, (B) Ubiq ve (C) B19-Ubiq inkübasyon numunelerine ait ESI-MS'de elde edilen toplam iyon kromatogramları.



Şekil 5.68. (A) B19, (B) Ubi ve (C) B19-Ubiq inkübasyon numunelerinin t=14.032 dk'da elde edilmiş ESI-MS spektrumları

5.6.3. Lizozim ile Etkileşimleri

B19-Liz -3-1 inkübasyonu için;

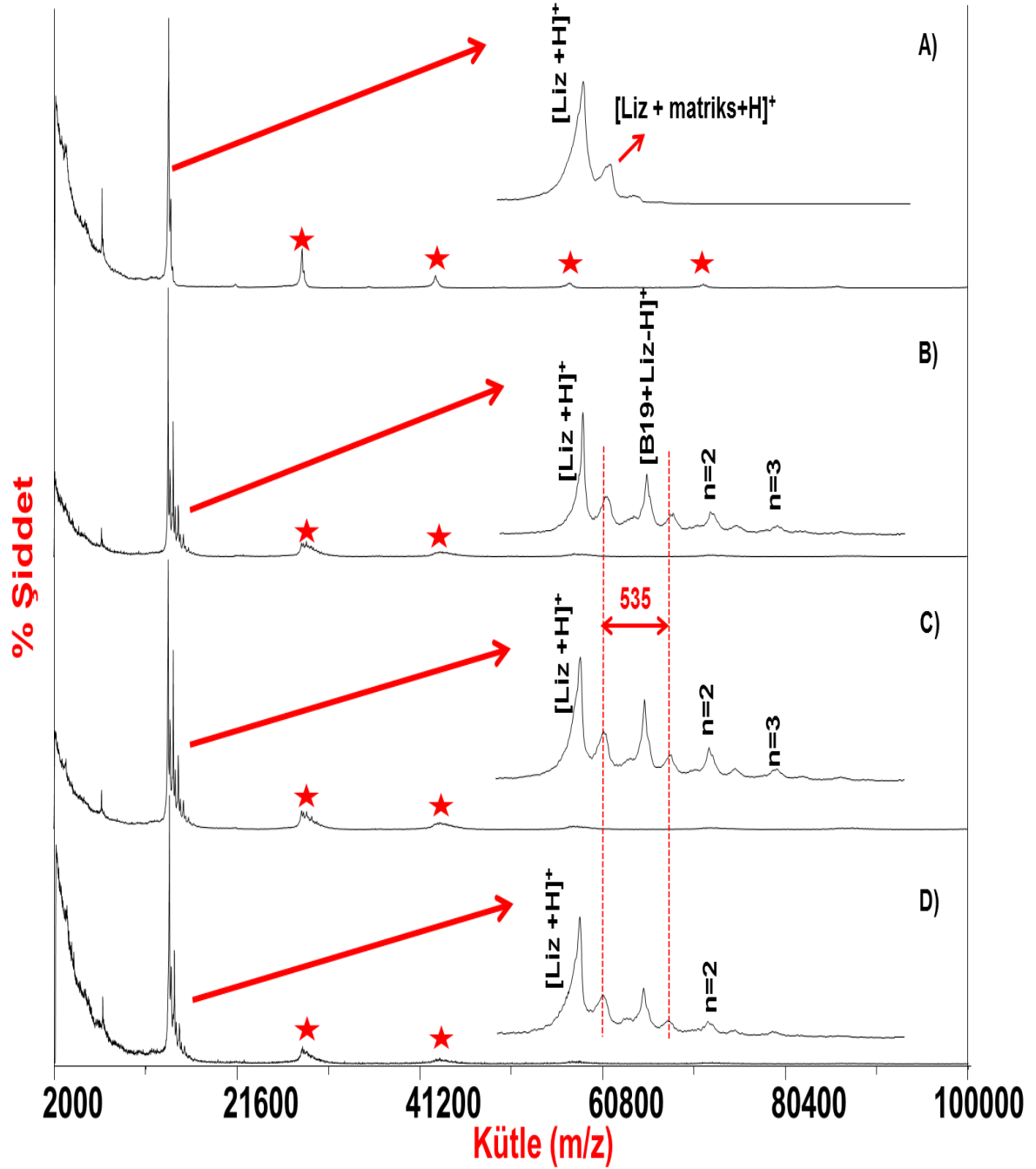
- 0.3 mM, 1 mL B19 + 0.1 mM, 1 mL Liz 37°C'de inkübe edildi.

B19-Liz-9-1 inkübasyonu için;

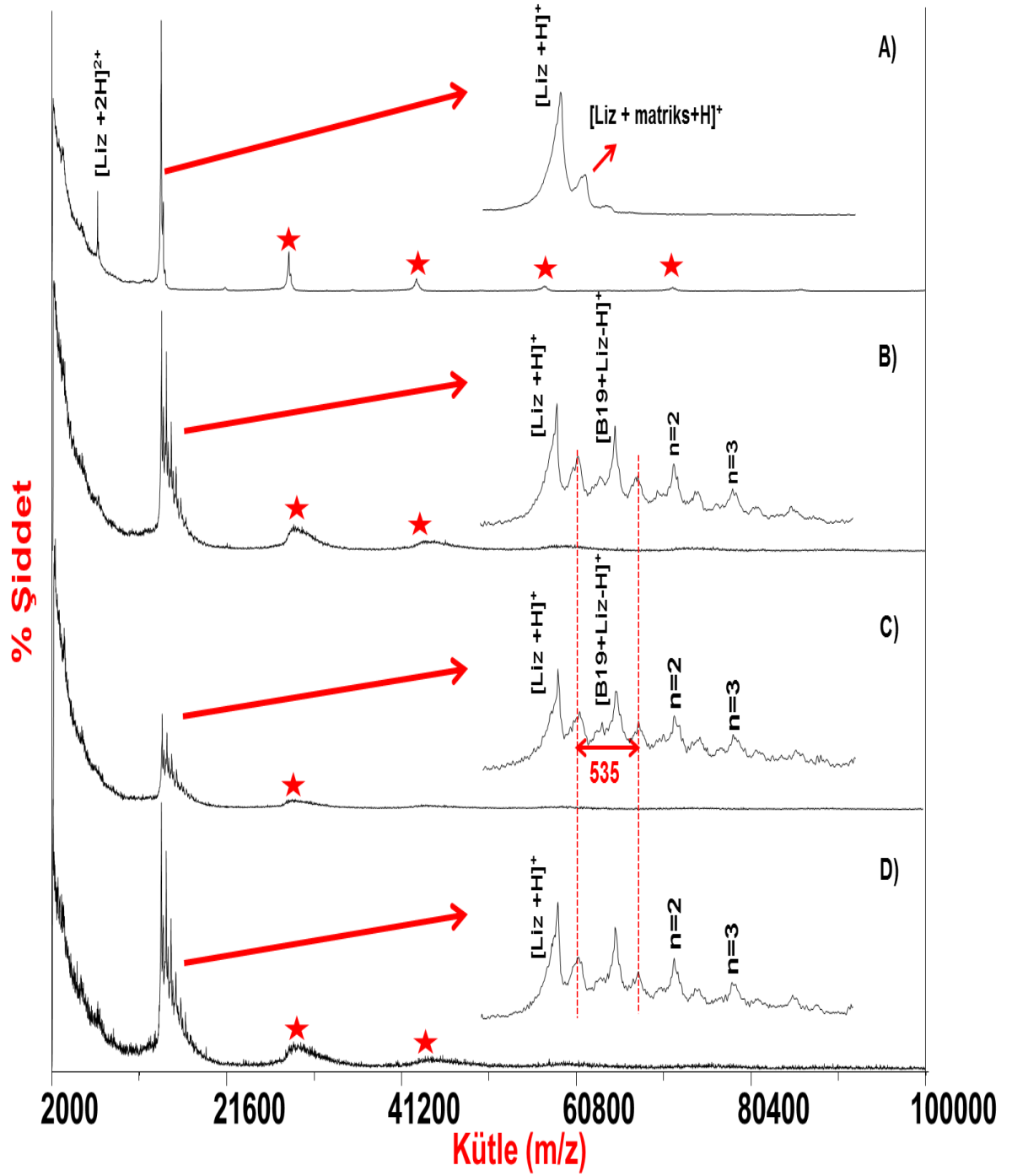
- 0.9 mM, 1 mL B19 + 0.1 mM, 1 mL Liz 37°C'de inkübe edildi.

5.6.3.1 MALDI-TOF MS Analizleri

Diğer bir serum proteini olan ve pI değeri yaklaşık 11.1 olan Lizozim (MW: 14275 Da) ile B19 molekülünün etkileşimi incelenmiştir. Şekil 5.69' da lizozim standardına ait kütle spektrumu verilmiştir. Proteinin SA matriksi kullanılarak elde edilen kütle spektrumunda oligomerleri de izlenmiştir (yıldız ile işaretlenmiştir). İnkübasyona bırakılan B19 mol oranının artırılmasının komplekse ait pik şiddetini arttırdığı izlenmiştir (Şekil 5.69C - 5.70C). İnkübasyon süresinin belirgin bir etkisi tespit edilmemiştir. Kullanılan SA matriksinin de proteinle etkileşime girdiği görülmüştür. Oluşan bu yapıya B19 bağlanması tespit edilmiştir (kesikli çizgilerle kütle farkları belirtilmiştir).



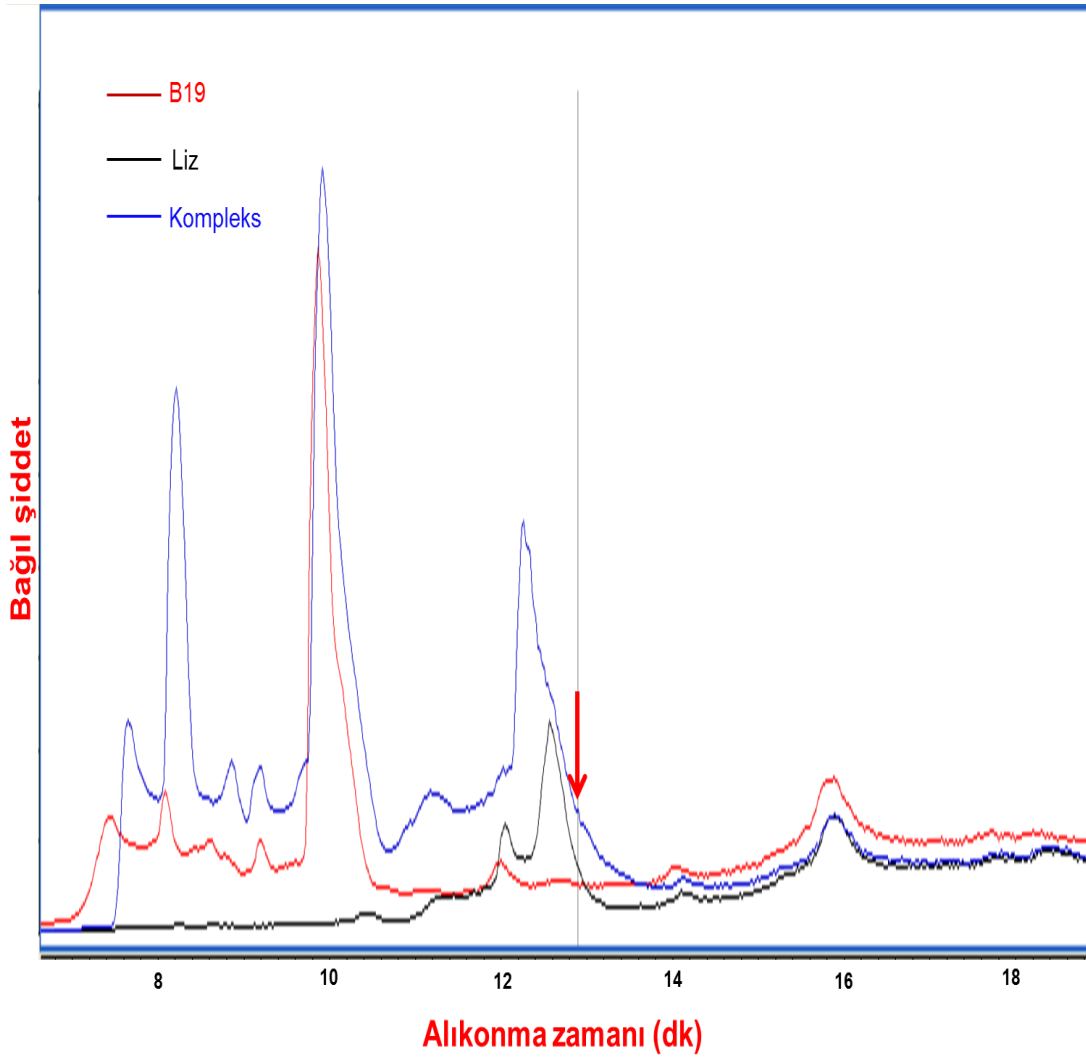
Şekil 5.69. (A) Lizozim standardının, (B) B19-liz-3-1-24 saatlik, (C) B19-liz-3-1-42 saatlik, (D) B19-liz-3-1-92 saatlik inkübasyon numunelerinin SA matriksi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (pI 11.1). Proteinin oligomerleri yıldız ile işaretlenmiştir.



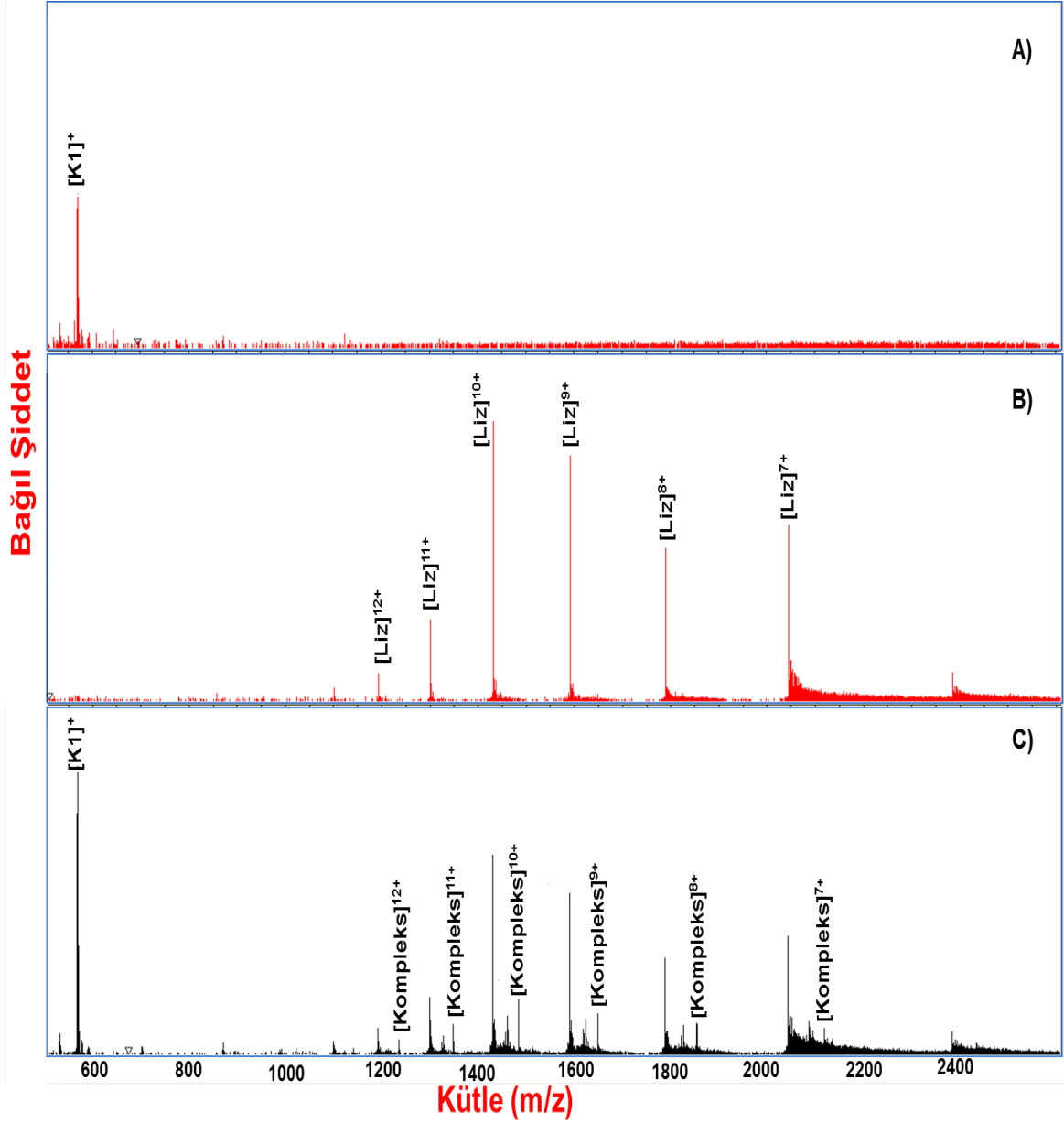
Şekil 5.70. (A) Lizozim standardının, (B) B19-liz-9-1-24 saatlik, (C) B19-liz-9-1-42 saatlik, (D) B19-liz-9-1-92 saatlik inkübasyon numunelerinin SA matrisi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu, proteinin oligomerleri yıldız ile işaretlenmiştir.

