

T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

**PSİKO-UYARICI MODAFİNİL İLE NÜKLEİK ASİTLERİN
ETKİLEŞİM MEKANİZMASININ FLORESANS
SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

ESRA OĞUZCAN

EYLÜL 2020

T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ADLI BİLİMLER ANABİLİM DALI**

**PSİKO-UYARICI MODAFİNİL İLE NÜKLEİK ASİTLERİN
ETKİLEŞİM MEKANİZMASININ FLORESANS
SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

ESRA OĞUZCAN

DANIŞMAN

PROF. DR. NURİYE AKBAY

EYLÜL 2020

BİLDİRİM

Hazırladığım tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt ederim.

Esra OĞUZCAN

Danışmanlığını yaptığım işbu tezin tamamen öğrencinin çalışması olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığını taahhüt ederim.

Prof. Dr. Nuriye AKBAY

İMZA SAYFASI

Esra OĞUZCAN tarafından hazırlanan ‘Psiko-Uyarıcı Modafinil İle Nükleik Asitlerin Etkileşim Mekanizmasının Floresans Spektroskopisi İle İncelenmesi’ başlıklı bu yüksek lisans, Adli Bilimler Anabilim Dalında hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Nuriye AKBAY
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Doç. Dr. Yelda YALÇIN GÜRKAN
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Dr. Öğrt. Üyesi Dila KAYA
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi:// 201...

ÖZET

PSİKO-UYARICI MODAFİNİL İLE NÜKLEİK ASİTLERİN ETKİLEŞİM MEKANİZMASININ FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ

Oğuzcan, Esra

Yüksek Lisans Tezi, Adli Bilimler Anabilim Dalı, Adli Bilimler Programı

Danışman: Prof.Dr. Nuriye Akbay

Eylül, 2020. 60 Sayfa.

Günümüzde psiko-uyarıcılar tıbbi açıdan narkolepsi, uyku bozuklukları ve dikkat eksikliği gibi hastalıkların tedavisinde, Alzheimer Hastalığı veya yaşlanmanın diğer bilişsel tahribatlarına karşı bilişi iyileştirmede reçeteli kullanılmaktadır. Tıbbi kullanımlarının dışında yasal olarak askeri alanda verimliliği ve uykusuzluğa direnci arttırma amaçlı kullanımları görülür. Spor müsabakalarında performans yükseltme amaçlı kullanımları da oldukça yaygındır. Uyarıcıların tedavi amaçlı kullanımlarında bağımlılık yapma ve kalıcı bilişsel hasar verme riskleri ise kullanımlarını sınırlamaktadır.

Modafinil 1998’de keşfedilmiş, bağımlılık etkisi ve metabolik etki mekanizması henüz aydınlatılamamış bir psiko-uyarıcıdır. Yaygın kullanılan diğer santral sinir sistemi uyarıcılarına (amfetaminler ve metilfenidat gibi) etki açısından büyük benzerlik gösterirken kimyasal özellikleri bakımından oldukça farklıdır. Tedavi amaçlı kullanımının geliştirilmesinde etki mekanizmasının aydınlatılması önemli yer tutmaktadır. Bu tez çalışmasında modafinil ile çift sarmal DNA (ct-DNA) arasındaki etkileşim mekanizması floresans spektroskopisi, UV-vis spektroskopisi ve viskozite ölçümleri ile incelenmiştir.

Çalışmada ct-DNA-EB kompleksinin modafinil ile florimetrik tirasyonu verilerinden Stern-Volmer sönüm sabitleri, bağlanma sabitleri, bağlanma kısım sayıları ve ΔH , ΔS ve ΔG gibi ilgili termodinamik parametreler çeşitli sıcaklıklarda hesaplandı.

Sonuçlar modafinil ile ct-DNA arasındaki etkileşimin interkelasyon üzerinden gerçekleştiğini ve baskın kuvvetlerin hidrojen bağı ve Van der Waals kuvvetleri olduğunu gösterdi. Yapılan docking çalışmaları deneysel sonucu destekledi. Absorpsiyon, iyonik şiddet ve viskozite çalışmalarının sonuçları modafinil ve ct-DNA arasında interkelativ bağlanma modunu destekledi.

Anahtar kelimeler: Stern-Volmer, modafinil, floresans sönümü, interkelasyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF INTERACTION MECHANISMS OF PSYCHO-STIMULANT MODAFINIL WITH NUCLEIC ACIDS BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

Oğuzcan, Esra

Thesis of MSc, Department of Forensic Sciences

Advisor: Prof. Dr. Nuriye Akbay

September, 2020. 60 Pages.

Today, psycho-stimulants are used medically in prescription to treat diseases such as narcolepsy, sleep disorders and attention deficit, cognition improvement against Alzheimer's Disease or other cognitive impairments of aging. Apart from medical uses, they are used legally in the military field to increase efficiency and resistance to insomnia. It is also widely used for performance enhancement in sports competitions. In the therapeutic use of stimulants, the risk of addiction and permanent cognitive damage limit their use.

Modafinil is a psycho-stimulant that was discovered in 1998 and its addictive effect and metabolic mechanism of action have not yet been elucidated. While it is very similar in effect to other common central nervous system stimulants (such as amphetamines and methylphenidate), it is quite different in its chemical properties. Clarifying the mechanism of action plays an important role in improving its use for therapeutic purposes. In this thesis, the interaction mechanism between modafinil and double helix DNA (ct-DNA) was investigated by fluorescence spectroscopy, UV-vis spectroscopy and viscosity measurements.

In the study, Stern-Volmer quenching constants, binding constants, binding site numbers and related thermodynamic parameters such as ΔH , ΔS and ΔG were calculated at various temperatures from the fluorimetric titration data of the ct-DNA-

EB complex with modafinil. Obtained results showed that the interaction between modafinil and ct-DNA occurred via intercalation mode and driven forces are hydrogen bonding and van der Waals forces. Results of the docking studies supported the experimental result. Results of the absorption, ionic strength and viscosity studies supported the intercalative binding mode between modafinil and ct-DNA.

Keywords: Stern-Volmer, modafinil, fluorescence quenching, intercalation

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, desteğini ve zamanını esirgemeyen, daha fazlasını öğrenmemi ve kendimi geliştirmemi sağlayan, bilgi birikimi ve alanındaki tecrübesiyle çalışmamda yol gösteren saygı değer hocam Prof. Dr. Nuriye AKBAY’a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım boyunca hoşgörü, anlayış, sabır ve en önemlisi yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Zeynep KÖKSAL’a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarda kullanacağım maddenin sentezini ve karakterizasyonunu gerçekleştiren Doç. Dr. Ayşe UZGÖREN-BARAN hocama teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarda kullanacağım docking çalışmalarında bilgisini esirgemeyen Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN-TOK hocama teşekkür ederim.

Bu çalışmada ve hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan, bu zamanlara gelmemi sağlayan, sevgi ve hoşgörü ile beni yetiştiren annem, babam ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BİLDİRİM	i
İMZA SAYFASI.....	ii
ÖZET	iii
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLO DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1 JABLONSKİ DİAGRAMI	4
2.2 FLORESANS EMİSYONUNA ETKİ EDEN FAKTÖRLER	6
2.2.1 YAPISAL FAKTÖRLER	6
2.2.2 ÇEVRESEL FAKTÖRLER.....	7
2.3 FLORESANS SÖNÜM.....	9
2.4 FLORESAN MADDELER.....	10
2.5 NÜKLEİK ASİTLERİN ÖZELLİKLERİ VE FLORESAN PROBLAR İLE ETKİLEŞİM TÜRLERİ.....	11
2.6 DNA'NIN FLORESAN PROBLARLA BAĞLANMA ÖZELLİKLERİ.....	13
2.7 MODAFİNİL	16
2.7.1 KİMYASAL VE FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ	17
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	19
3.1 KULLANILAN ALET VE CİHAZLAR	19
3.2 REAKTİF VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	19
3.3 MODAFİNİL SENTEZİ	19
3.4 YÖNTEM.....	23
3.5 DOCKING (KENETLENME) ÇALIŞMASI.....	23
4. DENEYSEL SONUÇLAR.....	25
4.1 FLORESANS ÇALIŞMALARI.....	25
4.2 BAĞLANMA DENGELERİNİN ANALİZİ.....	29
4.3 HOECHST 33258 İLE FLORESANS SÖNÜM ÇALIŞMASI.....	31

4.4 ABSORPSİYON ÇALIŞMALARI	33
4.5 SODYUM KlorÜR FLORESANS SÖNÜM ÇALIŞMASI.....	34
4.6 VİSKOZİTE ÇALIŞMALARI	35
4.7 TERMODİNAMİK PARAMETRELER VE ETKİLEŞİM TÜRLERİ.....	36
4.8 DOCKİNG (KENETLENME) ÇALIŞMA SONUÇLARI	38
<u>5. TARTIŞMA.....</u>	<u>41</u>
<u>KAYNAKÇA.....</u>	<u>43</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>47</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Floresans ve Fosforesansın Işık-madde Etkileşim Çerçevesindeki Yeri	4
Şekil 2. Jablonski Diyagramı	5
Şekil 3. Dinamik(a) ve Statik(b) Sönümlerin Sıcaklığa Bağlı Grafikleri(Lokowicz, 2006:280).	10
Şekil 4. Purin, Pirimidin Bazları ve Pentoz Şekerlerinin Yapıları	12
Şekil 6. Çeşitli Floresan DNA Problarının Yapısı.	14
Şekil 7. DNA ve Küçük Moleküllerin Bağlanma Türleri.	16
Şekil 8. Modafinil ve Modafinilin R-, S- enantiyomerlerinin Yapısı	17
Şekil 9. Bileşik 3' ün ¹ H-NMR Spektrumu	21
Şekil 11. ct-DNA-EB Kompleksinin Floresans Emisyonu Üzerine Modafinilin Etkisi	26
Şekil 12. EB Floresans Emisyonu Üzerine Modafinilin Etkisi [EB]=1.59x10 ⁻⁵ M... ..	27
Şekil 13. ct-DNA-EB Kompleksinin Modafinil İle Farklı Sıcaklıklarda Titrasyonundan Elde Edilen Stern-Volmer Grafiği	28
Şekil 14. ct-DNA-EB Kompleksinin Modafinil ile Farklı Sıcaklıklarda Titrasyonundan Elde Edilen Çift-Logaritma Grafikleri.....	30
Şekil 15. ct-DNA-Hoechst 33258 Kompleksinin Modafinil İle Titrasyonu Sonucu Elde Edilen Floresans Spektrumu	32
Şekil 16. ct-DNA-EB Kompleksi ile Modafinilin Etkileşimine Ait Absorpsiyon Spektrumları.....	33
Şekil 17. ct-DNA-EB Kompleksi ile Modafinilin Etkileşiminin 400-600 nm Arasındaki Absorpsiyon Spektrumları ([EB]=1.59x10 ⁻⁵ M)	34
Şekil 18. Modafinil-ct-DNA-EB Sisteminin Floresans Emisyonu Üzerine İyonik Şiddet Etkisi ([EB]= 1,59x10 ⁻⁵ M; [ct-DNA]= 6,09x10 ⁻⁵ M; [MD]= 2,95x10 ⁻⁵ M)	35
Şekil 19. ct-DNA'nın Viskozitesi Üzerine Modafinilin Etkisi	36
Şekil 20. Modafinil-ct-DNA-EB Sisteminin van't Hoff Grafiği	37
Şekil 22. Modafinil Bileşiğinin DNA'daki Yerleştirme Pozları ve Etkileşimleri	39

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Modafinil-ct-DNA-EB Sistemi İçin Stern –Volmer Verileri	29
Tablo 2. Modafinil-ct-DNA-EB Sistemi İçin Bağlanma Sabiti ve Bağlanma Kısım Sayısı Değerleri	30
Tablo 3. Modafinil-ct-DNA-Hoechst 33258 Sistemi İçin Stern –Volmer Verileri ...	32
Tablo 4. Modafinil-ct-DNA-EB Sisteminin Termodinamik Değerleri.....	37
Tablo 5. Modafinil'in B-DNA ile Etkileşim Türleri ve Mesafeleri.....	40
Tablo 6. Oluşturulan Kompleksin Bağlanma Enerjisi ve İnhibisyon Sabiti (K _i) Değerleri.....	40

1.GİRİŞ

Günümüzde uyarıcı özelliğe sahip maddelerin yasal veya yasal olmayan yollarla kullanımları birçok alanda karşımıza çıkmaktadır. Bu uyarıcılardan biri olan psiko-uyarıcılar narkolepsi, uyku bozuklukları, dikkat eksikliği ve hiperaktivite gibi hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi hastalığın tedavisi için geniş ölçüde reçete edilir. Tedavi amaçlı kullanımlarının dışında yasal olarak askeri alanda verimliliği ve uykusuzluğa direnci artırma amaçlı kullanılmaktadır. Bilişsel gelişimi artırmak, akademik olarak başarı elde etmek ve spor müsabakalarında performans yükseltmek için yasa dışı kullanımları da oldukça yaygındır. Spor müsabakalarında yasal olmayan yöntemler ile performansı üst seviyeye çıkarmak için eski zamanlardan beri gündemi meşgul etmiştir. Bu konuda denetimin sağlanabilmesi için Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) kurulmuş ve WADA tarafından doping etkisi yapan birçok madde yasaklanmıştır. Yasaklanan bu maddeler içerisinde 64 tane de uyarıcı madde bulunmaktadır. Bir maddeyi uyarıcı olarak sınıflandırmak için bir kriter bulunmamaktadır. Bununla beraber bir maddeyi uyarıcı ajan olarak sınıflandırmak için spor bağlamında bazı kurallar vardır. *Uyarıcı* kelimesi genellikle merkezi sinir sistemini (MSS) uyaran, zihinsel fonksiyon ve davranış üzerinde belirgin bir etkiye sahip olan, heyecan ve öfori (coşku) üreten, yorgunluk hissini azaltan ve motor aktivitede bir artış gösteren ajanları ifade eder (Deventer, Roels, Delbeke, Eenoo ve Van, 2011).

Modafinil, narkoleptik sınıfa ait, WADA tarafından yasaklanan psiko-uyarıcı bir ilaçtır. Kimyasal adı 2-[(Diphenilmetil)-sülfinil] asetamid olan modafinil, Cephalon tarafından üretilmiş ve Aralık 1998'de ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından

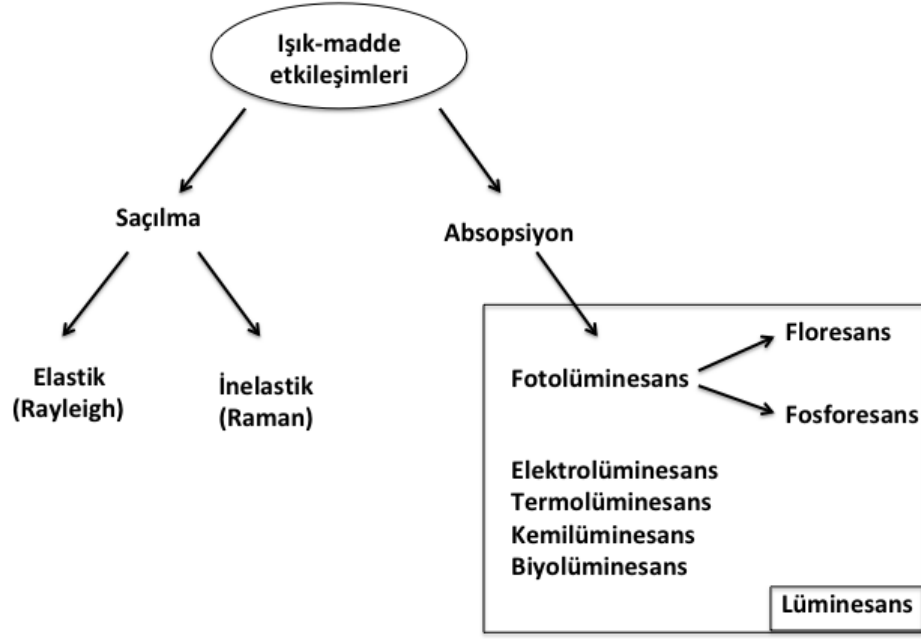
narkolepsi, vardiyalı iş uyku bozukluğu ve obstrüktif uyku apnesi ile ilişkili aşırı gündüz uykusu tedavisi için onaylanmış, daha sonraki yıllarda dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğu (DEHB) tedavisinde de kullanılmıştır (Bijithra, Ragan ve Shanmugasundara, 2016). Ayrıca hastalığa bağlı yorgunluk, dikkat eksikliği bozukluğu, Alzheimer Hastalığı, yaşa bağlı hafıza zayıflaması, depresyon, şizofrenide bilişsel bozukluk, anestezi sonrası durgunluk gibi problemlerde de denenmiştir. Etki mekanizması henüz aydınlatılmamış olmakla beraber diğer uyarıcı ilaçlardan farklı olduğu düşünülmektedir (Alacam, Basay, Tumkaya, Mart ve Kar, 2018). Modafinilin etkisini noradrenerjik (alfa-1 aktivasyonu reseptörleri) ve dopaminerjik nörotransmisyon üzerinden gösterdiği bilinmektedir (Stone, Cotecchia, Lin ve Quartermain, 2002; Mereu, Bonci, Newman ve Tanda, 2013). Minzenberg ve Carter'e (2008) göre uyanıklığı ve etkinliği teşvik eden özellikleri çoğunlukla bu nöromediyatörler üzerindeki etkileri ile ilişkilidir. Amfetamin benzeri etkiler gösteren modafinilin kötüye kullanım potansiyeli daha düşük kabul edilmektedir. Dopaminerjik aktivitesi ve düşük kötüye kullanım potansiyeli nedeniyle, modafinil kokain bağımlılığı tedavisinde, meth-amphetamine kötüye kullanımında ve alkol bağımlılarının bozulmuş bilişsel fonksiyonlarının düzeltilmesinde kullanılmıştır (Anderson ve diğerleri, 2009; Shearer ve diğerleri, 2009; Schmaal ve diğerleri, 2013).