5.6.3.2 ESI-QTOF-MS Analizleri

MALDI-TOF MS' de izlenen diğeri bir kompleks olan Liz-K2 kompleksine ve bileşenlerine ait kromatogramlar Şekil 5.71'te verilmiştir. Oluşan kompleksin kromatografik ayrımının sağlanmadığı kromatogramda, $R_t=12.849$ dk'da kompleks oluşumunu ifade eden kütle spektrumu elde edilmiştir. Olası komplekslerin hesaplanan kütle/yük değerleri ile aynı değerlerde sinyal alınması K2-Liz kompleksinin varlığını desteklemiştir (Şekil 5.72).



Şekil 5.71. (A) B19, (B) Liz ve (C) B19-Liz inkübasyon numunelerine ait ESI-MS ile elde edilen toplam iyon kromatogramları



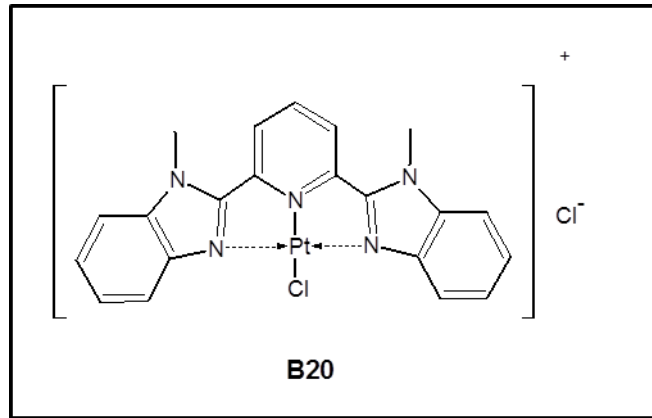
Şekil. 5.72. (A) B19, (B) Liz ve (C) B19-Liz inkübasyon numunelerinin $t=14.032$ dk'da elde edilmiş ESI-MS spektrumları

Farklı pI değerlerine sahip olan proteinlerin B19 molekülü ile kompleks oluşturabilmesi protein-B19 etkileşiminin protein uç grupları üzerinden gerçekleşmediğini göstermiştir.

5.7. Yeni İlaç Adayları ve Ön Denemeleri

Anti kanser özellik göstermesi amacıyla sentezlenen bileşiklerden B19 ile yapılan çalışmalar ışığında, sentezlenen diğer bileşiklerin MALDI-TOF MS ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ön denemeleri yapılacak olan ilaç adaylarında aranan temel özellik olan suda çözünme şartını sağlayan bileşiklerin nükleotidlerle etkileşimleri incelenmiştir.

Bu bileşiklerden ilki kloro-2,6-bis(*N*-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II) klorür molekülüdür. Şekil 5.73'te yapısı verilen bileşik, B19 molekülünden farklı olarak Pt yerine Pd içermektedir. Bu çalışma, aynı liganda sahip farklı metal ilaçların davranışları incelemek ve etkinliğin kullanılan metal atomu ile ilişkisini tespit edebilmek amacıyla yürütülmüştür. B20 olarak adlandırılan bileşiğin suda çözünürlüğünün düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle ön denemelere tabi tutulmamıştır.

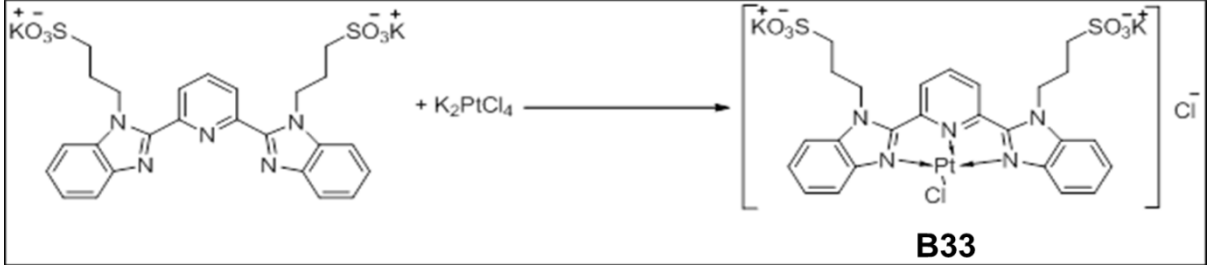


Şekil 5.73. Kloro-2,6-bis(*N*-metil-benzimidazol-2-il)piridinpaladyum(II)klorür bileşiğinin yapısı.

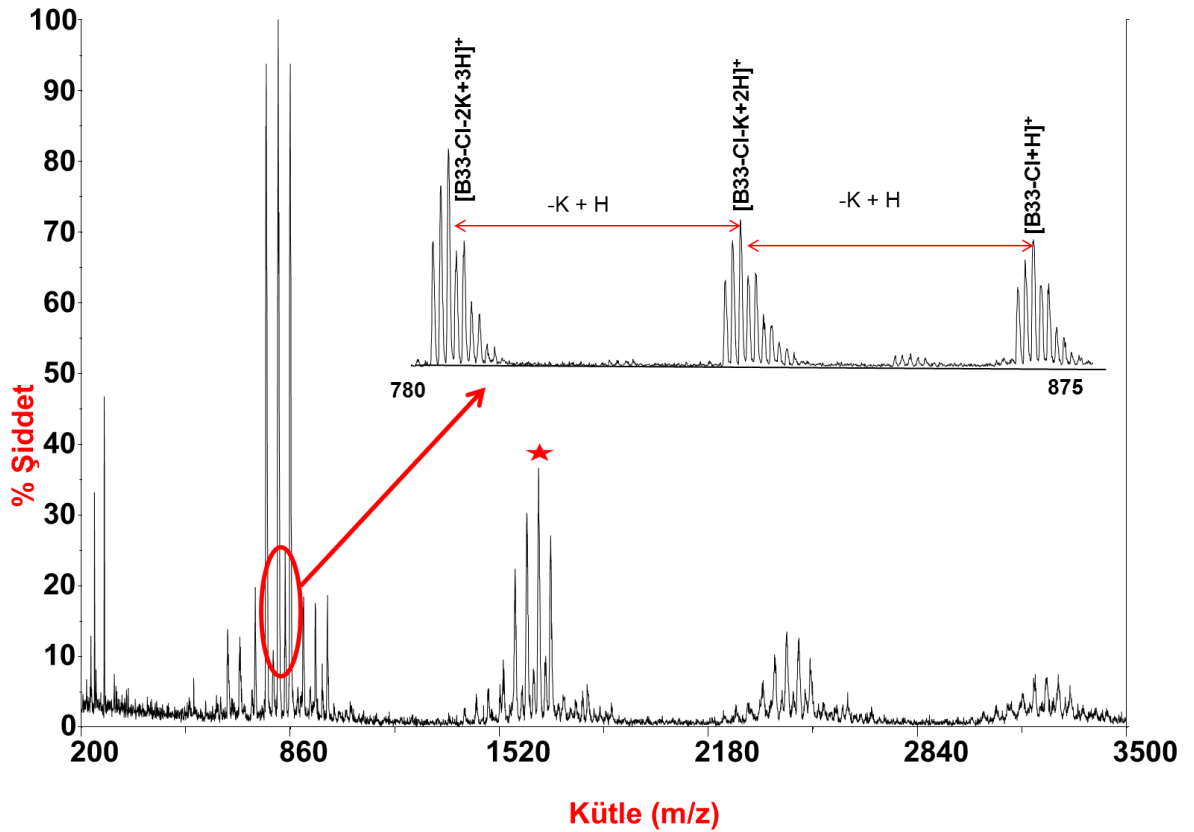
5.7.1. Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II) klorür Bileşiği (B33)

Şekil 5.74'de sentez şeması ve kimyasal yapısı verilen B33 bileşiğinin sudaki çözünürlüğünün yeterli düzeyde olduğu görüldükten sonra MALDI-TOF MS ile yapısı tayin edilmiştir. Şekil 5.75' de B33 molekülünün, DHB matrisi kullanılarak (B33:DHB, 1:5) elde edilmiş kütle spektrumu verilmiştir. Molekül formülü $C_{25}H_{23}Cl_2K_2N_5O_6PtS_2$ olarak verilen bileşiğin, bütün halinde, yapısında parçalanma/kopma gerçekleşmeksizin iyonlaşmadığı görülmüştür. m/z 861

değerinde görülen pik, iyonik halde bulunan Cl^- 'nin yapıdan ayrıldığı; m/z 823 ve 785.5 bölgesinde izlenen pik grupları ise sırasıyla yapıda ($-\text{K}^+ + \text{H}^+$) ve ($-\text{2K}^+ + \text{2H}^+$) kopma/katılmalarının gerçekleştiğini göstermiştir.

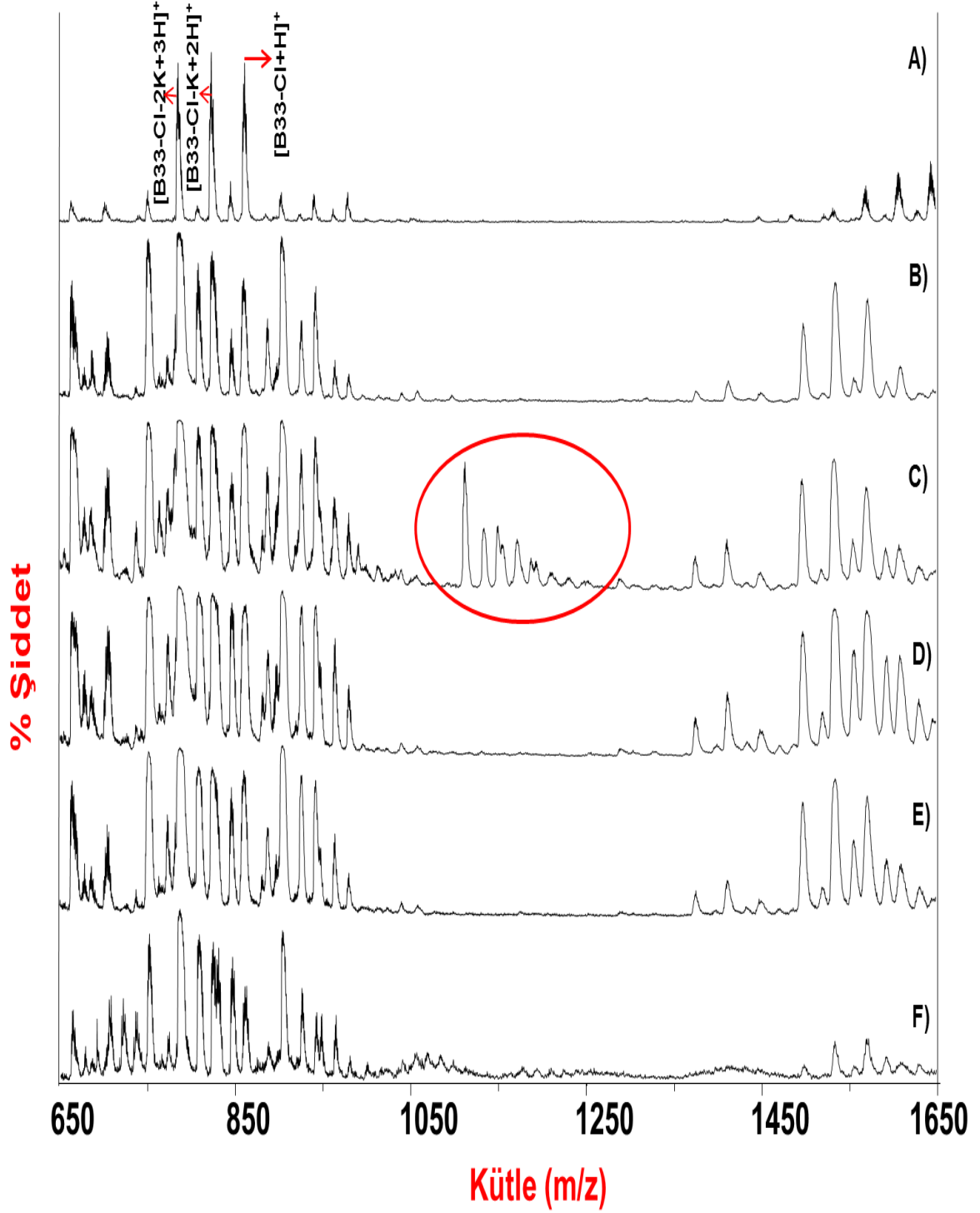


Şekil 5.74. Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II) klorür bileşiği (B33) sentez şeması.

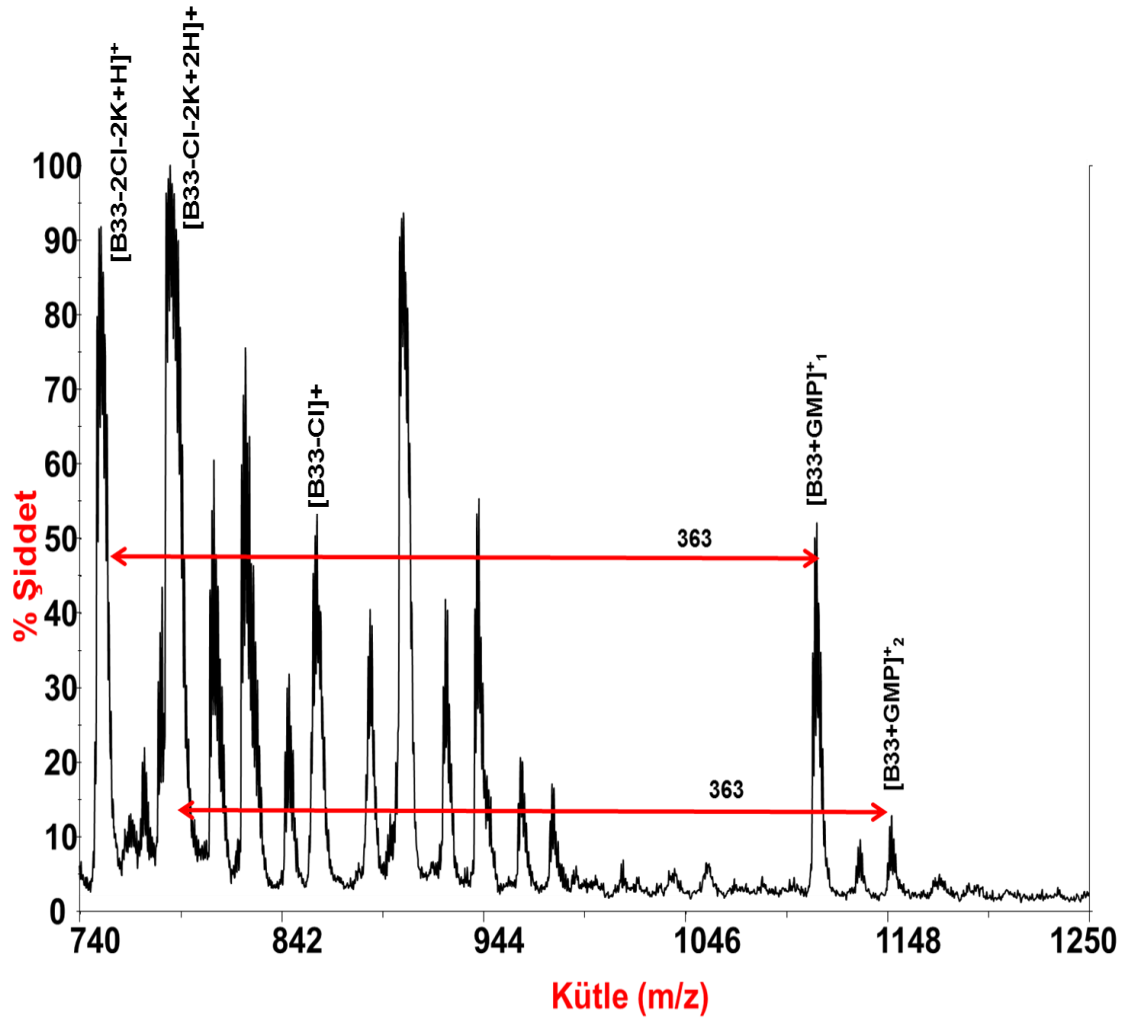


Şekil 5.75. B33 molekülünün DHB matrisi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu

B33-nükleotid bağlanmalarını incelemek amacıyla 0.25 mM, 100 µl B33, 0.25 mM 100 µl nükleotid çözeltilerinin her biri ile ayrı ayrı, 10 mM amonyum asetat tamponu ve 5 mM NaCl ortamında (pH:7.14) 12 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon mol oranı 1:1 olan çözeltiden 12 saat sonra 10 µl alınarak 50 µl DHB matrisi ile karıştırılıp vortekslenmiş ve 1 µl MALDI plate üzerine spotlanmıştır. Şekil 5.76'da B33 ile 1:1 mol oranında ayrı ayrı inkübe edilen örneklerin MALDI-MS spektrumu verilmiştir. B33 bileşiğinin kütle spektrumunda şiddetli olarak izlenen 861, 823 ve 785.5 m/z değerlerine nükleotidlerin molekül ağırlıkları ilave edilerek, oluşması beklenen komplekslerin m/z değerleri hesaplanmıştır. Yalnızca GMP'nin B33 ile kompleks yaptığı görülmüştür. Diğer dört nükleotidin B33 ile etkileşimi tespit edilmemiştir. Şekil 5.76C'de B33-GMP kompleksine ait pikler daire içine alınmıştır. Oluşan komplekslerin yapılarına bakıldığında, **[B33+GMP]⁺₁** ve **[B33+GMP]⁺₂**, en yüksek oranda oluşan kompleksin, B33 yapısından 2Cl atomunun da ayrıldığı durumda elde edildiği görülmüştür (Şekil 5.77).



Şekil 5.76. (A) Saf B33 molekülüne ait, (B) AMP , (C) GMP, (D) CMP, (E) TMP, (F) UMP ile B33 molekülünün 37°C 'de 12 saat inkübasyonu sonucu elde edilen karışımının DHB matriksi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (inkübasyon mol oranı:1:1)

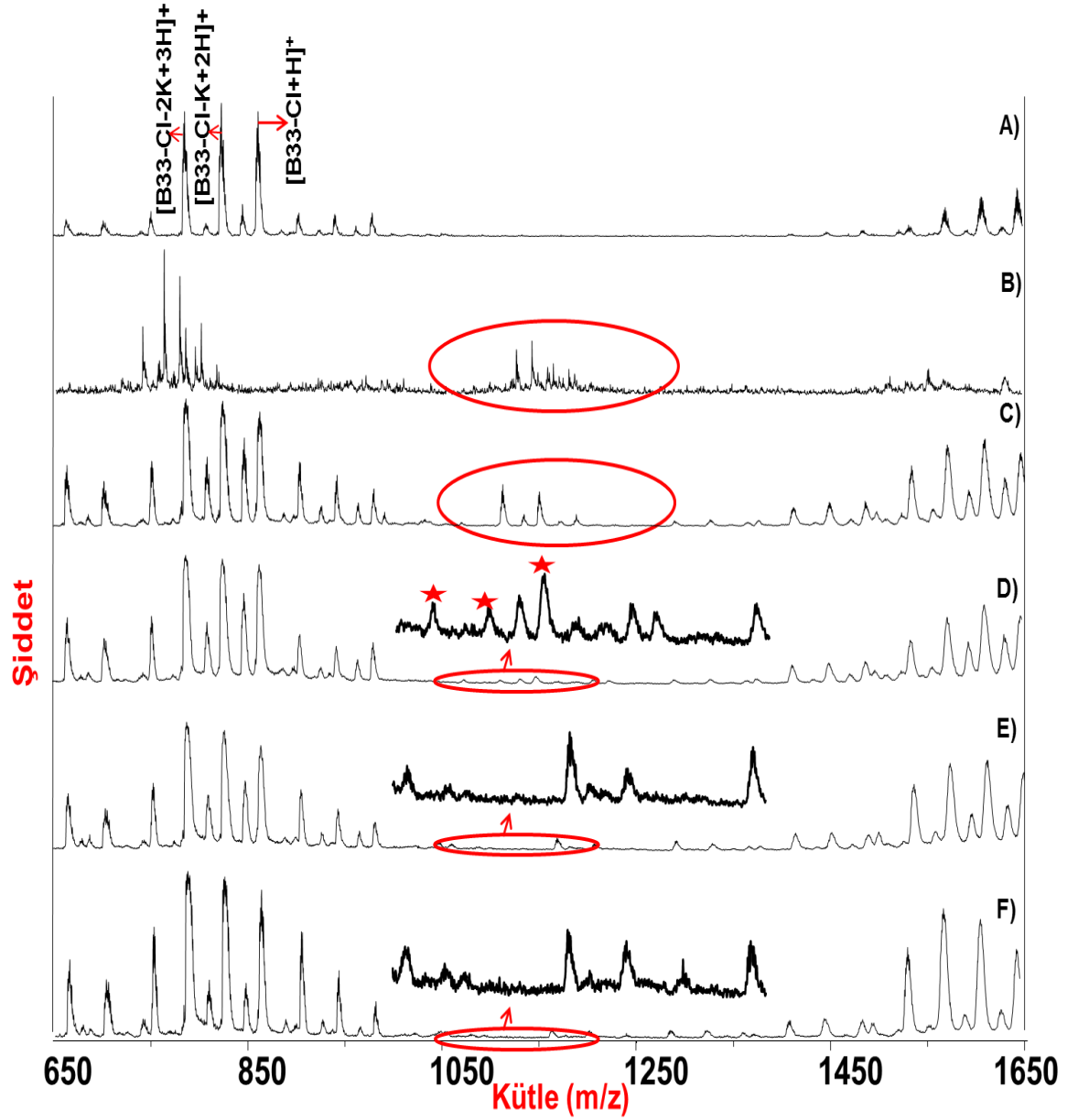


Şekil 5.77. B33-GMP kompleksine ait MALDI-TOF MS spektrumu

B19 molekülü ile yapılan çalışmalarda inkübasyon mol oranının kompleks oluşumu üzerinde etkisi olduğu tespit edildiğinden, inkübasyona konulan nükleotidin mol sayısı 20 kat artırılarak yeni inkübasyon seti oluşturulmuştur.

0.25 mM, 100 µl B33, 5 mM 100 µl nükleotid çözeltilerinin her biri ile ayrı ayrı, 10 mM amonyum asetat tamponu ve 5 mM NaCl ortamında (pH:7.14) 7 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon mol oranı 1:20 olan çözeltilerden 7 saat sonra 10 µl alınarak 50 µl DHB matriksi ile karıştırılıp vortekslenmiş ve 1 µl MALDI plate üzerine spotlanmıştır. Şekil 5.78'de B33 ve 1:20 mol oranlı inkübasyon çözeltilerinin MALDI-TOF MS spektrumu verilmiştir. İnkübe edilen oligonükleotidlerden AMP, GMP ve CMP'nin B33 ile etkileşime

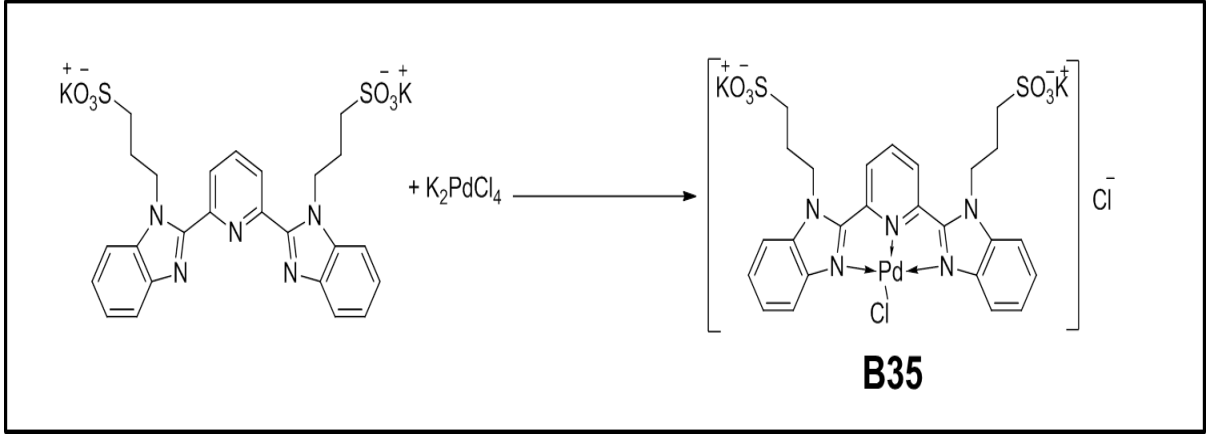
girdiği tespit edilmiştir (Şekil 5.78B-D). TMP ve UMP inkübasyonlarında elde edilen spektrumlarda, incelenen bölgede bazı pikler görülmüş ancak tanımlanamamıştır. Bu nedenle yalnızca AMP, GMP ve CMP komplekslerinin varlığı izlenmiştir. CMP-B33 kompleksleri yıldız işareti ile belirtilmiştir.



Şekil 5.78. (A) Saf B33 molekülüne ait, (B) AMP, (C) GMP, (D) CMP, (E) TMP, (F) UMP ile B33 molekülünün 37°C 'de 7 saat inkübasyonu sonucu elde edilen karışımının DHB matriksi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (inkübasyon mol oranı:1:20). AMP/ GMP- B33 komplekslerinin bulunduğu bölge daire içine alınmıştır.CMP-B33 kompleksleri yıldız işareti ile belirtilmiştir.

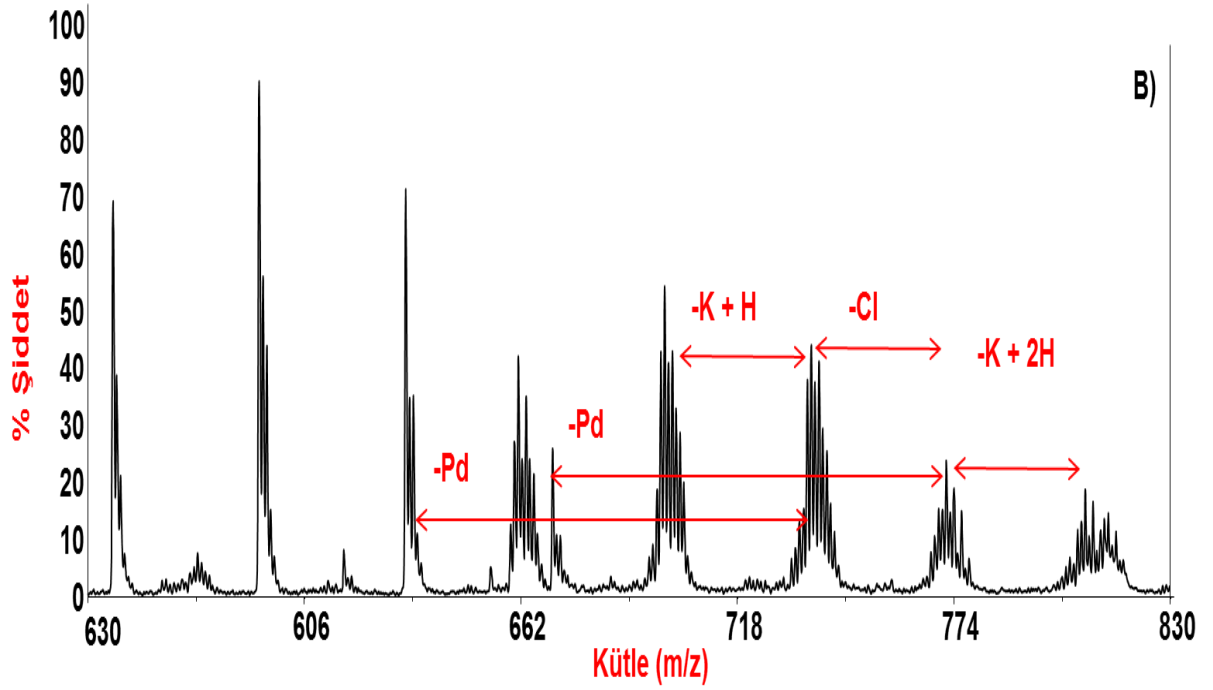
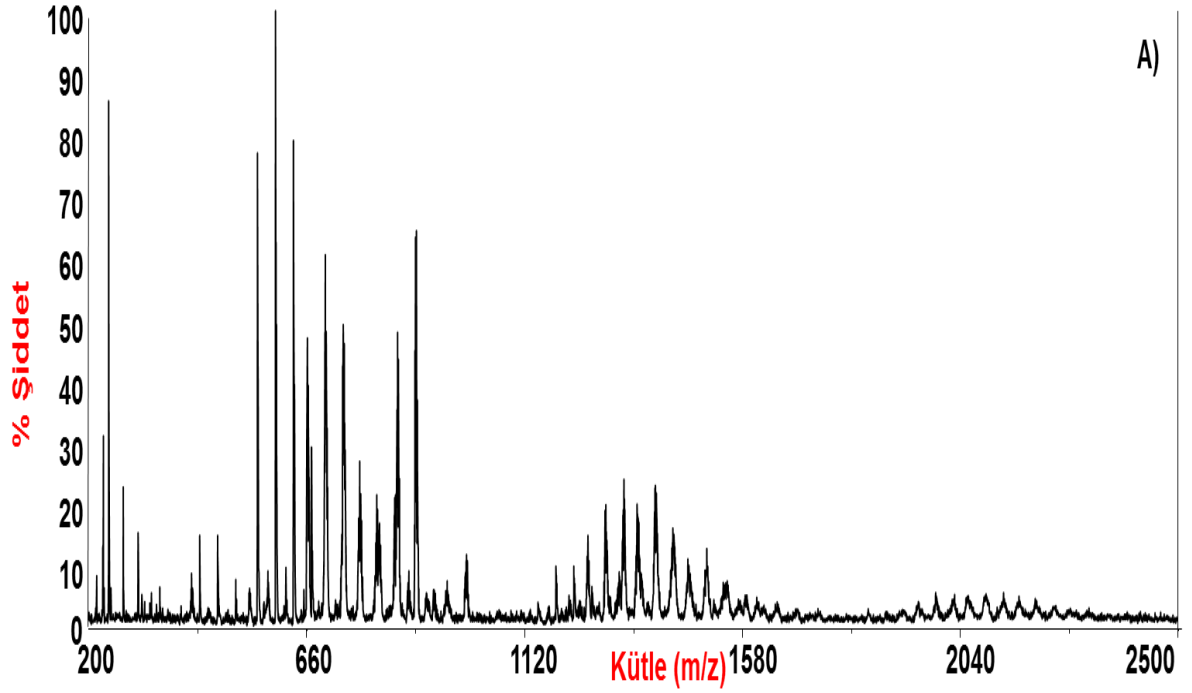
5.7.2. Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-İ) piridinpaladyum(II) klorür Bileşiği, B35.

Şekil 5.79'da B35 bileşiğinin sentez şeması ve kimyasal yapısı verilmiştir. B33 bileşiği ile aynı ligand ancak farklı metalden oluşan bileşiğin sudaki çözünürlüğünün yeterli düzeyde olduğu görüldükten sonra MALDI-TOF MS ile yapısı tayin edilmiştir.