DNA-küçük molekül etkileşimleri, ilaç, moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve tıp alanında yapılan DNA ile ilaç etkileşimi araştırmalarında büyük önem taşımaktadır. DNA'nın kendine özgü yapısı nedeniyle organik ve inorganik moleküller yapıya bağlanır veya yapısının içine katılarak etkileşime girer. Bu durum DNA ile ilaçların bağlanma türünün anlaşılması için birçok yöntem geliştirilmesine sebep olmuştur. Bu yöntemlerden biri olan florimetrik analizler hızlı, hassas, basit ve rahat uygulanabilir olması yönünden son yıllarda küçük molekül-DNA etkileşimlerinin araştırılmasında öncelikli olarak tercih edilmektedir. DNA'nın doğal floresansının çok düşük olması DNA-küçük molekül etkileşimlerinin incelendiği analitik çalışmalarda bir dış florofor gerektirmektedir. Bu çalışmada modafinil-DNA etkileşimi floresans ve UV-abs spektroskopileri ile incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

Lüminesans, elektronik olarak uyarılmış bir türden gelen ultraviyole, görünür veya kızılötesi fotonların emisyonudur. Latince'den gelen lüminesans (lümen=ışık) kelimesi ilk kez fizikçi ve bilim tarihçisi Eilhardt Wiedemannin tarafından 1888'de yalnızca sıcaklık artışı ile ilişkilendirilmeyen tüm ışık fenomenlerini tanımlamada kullanılmıştır. Lüminesans, uyarılma esnasında kullanılan enerji kaynağına göre sınıflandırılır (Valuer, 2002: 3).

Ultraviyole (UV) veya görünür bölgeden bir ışmanın foton absorpsiyonunda enerji kaynağı olarak kullanılması sonucu uyarılma sağlanırsa gözlenen lüminesans olayı **fotolüminesans** olarak adlandırılır. Fotolüminesans; uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında gerçekleşirse **floresans**, uyarılmış bir triplet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında gerçekleşirse **fosforesans** olarak ifade edilir. Floresans emisyonları, uyarılmış haldeki elektronun temel haldeki ters yönlü elektronun orbitaline dönmesi ile gerçekleşir ve spin izinli geçişlerdir. Fosforesans emisyonlarında ise uyarılmış düzeydeki elektron ile temel haldeki elektron aynı yönlüdür ve geçişler spin-yasaklıdır. Analit yapısının nicel ve nitel analizinde absorpsiyon yöntemlerine göre daha duyarlı ve bilgi verici olması nedeniyle özellikle floresans yöntemler yaygın kullanıma sahiptir (Özkan, 2016: 3). Şekil 1'de ışık-madde etkileşimi sonucunda gerçekleşmesi olası süreçler ile floresans ve fosforesansın ışık-madde etkileşim çerçevesindeki yeri görülmektedir.

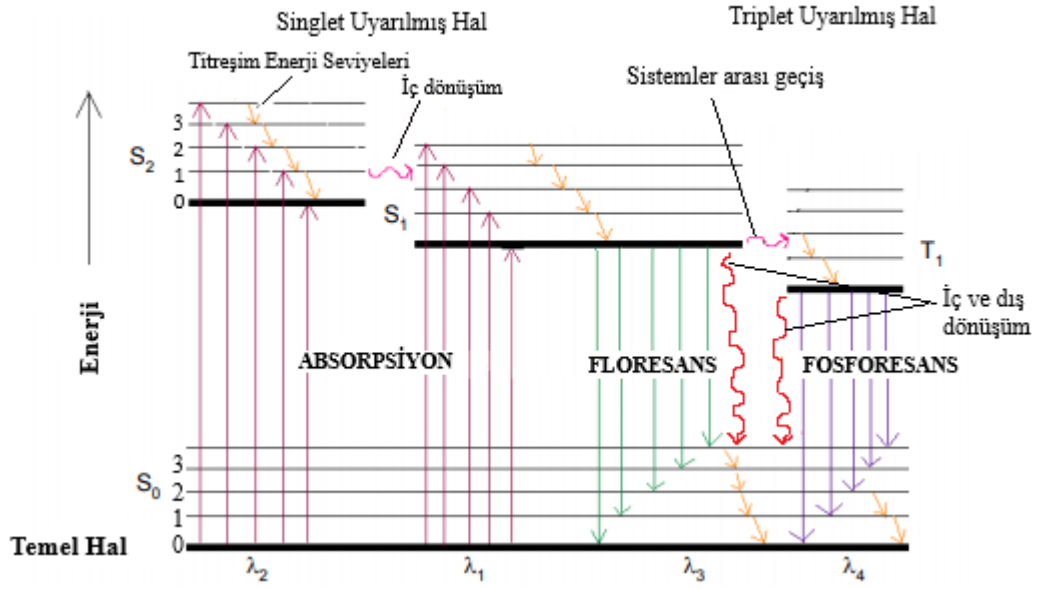


Şekil 1. Floresans ve Fosforesansın Işık-madde Etkileşim Çerçevesindeki Yeri

Lüminesans Kimyasal tepkime sonucunda gerçekleşiyor ise **kemilüminesans**, elektrokimyasal bir reaksiyon sonucunda gerçekleşiyor ise **elektrolüminesans**, biyolojik tepkime ürünü ise **biyolüminesans** olarak tanımlanmaktadır.

2.1 Jablonski Diagramı

Işığın absorpsiyonu ve emisyonu arasındaki süreçler genellikle Jablonski diyagramları ile ifade edilmektedir. Birçok farklı formda kullanılan diyagramlar uyarılmış enerji düzeylerinde oluşabilecek çeşitli moleküler süreçleri görselleştirmektedir. Diyagramlar floresansın babası olarak nitelendirilen Profesör Alexander Jablonski'nin adı ile anılmaktadır (Lokowicz, 2006:3-4). Şekil 2'de Jablonski diyagramının bir örneği görülmektedir.



Şekil 2. Jablonski Diyagramı

Singlet temel, birinci ve ikinci elektronik düzeyler sırası ile S_0 , S_1 ve S_2 ile gösterilir. Floroforlar bu elektronik enerji seviyelerinin her birinde 0, 1, 2, vb. ile gösterilen bütün titreşim enerji seviyelerinde bulunabilir. Jablonski diyagramı incelendiğinde, emisyon enerjisinin tipik olarak absorpsiyon enerjisinden daha az olduğu görülür. Bu nedenle, floresans emisyonu uyarılmaya göre daha uzun dalga boylarında meydana gelir. Bu fenomen Stokes kayması olarak tanımlanır. Çözücü etkileri, uyarılmış hal reaksiyonları, kompleks oluşumu veya enerji transferleri Stokes kaymalarının başlıca nedenleridir (Lokowicz, 2006: 5).

Şekil 2’ de verilen Jablonski diyagramında görüldüğü gibi, ışık absorpsiyonu sonucu oluşan uyarılmış bir molekül fazla enerjisini tamamen veya kısmen ışımasız yoldan atabilir. Bir molekülün elektronik enerji düzeyleri, titreşim enerji düzeylerinin üst üste çakışmasına olanak sağlayacak kadar yakın ise, iki uyarılmış singlet enerji düzeyi için gösterilen ve fazla enerjinin ısı şeklinde atıldığı *iç dönüşüm* olayı gerçekleşir. Bir elektronik enerji düzeyinde, titreşim enerji düzeyleri arasında gerçekleşen ışımasız geçiş sonucu ise *titreşim durulması* meydana gelir.

Uyarılmış singlet türü bir molekülden yine ışımasız yoldan daha düşük enerjili triplet türü uyarılmış bir molekül oluşabilir. Olasılığı oldukça az olan ve bu nedenle yavaş

bir biçimde gerçekleşen bu olayda üst orbitaldeki elektronun spini ters çevrilir. Bu olaya *sistemler arası geçiş* denir. Uyarılmış bir molekülün çözücü veya diğer çözünen moleküller ile etkileşim sonucunda ışımasız temel hale dönmesi *dış dönüşüm* olarak adlandırılır.

Floresansın emisyon hızı yaklaşık 10^8 sn^{-1} ve tipik bir floresans ömrü ise 10 ns ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$) olarak bilinmektedir. Fosforesansın emisyon hızı floresansa göre daha yavaştır. Fosforesans hızı $10^3\text{-}10^0 \text{ sn}^{-1}$ ömrü ise saniye cinsinden milisayinedir. Floresans olayı sistemi uyaran ışımaya ortadan kalkınca $10^{-6}\text{-}10^{-10} \text{ s}$ kadar daha sürerken, böyle bir durumda fosforesans $10^{-2}\text{-}10^{-6} \text{ s}$ kadar daha devam eder (Lokowicz, 2006:5; Fleming, 2017).

Floresans emisyonunda ışımaya kuvveti kuantum verimi ile ifade edilir. Yayılan foton sayısının absorplanan foton sayısına oranı *fotoluminesans kuantum verimi* olarak tanımlanır.

Spektroskopik yöntemler arasında floresans spektroskopisi göreceli olarak yeni bir metoddur (Skoog, Holler ve Crouch, 2016). Maddenin floresans emisyonunun incelenmesi ve takibi üzerine geliştirilen yöntem absorpsiyon spektroskopisine nazaran duyarlı ve seçici olması nedeni ile hızla kullanım alanlarını arttırmıştır. Floresans spektroskopisinin kullanım alanlarına biyoteknoloji, adli tıp, genetik analizler ve DNA zinciri ile ilgili çalışmalar örnek verilebilir (Fleming, 2017; Lokowicz, 2006).

2.2 FLORESANS EMİSYONUNA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Floresans emisyonuna etki eden iki büyük faktör vardır;

1. Molekülün yapısal özelliği
2. Molekülün çevresi

2.2.1 Yapısal Faktörler

π -elektron sisteminin etkisi: Floresan maddelerin büyük bir kısmı aromatik yapılar içerir. Alifatik bileşiklerden doymamışlık oranı oldukça yüksek olan bazı moleküllerin de floresan özelliği olduğu bilinmektedir. Genel olarak yapıda π -elektron sisteminde artış absorpsiyon ve floresans emisyon spektrumlarının uzun

dalgaboylarına kaymasına, kuantum veriminde ise artışa sebep olmaktadır. Aromatik hidrokarbonların en düşük enerjili geçişleri $\pi-\pi^*$ geçişleridir ve bu geçişler yüksek molar absorptivite katsayıları ve göreceli yüksek kuantum verimleri ile karakterize edilir.

Fonksiyonel grup içeren aromatik hidrokarbonlar: Fonksiyonel grupların aromatik hidrokarbonların floresans özelliklerine etkileri oldukça karmaşıktır ve genellemeler çok dikkatli yapılmalıdır. Hem fonksiyonel grubun yapısı hem de pozisyonu bu karakteristikleri değiştirebilir. *İç ağır atom* bulunduran yapılarda genellikle sistemler arası geçiş ihtimali arttığı için floresans sönümü gözlenir. Bu etki kuantum verimi oldukça yüksek olan yapılarda daha düşük gözlenir. Bununla beraber kuantum verimi çok düşük olan yapılarda da tam tersi olarak sistemler arası geçiş verimi düşük olacağından ağır atom etkisi düşük olabilir. *Elektron-itici fonksiyonel gruplar* molar absorpsiyon katsayısında artışa neden olarak hem absorpsiyon hem floresans spektrumlarında kaymaya neden olur. Bununla beraber spektrumlarda bantlar ana moleküle oranla daha geniş ve yapısal bozulmaya uğramış olur. *Elektron-çekici fonksiyonel gruplar* içeren yapılarda durum biraz daha karmaşık olabilir. Çözücü polaritesine göre gösterdikleri floresans verimi değişiklik gösterebilir (Valuer, 2002:11).

Yapısal Katılık (Rijidite) Etkisi: Floresans özelliklerini etkileyen yapısal etmenlerden bir tanesi olan rijidite molekülün esnek olmama durumuna denir. Moleküler katılık, hareket serbestliğini azalttığı için sistemler arası geçişler ve moleküller arası çarpışmalar gibi ışımasız geçiş olasılıklarını azaltır. Bu nedenle, yapının sabit ve hareketsiz olması floresans özelliğini artırır. Yapısal katılığı yüksek olan moleküller yapısal katılığı düşük olan benzer moleküllere göre daha düşük şiddetli floresans emisyonu gösterirler. Örneğin, floresein ve fenolftalein yapısal olarak çok benzer olmalarına rağmen floresein kuvvetli floresans özellik gösterirken, fenolftalein floresans özellik göstermemektedir.

2.2.2 Çevresel Faktörler

Floresan özellik gösteren moleküllerin büyük kısmı mikro çevrelerine yüksek duyarlılık gösterir.

Sıcaklık ve Viskozite Etkisi: Uyarılmış moleküllerin çarpışma olasılığı sıcaklığın artması ile orantılı olarak artmaktadır. Bu nedenle, sıcaklığın artması ile kuantum verimi azalmaktadır. Düşük sıcaklıkta ve yüksek viskoziteli bir ortamda ise dinlenme zamanı, uyarılmış durumun ömründen daha uzun olması floresansı artırmaktadır.

Çözücü: Kullanılan çözücülerin molekül ile etkileşimleri, maddenin floresans özellikleri üzerinde önemli etki göstermektedir. Örneğin, bazı aromatik karbonil bileşikleri düşük seviyede $\pi-\pi^*$ geçişlerine elverişli olmaları nedeni ile makul bir kuantum verimine sahiptir. Bununla birlikte, enerji farkı oldukça küçük olan bir $n-\pi^*$ seviyesi varsa floresans kuantum verimi büyük ölçüde çözücünün polaritesine bağlıdır. Aslında bazı çözücülerde $n-\pi^*$ düzeyinin enerjisi, $\pi-\pi^*$ düzeyinin enerjisinden daha düşük olabilir. Çözücünün polaritesi ve hidrojen bağı yapma gücü arttığında, $n-\pi^*$ düzeyi daha yüksek enerjiye, $\pi-\pi^*$ durumu ise daha düşük enerjiye kayar. Bu nedenle, polar çözücülerde yoğun floresans emisyonu ve polar olmayan çözücülerde zayıf floresans emisyonu gözlemlenebilir.

pH etkisi: Işığı absorplayan bir molekülün asidik ve bazik özellikleri temel ve uyarılmış hallerde aynı değildir. Uyarılma nedeniyle elektron yoğunluğunun tekrar düzenlenmesi bu gözlemin sebeplerinden biri olabilir. En ilginç durumlardan biri asitlerin ve bazların uyarılmış halde temel hale göre daha kuvvetli olmalarıdır. Böyle durumlarda uyarılmanın foton indüklenmiş proton transferini tetiklemiş olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, bir proton verici grubun asidik karakteri (bir aromatik halkaya bağlı OH grubu) uyarılma üzerine gelişebilir, böylece uyarılmış durumda bu grubun pK^* değeri, temel durumdaki pK değerinden çok daha düşük olur. Aynı şekilde, uyarılmış durumdaki bir proton alıcı grubun (heterosiklik nitrojen atomu) pK^* değeri, temel haldeki pK değerinden çok daha yüksek olur. Kısacası moleküllerin temel ve uyarılmış haldeki asidik ve bazik özellikleri sonucu hem absorpsiyon hem floresans spektrumları pH'ya bağlıdır. Örnek olarak fenol ve anilin nörtr, asidik ve bazik ortamlardaki farklı özellikleri gösterilebilir. Fenol nörtr ortamda floresans gösterirken bazik bir ortamda floresans göstermez. Anilin ise nörtr ve bazik ortamda görünür bölgede floresans emisyonu yaparken, asidik ortamda floresans özelliği kaybolur.

2.3 FLORESANS SÖNÜM

Floresans sönüm örneğin floresans şiddetini düşüren bütün süreçleri tanımlamak için kullanılır. Uyarılmış enerji düzeyi reaksiyonları, moleküler oryantasyon değişiklikleri, enerji transferleri, temel hal kompleks oluşumu ve çarpışmalı sönüm floresans sönüme neden olan moleküler etkileşimlere örnektir. Florofor ve söndürücü molekül arasında çarpışmadan kaynaklanan sönüm **çarpışmalı** veya **dinamik sönüm** olarak adlandırılır. Florofor ile söndürücü molekül arasında bir bağlanma sonucu gerçekleşen sönüm ise **statik sönüm** olarak adlandırılır. Floresans sönüm verileri *Stern-Volmer* eşitliği (1) ile incelenir (Lakowicz, 2006).

$$F_0 / F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + \tau_0 k_q [Q] \quad (1)$$

F_0 : Söndürücü molekül yokluğundaki floresans şiddeti

F : Söndürücü molekül varlığındaki floresans şiddeti

$[Q]$: Söndürücü maddenin derişimi

K_{SV} : Stern –Volmer sönüm sabiti

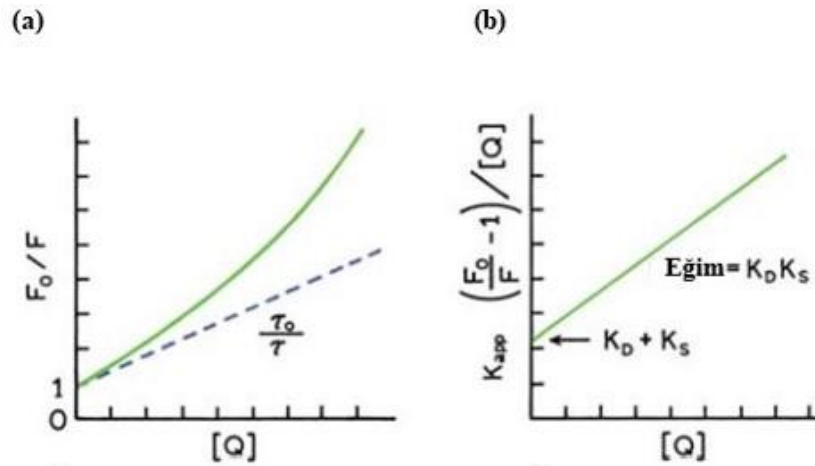
k_q : Bimoleküler sönüm sabiti

τ_0 : Söndürücü molekül yokluğunda floresans ömrü

Hem dinamik hem statik sönümde florofor ile söndürücü molekül arasında bir etkileşim olmaktadır. Bu durum özellikle biyokimyasal sistemlerde floresans sönümü kıymetli bir araç haline getirmektedir. Dinamik sönüm sırasında söndürücü moleküller, florofora uyarılmış haldeki ömrü süresince nüfuz eder. Florofor ve söndürücü arasındaki etkileşim üzerine florofor foton emisyonu olmaksızın temel hale döner. Burada genellikle floroforda kalıcı bir değişim gerçekleşmez. Florofor ve söndürücü molekül arasında floresans olmayan bir temel hal kompleksi oluşması sonucu ise statik sönüm meydana gelir. Bu kompleks ışımayı absorpladığında vakit kaybetmeksizin ışımasız geçiş yolu ile temel hale döner.

Etkileşim mekanizması farklı sıcaklıklarda yapılan floresans ölçümlerine göre aydınlatılabilir. Dinamik sönüm moleküler difüzyona bağlıdır. Genellikle yüksek sıcaklıklarda daha büyük difüzyon katsayıları elde edilir. Bu nedenle sıcaklık artışı

ile beraber bimoleküler sönüm sabitinde de artış beklenir. Buna karşılık statik sönümlerde sıcaklık artışı ile beraber komplekslerin kararlılıkları azalacağı için yüksek sıcaklıklarda düşük sönüm sabitleri elde edilir. Dinamik sönüm için literatürde tanımlanan bimoleküler hız sabiti üst sınırı $2.0 \times 10^{10} \text{ Lmol}^{-1}$ 'dir. Daha yüksek değerler kompleks oluşumu yönünde yorumlanmaktadır. Dinamik sönüm ve dinamik-statik birleşik sönüm durumlarında beklenen Stern-Volmer grafikleri Şekil 3'de görülmektedir (Stevens, 1971; Lokowicz, 2006; Ramana ve diğerleri, 2016).



Şekil 3. Dinamik(a) ve Statik(b) Sönümlerin Sıcaklığa Bağlı Grafikleri(Lokowicz, 2006:280).

2.4 Floresan Maddeler

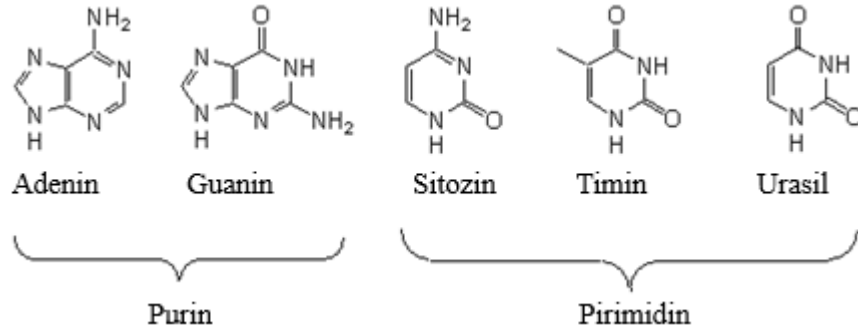
Floresan özellik gösteren maddeler floresan prob, floresans uç veya florofor olarak adlandırılır. Floresan problemler özelliklerine göre iki ana gruba ayrılır.

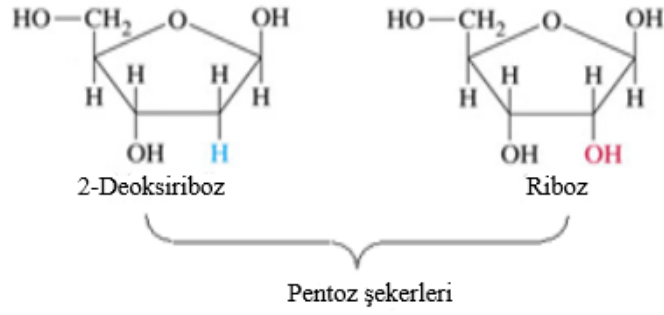
- **İntrinsik (iç veya doğal) problemler:** Bunlar doğal floresan maddelerdir. Diğer moleküller ile etkileşimleri incelenirken moleküllerin kendi floresans özellikleri üzerindeki değişiklikler incelenir. Aromatik amino asitler, flavinler, klorofil türevleri bu gruba örnektir.
- **Ekstrinsik (dış) problemler:** Floresan özellik göstermeyen yapılara bağlanarak etkileşimlerin incelenmesine olanak sağlayan floresan problemlerdir. Etkileşimler kullanılan dış problemlerin floresans özelliklerindeki değişikliklerin izlenmesi ile gerçekleştirilir. Dansil klorür, floresein, kumarin ve rodamin dış problemlere örnek olarak verilebilir.

Lokowicz'e (2006) göre floresan problemler biyoanalitik uygulamalarda, immüno-florimetrik tekniklerde ve biyomolekül işaretleme tekniklerinde oldukça sık kullanılmaktadır (Lokowicz, 2006).

2.5 NÜKLEİK ASİTLERİN ÖZELLİKLERİ VE FLORESAN PROBLEMLER İLE ETKİLEŞİM TÜRLERİ

Canlı organizmaların neredeyse tamamını lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve su oluşturmaktadır. Genetik bilgi aktarımını sağlayan nükleik asitler canlı organizmaların yaklaşık %1'lik kısmını oluşturan bileşikler arasındadır. Nükleik asitler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) olmak üzere iki gruba ayrılır. Nükleik asitler nükleotid adı verilen yapıtaşlarından meydana gelen polimer yapılardır. Nükleotidler bir fosfat grubu, pentoz şekerleri ve bir azotlu bazdan oluşurlar. Azotlu bazlar olarak adlandırılan grup purin ve pirimidin olarak iki ana yapıda bulunur. Purin, bazları olan adenin (A) ve guanin (G), 6 üyeli halkaya bağlı 5 üyeli iki halkasal yapının kaynaşmasından oluşurken; pirimidin bazları olan urasil (U), timin (T) ve sitozin (C) 6 üyeli halkadan oluşurlar. Timin, DNA'ya özgün bir bazdır. Adenin ile timin aralarında iki hidrojen bağ, guanin ve sitozin aralarında üç hidrojen bağ yaparak birbirlerini tamamlarlar (Caymaz, 2019; Lokowicz, 2006). Purin, pirimidin bazları ve pentoz şekerlerinin yapıları Şekil 4'de görülmektedir.



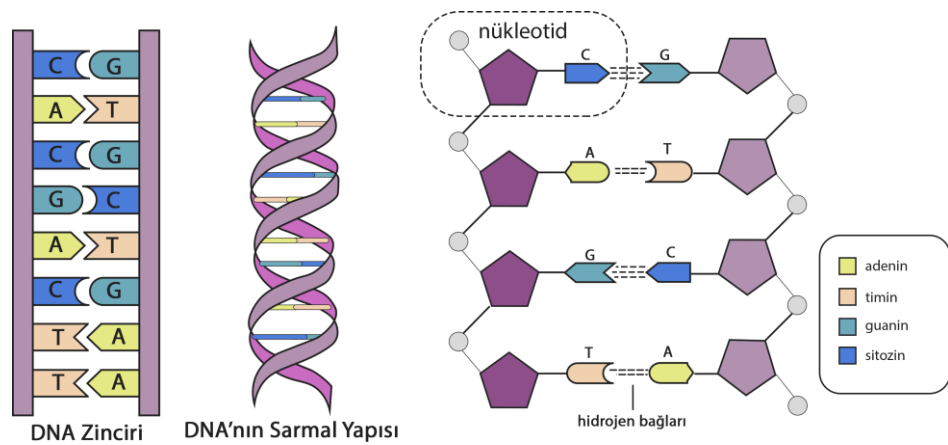


Şekil 4. Purin, Pirimidin Bazları ve Pentoz Şekerlerinin Yapıları

DNA'nın bugün kabul edilen şekli çift sarmaldır ve yapı 1953 yılında Francis Crick ve James Watson tarafından önerilmiştir. Bu da modern çağın en önemli olaylarından biri olarak kabul edilmektedir. Bu araştırmaları, Maurice Wilkins ve Rosalind Franklin'in DNA'nın X-ışını kırınımı çalışmaları ile Erwing Chargaff'ın nükleik asitlerde purin ve pirimidin bazlarının düzeni ile ilgili çalışmaları izlemiştir. Bu bazların düzenine baz-eşleşme kuralı denir ve aşağıdaki gibi ifade edilir.

1. Adenin miktarı timin miktarına eşittir. ($A=T$)
2. Guanin miktarı sitozin miktarına eşittir. ($G=C$)
3. Purin bazları toplamı pirimidin bazları toplamına eşittir. ($G+A=C+T$)

Çift sarmal DNA yapısı ve kısımları Şekil 5'de görülmektedir.

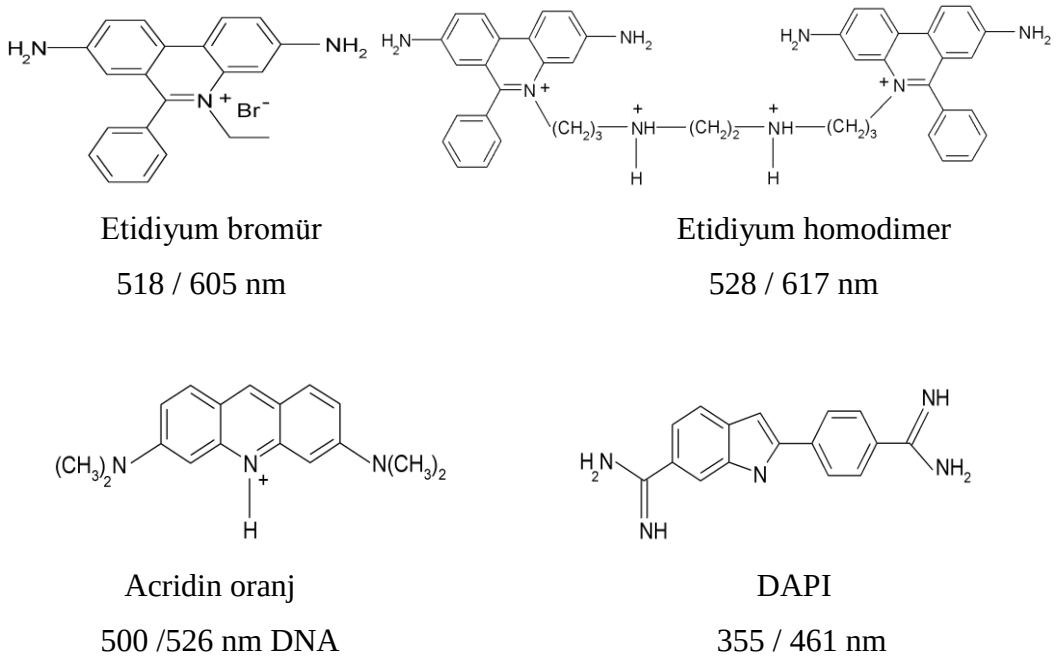


Şekil 5. Nükleik Asiti Oluşturan Kısımlar

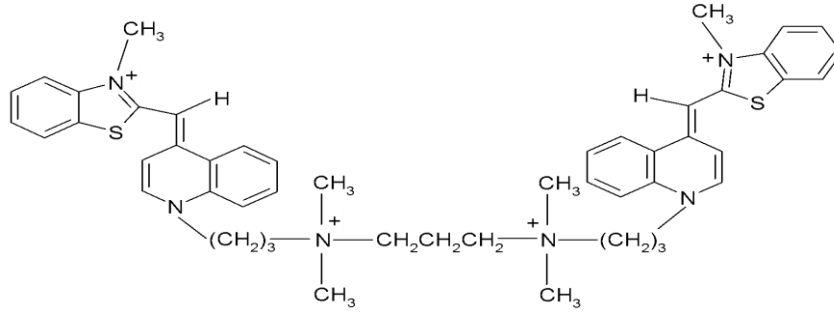
Çift sarmal yapısını koruyabilmek için, iki zincir arasında hidrojen bağ oluşumu ancak zincirlerden birindeki A'nın tamamlayıcı zincirdeki T'ye ya da G'in C'ye karşılık geldiği durumlar da olasıdır. A ile C göreceli küçük moleküller olduklarından birbirlerine yeteri kadar yaklaşamayacaklardır. G ve A'nın karşılıklı bulunmaları da moleküllerin fazla büyük olmaları nedeni ile olası değildir.