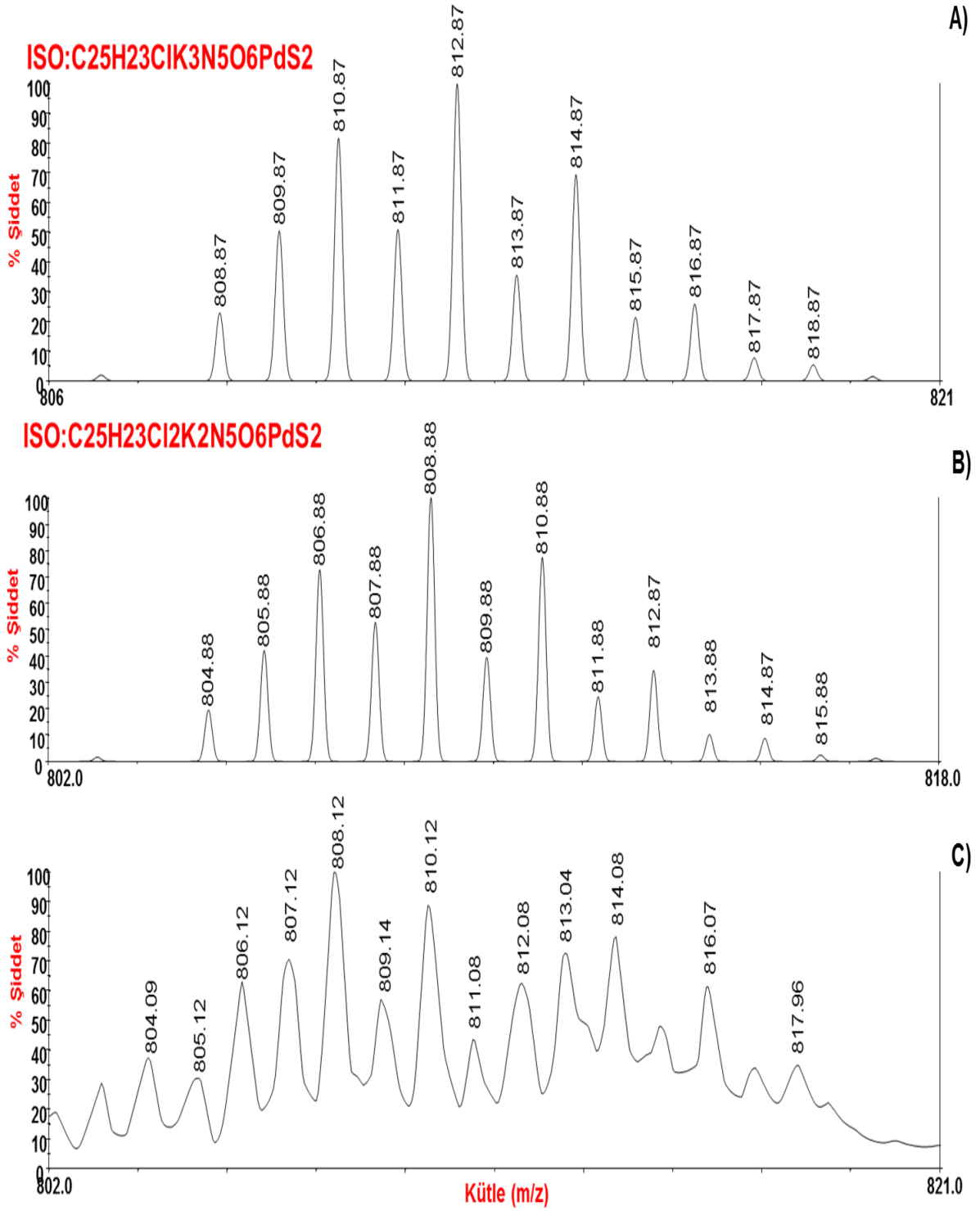


Şekil 5.79. Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-İ)piridinpaladyum(II) klorür, B35

Şekil 5.80'de B35 molekülünün, DHB matrisi kullanılarak (B35:DHB, 1:5) elde edilmiş kütle spektrumu verilmiştir. Molekül formülü C₂₅H₂₃Cl₂K₂N₅O₆PdS₂ olarak verilen bileşiğin, bütün halinde iyonlaşabildiği görülmüştür. m/z 804-818 aralığında görülen pik grubunun, yapının bütün halde iyonlaştığı durum ile [B35 -Cl+K]⁺ mekanizması ile iyonlaştığı durumda oluşabileceği düşünölmüştür. Bu iyonlaşma şekillerine ait cihazda hesaplanan teorik değer ve deneysel sonuç Şekil 5.81'de karşılaştırılmıştır. Deneysel sonucun (5.81C), Şekil 5.81A ve B 'de verilen piklerin bileşiminden oluştuğu tespit edilmiştir. Yani yapının hem bütün halde hem de klor kaybederek iyonlaşabildiği görülmüştür. Diğer iyonlaşma mekanizmaları Şekil 5.80B'de gösterilmiştir. Yapıdan bir potasyum kopmasından sonra Pd atomunun da ayrılabilirdiği tespit edilmiştir.



Şekil 5.80. B35 bileşiğinin (A) DHB matrisi ile elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu, (B) genişletilmiş kütle spektrumu



Şekil 5.81. B35 molekülünün (A) B35-Cl+K, teorik , (B) bütün halde, teorik, (C) DHB matriksi kullanılarak elde edilen MALDI-TOF MS deneysel spektrumu

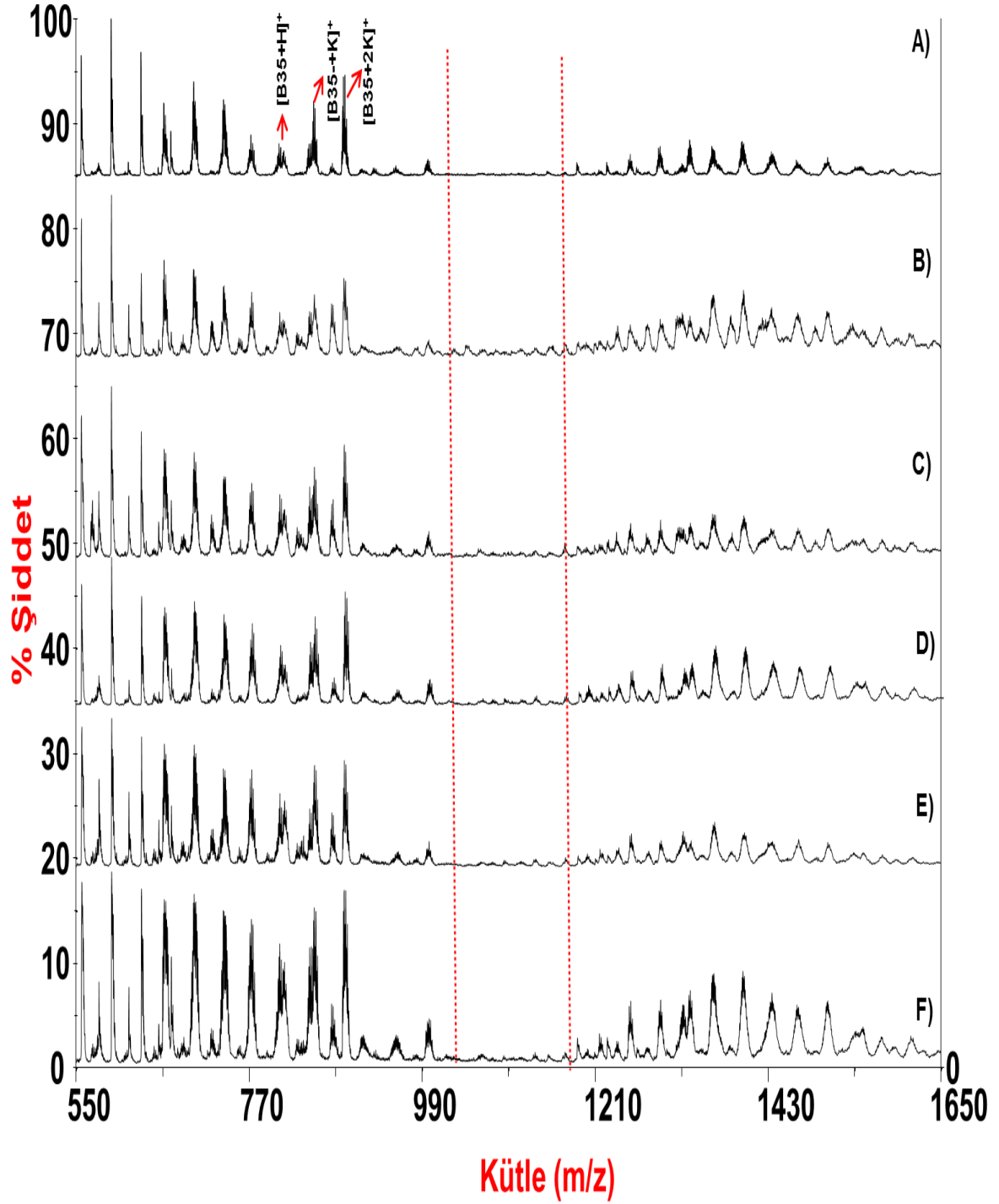
B35-nükleotid bağlanmalarını incelemek amacıyla, inkübasyon mol oranı 1:1 ve 1:20 olan inkübasyon deney setleri hazırlanmıştır. Her bir nükleotid ayrı ayrı B35 ile inkübe edilmiştir (10 mM amonyum asetat tamponu ve 5 mM NaCl ortamında).

- 0.25 mM, 100 µl B35, 0.25 mM 100 µl nükleotid (12 saat)
- 0.25 mM, 100 µl B35, 5 mM 100 µl nükleotid (7saat)

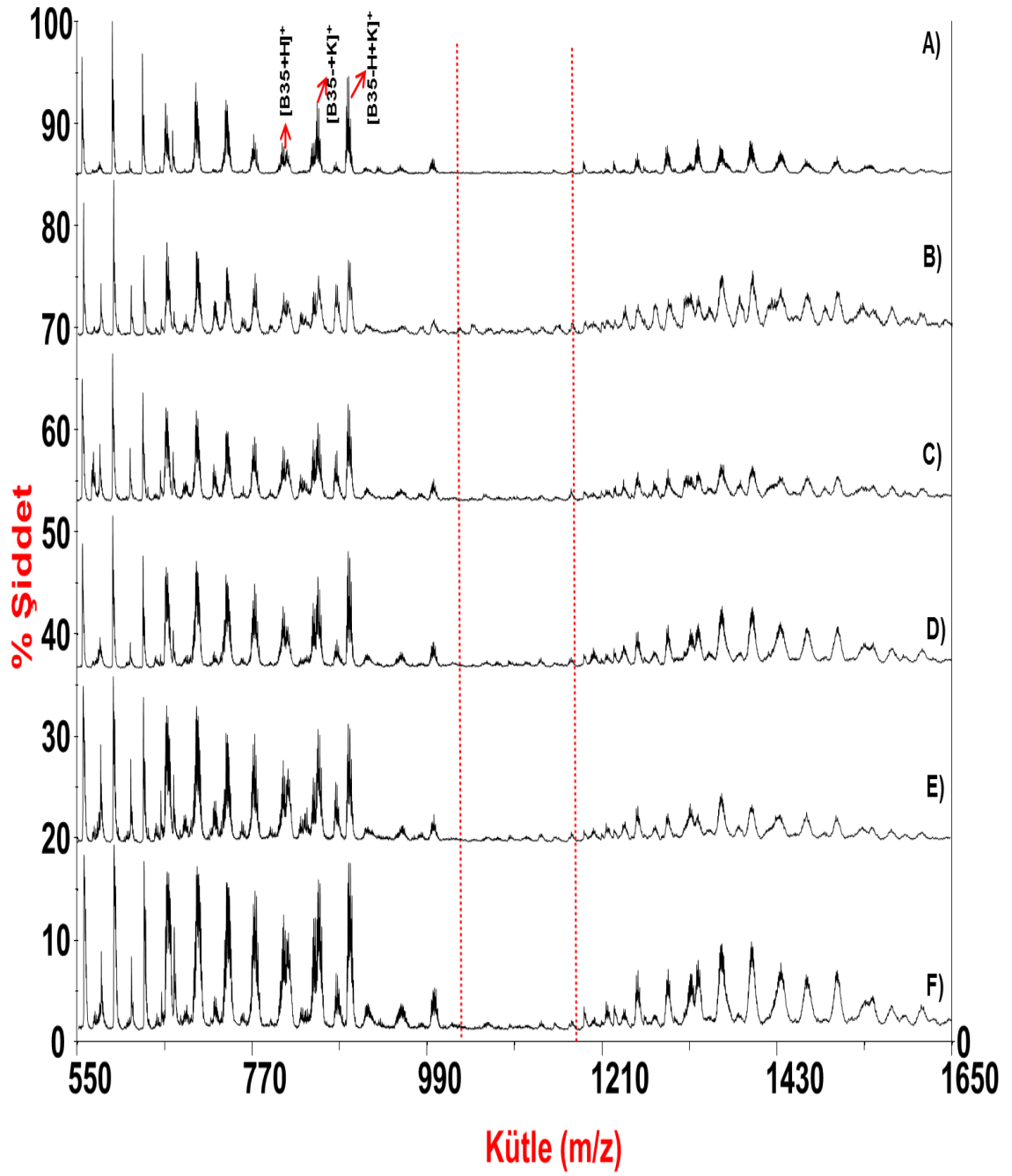
İnkübasyon çözeltileri 1:5 oranında DHB matriksi ile karıştırılıp, vortekslenmiş ve 1 µl MALDI plate üzerine spotlanmıştır.

Şekil 5.82 ve 5.83'de her iki mol oranındaki inkübasyon çözeltilerine ait kütle spektrumları, B35 'in kütle spektrumu ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Kompleks oluşumu durumunda pik elde edilmesi gereken bölgeler kesikli çizgiler arasına alınarak belirtilmiştir. Bu bölgede gürültü pikleri dışında, anlamlı kütleler tespit edilmemiştir. Bu durum B35 ile nükleotidlerin etkileşime girmediğini göstermiştir.

Elde edilen bu sonuçlar, literatürde palladyum içeren komplekslerin (ilaç adaylarının) çabuk hidroliz olduğu, çözelti fazında çabuk parçalanarak çok reaktif ancak hedef moleküllerle etkileşemeyen parçalanma ürünlerine dönüştüğü bilgisini doğrulamıştır [194].



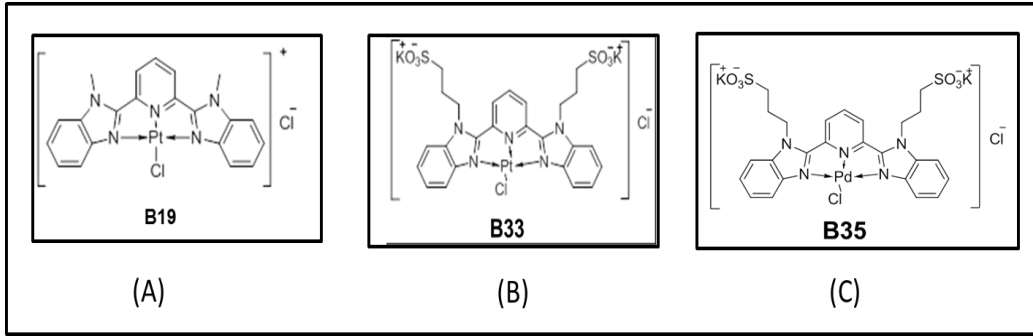
Şekil 5.82. (A) Saf B35 molekülüne ait, (B) AMP, (C) GMP, (D) CMP, (E) TMP, (F) UMP ile B35 molekülünün 37°C 'de 12 saat inkübasyonu sonucu elde edilen karışımının DHB matrisi kullanılarak elde edilmiş MALDI-TOF MS spektrumu (inkübasyon mol oranı:1:1). Kompleks oluşumu durumunda pik elde edilmesi gereken bölgeler kesikli çizgiler arasında alınarak belirtilmiştir.



Şekil 5.83. (A) Saf B35 molekülüne ait , (B) AMP , (C) GMP, (D) CMP, (E) TMP, (F) UMP ile B35 molekülünün 37°C 'de 7 saat inkübasyonu sonucu elde edilen karışımının DHB matrisi kullanılarak elde edilmiş MALDI-MS spektrumu (inkübasyon mol oranı:1:20). Kompleks oluşumu durumunda pik elde edilmesi gereken bölgeler kesikli çizgiler arasına alınarak belirtilmiştir.

5.8. B19, B33 ve B35 Moleküllerin Antikanser Aktivitelerinin Belirlenmesi

B19 molekülü ile yapılan nükleotid, oligonükleotid, GSH ve protein etkileşimleri ve B33 molekülü ile yapılan nükleotid etkileşimleri çalışmalarında elde edilen uygun sonuçlar, söz konusu moleküllerin sağlıklı ve kanserli hücre hatları üzerindeki etkilerinin de incelenmesi gerektiğini düşündürmüştür. Farklı metallere aynı ligand bağlanması ile elde edilen moleküllerin, hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla B35 molekülü de sitotoksikite denemelerine tabi tutulmuştur.