2.6 DNA'NIN FLORESAN PROBLARLA BAĞLANMA ÖZELLİKLERİ

Biyolojik moleküllerin tanımlanması için kullanılan yöntemler arasında floresans spektroskopisi göreceli olarak kolay uygulanabilir, ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Bu özellikleri nedeni ile özellikle nükleik asit küçük molekül etkileşimlerinde yapılan çalışmalarda sıkça görmekteyiz. Nükleik asitlerin doğal floresans emisyonlarının analitik çalışmalara olanak verecek kadar yüksek olmaması nükleik asit çalışmalarında floresan problemlerin kullanılmasını gerektirmektedir (Hoffmann ve Bischoff, 2002:322). Bir molekülün DNA ile etkileşim karakteristikleri incelenerek DNA'nın yapı ve fonksiyonları, protein-nükleik asit etkileşimi, DNA-ilaç etkileşimleri açıklanabilir. Günümüzde etkinliği daha yüksek DNA hedefli ilaçların tasarlanabilmesi için DNA-küçük molekül etkileşimlerinin aydınlatılabilmesi zorunludur. Şimdiye kadar geliştirilmiş olan etkin DNA problemlerinden bazıları Şekil 6'da görülmektedir.

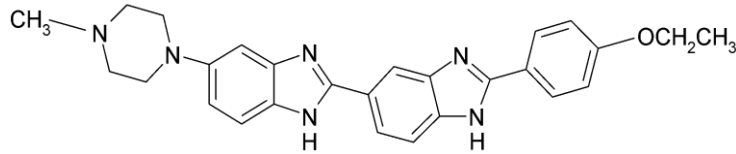


460 / 650 nm RNA



TOTO

514 / 533 nm



Hoechst 33342

350 / 460 nm

Şekil 5. Çeşitli Floresan DNA Problarının Yapısı.

Küçük moleküller DNA ile tersinir olarak üç temel mod üzerinden etkileşime girer:

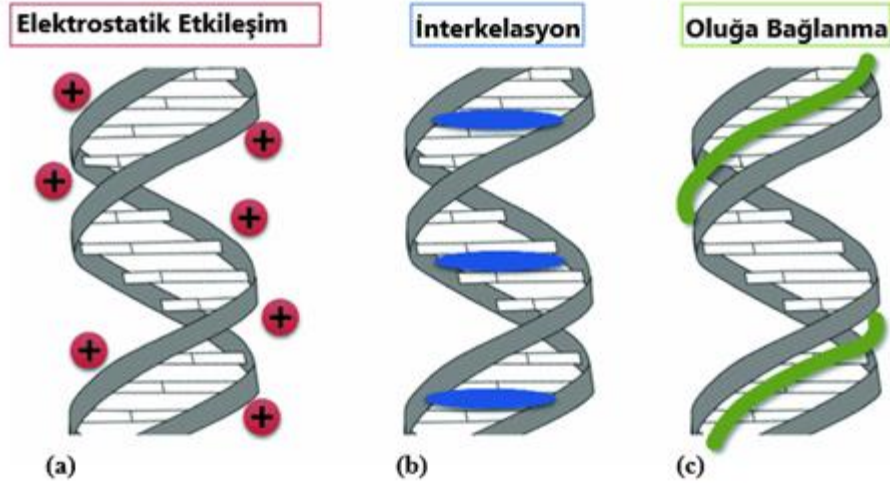
- elektrostatik dış bağlanma;
- interkelyasyon;
- major veya minor oluğa tutunma.

Elektrostatik dış bağlanma: DNA sarmalı hem yapısını hem de fonksiyonlarını etkileyen negatif yüklü fosfat grupları içermektedir. DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla Na^+ ve Mg^{+2} gibi pozitif yüklü iyonlar DNA'nın büyük bir kısmının nötralle olmasını sağlar ve karşıt iyonlar serbest kalır (Strekowski ve Wilson, 2007:3-4). Bunun sonucunda DNA yapısında ayrılmalar gerçekleşebilir. Bu tür etkileşimler genellikle seçici değildir. İnterkeleyasyon ve oluğa bağlanma gösteren

birçok küçük molekül bu etkileşimlerin yanı sıra elektrostatik etkileşimi de bünyelerinde bulundurur (Şekil 7.a).

İnterkalasyon: İnterkalasyon hipotezi, küçük molekülün DNA'nın bitişik baz çiftleri arasına interkelatif bir şekilde yerleştiği temeline dayanır. İnterkalasyon yapan yapılar genellikle düzlemsel ve aromatik yapı içermeleri ile karakterize edilir. Çok sayıda antibiyotik, antibakteriyel ve anti-tümör ilaç düzlemsel heteroatomik halka sistemine (kromofor) sahiptir. Bu temel yapısal özellik, bir baz çiftinin kendisi ile yaklaşık olarak aynı boyutta olan, tipik olarak üç kaynaşmış altı üyeli halkadan oluşan bir kromoforun DNA baz çiftleri arasına girerek interkalasyon yapmasına imkan sağlar (Şekil 7.b). Kromofor molekül ve baz çiftleri arasında van der Waals kuvvetleri etkindir ve interkalasyon sonucunda DNA sarmalında genişleme ve küçük değişimler meydana gelir.

Oluğa bağlanma: Moleküllerin DNA ile etkileşimlerinde oluğa bağlanma minör oluklara bağlanma ve major oluklara bağlanma olarak iki şekilde gerçekleşir. Küçük moleküller genellikle minor, protein gibi büyük moleküller ise major oluklara bağlanır (Hoffmann ve Bischoff, 2002:327). Oluğa bağlanan moleküller genellikle A-T bölgelerine bağlanma eğilimindedirler. Bunun nedeni ise minor oluk olarak adlandırılan A-T bölgelerinin daha dar olması, bu bölgede daha az sterik engel ve daha fazla elektrostatik etkileşim potansiyelinin olmasıdır. İnterkalasyon ile bağlanan yapılardan farklı olarak oluğa bağlanmalar DNA yapısında belirgin bir değişikliğe neden olmaz (Özkan, 2016: 12). Minor oluğa bağlayıcılar genellikle yarım ay şeklinde katyonik ligandlardır (Şekil 7.c).



Şekil 6. DNA ve Küçük Moleküllerin Bağlanma Türleri.

2.7 MODAFİNİL

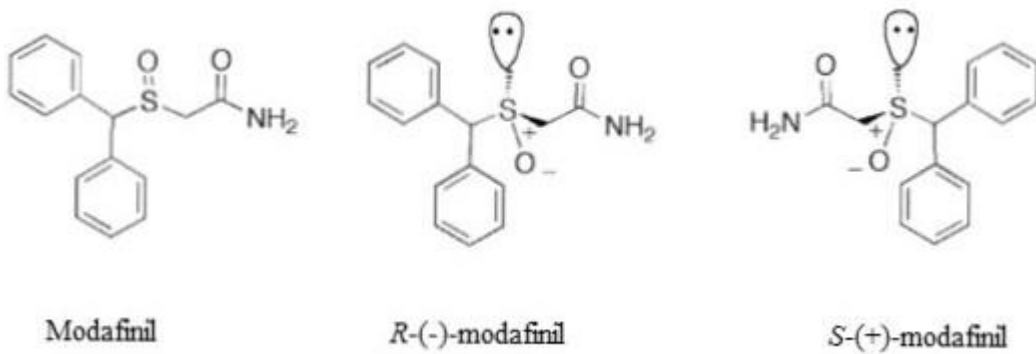
Merkezi sinir sistemi uyarıcıları (MSS) esas olarak narkolepsi tedavisinde kullanılır. Metilfenidat, amfetamin gibi MSS uyarıcıları narkolepsi ve dikkat eksikliği/hiperaktivite bozuklukları (DEHB) için kullanılsa da narkoleptik hastaların çoğunda gündüz aşırı uyku halini (EDS, excessive daytime sleepiness) kontrol etmek için etkili değildir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin potansiyel bir bağımlılık ve tolerans riski olması nedeniyle başka ilaçların gelişmesine sebep olmuştur. Araştırmalar sonucu ilk olarak 1994 yılında Fransa'da benzeri olmayan bir psiko-uyarıcı α 1-adrenoresoptör agonisti olan modafinil üretilmiştir. Uyarıcı özelliğinin olması, tolerans üreten etkilerinin olmaması ve düşük toksisite nedeniyle kısmi veya toplam uyku yoksunluğu içeren uzun süreli veya aralıksız operasyonlarda silahlı kuvvetler tarafından kullanılmıştır. 1998 ve 2003 yıllarında ise vardiyalı çalışma uyku bozuklukları, obstrüktif uyku apnesi/hipopne ve narkolepsi tedavisi için Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Ramachandra, 2016:486).

2007 yılında FDA tarafından modafinilin R-izomeri olan armodafinil aşırı uykululuk tedavisi ve bir uyarma teşvik edici ajan olduğu kabul edilmiştir (Chandasana, Kast, Bittman, Derendorf ve Hartmut, 2018).

2.7.1 Kimyasal ve Farmakolojik Özellikleri

Modafinil kimyasal adı 2-[(difenilmetil)-sülfinil] asetemit olan, narkoleptik sınıfına ait psiko-uyarıcı bir maddedir. Açık yapısı Şekil 8’de görülen modafinil molekül formülü $C_{15}H_{15}NO_2S$ ve molekül ağırlığı 273.35 g/mol’dür. FDA tarafından narkolepsi tedavisinde kullanılmak üzere izinli olan modafinil Fransız ilaç firması Cephalon tarafından üretilmektedir. Narkolepsi, uyanıklığı teşvik eden ve uyku bastıran peptitlerden olan oreksinler ailesinin işlev bozukluğu sonucu gelişen bir bozukluktur. Modafinil, oreksin nöronlarını aktive edilerek etkinlik gösterir (Bijithra ve diğerleri, 2016).

Modafinil R-ve S- enantiyomerlerinin rasemik karışımı halinde bulunur. R-modafinil, armodafinil olarak adlandırılır. İlginç bir şekilde modafinil WADA tarafından yasaklanan maddeler içerisinde, saf armodafinil ise bu listenin dışındadır (2020 WADA Yasaklılar Listesi, 2020). Kimyasal adı 2-[(R) (difenilmetil) sülfinil] asetemit olan armodafinilin de kesin etki mekanizması bilinmemektedir. Armodafinilin *in vitro* olarak dopamin taşıyıcılarına bağlandığı ve dopamin geri alımını inhibe ettiği bilinmektedir (Chandasana ve diğerleri, 2018)



Şekil 7. Modafinil ve Modafinilin R-, S- enantiyomerlerinin Yapısı

Oral yolla kullanımı yaygın olan modafinil suda ve etanolde düşük çözünürlüğe, metanolde ise eser miktarda çözünürlüğe sahiptir. Görünümü biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre beyaz-kirli beyaz kristal olan toz yapı 160-165 °C'de erimektedir. Difenil metanlar olarak bilinen ve uzun süreli zihinsel uyarılma sağlayan uyarıcı ilaç sınıfına aittir. Hafızayı geliştiren ve ruh halini aydınlatan bir psiko-uyarıcı olması nedeni ile DEHB, depresyon, Parkinson hastalığı ve çeşitli hastalıklara bağlı yorgunluğun tedavisinde de kullanılır. Literatürde bulunan çalışmalar hastaların anlamlı uyku kapasitesinden yoksun olduğu ve günde on saat veya daha fazla uyku gerektirebilen bir bozukluk olan hipersomniyi (aşırı uyku) tedavi etmek için kullanıldığını göstermektedir. Son çalışmalar ise modafinilin kokain bağımlılarının iyileşmesine, bağımlılık ile mücadele etmelerine yardımcı olabileceğini ortaya koymuştur (Ramachandra, 2016:613). Buna benzer olarak Deventer ve diğerleri tarafından yapılan çalışmalarda, modafinilin bağımlılık yapmayan yeni bir psiko-uyarıcı olduğu ve amfetamin bağımlılığı tedavisinde kullanılabileceği ifade edilmektedir (Deventer, Roels, Delbeke ve Eenoo, 2011).

Diğer bir çalışmada ise modafinilin dolaylı olarak hem insanlarda hem de hayvanlarda beynin uyku ve uyanıklık döngüsünü düzenleyen bölgelerinde gama-aminobutirik asit (GABA) salınımını düzenlediği ileri sürülmektedir (Tseng, Uralets, Lin ve Kuo, 2005).

Modafinili içeren ilk doping ihlali 2003 yılında Atletizm Dünya Şampiyonasında rapor edilmiştir (Deventer ve diğerleri, 2011). Modafinil, WADA tarafından 2004'ten beri yasaklı maddeler arasında kabul edilmektedir. İdrar ve kan plazmasındaki modafinili tespit etmek için GC-MS, LC-MS/MS, UPLC-MS ve HPLC gibi cihazlarla biyo-analitik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (Pandya ve Joshi, 2013:22)

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 KULLANILAN ALET VE CİHAZLAR

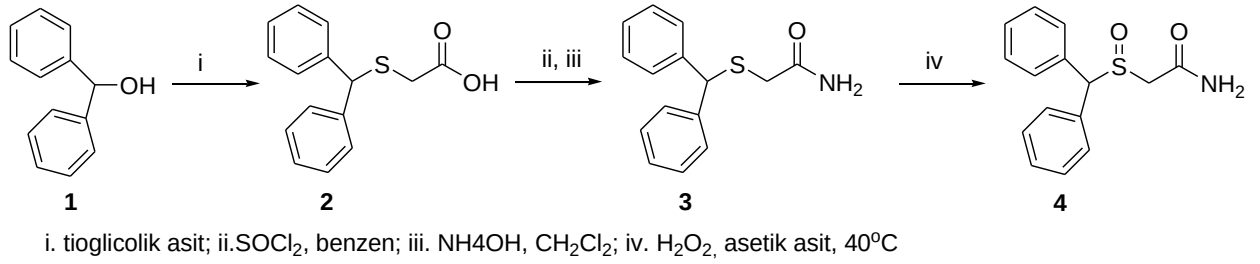
Floresans ve UV-görünür bölge absorpsiyon çalışmaları 150W zinnon lambalı Edinburgh Instruments Spectrofluorometer FS5 ile 1cm'lik quartz küvet kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada kütle ölçümlerinde VWR TX-4202L hassas terazi kullanılmıştır, pH ölçümleri ise FiveEasy Mettler Toledo pH metre ile yapılmıştır. ¹H-NMR spektrumları, bir Bruker DPX-400 enstrüman ile elde edilmiştir. Viskozite ölçümleri Cone Plate Viscometer RM100 CP2000 PLUS ile yapıldı.

3.2 REAKTİF VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

2.0×10^{-3} M stok modafinil çözeltisi DMSO içinde hazırlanmış ve tüm çalışmalarda kullanılmıştır. 2.0×10^{-3} M etidiyum bromür stok çözeltisi %1'lik etanol içerisinde, 4.06×10^{-4} M Hoechst 33258 stok çözeltisi ise saf su içerisinde hazırlanmıştır. 6.13×10^{-3} M calf thymus DNA (ct-DNA, çift sarmalı, calf thymus, Sigma) pH 7.4 Tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanmış ve 24 saat oda sıcaklığında tam çözünmesi için bekletilmiştir. Tüm spektroskopik ölçümler Tris-HCl (pH 7.4) tampon ortamında gerçekleştirilmiştir.

3.3 MODAFİNİL SENTEZİ

Modafinil sentezi Şema 1'de verilmiş olan sentez planı doğrultusunda yapılmıştır.



Şema 1. Modafinil Sentez Planı

Trifloroasetik asit içerisinde eşit mol sayısında benzohidril ve glikolik asit oda sıcaklığında 3 saat karıştırılır. Bu süre sonunda, çözücü uzaklaştırılır ve kalan kısım üzerine su eklenir. Katı süzülür, hekzandan kristallendirilir ve bileşik 2 elde edilir.

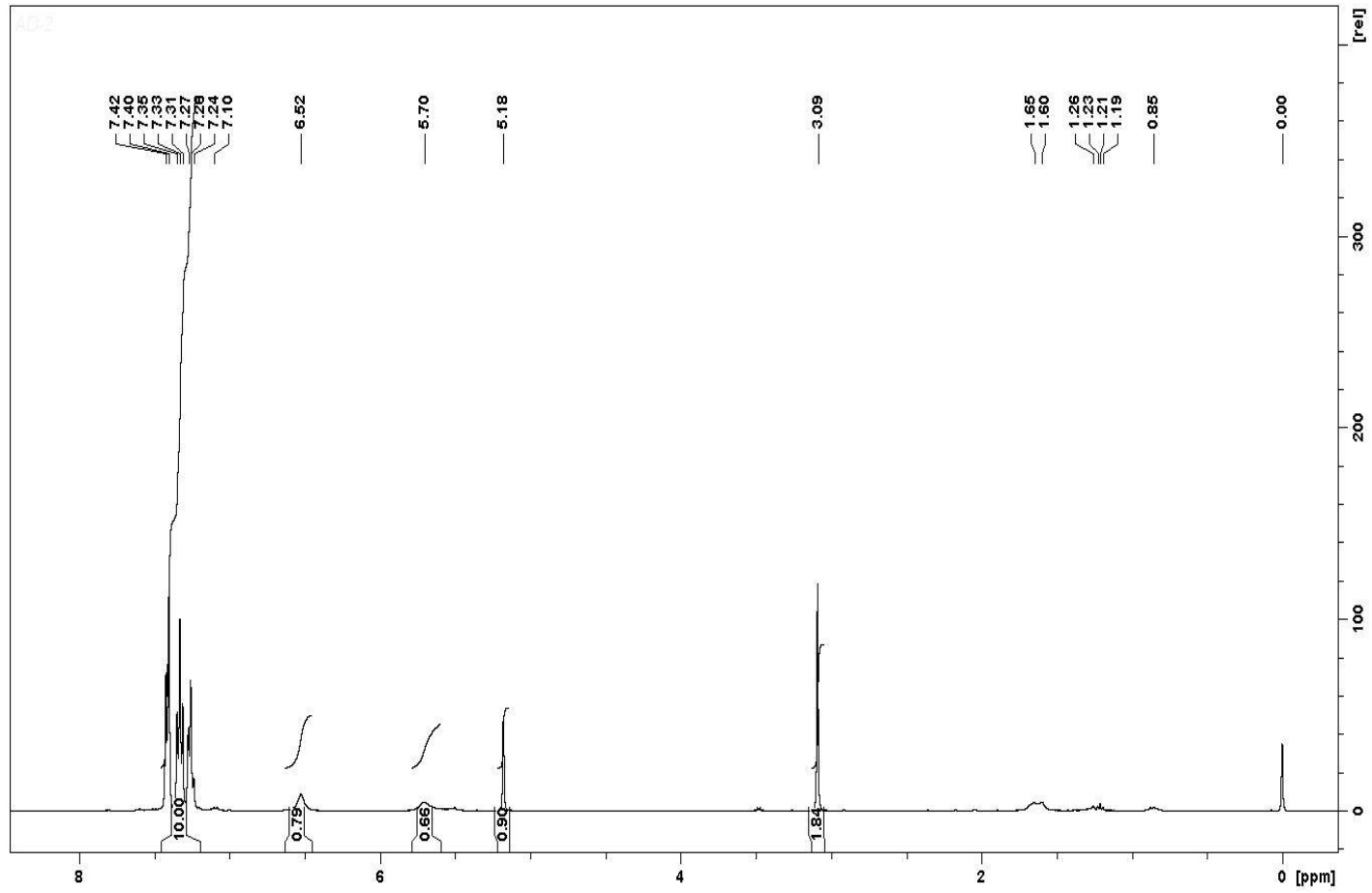
Toluen içindeki 1 mol bileşik 2'nin üzerine 3.5 mol tionil klorür ilave edilir ve karışım 2 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Çözücü uzaklaştırılır. Kalan yağimsı madde üzerine CH₂Cl₂ ilave edilir. 30 % NH₃ ilave edilerek 2 saat karıştırılır. CH₂Cl₂ fazı ayrılır. Sulu faz birkaç kere ekstrakte edilir. Çözücü uzaklaştırılır ve bileşik 3 elde edilir. Bileşik 3 yapısına ait ¹H-NMR spektrumu Şekil 9'da sunulmuştur.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 3.09 (2H, s), 5.18 (1H, s, CH), 5.70 (1H, s, NH₂), 6.52 (1H, bs, NH₂), 7.06 (1H, bs, NH₂), 7.18 - 7.48 (10H, m, ArH).

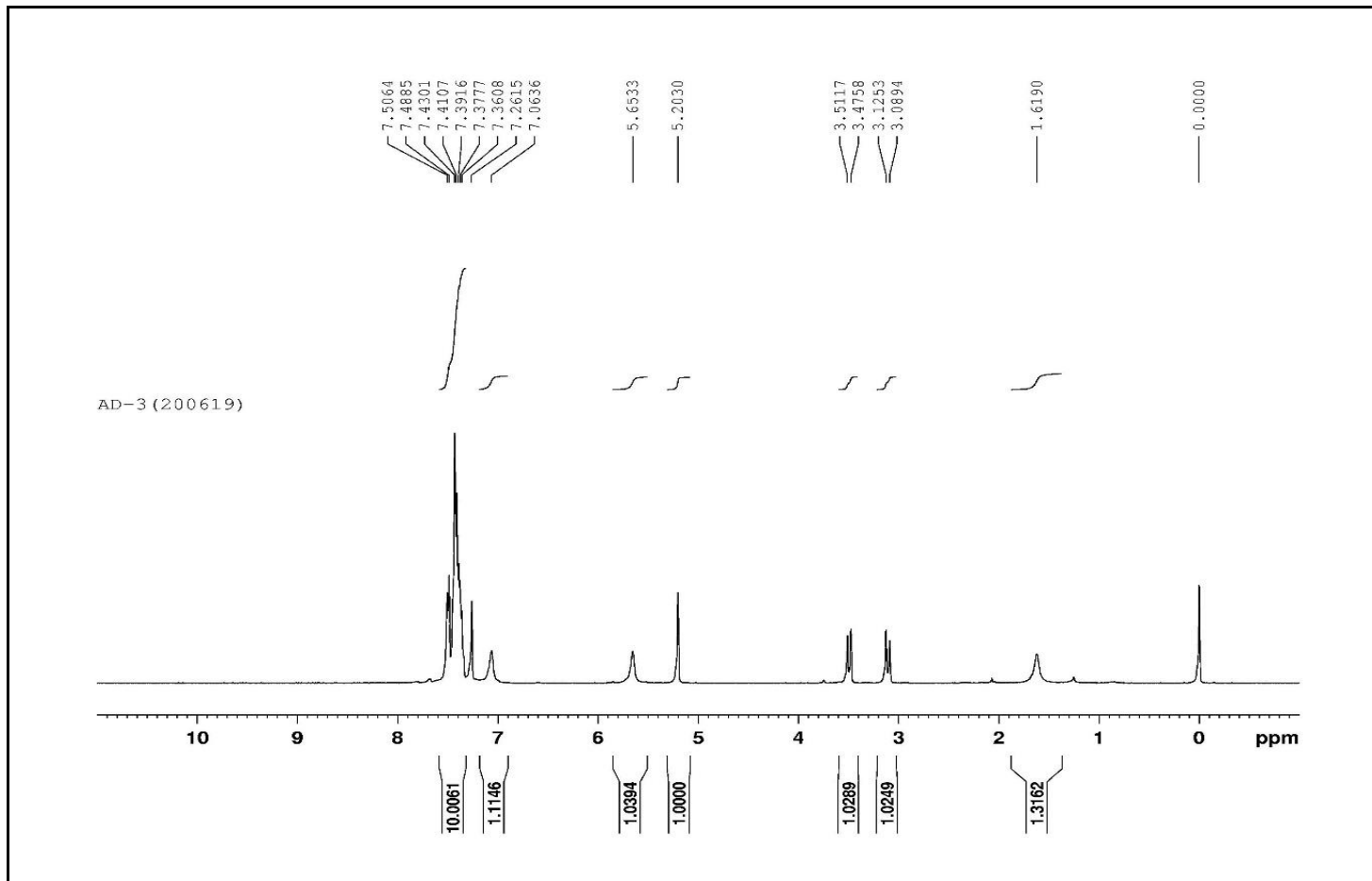
Asetik asit içerisinde ki 1.1 mol bileşik 3 içerisine 1 mol 30 % H₂O₂ ilave edilir ve 40°C'de bir gece karıştırılır. Katı süzülür ve metanolden kristallendirilerek modafinil (Bileşik 4) elde edilir.

Yapıların karakterizasyonu ¹H-NMR spektroskopisi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur. Modafinil yapısına ait ¹H-NMR spektrumu Şekil 10'da sunulmuştur.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 3.11 (1H, JAB = 14.2 Hz), 3.50 (1H, JAB = 14.3 Hz), 5.20 (1H, s, CH), 5.66 (1H, bs, NH₂), 7.06 (1H, bs, NH₂), 7.33 - 7.57 (10H, m, ArH).



Şekil 8. Bileşik 3' ün ^1H -NMR Spektrumu



Şekil 10. Bileşik 4'ün ^1H -NMR Spektrumu

3.4 YÖNTEM

Psiko-uyarıcı modafinilin ct-DNA ile etkileşimini belirlemek için bir seri spektroskopik çalışma, viskozite değişim çalışmaları ve hesaplamalı moleküler kenetleme (docking) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Modafinilin doğal floresans özelliği olmaması nedeni ile florimetrik analizler ct-DNA'nın bir interkelatör bir de oluğa bağlayıcı floresan prob ile oluşturulan kompleksleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. İnterkelatör olarak etidiyum bromür (EB), oluğa bağlayıcı olarak ise Hoechst 33258 kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler ve florimetrik titrasyon ölçümleri 2ml pH 7.4 Tris-HCl tamponu içerisinde oluşturulan ct-DNA-EB ve ct-DNA-Hoechst 33258 kompleksleri üzerine değişen miktarlarda modafinil eklenerek alınmıştır. ct-DNA-EB kompleksi 2 mL tampon çözeltisi içerisine 6.06×10^{-5} M ct-DNA ve 1.59×10^{-5} M EB eklenerek oluşturulmuştur. 485 nm'de uyarılan sistemin 520-800 nm arasında emisyon spektrumları kaydedilmiştir. ct-DNA-Hoechst 33258 kompleksi ise 6.06×10^{-5} M ct-DNA ve 1.01×10^{-6} M Hoechst 33258 eklenerek elde edilmiştir. Kompleks sistemi 347 nm'de uyarılarak 350-750 nm arasında emisyon spektrumları kaydedilmiştir. Florimetrik tirasyonlar 25, 37, 45°C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Stern-Volmer ve Stern-Volmer eşitliğinden türetilen çift-logaritma eşitliklerine göre analiz edilmiştir. Stern-Volmer analizlerinden bağlanma sabitleri, sönmüm sabitleri ve bağlanma kısım sayıları bulunmuştur. Etkileşim türünün aydınlatılması için ΔH , ΔS ve ΔG termodinamik parametreleri hesaplanmıştır. İncelen sistemin interkelasyon ve oluğa bağlanma özellikleri viskozite ve iyonik şiddet etkilerinin incelenmesi ile belirlenmiştir.

3.5 DOCKING (KENETLENME) ÇALIŞMASI

Modafinil ve ct-DNA arasındaki etkileşimleri anlamak için DS 2020 ile moleküler docking çalışması gerçekleştirilmiştir. Ligand olarak modafinil ve B-DNA içeren DNA (PDB: 1BNA) (Drew, 1981; Biovia, 2016) yapılarını hazırlamak için Gaussian09 (G09) (Frisch ve diğerleri, 2009) ve moleküler docking (kenetlenme) çalışmaları için DS 2020 yazılımları kullanılmıştır. Bileşiğin geometrisi ve enerji optimizasyonları G09'da uygulandığı gibi DFT / B3LYP / 6-31G* seviyesinde

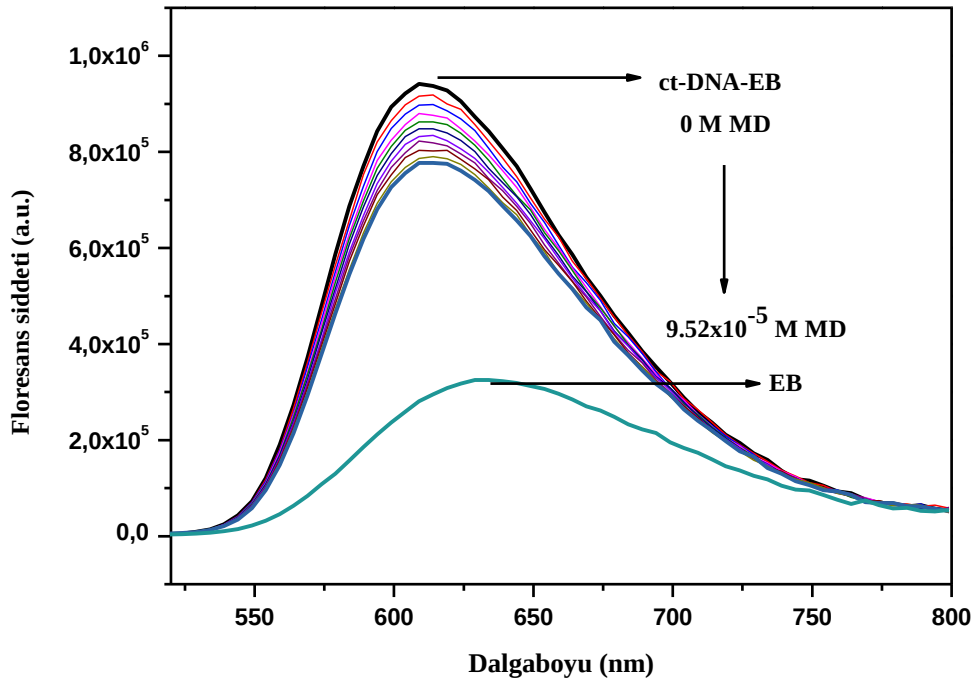
yapıldı. DNA pozisyonları daha sonra DS2020 protokolünde mevcut olan CHARMM kuvvet ve adopted-bases Newton-Raphson (ABNR) yöntemleri kullanılarak kök ortalama kare sapma (RMSD) eğimi (gradyanı) $<0.05 \text{ kcal / mol } \text{\AA}^2$ değeri elde edilinceye kadar optimize edildi (Chattaraj, Giri ve Duley, 2011). Tüm docking çalışmalarında Lamarckian genetik algoritması kullanılarak AutoDock 4.2 (Morris ve diğerleri, 2009) gerçekleştirildi. Tüm parametreler için varsayılan ayarlar kullanıldı. Kompleksler için en iyi poz bağlanma enerjisi ve inhibisyon sabiti (K_i) değerlerine göre tanımlandı.

4. DENEYSEL SONUÇLAR

4.1 FLORESANS ÇALIŞMALARI

ct-DNA'nın iç floresansının çok zayıf olması florimetrik yöntemler ile çalışmalarda bir dış floresan prob kullanımını zorunlu kılmaktadır (Geng, Wub, Shia ve Cuia, 2013). Son yıllarda etkileşimi incelenecek molekülün de floresans emisyon özelliği göstermemesi durumunda ct-DNA'nın bir dış prob ile oluşturulan kararlı bir kompleksinin kullanılması yaygınlaşmıştır. EB bilinen en kararlı DNA interkelatörlerinden biridir. EB ve ct-DNA arasında gerçekleşen bağlanma sonucu EB'ün floresans şiddetinde 20-30 kata kadar artış olduğu bilinmektedir (Ramana ve diğerleri, 2015,2016).

Yöntem kısmında açıklanan prosedür ile florimetrik titrasyonlar gerçekleştirilmiştir. ct-DNA-EB kompleksi üzerine modafilin artan miktarlarının eklenmesi sonucunda floresans sönüm gözlenmiştir. Florimetrik titrasyon spektrumu Şekil 11'de görülmektedir.