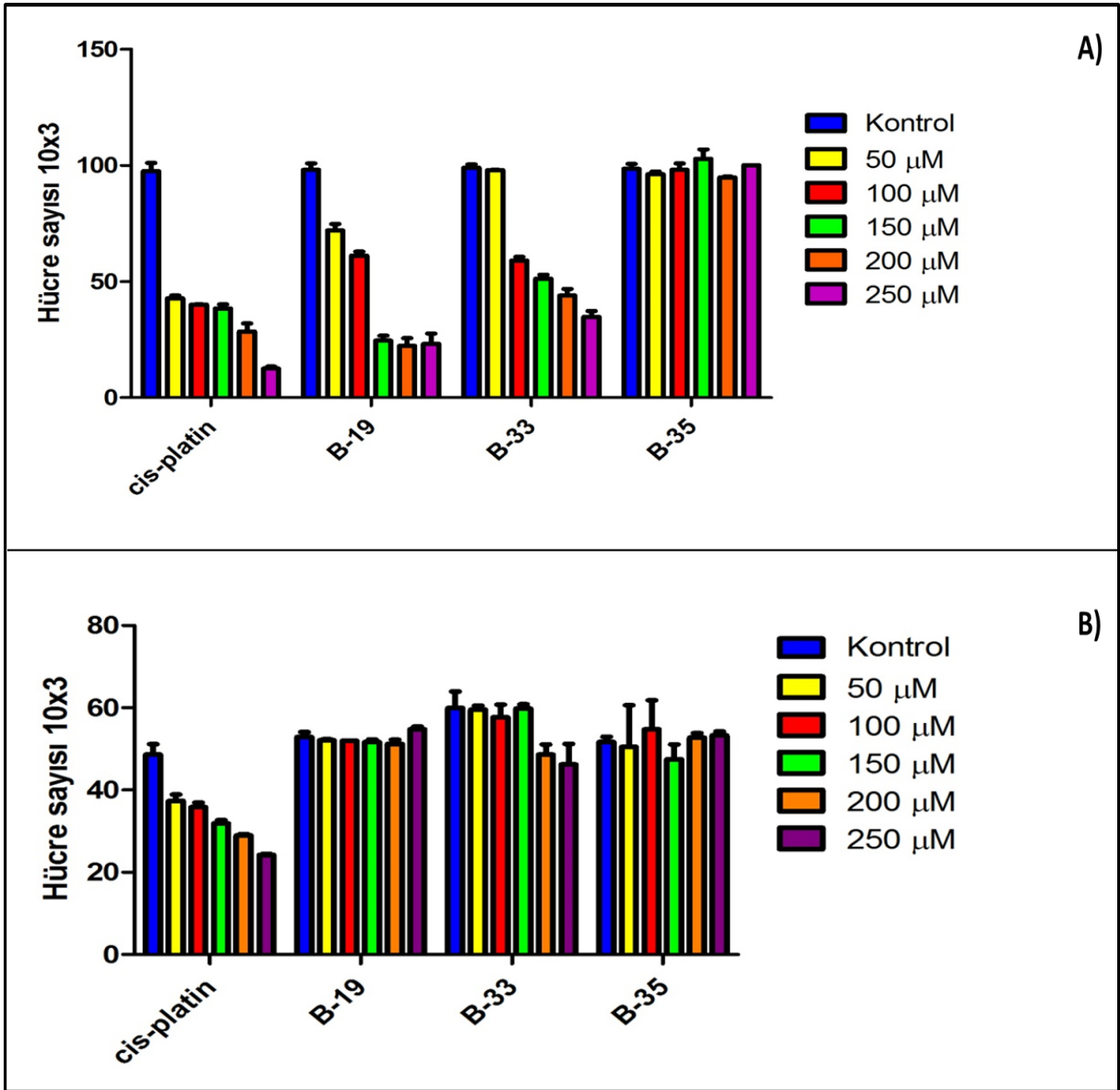
Şekil 5.84. (A) Kloro-2,6-bis (N-metil-benzimidazol-2-il) piridinplatin(II)klorür; B19, (B) Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)klorür; B33, (C) Kloro-2,6-bis(1,3-propilsülfonat-benzimidazol-2-il) piridinpaladyum(II)klorür; B35 moleküllerinin kimyasal yapıları

Şekil 5.84'te kimyasal yapıları verilen bu bileşiklerin hücre büyümesi üzerine olan etkisi hesaplanarak % 50 hücre büyümesini engelleyen bileşik derişimi (IC_{50}) hesaplanmıştır (çizelge 5.5).

Çizelge 5.5. Cisplatin, B19, B33, B35 moleküllerinin hesaplanan IC_{50} değerleri.

	IC_{50} (μM)
Cisplatin	104,8
B19	131,9
B33	181,4
B35	GY

GY: Gözlem yapılamadı.



Şekil 5.85. Cisplatin ve türevlerinin (A) PC-3 Prostat kanseri hücre hattı ve (B) Normal prostat hücre hattı PNT1A üzerine etkisi.

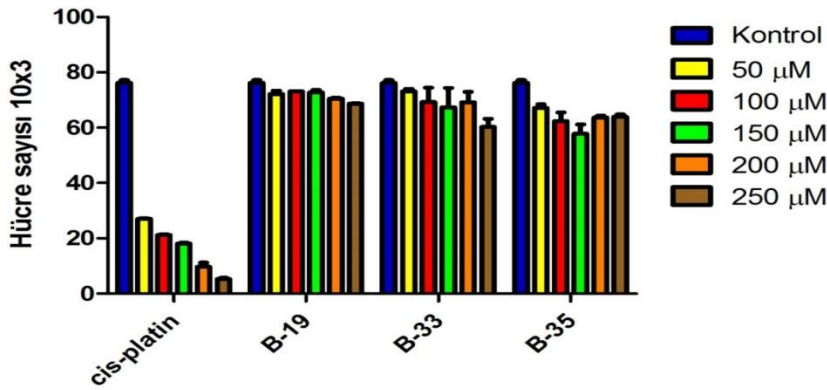
CDDP ve ilaç adayları için verilen IC_{50} değerlerine bakıldığında B19 moleküllerinin CDDP ile yarışabilecek seviyede toksik etki gösterdiği, Şekil 5.92A'da verilen canlı hücre sayısı-derişimi bar grafiğine bakıldığında 150-200 μM 'lık ilaç uygulandığında B19'un CDDP'den daha fazla kanserli hücre ölümüne sebep olduğu izlenmiştir. Normal Prostat Hücre hattı PNT1A üzerinde yapılan deneylerde CDDP'nin sağlıklı hücreleri öldürme oranının B19'dan fazla olduğu bulunmuştur. Bu durum B19'un

IC₅₀ değeri Cisplatinden fazla olsa bile antikanser olarak kullanılabilme ihtimalini desteklemiştir.

B33 molekülünün hesaplanan IC₅₀ değeri, CDDP'den yüksek olmasına rağmen, normal prostat hücre hattı PNT1A üzerine etkisine bakıldığında bu derişimdeki ilacın sağlıklı hücreleri öldürme oranının CDDP'den daha düşük olduğu bulunmuştur. B35 molekülünün kanserli ve normal prostat hücreleri üzerine etkisi izlenmemiştir. Bu nedenle B35 molekülü ileri çalışmalarda kullanılmamıştır.

Sitotoksosite testi antikanser aktivitesini belirleyen tek parametre olmadığından, ileri çalışmalarda, B19 ve B33 moleküllerinin PC-3 hatlarında DNA sentez inhibisyonuna etkilerinin tespit edilerek antiproliferatif aktivitelerinin (yayıma önleyici) hesaplanması gerektiği düşünülmüştür.

Şekil 5.86'da ilaç adayları ve CDDP'nin tümörlü A549 hücre hattı üzerindeki etkisi gösterilmiştir. İlaç adaylarının hiç birisinin A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösteremediği tespit edilmiştir. Bu nedenle sağlıklı A549 hücre hatları ile deneme yapılmamıştır. B35 molekülünün hem PC-3 hem de A549 hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterememesinin, MALDI-MS analizinde tespit edilen, palladyum atomunun yapıdan ayrılması ve bileşiğin hiçbir formunun nükleotidlerle kompleks yapmaması ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür. Bu iki sonucun birbirini destekler nitelikte olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.86. Cisplatin ve türevlerinin akciğer kanseri hücre hattı A-549 üzerine etkisi.

6. TOPLU SONUÇLAR

Bu tez kapsamında, “Kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il) piridinplatin(II) klorür” molekülünün (B19), ESI-QTOF-MS ve MALDI-TOF MS teknikleri ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir ve *in vitro* ortamda biyomoleküllerle etkileşimleri kütle spektrometrisi kullanılarak detaylı olarak incelenmiştir. B19 molekülünün türevi olan B33 ve B35 molekülleri MALDI-TOF MS’de karakterize edilmiş ve nükleotidlerle etkileşimleri incelenmiştir. Söz konusu yapıların PC3 prostat ve A549 akciğer kanseri hücre hatlarında anti kanser aktiviteleri test edilmiştir.

- B19 molekülü THAP, DHB, ATT, CHCA, 3-HPA matriksleri kullanılarak MALDI-TOF MS’de analiz edilmiştir. Söz konusu bu matrikslerin hepsi ile anlamlı spektrumlar elde edilebilmiştir. DHB matriksi ile elde edilen spektrumlarda ayırıcılık ve S/N oranının daha yüksek olması sebebiyle ileri analizlerde DHB matriksinin kullanılması uygun görülmüştür.
- İyonik halde bulunan [B19-Cl]⁺ yapısının MALDI-TOF MS sisteminde elde edilen teorik ve deneysel spektrumları karşılaştırılmış, herhangi bir transfer olmaksızın iyonlaştığı tespit edilmiştir.
- [B19-2Cl]⁺² iyonuna DHB matriksinden H⁺ transferi ve MALDI tabakası-matriks ara yüzeyinden 2e⁻ katılımı ile tek yüklü iyon oluşumu gerçekleştiği bulunmuştur.
- Deneysel ESI-MS spektrumları ve teorik sonuçlar karşılaştırılmış, [B19-2Cl]⁺² yapısının proton vererek iyonlaştığı tespit edilmiştir.
- AMP, GMP, CMP, UMP ve TMP nükleotidlerinin MALDI-TOF MS ile analizi için uygun matriks seçimi denemeleri yapılmıştır. Her bir nükleotid THAP, DHB, ATT, CHCA, 3-HPA matriksleri kullanılarak MALDI-TOF MS’de analiz edilmiştir. En uygun matriksin DHB olduğu tespit edilmiştir.
- MALDI-TOF MS ile UMP negatif diğer nükleotidler ise pozitif iyonlaşma modunda izlenebilmiştir.
- ESI-MS Analizleri için şartlar optimize edilmiş ve parçalayıcı voltaj değeri nükleotidler ve B19 yapısı için 175 V, akış hızı 0.5 µl /dk olarak belirlenmiştir.

- Yapılan ilk denemelerde tüm nükleotidlerin K2 formundaki B19 ile kompleks oluşturduğu ve 3-HPA matriksi hariç tüm matrikslerin K2 komplekslerini izlemeye kullanılabileceği görülmüştür.
- B19-nükleotid kompleksleri MALDI-TOF MS'te pozitif iyonlaşma modunda tayin edilmiştir.
- DHB matriksi; B19, oligonükleotid ve komplekslerin analizinde ortak ve tek matriks olarak seçilmiştir.
- MALDI-TOF MS çalışmaları sonucu elde edilen deneysel ve teorik spektrumların uyum içinde olduğu, negatif yüklü nükleotidler ile $[B19-2Cl]^{+2}$ molekülünün etkileşimi ile oluşan pozitif yüklü kompleksin, herhangi bir H^+ transferine gerek olmadan, doğrudan iyonlaştığı tespit edilmiştir.
- Nükleotid: B19 mol oranı 30:1 olduğu durumda kompleks oluşumunun 24 saate tamamlandığı, inkübasyon süresinin 46 saate uzatılmasının komplekslere ait kütle/yük sinyallerinde bir artışa sebep olmadığı görülmüştür.
- B19:nükleotid mol oranı 1:30 olan çözeltiler 24 saat inkübe edildikten sonra, inkübasyon çözeltilerinin ESI-MS ile de analizi yapılmış ve tüm nükleotidlerin B19 ile kompleks oluşumu iyon seçimli modda tespit edilmiştir.
- Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen spektrumlar sentezlenmiş olan B19 molekülünün antikanser ilaç aday olma şartlarından en önemlisi olan DNA baz birimleriyle etkileşime girme zorunluluğunu sağladığını göstermiştir.
- *In vivo* hücre ortamını taklit etmek amacıyla 5 mM NaCl ortamında, tampon olarak amonyum bikarbonat kullanılmış, mol oranı 1:1 de sabit tutularak, özgün etkileşimlerin varlığı incelenmiştir. Yalnızca AK ve GK komplekslerinin varlığı net olarak tespit edilebilmiştir. 3 ve 24 saatlik inkübasyon sürelerinin kompleks oluşumuna belirgin bir etkisi olmadığı görülmüştür.
- *In vitro* çalışmalarda hücre içi ortam şartlarını sağlayan çalışmalarda olumlu sonuçlar alınması üzerine, hücre dışı ortamı temsil eden 100 mM NaCl ortamında spesifik etkileşim kompleks oluşumu incelenmiştir. Yalnızca AK kompleksini temsil eden m/z değerinde zayıf sinyal elde edilmiştir. Diğer

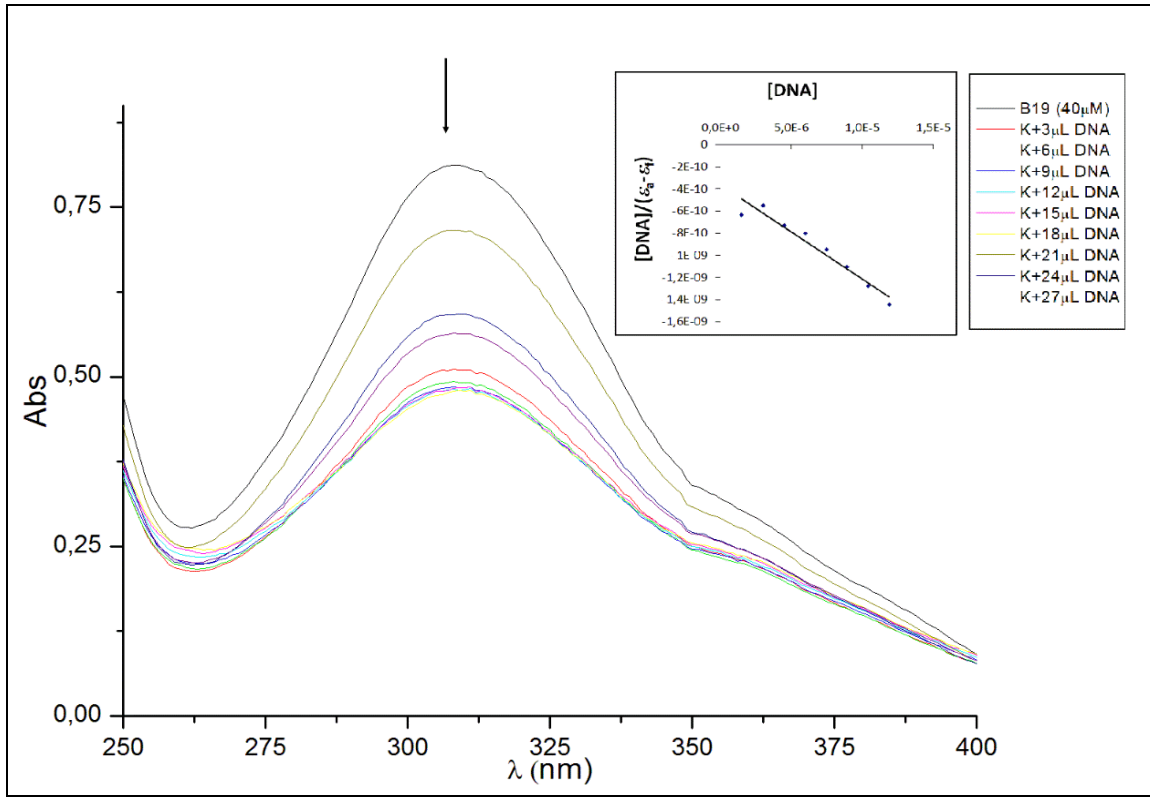
nükleotidlerle pik alınamaması B19 ile kompleks oluşturmadıklarını göstermiştir.

- Yarışmalı inkübasyonda, GMP ve AMP ile etkileşiminin diğer oligonükleotidlerle olan etkileşimlerden hızlı olduğu, TMP, UMP ve CMP ile etkileşiminin yavaş da olsa tayin edilebilir ölçüde kompleks oluşturduğu tespit edilmiştir.
- B19 ile özgün etkileşime giren ve 1:1 mol oranından itibaren kompleks yapabilen nükleotidin GMP olduğu tespit edilmiştir. Ardından AMP sonra TMP ve UMP geldiği belirlenmiştir. Minimum etkileşimin ise CMP ile olduğu kütle spektrometrik olarak belirlenmiştir.
- GK ve AK komplekslerin anlık etkileşimlerinin, oda şartlarında dahi kompleks oluşumuna sebep olduğu bulunmuştur.
- Bileşenlerin ESI-MS ile elde edilen kütle spektrumları ve B19 kalibrasyon eğrisi değerlendirilmiş, GMP dışında, dört saatlik inkübasyon sonrası hem 1:1 hem de 1:20 mol oranındaki inkübasyonlarda diğer nükleotidlerin miktarında değişim olmaması, dört saatlik inkübasyon süresinin yalnızca B19-GMP kompleksinin oluşumu için yeterli olduğunu göstermiştir.
- GSH peptidi ve bu peptidin B19 ile yapmış olduğu kompleks MALDI-TOF MS ile tayin edilmiştir. Inkübasyon süresinin uzatılmasının kompleks oluşumunu negatif yönde etkilediği tespit edilmiştir.
- Farklı baz dizilimine sahip 3 adet oligonükleotid zinciri (ON1, ON2, ON3) pozitif iyonlaşma modunda, DHB matriksi kullanılarak MALDI-TOF MS sisteminde analiz edilmiştir.
- ON1, ON2, ON3 oligonükleotidleri B19 ile inkübe edilmiş ve kompleks oluşumları MALDI-TOF MS ile tespit edilmiştir. Kompleks oluşumunun baz diziliminden bağımsız olduğu bulunmuştur. ON1 oligonükleotidinin iki adet B19 ile etkileşime girebilmesi B19'un cisplatinden farklı olarak DNA ile etkileşime girebildiğini göstermiştir.
- GSH ve ON1 oligonükleotidi yarışmalı ortamda B19 ile inkübe edilmiştir. ON1-B19 kompleksinin oluşumunun GSH varlığından etkilenmediği ancak GSH-B19 kompleks oluşumu şiddetinin ON1 oligonükleotidi varlığında belirgin şekilde azaldığı, B19 yapısının ON1 ile kompleks oluşturma eğiliminde olduğunu göstermiştir.