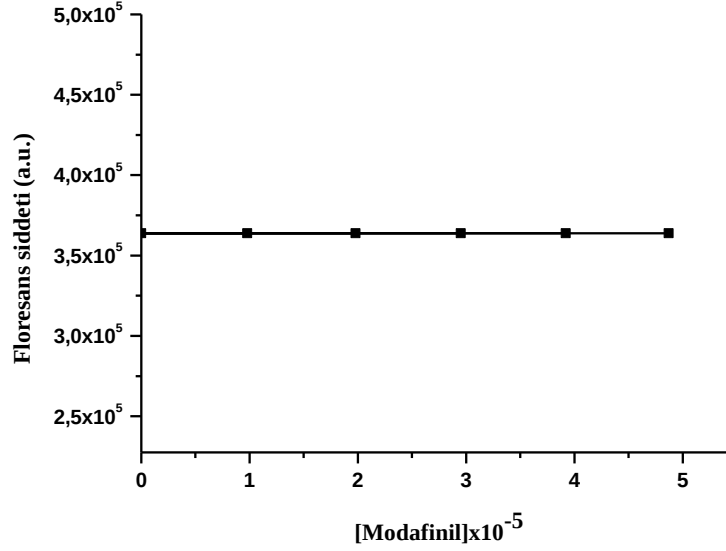
Şekil 9. ct-DNA-EB Kompleksinin Floresans Emisyonu Üzerine Modafinilin Etkisi

ct-DNA-EB kompleksi ile etkileşim gösteren küçük moleküllerin sebep olduğu floresans sönümün üç nedenden dolayı olabileceği düşünülmektedir (Geng ve diğerleri, 2013):

- Küçük molekül ile EB'ün birbirine bağlanarak yeni bir kompleks oluşturması sonucu floresans sönüm gerçekleşebilir.
- Küçük molekülün kompleksteki EB ile yer değiştirmesi nedeni ile DNA'ya bağlanan EB'ün konsantrasyonunun azalması ve bunun sonucu floresans şiddet de azalabilir.
- Küçük molekülün ct-DNA-EB kompleksi ile etkileşiminden yeni bir kompleksin meydana gelmesi ve bunun sonucunda sönüm gerçekleşebilir.

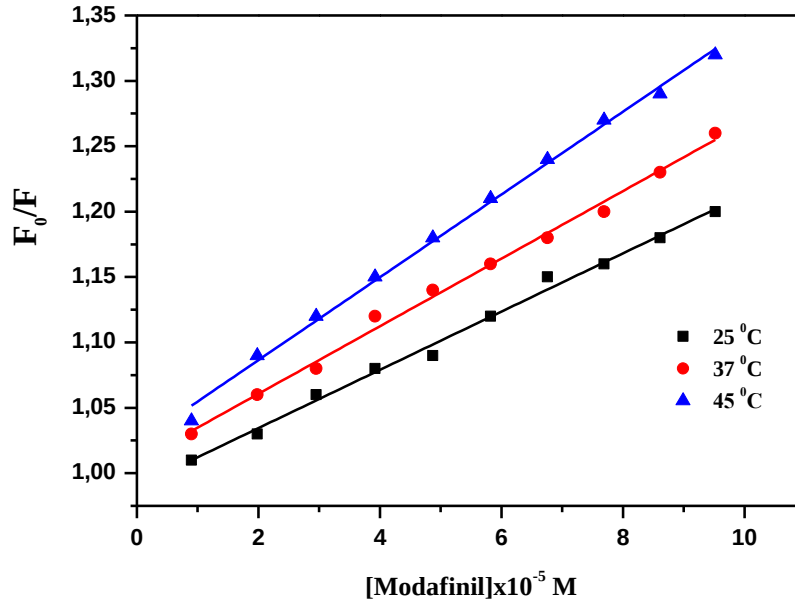
EB ile modafinil arasında bir kompleks oluşması sonucu sönüm gözlenmesini araştırmak üzere Tris-HCl tampon ortamında EB ve modafinil etkileştirilerek floresans emisyonları incelendi. Sabit miktarda EB üzerine artan miktarlarda modafinil eklendi. Modafinil miktarına bağlı EB'ün floresans emisyon değişimi Şekil.12'de görülmektedir. Modafinil eklenmesinin EB floresans emisyonu

üzerine bir etkisinin olmaması iki molekül arasında kompleks oluşumu söz konusu olmadığını göstermiştir.



Şekil 10. EB Floresans Emisyonu Üzerine Modafinilin Etkisi [EB]=1.59x10⁻⁵ M

ct-DNA-EB kompleksinin modafinil ile florimetrik titrasyonundan elde edilen veriler Stern-Volmer eşitliği ile analiz edildi. Farklı sıcaklıklarda (25, 37, 45°C) gerçekleştirilen titrasyonlardan elde edilen doğrusal Stern-Volmer grafikleri Şekil 13’de görülmektedir.



Şekil 11. ct-DNA-EB Kompleksinin Modafinil İle Farklı Sıcaklıklarda Titrasyonundan Elde Edilen Stern-Volmer Grafiği

Doğrusal grafiklerin eğimlerinden elde edilen K_{SV} değerleri Tablo 1’de sunulmuştur. Sıcaklık artışı ile birlikte K_{SV} değerlerinde artış görülmektedir. Bu durum kompleks ile modafinil arasındaki sönmün dinamik sönmün olduğuna işaret etmektedir. Stern-Volmer eşitliği kullanılarak bimoleküler sönmün hız sabiti (k_q) değeri $K_{SV} = \tau_0 k_q$ eşitliğinden hesaplanmaktadır. Eşitlikte bulunan τ_0 değeri literatürde 10^{-8} olarak belirlenmiştir. Literatürde göre difüzyon hız sabitinin üst sınırı olarak $K_{dif} = 2.0 \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ kabul edilmektedir (Ramana ve diğerleri, 2016). k_q değerinin $10^{10} \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ ’den büyük olması kompleks oluşumu üzerinden statik sönmün olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak sıcaklık artışı ile k_q değerinin artması dinamik sönmün olduğunu gösterirken elde edilen sayısal değerlerin difüzyon üst sınırından büyük olması ct-DNA-EB kompleksi ile modafinil arasında birleşik bir sönmün olduğu düşündürmektedir.

Tablo 1. Modafinil-ct-DNA-EB Sistemi İçin Stern –Volmer Verileri

T(°C)	Lineer Regrasyon Eşitliği	K _{sv}	R ²	k _q
25	F ₀ /F =2x10 ³ [MD]+1.000	2x10 ³	0.995	2x10 ¹¹
37	F ₀ /F =2.2x10 ³ [MD]+1.017	2.2x10 ³	0.997	2.2x10 ¹¹
45	F ₀ /F =2.9x10 ³ [MD]+1.048	2.9x10 ³	0.995	2.9x10 ¹¹

4.2 BAĞLANMA DENGELERİNİN ANALİZİ

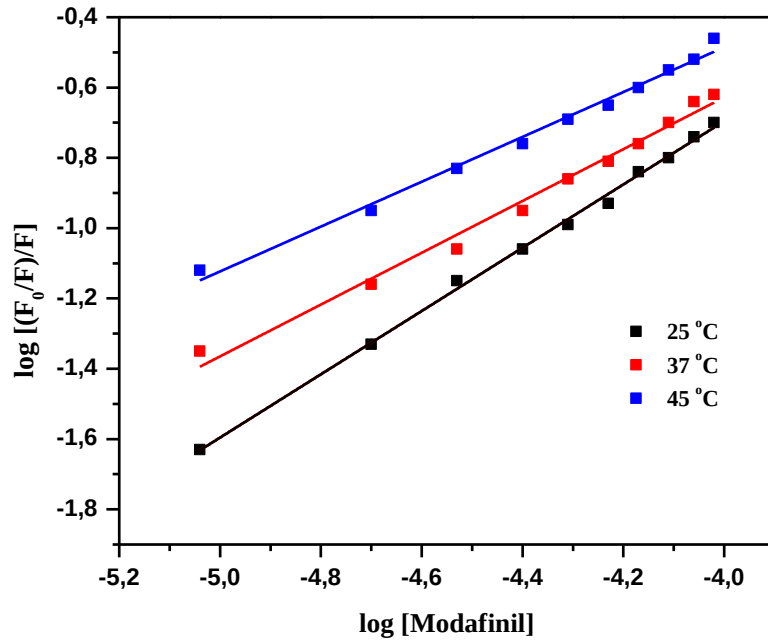
Stern-Volmer eşitliğinden türetilen ve modifiye Stern-Volmer eşitliği veya çift logaritma eşitliği olarak adlandırılan eşitlik (2) kullanılarak bağlanma kısım sayıları ve bağlanma sabitleri hesaplanabilmektedir. Biyomoleküllerde bağ yapmaya uygun birbirinden bağımsız ama benzer kısımlar olduğunu varsaydığımız kısımların sayısı bağlanma kısım sayısı olarak ifade edilmektedir.

$$\log (F_0-F) / F = \log K_b + n \log [Q] \quad (2)$$

K: bağlanma sabiti

n: bağlanma kısım sayısı

ct-DNA-EB kompleksinin modafinil ile üç farklı sıcaklıkta florimetrik titrasyonundan elde edilen çift logaritma grafikleri Şekil 14’de görülmektedir.



Şekil 12. ct-DNA-EB Kompleksinin Modafinil ile Farklı Sıcaklıklarda Titrasyonundan Elde Edilen Çift-Logaritma Grafikleri

Çift-logaritma grafiklerinden elde edilen bağlanma kısım sayıları (n) ve bağlanma sabitleri (K_b) Tablo 2’de görülmektedir.

Tablo 2. Modafinil-ct-DNA-EB Sistemi İçin Bağlanma Sabiti ve Bağlanma Kısım Sayısı Değerleri

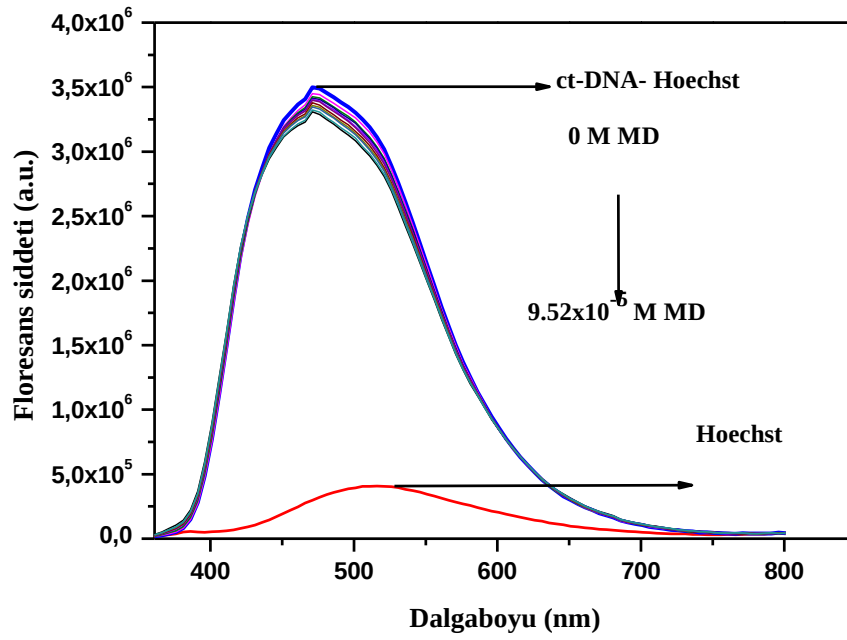
T(°C)	Çift Logaritma Eşitliği	K_b (M^{-1})	R^2	n
25	$\log (F_0-F)/F=\log 2.905 +0.900\log [MD]$	8.0×10^2	0.997	0.900
37	$\log (F_0-F)/F=\log 2.319 +0.736\log [MD]$	2.0×10^2	0.987	0.736
45	$\log (F_0-F)/F=\log 2.066 +0.638\log [MD]$	1.1×10^2	0.990	0.638

Elde edilen K_b değerlerinin sıcaklık artışı ile azalsa da üstel olarak aynı mertebede olduğu görülmektedir. Bu nedenle sıcaklığın kompleks kararlılığı üzerinde büyük bir

etkisi olmadığı düşünölmüştür. Literatürde ct-DNA-EB kompleksinin bağlanma sabiti $5.16 \times 10^5 \text{ mol/L}^{-1}$ olarak ifade edilmiştir (Ramana ve diğeri, 2016). Bu değeri elde edilen bağlanma sabiti değeri ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Bu durumda modafinilin EB ile yarışmalı olarak ct-DNA ile bağlanması ve bunun sonucunda floresans sönüm gözlenmesi olasılık dışı olduğu düşünölmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen florimetrik analizlerden modafinilin ct-DNA-EB kompleksine bağlanarak yeni bir modafinil-ct-DNA-EB kompleksi oluşturduğunu düşünölmektedir.

4.3 HOECHST 33258 İLE FLORESANS SÖNÜM ÇALIŞMASI

Hoechst 33258 DNA ile etkileşim çalışmalarında karşımıza çıkan en etkin oluğa bağlanma problemlerinden biridir. Hoechst 33258 de EB gibi sulu çözeltilerde düşük floresans göstermektedir. ct-DNA ile bağlanması sonucunda artan floresans emisyonu etkileşim analizlerinde kullanılmaktadır. Çalışmamızda modafinilin ct-DNA-Hoechst 33258 kompleksinin floresans emisyonuna etkisi incelenerek yarışmalı bağlanma olasılığı araştırılmıştır. Tris-HCl tampon çözeltisi içerisinde ortamdaki derişimleri $6.06 \times 10^{-5} \text{ M}$ ct-DNA ve $1.01 \times 10^{-6} \text{ M}$ Hoechst 33258 olacak şekilde kompleks oluşturuldu. Kompleks üzerine artan miktarlarda modafinil eklenerek florimetrik titrasyon gerçekleştirildi. Titrasyon floresans spektrumunu Şekil 15'deki gibi görölmektedir.



Şekil 13. ct-DNA-Hoechst 33258 Kompleksinin Modafinil ile Titrasyonu Sonucu Elde Edilen Floresans Spektrumu

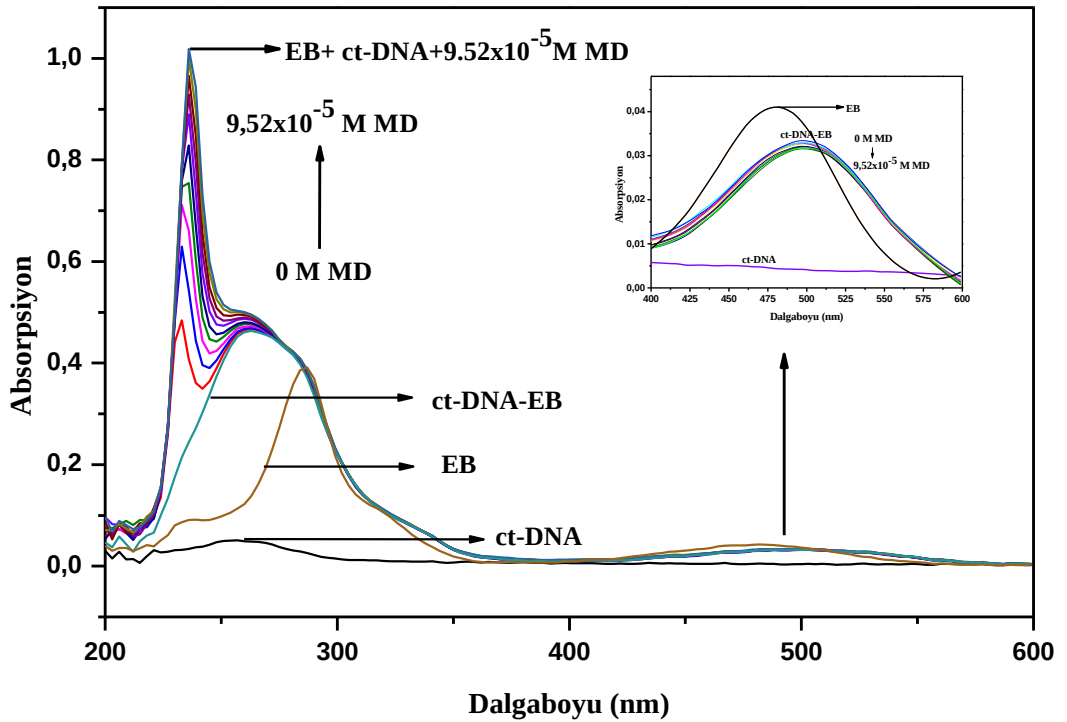
25, 37, 45°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen florimetrik titrasyonlardan elde edilen sönüm sabitlerinin birbirine eşit olduğu görülmüştür. Stern-Volmer analizlerinden elde edilen sonuçlar Tablo 3’de sunulmuştur.