- Anlık etkileşimde 1:1 mol oranında ON1-B19 kompleksinin maksimum seviyede oluştuğu ve ON1 mol sayısı arttıkça kompleks oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir. ON1 üzerinde 3' G-A-G etkileşiminin B19 için en yüksek ihtimalli etkileşim olduğu tespit edilmiştir.
- Cyt C, ubiquitin ve lizozim proteinlerinin ve bu yapıların B19 ile inkübasyonu sonucu elde edilen komplekslerin MALDI-TOF MS sisteminde, sinapinik asit matriksi ile yapıları tayin edilmiştir. ESI-MS kullanılarak da bu yapıların analizleri gerçekleştirilmiştir.
- MALDI-TOF MS analizlerinde Cyt C - B19 kompleksi için optimum etkileşimin 1:9 mol oranında ve 24 saat inkübasyon sonrası elde edildiği görülmüştür. Ubiquitin- B19 ve Lizozim-B19 kompleksleri için 1:9 mol oranın ideal olduğu ve kompleks oluşumunun inkübasyon süresine bağlı olmadığı bulunmuştur.
- ESI-MS kullanılarak, Cyt C-B19 kompleksleri; [Cyt C-B19]ⁿ (n:11-16) iyonları ile, Ubiquitin-B19 kompleksleri [ubiq-B19]ⁿ (n:7-12) iyonları ile ve Lizozim-B19 kompleksleri [Liz-B19]ⁿ (n:7-12) iyonları ile tespit edilmiştir.
- Farklı pI değerlerine sahip olan proteinlerin B19 molekülü ile kompleks oluşturabilmesi protein-B19 etkileşiminin protein uç grupları üzerinden gerçekleşmediğini göstermiştir.
- B19 türevi, yeni ilaç adayları olan B33 ve B35 moleküllerinin MALDI-TOF MS'te yapıları tayin edilmiştir.
- B33'ün AMP, GMP ve CMP ile kompleks oluşturduğu MALDI-TOF MS'de tespit edilmiştir.
- B35 molekülünün yapısından Pd atomunun ayrıldığı ve nükleotidlerle etkileşime giremediği bulunmuştur.
- B19, B33 ve B35 yapılarının PC-3 prostat kanseri hücre hattı, normal prostat hücre hattı PNT1A ve akciğer kanseri hücre hattı A-549 üzerine etkisini incelemek amacıyla sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır. IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. B19, ve B33 için IC₅₀ (µM) değeri sırasıyla; 131.9, 181.4 olarak bulunmuştur. B35 için gözlem yapılamamıştır.

- CDDP ve ilaç adayları için verilen IC_{50} değerlerine bakıldığında B19 moleküllerinin CDDP ile yarışabilecek seviyede toksik etki gösterdiği bulunmuştur. Normal Prostat Hücre hattı PNT1A üzerinde yapılan deneylerde CDDP'nin sağlıklı hücreleri öldürme oranının B19'dan fazla olduğu bulunmuştur. Bu durum B19 'un IC_{50} değeri cisplatinden fazla olsa bile antikanser olarak kullanılabilme ihtimalini desteklemiştir.
- B33 molekülünün hesaplanan IC_{50} değeri, CDDP'den yüksek olmasına rağmen, normal prostat hücre hattı PNT1A üzerine etkisine bakıldığında bu derişimdeki ilacın sağlıklı hücreleri öldürme oranının CDDP'den daha düşük olduğu bulunmuştur.
- İlaç adaylarının hiç birisinin A-549 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösteremediği tespit edilmiştir.

EK-1



Şekil 1. B19-DNA etkileşimine ait UV spektrumu [166].

Çizelge 1. Farklı mol oranı ve inkübasyon süreleri sonucu ESI-MS sistemine göre hesaplanan, kalan B19 miktarı.

		İNKÜBASYONA GİREN İYONU	B19 BAŞLANGIÇ DERİŞİMİ	İNKÜBASYON SÜRESİ (SAAT)	KALAN B19	KOMPLEKSİN ADI
		347.06 ve				
B19-AMP1-1-4s		535.12	0,01	4	0.01	AK-1-1-4s
		347.06 ve				
B19-AMP1-1-24Hs		535.12	0,01	24	0.0034	AK-1-1-24s
		347.06 ve				
B19-AMP1-20-4s		535.12	0,01	4	0.01	AK-1-20-4s
		347.06 ve				
B19-AMP1-20-24s		535.12	0,01	24	0.0059	AK-1-20-24s
		347.06 ve				
B19-MiX-1-20-4s		535.12	0,01	4	0,008	
		347.06 ve				
B19-MiX-1-20-24s		535.12	0,01	24	0,004	

		İNKÜBASYONA GİREN İYONU	B19 BAŞLANGIÇ DERİŞİMİ	İNKÜBASYON SÜRESİ (SAAT)	KALAN B19	KOMPLEKSİN ADI
		363.06 ve				
B19-GMP-1-1-4s		535.12	0,01	4	0,0039	GK-1-1-4s
		363.06 ve				
B19-GMP-1-1-24s		535.12	0,01	24	0,0058	GK-1-1-24s
		363.06 ve				
B19-GMP-1-20-4s		535.12	0,01	4	0,0055	GK-1-20-4s
		363.06 ve				
B19-GMP-1-20-24s		535.12	0,01	24	0,0031	GK-1-20-24s
		363.06 ve				
B19-MiX-1-20-4s		535.12	0,01	4	0,008	
		363.06 ve				
B19-MiX-1-20-24s		535.12	0,01	24	0,004	

		İNKÜBASYONA GİREN İYONU	B19 BAŞLANGIÇ DERİŞİMİ	İNKÜBASYON SÜRESİ (SAAT)	KALAN B19	KOMPLEKSİN ADI
		323.05 ve				
B19-CMP-1-1-4s		535.12	0,01	4	0.01	CK-1-1-4s
		323.05 ve				
B19-CMP-1-1-24s		535.12	0,01	24	0.0055	CK-1-1-24s
		323.05 ve				
B19-CMP-1-20-4s		535.12	0,01	4	0.01	CK-1-20-4s
		323.05 ve				
B19-CMP-1-20-24s		535.12	0,01	24	0.0062	CK-1-20-24s
		323.05 ve				
B19-MiX-1-20-4s		535.12	0,01	4	0.008	
B19-MiX-1-20-24s			0,01	24	0.004	

		İNKÜBASYONA GİREN İYONU	B19 BAŞLANGIÇ DERİŞİMİ	İNKÜBASYON SÜRESİ (SAAT)	KALAN B19	KOMPLEKSİN ADI
		322.06 ve				
B19-TMP-1-1-4s		535.12	0,01	4	0.01	TK-1-1-4s
		322.06 ve				
B19-TMP-1-1-24s		535.12	0,01	24	0.006	TK-1-1-24s
		322.06 ve				
B19-TMP-1-20-4s		535.12	0,01	4	0.01	TK-1-20-4s
		322.06 ve				
B19-TMP-1-20-24s		535.12	0,01	24	0.004	TK-1-20-24s
		322.06 ve				
B19-MiX-1-20-4s		535.12	0,01	4	0.008	
		322.06 ve				
B19-MiX-1-20-24s		535.12	0,01	24	0.004	

		İNKÜBASYONA GİREN İYONU	B19 BAŞLANGIÇ DERİŞİMİ	İNKÜBASYON SÜRESİ (SAAT)	KALAN B19	KOMPLEKSİN ADI
		324.04 ve				
B19-UMP-1-1-4s		535.12	0,01	4	0.01	UK-1-1-4s
		324.04 ve				
B19-UMP-1-1-24s		535.12	0,01	24	0.008	UK-1-1-24s
		324.04 ve				
B19-UMP-1-20-4s		535.12	0,01	4	0.009	UK-1-20-4s
		324.04 ve				
B19-UMP-1-20-24s		535.12	0,01	24	0.004	UK-1-20-24s
		324.04 ve				
B19-MiX-1-20-4s		535.12	0,01	4	0.008	
		324.04 ve				
B19-MiX-1-20-24s		535.12	0,01	24	0.004	

KAYNAKLAR

- [1] Lobinski, R., Moulin, C., Ortega, R., Imaging and speciation of trace elements in biological environment, *Biochimie*, 88, 1591-1604, **2006**.
- [2] Reedijk, J., New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3611-3616, **2003**.
- [3] Lobinski, R., Schaumlöffel D., Szpunar, J., Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry, *Mass Spectrometry Review*, 25, 255-289, **2006**.
- [4] Sun, X., Tsang, C.N., Sun, H., Identification and characterization of metaldrug binding proteins by (metallo)proteomics, *Metallomics*, 1, 25-31, **2009**.
- [5] Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J.E., Mansour, V.H., Platinum Compounds: a new class of potent antitumour agents, *Nature*, 222, 385-386, **1969**.
- [6] Orvig, C., Abrams, M.J., Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction, *Chemical Reviews*, 99, 2201-2204, **1999**.
- [7] Lippard, S.J., The inorganic side of chemical biology, *Nature Chemical Biology*, 2, 504-507, **2006**.
- [8] Guo, Z.J., Sadler, P.J., Metals in Medicine, *Angewandte Chemie, International Edition*, 38, 1513-1531, **1999**.
- [9] Rosenberg, B., Camp, V., Krigas, L.T., Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature*, 205, 698-699, **1965**.
- [10] Michalke, B., Platinum speciation used for elucidating activation or inhibition of Pt-containing anti-cancer drugs, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 69-77, 2010.
- [11] Wong E., Giandomenico D.M., Current status of platinum-based anti-tumor drugs, *Chemical Reviews*, 99, 2451-2466, **1999**.
- [12] Galanski, M., Arion, V.B., Jakupec M.A., Keppler B.K., Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes, *Current Pharmaceutical Design*, 9, 2078-2089, **2003**.
- [13] Timerbaev, A.R., Hartinger, Ch.G., Aleksenko, S.S., Keppler B.K., Interactions of antitumor metallodrugs with serumproteins: advances in characterization using modern analytical methodology, *Chemical Reviews*, 106, 2224-2248, **2006**.
- [14] Jakupec, M.A., Galanski, M, Keppler, B.K., Tumour-inhibiting platinum complexes state of the art and future perspectives, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 146, 1-53, **2003**.
- [15] McKeage, M.J., Lobaplatin: a new antitumourplatinum drug, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 10, 119-128, **2001**.
- [16] Galanski, M., Jakupec, M.A., Keppler, B.K., Up date of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches, *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2075-2094, **2005**.
- [17] Guo, Z., Sadler, P.J., Metals in medicine, *Angewandte Chemie International Edition*, 38, 1513-1531, **1999**.
- [18] Takahara, P.M., Frederick, C.A., Lippard, S.J., Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 118, 12309-12312, **1996**.

- [19] Takahara, P.M., Rosenzweig, A.C., Frederick, C.A., Lippard, S.J., Crystal-structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anti cancer drug cisplatin, *Nature*, 377, 649-652, **1995**.
- [20] Silverman, A.P., Bu, W., Cohen, S.M., Lippard, S.J., 2.4-Acrystal structure of the asymmetric platinum complex {Pt(amine)(cyclohexylamine)}(2+) bound to a dodecamer DNA complex, *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 49743–49749, **2002**.
- [21] Gelasco, A., Lippard, S.J., NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intra strand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin, *Biochemistry*, 37, 9230–9239, **1998**.
- [22] Esteban-Fernandez, D., Montes-Bayon, M., Gonzales, E.B., Gomez Gomez M.M., Palacios, M.A., Sanz-Medel, A., Atomic (HPLC–ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cis-platin interactions with serum proteins, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 378-84, **2008**.
- [23] Hann, S., Koellensperger, G., ZsStefanka, S.G., Furrhacker, M., Buchberger, W., Mader, R.M., Application of HPLC–ICP MS to speciation of cisplatin and its degradation products in water containing different chloride concentrations and in human urine, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, 1391-1395, **2003**.
- [24] Nygren, Y., Hemstroem, P., Astot, C., Naredi, P., Bjoern, E., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) utilized in gamobile phase with a low-volatile organic modifier for determination of cisplatin, and its monohydrolyzed metabolite, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 948-954, **2008**.
- [25] Chen, D., Ohta, N., Ukai, M., Masuda, M., Yotsuyanagi, T., Binding and aggregation of human gamma-globulin by cis-diammine dichloroplatinum(II) through disulfide bond, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17, 1561-1566, **1994**.
- [26] Trynda-Lemiesz, L., Kozlowski, H., Keppler, B.K., Effect of cis-, trans-diammine dichloro-platinum(II) and DBP on human serum albumin, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 77, 141-146, **1999**.
- [27] Yotsuyanagi, T., Ohta, N., Futo, T., Ito, S., Chen, D., Ikeda, K., Multiple and irreversible binding of cis-diammine dichloroplatinum (ii) to human serum-albumin and its effect on warfarin-binding, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39, 3003-3006, **1991**.
- [28] Timerbaev, A.R., Aleksenko, S.S., Polec-Pawlak, K., Ruzik, R., Semenova, O., Hartinger, C.G., Oszwaldowski, S., Galanski, M., Jarosz, M., Keppler, B.K., Platinum metallodrug–protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin, *Electrophoresis*, 25, 1988-1995, **2004**.
- [29] Ivanov, A.I., Christodoulou, J., Parkinson, J.A., Barnham, K.J., Tucker, A., Woodrow, J., Sadler, P.J., Cisplatin binding sites on human albumin, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 14721-14730, **1998**.
- [30] Heudi, O., Mercier-Jobard, S., Cailleux, A., Allan, P., Mechanisms of reaction of L-methionine with carboplatin and oxaliplatin in different media: a comparison with cisplatin, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 20, 107-116, **1999**.

- [31] Zenker, A., Galanski, M., Bereuter, T.L., Keppler, B.K., Linder, W., Capillary electrophoretic study of cisplatin interaction with nucleoside monophosphates, di and trinucleotides, *Journal of Chromatography A*, 852, 337-346, **1999**.
- [32] Zenker, A., Galanski, M., Bereuter, T.L., Keppler, B.K., Linder, W., Kinetics of binding properties of 5'-GMP with cisplatin undersimulated physiological conditions by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 745, 211-219, **2000**.
- [33] Zenker, A., Galanski, M., Bereuter, T.L., Keppler, B.K., Linder, W., Time-dependent interactions of platinum(II) complexes with 5'-GMP undersimulated physiological conditions studied by capillary electrophoresis, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5, 498-504, **2000**.
- [34] Sar, D.G., Montes-Bayon, M., Gonzales, E.B., Sanz-Medel, A., Speciation studies of cis-platin adducts with DNA nucleotides via elemental specific detection (P and Pt) using liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry and structural characterization by electro spray mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 861-868, **2006**.
- [35] Szpunar, J., Makorov, A., Pieper, T., Keppler, B.K., Łobinski, R., Investigation of metallodrug–protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *Analytica Chimica Acta*, 387, 135-144, **1999**.
- [36] Falta, Th., Koellensperger, G., Sandler, A., Buchberger, W., Mader, R.M., Hann, S., Quantification of cisplatin, carbo platin and oxaliplatin in spiked human plasma samples by ICP–SFMS and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) combined with ICP-MS detection, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24, 1336-1342, **2009**.
- [37] Koellensperger, G., Stefanka, Zs., Meelich, K., Galanski, M., Keppler, B.K., Stingerder, G., Hann, S., Species specific IDMS for accurate quantification of carbo platin in urine by LC–ESI-TOFMS and LC–ICP-QMS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 29-36, **2008**.
- [38] Vacchina, V., Torti, L., Allievi, C., Łobinski, R., Sensitive species-specific monitoring of a new triplatinum anti-cancer drug and its potential related compounds in spiked human plasma by cation-exchange HPLC–ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, 884-890, **2003**.
- [39] Timerbaev, A.R., Hartinger, C.G., Aleksenko, S.S., Keppler, B.K., Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology, *Chemical Reviews*, 106, 2224-2248, **2006**.
- [40] Reedijk, J., New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 3611-3616, **2003**.
- [41] Peyrone, M., Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 51, 1-29, **1844**.
- [42] Rosenberg, B., Vancamp, L., Krigas, T., Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature*, 205, 698-700, **1965**.
- [43] Higby, D.J., Wallace, H.J., Albert, D.J., Holland, J.F., Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors, *Cancer*, 33, 1219-1228, **1974**.