Tablo 3. Modafinil-ct-DNA-Hoechst 33258 Sistemi İçin Stern –Volmer Verileri

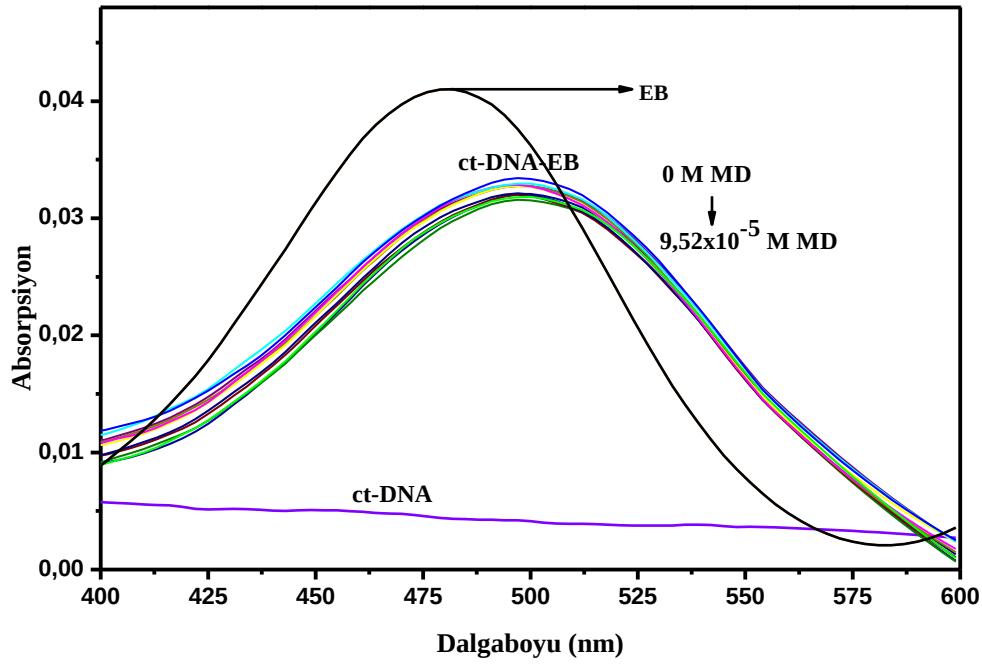
T(°C)	Lineer Regrasyon Eşitliği	K_{sv}	R^2	k_q
25	$F_0/F = 3 \times 10^2 [MD] + 1.006$	3×10^2	0.974	3×10^{10}
37	$F_0/F = 3 \times 10^2 [MD] + 1.014$	3×10^2	0.956	3×10^{10}
45	$F_0/F = 3 \times 10^2 [MD] + 1.023$	3×10^2	0.898	3×10^{10}

4.4 ABSORPSİYON ÇALIŞMALARI

Küçük moleküller ile DNA'nın etkileşimlerinin aydınlatılmasında absorpsiyon spektrumları bağlanma türüne ilişkin bilgi vermektedir. İnterkelasyon sonucunda absorpsiyon şiddetinde azalma, absorpsiyon maksimumunda kırmızıya kayma karakteristik özelliklerdendir. Oluğa bağlanma ise absorpsiyon şiddetinde artış ile karakterize edilir (Akay ve diğerleri, 2019). ct-DNA-EB kompleksinin absorpsiyon özelliklerine modafinilin etkisi incelenmiştir. Elde edilen absorpsiyon spektrumu Şekil 16'da görülmektedir. Artan modafinil miktarı ile birlikte ct-DNA-EB kompleksinin 500 nm de maksimum gösteren küçük absorpsiyon bandının şiddetinde azalma gözlenmiştir (Şekil 17). Floresans ölçümlerinde bu absorpsiyon bandı uyarılma için kullanılmıştır. Absorpsiyon çalışma sonuçları interkелasyonun karakteristik özelliği olan absorpsiyon şiddetinde azalma, absorpsiyon maksimumunda uzun dalgaboyuna kaymaya uygunluk göstermektedir.



Şekil 14. ct-DNA-EB Kompleksi ile Modafinilin Etkileşimine Ait Absorpsiyon Spektrumları



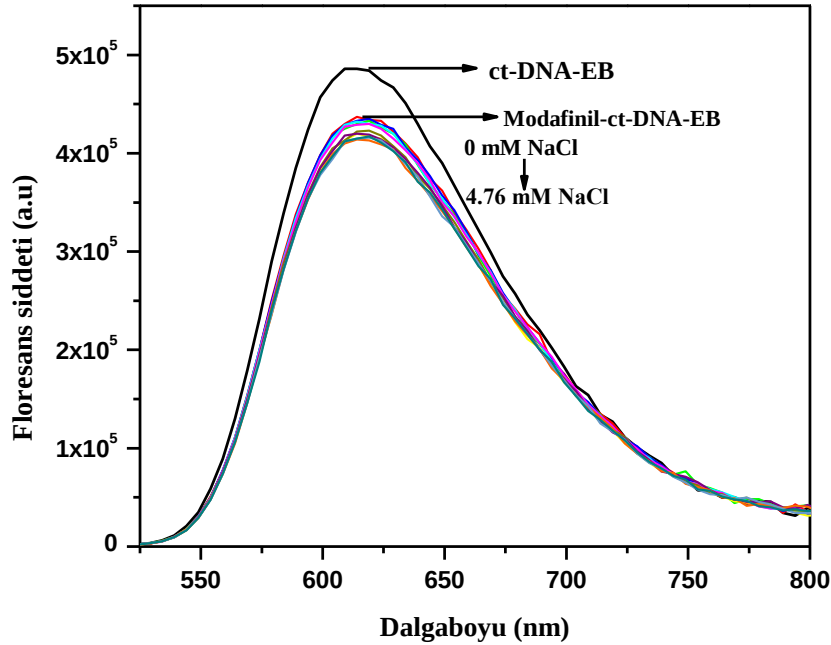
Şekil 15. ct-DNA-EB Kompleksi ile Modafinilin Etkileşiminin 400-600 nm Arasındaki Absorpsiyon Spektrumları ([EB]= 1.59×10^{-5} M)

4.5 SODYUM KLORÜR FLORESANS SÖNÜM ÇALIŞMASI

Moleküllerin floresans özellikleri çevresel özelliklere yüksek duyarlılık gösterir. Küçük moleküllerin DNA ile etkileşimlerinde iyonik şiddet değişimine karşı gösterilen tepkiler bağlanma türünün aydınlatılmasında önemlidir. İnterelasyonda molekül DNA'nın baz çiftleri tarafından korunduğu için iyonik şiddet değişimi floresans şiddeti düşük oranda etkiler veya hiç etkilemez. Buna karşın oluğa bağlanmada molekül DNA'nın dış yüzeyinde olduğundan iyonlara maruz kalır ve DNA ile oluşturdukları bağlar kırılır. Bu durumda sönm etkisi ortadan kalkar ve floresans şiddetinde artış gözlenir.

Modafinilin ct-DNA-EB kompleksi ile etkileşimi üzerine iyonik şiddetin etkisi, ortam iyonik şiddeti NaCl ile değiştirilerek incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sistemin floresans şiddetinde belirgin bir değişim olmadığını göstermiştir (Şekil 18). Analitik açıdan anlamlı olmayan bu floresans sönmünün seyrelmeden

kaynaklandığı düşünülebilir. Elde edilen sonuçlar modafinil ile ct-DNA-EB arasındaki etkileşimin interkalasyon olduğuna işaret etmektedir.

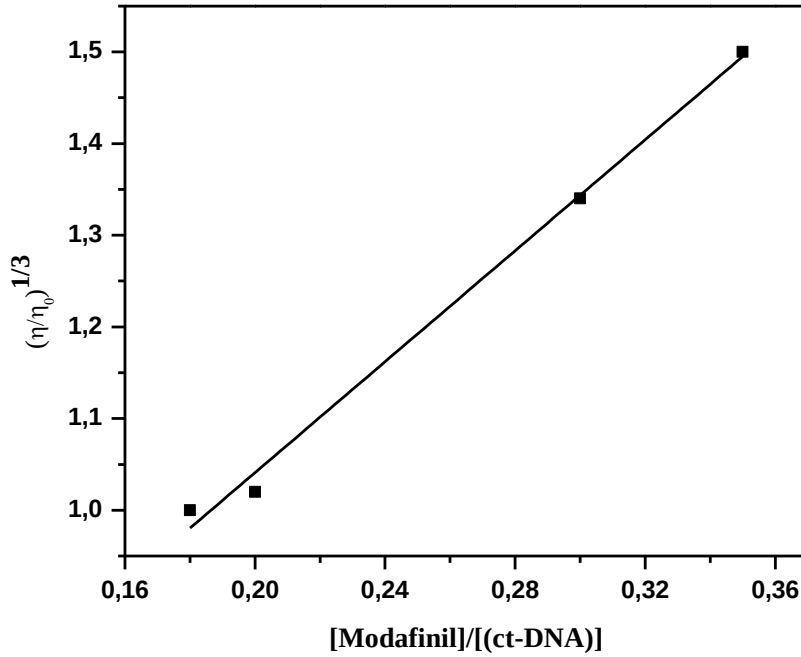


Şekil 16. Modafinil-ct-DNA-EB Sisteminin Floresans Emisyonu Üzerine İyonik Şiddet Etkisi ([EB]= $1.59 \times 10^{-5} \text{M}$; [ct-DNA]= $6.09 \times 10^{-5} \text{M}$; [MD]= $2.95 \times 10^{-5} \text{M}$)

4.6 VİSKOZİTE ÇALIŞMALARI

DNA'nın viskozitesi, yapısındaki çift sarmalın uzunluk değişimine duyarlıdır. Bu nedenle viskozite ölçümü, DNA'nın küçük moleküllerle bağlanma modu belirlemede kullanılan kritik testlerden biridir. İnterkalasyon yapan maddeler, baz çiftlerini birbirinden uzaklaştırarak çift sarmalın gevşemesine ve DNA'nın viskozitesinde belirgin bir artışla DNA'nın uzamasına neden olabilir (Zhou, Zhang ve Pan, 2015). Oluğa bağlanma veya elektrostatik etkileşim ise böyle bir etki göstermediğinden DNA viskozitesinin sabit kalmasına veya çok küçük miktarda değişmesine neden olur. Artan modafinil miktarına karşı $[\text{Modafinil}]/[\text{ct-DNA}]$ ölçülen viskozite değerleri $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ Şekil 19'de görülmektedir. Gözlenen artış modafinil ile ct-DNA

arasındaki etkileşimin interkelasyon olduğu önerisini desteklemektedir.



Şekil 17. ct-DNA'nın Viskozitesi Üzerine Modafinilin Etkisi

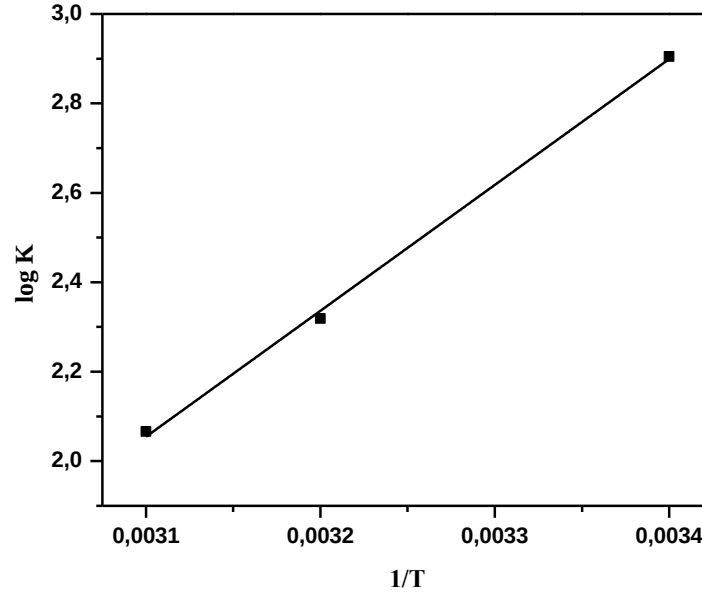
4.7 TERMODİNAMİK PARAMETRELER VE ETKİLEŞİM TÜRLERİ

Florimetrik çalışmalarda küçük moleküller ile biyomoleküller arasında oluşan etkileşim türleri beş grupta incelenmektedir. Bu etkileşimler; hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşim ve kovalent bağlanma olarak sınıflandırılır (Akday ve diğerleri, 2019). Termodinamik etkileşimlerin türlerinin belirlenmesinde ΔG , ΔH ve ΔS değerleri kullanılmaktadır. Modafinil-ct-DNA-EB sistemi için üç farklı sıcaklıkta (25, 37 ve 45 °C) hesaplanan bağlanma sabitlerinden van't Hoff eşitliğine göre ΔH ve ΔS değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen van't Hoff grafiği Şekil 20'de görülmektedir.

$$\log K = -\Delta H/2,303RT + \Delta S/2,303R \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

Hesaplanan ΔH ve ΔS değerler kullanılarak ΔG değeri (4) nolu eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 18. Modafinil-ct-DNA-EB Sisteminin van't Hoff Grafiği

Modafinil-ct-DNA-EB sisteminin van't Hoff grafiğinden elde edilen eşitlik ve R^2 değeri aşağıda görülmektedir.

$$\log K = 2815.7 \frac{1}{T} - 6.6741; R^2 = 0.9988$$

Tablo 4. Modafinil-ct-DNA-EB Sisteminin Termodinamik Değerleri

T(K)	ΔG (kJmol ⁻¹)	ΔH (kJmol ⁻¹)	ΔS (Jmol ⁻¹ K ⁻¹)
298	-21.9	-16065	-127.7
310	-22.8		
318	-23.4		

Elde edilen termodinamik parametrelerin pozitif veya negatif olmaları durumunda 3 şekilde yaklaşımda bulunulabilir (Akbaş ve diğerleri, 2019) ;

$\Delta H < 0$ ve $\Delta S > 0$ ise elektrostatik kuvvet

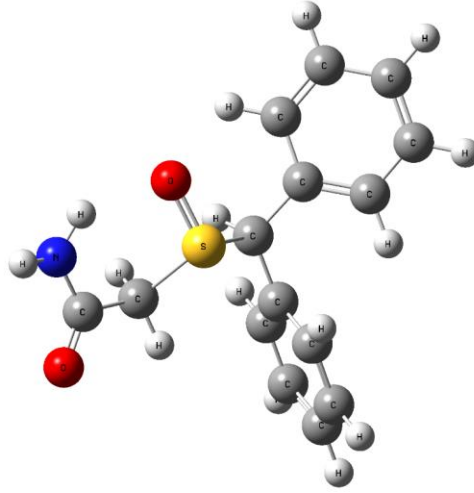
$\Delta H > 0$ ve $\Delta S > 0$ ise hidrofobik

$\Delta H < 0$ ve $\Delta S < 0$ ise hidrojen bağ ve van der Waals kuvveti

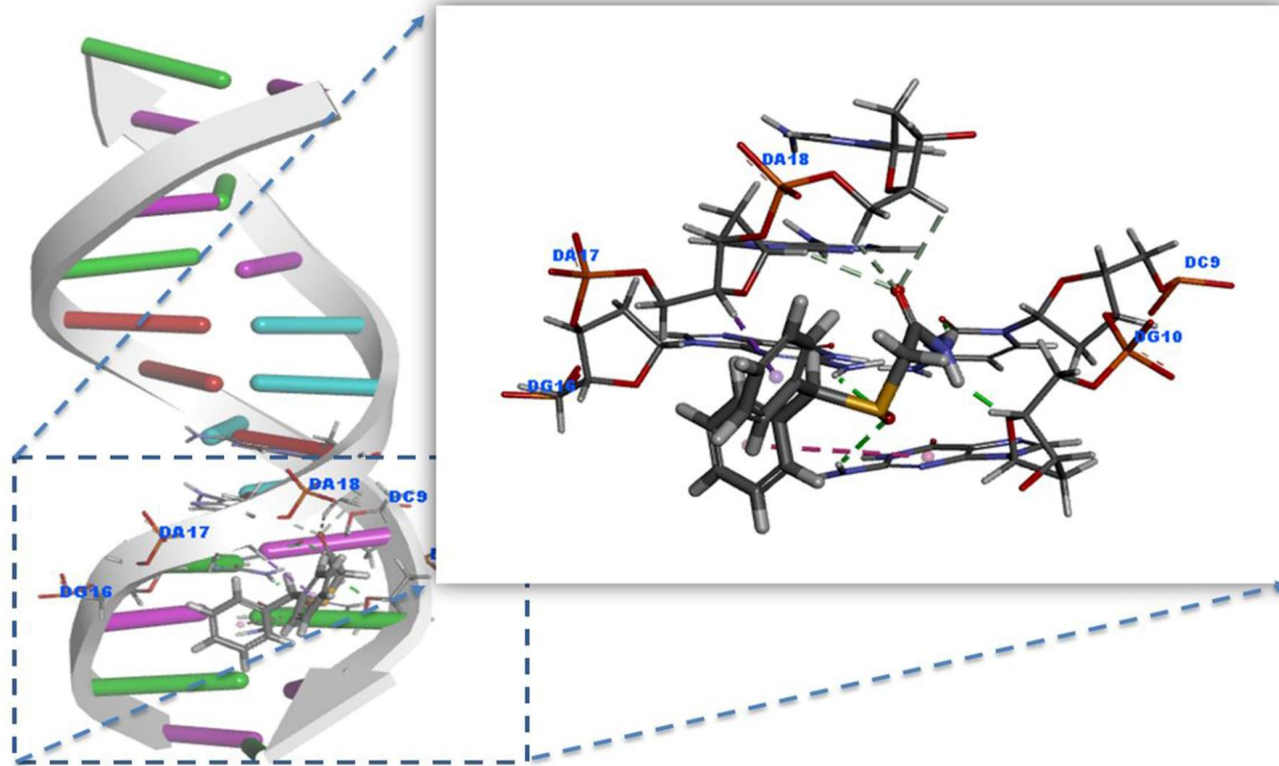
Parametrelerden ΔG 'nin negatif değeri olması etkileşimin kendiliğinden gerçekleştiğini gösterir.