- [44] Reedijk, J., Platinum anticancer coordination compounds: study of DNA binding inspires new drug design, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 1303-1312, **2009**.
- [45] Guo, Z., Sadler, P.J., Metals in medicine, *Angewandte Chemie International Edition*, 38, 1512-1531, **1999**.
- [46] Clarke, M.J., Ruthenium metallopharmaceuticals, *Coordination Chemistry Reviews*, 236, 209-233, **2003**.
- [47] Clarke, M.J., Zhu, F., Frasca, D.R., Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals, *Coordination Chemistry Reviews*, 99, 2511-2533, **1999**.
- [48] Jakupec, M.A., Keppler, B.K., *In Metal Ions in Biological Systems*, (ed: Sigel, A., Sigel, H.), Dekker, New York, 42, 425, **2004**.
- [49] O'Dwyer, P.J., Stevenson, J.P., Johnson, S.W., *In Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, (ed: Lippert, B.), *Verlag Helvetica Chimica Acta*, Zurich, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **1999**.
- [50] Reedijk, J., Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes, *Platinum Materials Reviews*, 52, 2-11, **2008**.
- [51] Chen, H.M., Parkinson, J.A., Parsons, S., Coxall, R.A., Gould, R.O., Sadler, P.J., *Journal of the American Chemical Society*, 124, 3064-3082, **2002**.
- [52] Velders, A.H., Kooijman, H., Spek, A.L., Haasnoot, J.G., de Vos, D., Reedijk, J., Synthesis, characterization, and crystal structure of α -[ru(azpy)₂(no₃)₂] (azpy = 2-(phenylazo)pyridine) and the products of its reaction with guanine derivatives, *Inorganic Chemistry*, 39, 2966-2967, **2000**.
- [53] Vanvliet, P.M., Toekimin, S.M.S., Haasnoot, J.G., Reedijk, J., Novakova, O., Vrana, O., Brabec, V., Mer-[Ru(Terpy)Cl-3] (Terpy=2,2',6',2''-Terpyridine) shows biological-activity, forms interstrand cross-links in dna and binds 2 guanine derivatives in a trans configuration, *Inorganica Chimica Acta*, 231, 57-64, **1995**.
- [54] Sava, G., Bergamo, A., Zorzet, S., Gava, B., Casarsa, C., Cocchietto, M., Furlani, A., Scarcia, V., Serli, B., Iengo, E., et al., Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A, *European Journal of Cancer*, 38, 427-435, **2002**.
- [55] Gale, G.R., Morris, C.R., Atkins, L.M., Smith, A.B., Binding of an antitumor platinum compound to cells as influenced by physical factors and pharmacologically active agents, *Cancer Research*, 33, 813-818, **1973**.
- [56] Binks, S.P., Dobrota, M., Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine, *Biochemical Pharmacology*, 40, 1329-1336, **1990**.
- [57] Hromas, R.A., North, J.A., Burns, C.P., Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells, *Cancer Letters*, 36, 197-201, **1987**.
- [58] Mann, S.C., Andrews, P.A., Howell, S.B., Short-term cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 25, 236-240, **1990**.
- [59] Andrews, P.A., Mann, S.C., Velury, S., Howell, S.B., *In Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*, (ed: Nicolini, M.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 248-254, **1998**.
- [60] Witkin, E.M., The radiation sensitivity of Escherichia coli B: a hypothesis relating filament formation and prophage induction, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 57, 1275-1279, **1967**.

- [61] Adler, H.I., Hardigree, A.A., Postirradiation Growth, Division and Recovery In Bacteria, *Radiation Research Society*, 25, 92-102, **1965**.
- [62] Rosenkranz, H.S., Garro, A.J., Levy, J.A., Carr, H.S., Studies with hydroxyurea. I. The reversible inhibition of bacterial DNA synthesis and the effect of hydroxyurea on the bactericidal action of streptomycin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 114, 501-515, **1966**.
- [63] Reslova, S., The induction of lysogenic strains of Escherichia coli by cis-dichloro-diammineplatinum (II), *Chemico-Biological Interactions*, 4, 66-70, **1971**.
- [64] Rosenberg, B., Vancamp, L., The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds, *Cancer Research*, 30, 1799-1802, **1970**.
- [65] Reed, E., Ozols, R.F., Tarone, R., Yuspa, S.H., Poirier, M.C., Platinum-DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian cancer patients receiving platinum-based chemotherapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 5024-5028, **1987**.
- [66] Pilch, D.S., Dunham, S.U., Jamieson, E.R., Lippard, S.J., Breslauer, K.J., DNA sequence context modulates the impact of a cisplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link on the conformational and thermodynamic properties of duplex DNA, *Journal of Molecular Biology*, 296, 803-812, **2000**.
- [67] Yang, D., Wang, A.H.J., Structural studies of interactions between anticancer platinum drugs and DNA, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 66, 81-111, **1997**.
- [68] Gelasco, A., Lippard, S.J., *In Topics in Biological Inorganic Chemistry*, (eds: Clarke, M., Sadler, P.J.), Springer-Verlag, Heidelberg, 1, 1-43, **1999**.
- [69] Sherman, S.E., Gibson, D., Wang, A.H.J., Lippard, S.J., X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH₃)₂(d(pGpG))], *Science*, 230, 412-417, **1985**.
- [70] Sherman, S.E., Gibson, D., Wang, A.H.J., Lippard, S.J., Crystal and Molecular Structure of cis-[Pt(NH₃)₂(d(pGpG))], the Principal Adduct Formed by cis-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 110, 7368-7381, **1988**.
- [71] Admiraal, G., Vanderveer, J.L., de Graaff, R.A.G., den Hartog, J.H.J., Reedijk, J., Intrastrand Bis(guanine) Chelation of d(CpGpG) to cis-Platinum: An X-ray Single-Crystal Structure Analysis, *Journal of the American Chemical Society*, 109, 592-594, **1987**.
- [72] Gately, D.P., Howell, S.B., Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review, *British Journal of Cancer*, 67, 1171-1176, **1993**.
- [73] Jamieson, E.R., Lippard, S.J., Structure, Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts, *Chemical Reviews*, 99, 2467-2498, **1999**.
- [74] Michalke, B., Platinum speciation used for elucidating activation or inhibition of Pt-containing anti-cancer drugs, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 69-77, **2010**.
- [75] Akaboshi, M., Kawai, K., Maki, H., Akuta, K., Ujeno, Y., Miyahara, T., The number of platinum atoms binding to DNA, RNA and protein molecules of HeLa cells treated with cisplatin at its mean lethal concentration, *Japanese journal of cancer research*, 83, 522-526, **1992**.
- [76] Molenaar, C., Teuben, J.M., Heetebrij, R.J., Tanke, H.J., Reedijk, J., New insights in the cellular processing of platinum antitumor compounds, using

fluorophore-labeled platinum complexes and digital fluorescence microscopy, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5, 655-665, **2000**.

[77] Ohndorf, U.M., Rould, M.A., He, Q., Pabo, C.O., Lippard, S.J., Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins, *Nature*, 399, 708-712, **1999**.

[78] Jung, Y.W., Lippard, S.J., Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage, *Chemical Reviews*, 107, 1387-1407, **2007**.

[79] Kalayda, G.V., Wagner, C.H., Buss, I., Reedijk, J., Jaehde, U., Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells, *BMC Cancer*, 8, 12, **2008**.

[80] Samimi, G., Safaei, R., Katano, K., Holzer, A.K., Rochdi, M., Tomioka, M., Goodman, M., Howell, S.B., Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells, *Clinical Cancer Research*, 10, 4661-4669, **2004**.

[81] Jung, Y., Lippard, S.J., RNA Polymerase II Blockage by Cisplatin-damaged DNA Stability and Polyubiquitylation of Stalled Polymerase, *Journal of Biological Chemistry*, 281, 1361-1370, **2006**.

[82] Appleton, T.G., Donor atom preferences in complexes of platinum and palladium with aminoacids and related molecules, *Coordination Chemistry Reviews*, 166, 313-359, **1997**.

[83] Xie, R., Johnson, W., Rodriguez, L., Gounder, M., Hall, G.S., Buckley, B., A study of the interactions between carboplatin and blood plasma proteins using size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2815-2822, **2007**.

[84] Holzer, A.K., Manorek, G.H., Howell, S.B., Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, *Molecular Pharmacology*, 70, 1390-1394, **2006**.

[85] Safaei, R., Holzer, A.K., Katano, K., Samimi, G., Howell, S.B., The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs, *Journal of Inorganic Chemistry*, 98, 1607-1613, **2004**.

[86] Mistry, P., Kelland, L.R., Abel, G., Sidhar, S., Harrap, K.R., The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines, *British Journal of Cancer*, 64, 215-220, **1991**.

[87] Kelland, L., The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nature*, 7, 573-584, **2007**.

[88] Jakupec, M.A., Galanski, M., Keppler, B.K., The effect of cytoprotective agents in platinum anticancer therapy, *Metal Ions in Biological Systems*, 42, 179-208, **2004**.

[89] Lebwohl, D., Canetta, R., Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update, *European Journal of Cancer*, 34, 1522-1534, **1998**.

[90] Wong, E., Giandomenico, C.M., Current status of platinum-based antitumor drugs, *Chemical Reviews*, 99, 2451-2466, **1999**.

[91] Yang, D., Vanboom, S.S.G.E., Reedijk, J., Vanboom, J.H., Farrell, N., Wang, A.H.J., A Novel DNA-Structure Induced by the Anticancer Bisplatinum Compound Cross-Linked to a Gpc Site in DNA, *Nature Structural Biology*, 2, 577-586, **1995**.

- [92] Farrell, N., Kelland, L.R., Roberts, J.D., Vanbeusichem, M., Activation of the trans geometry in platinum antitumor complexes: a survey of the cytotoxicity of trans complexes containing planar ligands in murine L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action, *Cancer Research*, 52, 5065-5072, **1992**.
- [93] Brabec, V., Kasparkova, J., Vrana, O., Novakova, O., Cox, J.W., Qu, Y., Farrell, N., DNA modifications by a novel bifunctional trinuclear platinum Phase I anticancer agent, *Biochemistry*, 38, 6781-6790, **1999**.
- [94] Fink, D., et al., The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance, *Cancer Research*, 56, 4881-4886, **1996**.
- [95] Spingler, B., Whittington, D.A., Lippard, S.J., 2.4 angstrom crystal structure of an oxaliplatin 1,2- d(GpG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex, *Inorganic Chemistry*, 40, 5596-5602, **2001**.
- [96] Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J., Cvitkovic, E., Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin, *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 227-235, **2002**.
- [97] Qu, Y., Farrell, N., Effect of diamine linker on the chemistry of bis(platinum) complexes. A comparison of the aqueous solution behavior of 1,4-butanediamine and 2,5-dimethyl-2,5-hexanediamine complexes, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 40, 255-264, **1990**.
- [98] Bloemink, M.J., Reedijk, J., Farrell, N., Qu, Y., Stetsenko, A.I., The dinuclear complex $[\text{trans PtCl}(\text{NH}_3)_2]_2\{\text{m H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}\text{Cl}_2$ forms an unique macrochelate intrastrand crosslink with d(GpG), *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1002–1003, **1992**.
- [99] Farrell, N., Current status of structure-activity relationships of platinum anticancer drugs: activation of the trans geometry, *Metal Ions in Biological Systems*, 32, 603-639, **1996**.
- [100] Montero, E.I., Diaz, S., Gonzalez-Vadillo, A.M., Perez, J.M., Alonso, C., Navarro-Ranninger, C., Preparation and characterization of novel trans-[PtCl₂(amine)(isopropylamine)] compounds: Cytotoxic activity and apoptosis induction in ras-transformed cells, *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 4264-4268, **1999**.
- [101] Pantoja, E., Gallipoli, A., Zutphen S.v., Komeda, S., Reddy, D., Jaganyi, D., Lutz, M., Tooke, D., M., Spek, A.L., Navarro-Ranninger, C., Reedijk, J., Three new asymmetric trans-amine(azole)dichloridoplatinum complexes that overcome cisplatin resistance and their reactions with 5'-GMP, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 1955-1964, **2006**.
- [102] Gibson, D., Najajreh, Y., Kasparkova, J., Brabec, V., Perez, J.M., Navarro-Ranninger, C., Novel cytotoxic trans-diaminedichloro platinum(II) complexes with nonplanar heterocyclic ligands, preparation, cytotoxicity and DNA binding properties, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 96, 42-42, **2003**.
- [103] Intini, F.P., Pellicani, R.Z., Boccarelli, A., Sasanelli, R., Coluccia, M., Natile, G., Synthesis, Characterization, and *In vitro* Antitumor Activity of New Amidineplatinum(II) Complexes Obtained by Addition of Ammonia to Coordinated Acetonitrile, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 4555-4561, **2008**.
- [104] Taube, H., Rates and mechanisms of substitution in inorganic complexes, *Chemical Reviews*, 50, 69-78, **1952**.

- [105] Zutphen, S.v., Reedijk, J., Targeting platinum anti-tumour drugs: Overview of strategies employed to reduce systemic toxicity, *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 2845-2853, **2005**.
- [106] Bruijninx, P.C.A., Sadler, P.J., New trends for metal complexes with anticancer activity, *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, 197-206, **2008**.
- [107] Petkovic, M., Kamceva, T., FAB, ESI and MALDI Mass Spectrometric methods in the study of metallo-drugs and their biomolecular interactions. *Metallomics*, 3, 550-565, **2011**.
- [108] Demirel, Ö., *Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı Kütle Spektrometrisinde Yapılacak Proteolitik Parçalanma Temelli Proteomik Çalışmaları İçin, Enzim İmmobilize Edilmiş Sol-Jel Yüzeylerin Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2009**.
- [109] Manz, A., Pamme, N., Iossifidis, D., *Bioanalytical Chemistry*, World Scientific Publishing Company, Singapore, **2003**.
- [110] Salih, B., *Poliamin Kanser İlaçlarının CKII Enzimi ve MYC Onkoproteinler ile Etkileşim Mekanizmalarının Kapiler Elektroferez ve MALDI-MS ile İncelenmesi*, DPT Projesi Sonuç Raporu, Ankara, **2005**.
- [111] Cotter, R.J., Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research. *ACS Professional Reference Books*, American Chemical Society, 19-45, Washington, **1997**.
- [112] Hoffmann, E.D., Charette, J., Stroobant, V., *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 91-93, John Wiley & Sons Ltd., Masson, Paris, **1996**.
- [113] Kandaz, M., Ozkaya, A.R., Koca, A., Salih, B., Water and alcohol-soluble octakis-metalloporphyrines bearing sulfanyl polyetherol substituents: synthesis, spectroscopy and electrochemistry. *Dyes and Pigments*, 74, 483, **2007**.
- [114] Al-Ansari, Y.F., Baulin, V.E., Savinkina, E.V., Tsivadze, A.Y., Novel crown-containing porphyrin and its complexes with transition metals, *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 34, 911, **2008**.
- [115] Ceyhan, T., Yuksek, M., Yaglioglu, H.G., Salih, B., Erbil, M.K., Elmali, A., Bekaroglu, O., Synthesis, characterization and nonlinear absorption of novel octakis-POSS substituted metallophthalocyanines and strong optical limiting property of CuPc, *Dalton Transactions*, 18, 2407-2413, **2008**.
- [116] Ceyhan, T., Altindal, A., Ozkaya, A.R., Salih, B., Bekaroglu, O., Synthesis, characterization, and electrocatalytic and electrical properties of novel ball-type four cyclopentyl-disilanoxy-POSS bridged metallophthalocyanines, *Dalton Transactions*, 46, 10318-10329, **2009**.
- [117] Baker, R., Wilkinson, D.P., Zhang, J.J., Facile synthesis, spectroscopy and electrochemical activity of two substituted iron phthalocyanines as oxygen reduction catalysts in an acidic environment, *Electrochimica Acta*, 54, 3098, **2009**.
- [118] Chifotides, H.T., Koomen, J.M., Kang, M., Tichy, S.E., Dunbar, K.R., David, H., Binding of DNA Purine Sites to Dirhodium Compounds Probed by Mass Spectrometry Russell, *Inorganic Chemistry*, 43, 6177-6187, **2004**.
- [119] Heetebrij, R.J., Kort, M., Meeuwenoord, N.J., Dulk, H., Marel, G.A., Boom, J.H., Reedijk, J., A Versatile Approach Towards Regioselective Platinated DNA Sequences, *Chemistry: A European Journal*, 9, 1823-1827, **2003**.
- [120] Bellido, M., Radpour, R., Lapaire, O., Debie, I., Hosli, I., Bitzer, J., Hmadcha, A., Zhong, X., Holzgreve, W., MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma, *Biology of Reproduction*, 82, 745-750, **2010**.

- [121] Fernandez, A.G., Diez, J., Manteca, A., Sanchez, J., Garcia-Navas, R., Sierra, B., Mollinedo, F., Gamasa, M., Lastra, E., Antitumor activity of new hydrotris(pyrazolyl)borate ruthenium(II) complexes containing the phosphanes PTA and 1-CH₃-PTA, *Dalton Transactions*, 39, 10186-10196, **2010**.
- [122] Bugarcic, Z.D., Soldatovic, T., Jelic, R., Alguero, B., Grandas, A., Equilibrium, kinetic and HPLC study of the reactions between platinum(II) Complexes and DNA constituents in the presence and absence of glutathione, *Dalton Transactions*, 22, 3869-3877, **2004**.
- [123] Ossipov, D., Gohil, S., Chattopadhyaya, J., Synthesis of the DNA [Ru(tpy)(dppz)(CH₃CN)]²⁺ Conjugates and their Photo Cross-Linking Studies with the Complementary DNA Strand, *Journal of American Chemical Society*, 124, 13416-13433, **2002**.
- [124] Fenn, J.B., Mann, M., Meng C.K., Wong, F.S., Whitehouse, C.M., Electrospray ionization principles and practice, *Mass Spectrometry*, 9, 37, **1990**.
- [125] Fenn JB, et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926):64–71, **1989**.
- [126] Simpson, R.J., *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **2003**.
- [127] De Hoffmann, E., Charette, J., Stroobant, V., *Mass Spectrometry Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, **1996**.
- [128] Özgen, A., *Kovalent Olmayan Komplekslerin Sitokiyometri Ve Kararlılıklarının Kütle Spektrometresi İle İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2012**.
- [129] Dole, M., et al., Molecular Beam of Macroions, *Journal of Chemical Physics*, 49, 2240-2242, 1968.
- [130] Chernushevich, I.V., Loboda A.V., Thomson, B.A., An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 849-865, **2001**.
- [131] Shevchenko, A.A., Chernushevich, I.V., Ens, W., Standing, K.G., Thomson, B., Wilm, M., Mann, M., Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11, 1015-1024, **1997**.
- [132] Henderson, W., McIndoe, J.S., Nicholson, B.K., Dyson, P.J., Electrospray mass spectrometry of metal carbonyl complexes, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 519-525, **1998**.
- [133] Ross, A., Ikonomou, M., Thompson, J., Orians, K., Determination of dissolved metal species by electrospray ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 70, 2225-2235, **1998**.
- [134] Matsumoto, A., Fukumoto, T., Adachi, H., Watarai, H., Electrospray ionization mass spectrometry of metal complexes. Gas phase formation of a binuclear copper(II)-5-Br-PADAP complex, *Analytica Chimica Acta*, 390, 193-199, **1999**.
- [135] Deguchi, K., Ishikawa, M., Yokokura, T., Ogata, I., Ito, S., Mimura, T., Ostrander, C., Enhanced mass detection of oligonucleotides using reverse-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 2133-2141, **2002**.

- [136] Gong, F., Peng, X., Zeng, Z., Yu, M., Zhao, Y., Tong, A., Proteomic analysis of cisplatin resistance in human ovarian cancer using 2-DE method, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 12, 141-147, **2011**.
- [137] Loo, J.A., Ogorzalek L.R.R., *Applying Charge Discrimination with Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*, *The Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 6, 1098-1104, **1995**.
- [138] Myszkka, D.G., Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE, *Methods in enzymology*, 323, 325-340, **2000**.
- [139] Spasov, A.A., Iezhitsa, I.N., Bugaeva, L.I., Anisimova, V.A., Pharmacological activity spectrum and toxic properties of benzimidazole derivatives: A review, *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 33, 6-17, **1999**.
- [140] Labanauskas, L.K., Brukstus, A.B., Gaidelis, P.G., Buchinskaite, V.A., Udrenaitė, E.B., Dauksas, V.K., Synthesis and Antiinflammatory Activity of Some New 1Acyl Derivatives of 2Methylthio5,6-Diethoxybenzimidazole, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 34, 353-355, **2000**.
- [141] Can-Eke, B., Puskullu, M.O., Buyukbingol, E., Iscan, M., A Study On The Antioxidant Capacities of Some Benzimidazoles In Rat-Tissues, *Chemico-Biological Interactions*, 113, 65-77, **1998**.
- [142] Sevak, R., Paul, A., Goswami, S., Santini, D., Gastroprotective effect of beta3 adrenoreceptor agonists ZD 7114 and CGP 12177A in rats, *Pharmacological Research*, 46, 351-356, **2002**.
- [143] Boiani, M., González, M., Imidazole and Benzimidazole Derivatives as Chemotherapeutic Agents, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 5, 409-424, **2005**.
- [144] Schulz, W.G., Islam, I., Skibo, E.B., Pyrrolo[1,2-A]Benzimidazole-Based Quinones And Iminoquinones-The Role Of The 3-Substituent On Cytotoxicity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 109-118, **1995**.
- [145] Islam, I., Skibo, E.B., Dorr, R.T., Alberts, D.S., Structure-activity studies of antitumor agents based on pyrrolo[1,2-a]benzimidazoles: new reductive alkylating DNA cleaving agents, *Journal of Medicinal Chemistry*, 34, 2954-2961, **1991**.
- [146] Skibo, E.B., Schulz, W.G., Pyrrolo[1,2-A]Benzimidazole-Based Aziridinyl Quinones - A New Class of Dna-Cleaving Agent Exhibiting G-Base and A-Base Specificity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 36, 3050-3055, **1993**.
- [147] Skibo, E.B., Islam, I., Heileman, M.J., Schulz, W.G., Structure-Activity Studies of Benzimidazole-Based Dna-Cleaving Agents- Comparison Of Benzimidazole, Pyrrolobenzimidazole, and Tetrahydropyridobenzimidazole Analogs, *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 78-92, **1994**.
- [148] Boruah, R.C., Skibo, E.B., A Comparison Of The Cytotoxic And Physical-Properties Of Aziridinyl Quinone Derivatives Based On The Pyrrolo[1,2-A]Benzimidazole And Pyrrolo[1,2-A]Indole Ring-Systems, *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 1625-1631, **1994**.
- [149] El-Naem, Sh.I., El-Nzhawy, A.O., El-Diwani, H.I., Abdel Hamid, A.O., Synthesis of 5-Substituted 2-Methylbenzimidazoles with Anticancer Activity, *Archiv der Pharmazie*, 336, 7-17, **2003**.
- [150] Ramla, M.M., Omar, M.A., Tokuda, H., El-Diwani, H.I., Synthesis and inhibitory activity of new benzimidazole derivatives against Burkitt's lymphoma promotion, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 6489-6496, **2007**.

- [151] Ni, Z.J., Barsanti, P., Brammeier, N., Diebes, A., Poon, D.J., Ng, S., Pecchi, S., Pfister, K., Renhowe, P.A., Ramurthy, S., Wagman, A.S., Bussiere, D.E., Le, V., Zhou, Y., Jansen, J.M., Ma, S., Gesner, T.G., 4-(Aminoalkylamino)-3-benzimidazole-quinolinones as potent CHK-1 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 3121, 2006.
- [152] Bansal, Y., Silakari, O., The therapeutic journey of benzimidazoles: A review, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 6208-6236, 2012.
- [153] Chen, A., Yu, C., Gatto, B., Liu, L.F., DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 8131, 1993.
- [154] Chen, A.Y., Yu, C., Bodley, A.L., Peng, L.F., Liu, L.F., A new mammalian DNA topoisomerase I poison Hoechst 33342: cytotoxicity and drug resistance in human cell cultures, *Cancer Research*, 53, 1332-1337, 1993.
- [155] Kraut, E., Fleming, T., Segal, M., Neidhart, J., Behrens, B.C., MacDonald, J., Phase II study of pibenzimol in pancreatic cancer, A Southwest Oncology Group study, *Investigational New Drugs*, 9, 95, 1991.
- [156] Tolner, B., Hartly, J.A., Hochhauser, D., Transcriptional regulation of topoisomerase II alpha at confluence and pharmacological modulation of expression by bis-benzimidazole drugs, *Molecular Pharmacology*, 59, 699-706, 2001.
- [157] Zhou, Q., Yang, P., Crystal structure and DNA-binding studies of a new Cu(II) complex involving benzimidazole, *Inorganica Chimica Acta*, 359, 1200-1206, 2006.
- [158] Gumus, F., Algul, O., DNA binding studies with cis-Dichlorobis (5(6)-non/chlorosubstituted-2-hydroxymethyl-benzimidazole) platinum(II) complexes, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 68, 71-74, 1997.
- [159] Gumus, F., Algul, O., Eren, G., Eroglu, H., Diril, N., Gur, S., Ozku, A., Synthesis, cytotoxic activity on MCF-7 cell line and mutagenic activity of platinum(II) complexes with 2-substituted benzimidazole ligands, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 473-480, 2003.
- [160] Gumus, F., Izgu, F., Algul, O., Synthesis and Structural Characterization of Some 5(6)-Substituted-2-Hydroxymethyl- benzimidazole Derivatives and Their Platinum (II) Complexes and Determination of Their *in vitro* Antitumor Activities by "Rec-Assay" Test, *The FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, 7-15, 1996.
- [161] Gumus, F., Pamuk, I., Ozden, T., Yildis, S., Diril, N., Oksuzoglu, E., Gur, S., Ozkul, A., Synthesis, characterization and *in vitro* cytotoxic, mutagenic and antimicrobial activity of platinum(II) complexes with substituted benzimidazole ligands, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94, 255-262, 2003.
- [162] Gokce, M., Utku, S., Gur, S., Ozkul, A., Gumus, F., Synthesis, *in vitro* cytotoxic and antiviral activity of cis-[Pt(R(-) and S(+)-2- α -hydroxybenzylbenzimidazole)2Cl2] complexes, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 135-141, 2005.
- [163] Gumus, F., Algul, O., Eren, G., Eroglu, H., Diril, N., Gur, S., Ozkul, A., Synthesis, cytotoxic activity on MCF-7 cell line and mutagenic activity of platinum(II) complexes with 2-substituted benzimidazole ligands, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 473-480, 2003.
- [164] Galal, S.A., Hegab, K.H., Kassab, A.S., Rodriguez, M.L., Kerwin, S.M., El-Khamry, A.M.A., El Diwani, H.I., New transition metal ion complexes with

benzimidazole-5-carboxylic acid hydrazides with antitumor activity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 1500-1508, **2009**.

[165] Galal, S.A., Hegab, K.H., Hashem, A.M., Youssef, N.S., Synthesis and antitumor activity of novel benzimidazole-5-carboxylic acid derivatives and their transition metal complexes as topoisomerase II inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 5685, **2010**.

[166] Tutkun, B., *N-Heterohalkali Benzimidazol Türevlerinin Sentezi ve Metal Kompleksleri*, Yüksek Lisans Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, **2013**.

[167] Frankevich, V., Knochenmuss, R., Zenobi, R., The origin of electrons in MALDI and their use for sympathetic cooling of negative ions in FTICR, *International Journal of Mass Spectrometry*, 220, 11-19, **2002**.

[168] Zenker, A., Galanski, M., Bereuter, T.L., Keppler, B.K., Lindner, W., Capillary electrophoretic study of cisplatin interaction with nucleoside monophosphates, di- and trinucleotides, *Journal of Chromatography A*, 852, 337-346, **1999**.

[169] Sherman, S.E., Lippard, S.J., Structural Aspects Of Platinum Anticancer Drug-Interactions with DNA, *Chemical Reviews*, 87, 1153-1181, **1987**.

[170] Sar, D.G., Montes-Bayon, M., Gonzales, E.B., Sanz-Medel, A., Speciation studies of cis-platin adducts with DNA nucleotides via elemental specific detection (P and Pt) using liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and structural characterization by electrospray mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 861-868, **2006**.

[171] Gammelgaard, B., Hansen H.R., Sturup, S., Moller, C., The use of inductively coupled plasma mass spectrometry as a detector in drug metabolism studies, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4, 1187-1207, **2008**.

[172] Hann, S., Zenker, A., Galanski, M., Bereuter, T.L., Stingeder, G., Keppler, B.K., HPIC-UV-ICP-SFMS study of the interaction of cisplatin with guanosine monophosphate, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 370, 581-586, **2001**.

[173] Dohta, Y., Kodaka, M., Okuno, H., MALDI-TOF Mass Selects Platinated Oligonucleotides, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 67, 159, **1997**.

[174] Lombardy, R.L., Fariol, A.T., Ramachandran, K., Tidwell, R.R., Wilson, W.D., Synthesis and DNA interactions of benzimidazole dications which have activity against opportunistic infections, *Journal of Medicinal Chemistry*, 39 (7), 1452-1462, **1996**.

[175] Boiani, M., González, M., Imidazole and Benzimidazole Derivatives as Chemotherapeutic Agents, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 5, 409-424, **2005**.

[176] Kung, A., Zenker, A., Galanski, M., Keppler, B.K., Capillary electrophoretic study of carboplatin and analogues with nucleoside monophosphates, di- and trinucleotides, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83, 181-186, **2001**.

[177] Feng, C.H., Huang, H.Y., Lu, C.Y., Quantitation of the glutathione in human peripheral blood by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry coupled with micro-scale derivatization, *Analytica Chimica Acta*, 690, 209-214, **2011**.

[178] Chu, G., Cellular-Responses To Cisplatin - The Roles Of Dna-Binding Proteins And Dna-Repair, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 787-790, **1994**.

[179] Kelland, L.R., Mistry, P., Abel, G., Friedlos, F., Loh, S.Y., Roberts, J.J., Harrap, K.R., Establishment and characterization of an *in vitro* model of acquired

resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line, *Cancer Research*, 52, 1710-1716, **1992**.

[180] Fram, R.J., Woda, B.A., Wilson, J.M., Robichaud, N., Characterization of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in BE human colon carcinoma cells, *Cancer Research*, 50, 72-77, **1990**.

[181] Juan Carlos García-Ramos, Rodrigo Galindo-Murillo, Fernando Cortés-Guzmán, Lena Ruiz-Azuara. Metal-Based Drug-DNA Interactions. *J. Mex. Chem. Soc.* 2013, 57(3), 245-259. Review

[182] Suchankova, T., Vojtiskova, M., Reedijk, J., Brabec, V., Kasparkova, J., DNA and glutathione interactions in cell-free media of asymmetric platinum(II) complexes cis- and trans-[PtCl₂(isopropylamine) (1-methylimidazole)]: relations to their different antitumor effects, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 14, 75-87, **2009**.

[183] Mika, A., Skorkowski, E., Stepnowski, P., The Use of Different MS Techniques to Determine Glutathione Levels in Marine Tissues, *Food Analytical Methods*, 6, 789-802, **2013**.

[184] Ellman, G.L., Tissue sulfhydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77, **1959**.

[185] Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification, *Clinica Chimica Acta*, 333, 19-39, **2003**.

[186] Guan, X., Hoffman, B., Dwivedi, C., Matthees, D.P., A Simultaneous Liquid Chromatography/Mass Spectrometric Assay of Glutathione, Cysteine, Homocysteine and Their Disulfides in Biological Samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 251-261, **2003**.

[187] Camera, E., Picardo, M., Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes, *Journal of Chromatography B*, 781, 181-206, **2002**.

[188] Iwasaki, Y., Saito, Y., Nakano, Y., Mochizuki, K., Sakata, O., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H., Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples, *Journal of Chromatography B*, 877, 3309-3317, **2009**.

[189] Trabesinger, A.H., Boesiger, P., Improved selectivity of double quantum coherence filtering for the detection of glutathione in the human brain *in vivo*, *Magnetic Resonance in Medicine*, 45, 708-710, **2001**.

[190] Bouligand, J., Deroussent, A., Paci, A., Morizet, J., Vassal, G., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay of reduced and oxidized glutathione and main precursors in mice liver, *Journal of Chromatography B*, 832, 67-74, **2006**.

[191] Yilmaz, K., Keser, S., Tuzcu, M., Guvenc, M., Çetintas, B., Irtegun, S., Tastan, H., Sahin, K., A Practical HPLC Method to Measure Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Glutathione Concentrations in Animal Tissues, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 343-347, **2009**.

[192] Wan, D., Gao, M., Wang, Y., Zhang, P., Zhang, X., A rapid and simple separation and direct detection of glutathione by gold nanoparticles and graphene-based MALDI-TOF MS, *Journal of Separation Science*, 36, 629-635, **2013**.

[193] Sigman, D. S. Chemical nucleases. *Biochemistry* 1990, 29, 9097-9105.

[194] Abu-Surrah, A.S., Al-Sa'doni, H.H., Abdalla, M.Y., Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity, *Cancer Therapy*, 6, 1-10, **2008**.

[195] Brodie, C. R.; Collins, J. G.; Aldrich-Wright, J. R. DNA binding and biological activity of some platinum(II) intercalating compounds containing methyl-substituted 1,10-phenanthrolines. Dalton Transactions 2004, 1145-52.

[196] McFadyen, W. D.; Wakelin, L. P. G.; Roos, I. A. G.; Leopold, V. A. Activity of platinum(II) intercalating agents against murine leukemia L1210. J. Med. Chem. 1985, 28, 1113-1116.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı: Aslı Çal

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Evli

E-posta: asli.cal@saglik.gov.tr

Adresi: Adnan Saygun Cad. Refik Saydam Yerleşkesi, No:80, B Blok

Eğitim:

Lise: Hafsa Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Fizikokimya A.B.D

Doktora: Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Fizikokimya A.B.D

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, iyi

İş Deneyimi

2006 –2009 Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü,
Fizikokimya Ana Bilim Dalı

2009- Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Su Laboratuvarı

Deneyim Alanları

Gıdalarda Toksik Düzeyde Pestisit Analizleri, Suda Kalıntı Analizleri, Kütle
Spektroskopisi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile katıldığı toplantılar