4.8 DOCKING (KENETLENME) ÇALIŞMA SONUÇLARI

Bu çalışmada optimize edilmiş yapı Şekil 21’de görülmektedir. Bileşik için moleküler doking işlemi uygulandı. Modafinil-DNA kompleksi ve üç boyutlu etkileşimleri Şekil 22 ve Tablo 6’da verilmiştir. Yerleştirme hesaplamaları sonucunda, modafinilin DNA ile iyi bir etkileşime sahip olduğu ortaya çıktı. Bu komplekste aktif nükleotidler A: DC9, A: DG10, B: DG16, B: DA17, B: DA18 ve A: DG10, B: DA17 ile yedi hidrojen bağı ve iki hidrofobik etkileşim yaptığı belirlendi. Modafinilin DNA ile bağlanma enerjisi ve Ki değerleri sırasıyla -7.16 kcal / mol ve 5.66 uM olarak bulundu (Tablo 5).



Şekil 21. Modafinilin DFT Yöntemi ile Elde Edilen Optimum Geometrik Yapısı



Şekil 19. Modafinil Bileşiğinin DNA'daki Yerleştirme Pozları ve Etkileşimleri

Tablo 5. Modafinil'in B-DNA ile Etkileşim Türleri ve Mesafeleri

Bileşik	Etkileşimler	Mesafe Å	Bağlanma	Bağlanma Türü	DNA'nın bağlanma bölgesi	Ligandın bağlanma bölgesi
Modafinil-B-DNA	A:DG10:H21 - :Modafinil:O2	2.3609	Hidrojen bağı	Konvansiyonel hidrojen bağı	A:DG10:H21	:Modafinil:O2
	B:DG16:H21 - :Modafinil:O2	2.1057	Hidrojen bağı	Konvansiyonel hidrojen bağı	B:DG16:H21	:Modafinil:O2
	:Modafinil:H34 - A:DG10:O4'	1.7775	Hidrojen bağı	Konvansiyonel hidrojen bağı	A:DG10:O4'	:Modafinil:H34
	:Modafinil:H33 - A:DC9:O2	1.6837	Hidrojen bağı	Konvansiyonel hidrojen bağı	A:DC9:O2	:Modafinil:H33
	B:DA17:H1' - :Modafinil:O3	2.7477	Hidrojen bağı	Karbon-Hidrojen bağı	B:DA17:H1'	:Modafinil:O3
	B:DA18:H5'2 - :Modafinil:O3	2.5825	Hidrojen bağı	Karbon-Hidrojen bağı	B:DA18:H5'2	:Modafinil:O3
	B:DA18:H4' - :Modafinil:O3	2.9851	Hidrojen bağı	Karbon-Hidrojen bağı	B:DA18:H4'	:Modafinil:O3
	B:DA17:H4' - :Modafinil	2.8971	Hidrofobik	Pi-Sigma	B:DA17:H4'	:Modafinil
	A:DG10 - :Modafinil	5.9610	Hidrofobik	Pi-Pi T-shaped	A:DG10	:Modafinil

Tablo 6. Oluşturulan Kompleksin Bağlanma Enerjisi ve İnhibisyon Sabiti (Ki) Değerleri

Bileşik	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	Ki (μM)
Modafinil-DNA	-7.16	5.66

5. TARTIŞMA

- Tez kapsamında ct-DNA ile etkileşim mekanizması araştırılan modafinilin floresans emisyonuna sahip olmaması nedeni ile florimetrik titrasyonlarda EB dış prob olarak kullanıldı. Oluşturulan ct-DNA-EB kompleksinin floresans emisyonu üzerine modafinilin etkisi üç farklı sıcaklıkta (25, 37, 45°C) incelendi.
- En kararlı ve yaygın kullanıma sahip nükleik asit problemlerinden interkalatör olarak EB, oluğa bağlayıcı olarak Hoechst 33258 ile ct-DNA kompleksleri oluşturularak modafinilin bu problemler ile yarışmalı bağlanma karakteristikleri incelendi. Elde edilen sonuçlar ct-DNA-Hoechst 33258 kompleksinin floresans emisyonu üzerine modafinil etkisinin analitik açıdan anlamlı olmadığını gösterdi. İlk aşamada bu sonuç modafinilin interkalatör olma olasılığına işaret olarak yorumlandı.
- ct-DNA floresans sönümünden elde edilen Stern-Volmer grafiklerinden, sıcaklık artışı ile K_{sv} (sönüm sabiti) değerlerinde artış olduğu görüldü. Bununla beraber bimoleküler sönüm sabitlerinin, k_q , için belirlenmiş olan üst limitten büyük olması ortamda dinamik ve statik sönümün birlikte gerçekleştiği şeklinde yorumlandı. Buna göre modafinilin ortamda bir tür kompleksleşme gösterdiği düşünüldü.
- Modafinil-ct-DNA-EB sisteminin üç farklı sıcaklıkta elde edilen doğrusal çift logaritma grafiklerinden hesaplanan bağlanma sabiti, K_b , değerlerinin sıcaklık ile azalması kompleks kararlılığının yüksek sıcaklıklarda azaldığı şeklinde yorumlandı.
- Modafinil-ct-DNA-EB sisteminin farklı modafinil miktarları varlığında incelenen absorpsiyon karakteristiklerinin interkalasyon üzerinden etkileşimin karakteristikleri ile örtüştüğü görüldü. Uyarılma dalga boyunu

kapsayan 400-600 nm aralığında bulunan absorpsiyon bandı esas alınarak değerlendirme yapıldı.

- Modafinil-ct-DNA-EB sisteminin farklı iyonik şiddetlerde gösterdiği davranış ortam iyonik şiddetinin NaCl ile değiştirilmesi ile incelendi. Artan miktarlarda NaCl eklenmesi ile analitik açıdan anlamlı olmayan küçük sönümlerin gözlenmesi seyrelme etkisi olarak değerlendirildi. Artan iyonik şiddet ile floresans emisyonunda değişim olmaması interkelasyon türü etkileşim olduğunu desteklemektedir.
- ct-DNA'nın viskozitesi üzerine modafinilin etkisi incelendiğinde artan modafinil miktarı ile birlikte viskozitenin arttığı gözlemlendi. Küçük moleküller ile ct-DNA etkileşimlerinde viskozite artışı interkelasyon üzerinden etkileşim olduğunu göstermektedir.
- Elde edilen termodinamik parametreler incelendiğinde modafinil-ct-DNA-EB sisteminin ΔH ve ΔS değerlerinin negatif olması nedeni ile baskın olan etkileşim türünün hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimleri olduğu görüldü. Negatif ΔG değerleri etkileşimin kendiliğinden oluştuğunu göstermektedir.
- Docking (kenetlenme) çalışmaları sonucunda elde edilen hidrojen bağı oluşumu deneysel sonuçlarımız desteklemektedir.

KAYNAKÇA

- ¹2020 WADA Yasaklılar Listesi. (2020, Ocak 01). shgm.gsb.gov.tr:
https://shgm.gsb.gov.tr/Public/Edit/images/SGM/2020/2020_WADA_Yasakli_lar_Listesi_A3_Formatı.pdf adresinden alındı
- ²Akbay, N., Köksal, Z., Taşkın-Tok, T., & Uzgoren-Baran, A. (2019). Naproxen Derivative Interaction Properties with ct-DNA. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, s. 177-184.
- ³Alacam, H., Basay, O., Tumkaya, S., Mart, M., & Kar, G. (2018). Modafinil Dependence: A Case with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Korean Neuropsychiatric Association*, s. 424-427.
- ⁴Anderson, A., Reid, M., Li, S., Holmes, T., Shemanski, L., Slee, A., & al., e. (2009). Modafinil for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend*, s. 133-139.
- ⁵B. Stevens. (1971). *Adv. Photochem.*
- ⁶Bijithra, C., Ragan, G., & Shanmugasundaram, P. (2016). Analytical Method Development and Validation of Modafinil in Pure and Tablet Dosage Form by UV Spectroscopy. *Research J. Pharm. and Tech.*, s. 1303-1308.
- ⁷Biovia, D. S. (2016). Discovery Studio Modeling Environment Release 2017. *Dassault Systemes*. San Diego.
- ⁸Caymaz, B. (2019). İmidazo(1,2-A)Piridin Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Dna Etkileşimlerinin Çalışılması. (Yükseklisans Tezi-ZONGULDAK).
- ⁹Chandasana, H., Kast, J., Bittman, J. A., & Derendorf, H. (2018). Quantitative determination of armodafinil in human plasma by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry:Application to a clinical study. *Biomedical Chromatography*, s. 1-8.
- ¹⁰Chattaraj, P. K., Giri, S., & Duley, S. C.-7. (2011). *S. Chem. Rev.* , s. 43-75.
- ¹¹Daggett, J. M. (2011). *Modafinil's Effects On Latent Spatial Working Memory Task Performance, And Interactions With Da Receptor Antagonist flupenthixol.*

Thesis Presented to the Faculty of The University of Houston-Clear Lake:
B.A.

- ¹²Dahm, R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, s. 274–288.
- ¹³Deventer, K., Roels, K., Delbeke, F. T., & Eenoo, P. V. (2011). Prevalence of legal and illegal stimulating agents in sports. *Anal Bioanal Chem*, s. 421-432.
- ¹⁴Docherty, J. (2008). Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA). *British Journal of Pharmacology* , s. 606–622.
- ¹⁵Drew, H. . (1981). Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, s. 2179–2183.
- ¹⁶E.Frisch, M.J.Trucks, G.W.Schlegel, H.B.Scuseria, G.E.Robb, M.A.Cheeseman, . . . B.Petersson. (2009). *G.A.etal.Gaussian,Inc.* Wallingford,CT,USA.
- ¹⁷Fleming, K. G. (2017). *Fluorescence Theory*. Baltimore, MD, USA: Elsevier Ltd.
- ¹⁸Geng, S., Wub, Q., Shia, L., & Cuia, F. (2013). Spectroscopic study one thiosemicarbazone derivative with ctDNA using ethidium bromide as a fluorescence probe. *International Journal of Biological Macromolecules*, s. 288-294.
- ¹⁹Hoffmann, S., & Bischoff, G. (2002). DNA-Binding of drugs used in medicinal therapies. *Current Medicinal Chemistry*,s. 312-348.
- ²⁰Kaufman, K. R. (2005). Modafinil in sports: ethical considerations. *Br J Sports Med* , s. 241–244.
- ²¹Lokowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Vol. 3rd Edition). New York: Springer.
- ²²Mereu, M., Bonci, A., Newman, A. H., & Tanda, G. (2013). The neurobiology of modafinil as an enhancer of cognitive performance and a potentia treatment for substance use disorders. *Psychopharmacology*, s. 415-434.
- ²³Minzenberg, M., & Carter, C. (2008). Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. *Neuropsychopharmacology*, s. 1477-1502.
- ²⁴Morris, G., M., H. R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., & Goodsell, D. S. (2009). Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*, s. 2085-91.
- ²⁵Ozkan, S., Taskin-Tok, T., Uzgoren-Baran, A., & Akbay, N. (2019). Multispectroscopic and Computational Investigation of ct-DNA Binding

Properties with Hydroxybenzylidene Containing Tetrahydrocarbazole Derivative. *Journal of Fluorescence*, s. 101-110.

- ²⁶Özkan, Ş. (2016). Çeşitli Hidrojen Türevleri ile Nükleik Asitlerin Bağlanma Mekanizmasının Florimetrik Yöntemle İncelenmesi. *Yükseklisans Tezi*. Tekirdağ.
- ²⁷Pandya, G. P., & Joshi, D. H. (2013). Stability Indicating HPTLC Method for Estimation of Modafinil in the Bulk and Tablet Formulation. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, s. 22-28.
- ²⁸Qiao, C., Bi, S., Suna, Y., & Songa, D. (2008). Study of interactions of anthraquinones with DNA. *Spectrochimica Acta Part A*, s. 136-143.
- ²⁹Ramachandra, B. (2016). A Critical Review of Properties of Modafinil and Analytical, Bio Analytical Methods for Its Determination. *Critical Reviews in Analytical*, s. 482-489.
- ³⁰Ramana, M., Betkar, R., Nimkar, A., Ranade, P., Mundhe, B., & Pardeshi, S. (2015). In vitro DNA binding studies of antiretroviral drug nelfinavir using ethidium bromide as fluorescence probe. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, s. 194-200.
- ³¹Ramana, M., Betkar, R., Nimkar, A., Ranade, P., Mundhe, B., & Pardeshi, S. (2016). Synthesis of a novel 4H-pyran analog as minor groove binder to DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, s. 165-171.
- ³²Schmaal, L., Goudriaan, A., Joos, L., K. A., Dom, G., Brink, v. d., & al., e. (2013). Modafinil modulates resting-state functional network connectivity and cognitive control in alcohol-dependent patients. *Biol Psychiatry*, s. 789-795.
- ³³Shearer, J., Darke, S., Rodgers, C., Slade, T., I, v. B., Lewis, J., & al, e. (2009). A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil (200 mg/day) for methamphetamine dependence. *Addiction*, s. 224-233.
- ³⁴Skoog, D. A. (2013). *Enstrümental Analiz İlkeleri*. (H. Y. E. Kılıç, Trans.) Ankara: Bilim yayıncılık.
- ³⁵Skoog, D. A., Holler, J., & Crouch, S. R. (2016). *Principles of Instrumental Analysis*. Boston, ABD: Cengage Learning.
- ³⁶Stone, E., Cotecchia, S., Lin, Y., & Quartermain, D. (2002). Role of brain alpha 1 B adrenoceptors in modafinil-induced behavioral activity. *Snapse*, s. 269-270.

- ³⁷Strekowski, L., & Wilson, B. (2007). Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research*, 3-13.
- ³⁸Tseng, Y. L., Uralets, V., Lin, C.-T., & Kuo, F.-H. (2005). Detection of modafinil in human urine by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , s. 1042–1045.
- ³⁹Valuer, B. (2002). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH.
- ⁴⁰Watson, J., & Crick, F. (1953). A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, s. 737– 738.
- ⁴¹Zhang, G., Hu, X., & Pan, J. (2011). Spectroscopic studies of the interaction between pirimicarb and calf thymus DNA. *Spectrochimica Acta Part A*,s. 687-694.
- ⁴²Zhou, X., Zhang, G., & Pan, J. (2015). Groove binding interaction between daphnetin and calf thymus DNA. *International Journal of Biological Macromolecules*, s. 185-194.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Esra OĞUZCAN

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 1 Kasım 1988, Erzincan

Elektronik Posta: e.oguz24@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lisans	Fatih Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği	2012
Yüksek Lisans	İMU, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Adli Bilimler Anabilim Dalı	2020