

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELAMİN, SİYANÜRİK ASİT VE ÜRİK ASİDİN DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ

Ali ŞENOL

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM

2020 – KIRIKKALE

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELAMİN, SİYANÜRİK ASİT VE ÜRİK ASİDİN DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ

Ali ŞENOL

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM

2020 – KIRIKKALE

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İçindekiler	I
Önsöz	III
Simgeler ve Kısaltmalar	IV
Şekiller	V
Çizelgeler	VII
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. DNA Molekülünün Tarihçesi	2
1.2. DNA Molekülünün Yapısı	4
1.3. DNA Molekülünün Formları	8
1.4. Moleküllerin DNA'ya Bağlanma Yolları	10
1.4.1. Kovalent Bağlanma	10
1.4.2. Elektrostatik Etkileşim	11
1.4.3. İnterkalasyon	12
1.4.4. Groove Bağlanma	13
1.5. Melamin, Siyanürik Asit ve Ürik Asit	14
1.6. Çalışmanın Amacı	20
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1. Kullanılan Materyaller	21
2.2. Kullanılan Malzemeler ve Sterilizasyon İşlemi	22
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
2.4. Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması	23
2.4.1. Tris Tampon Çözeltisi (TBS)	23
2.4.2. Melamin, Siyanürik Asit ve Ürik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması	24
2.4.3. Tris-Borik Asit-EDTA Tampon Çözeltisi (TBE)	24

2.5. Sığır Timus Dokusu DNA İzolasyonu	25
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> Bakteri Kültürü DNA İzolasyonu	26
2.7. UV-absorbans Spektrofotometri Tekniği	28
2.8. Floresans Spektrofotometri Tekniği	29
2.9. Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği	30
2.9.1. Örneklerin Hazırlanması	30
2.9.2. Agaroz Jelin Hazırlanması	30
2.9.3. Örneklerin Yüklmesi	31
2.9.4. Elektroforez İşlemi ve DNA Bantlarının Görüntülenmesi	31
3. BULGULAR	32
3.1. DNA İzolasyonu	32
3.2. UV-absorbans Spektrofotometri Bulguları	33
3.3. Floresans Spektrofotometri Bulguları	42
3.4. Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları	46
3.4.1. Sığır Timus DNA'sı Kullanılarak Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları	47
3.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> DNA'sı Kullanılarak Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları	50
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
KAYNAKLAR	59
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

ÖNSÖZ

Nükleik asitler canlılık özelliklerini yönettikleri için yaşamın devamı açısından en önemli makro molekülleri oluşturmaktadır. Temel rolleri genetik bilginin saklanması ve nesilden nesile geçişinin sağlanmasıdır. Günümüzde, moleküler teknikler sayesinde genomun biyokimyasal yapısı ve gösterdiği değişimler ortaya konabilmektedir. Genetik bilginin transferi ve muhafazasında fonksiyonu olan DNA'nın üzerinde oluşabilecek kimyasal etkiler, bu molekülün sahip olduğu hayatı fonksiyonlar sebebiyle sağlığı tehdit etmektedir. Bu çalışmada azotlu organik bir bileşik olan ve hem insan hem de hayvan tüketimine sunulan gıdalarda sahte protein yüksekliği sağlamak için kullanılan melamin ve metabolitlerinin DNA molekülü ile etkileşiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmamın her aşamasını yakından takip ederek bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, teşvik ve hoşgörüsünü esirgemediğim sorunlar karşısında yol gösteren ve gerekli tüm laboratuvar imkânlarını sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM'e, laboratuvar çalışmalarımın floresans spektrofotometri aşamasında büyük katkılar sunan kıymetli hocalarım Mert SUDAĞIDAN ve Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP'a, yüksek lisans eğitimim boyunca emek veren ve her türlü fedakârlığı göstererek desteklerini hissettiren anabilim dalımızın değerli hocaları Prof. Dr. Miyase ÇINAR ve Dr. Öğr. Üyesi Özkan DURU hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Ayrıca, bu sürece tanıklık eden ve daima beni destekleyen yüksek lisans yapan arkadaşlarıma, hayatımın her aşamasında yanımda olan ve her türlü kararına saygı duyan sevgili aileme minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
C	Sitozin
DNA	Deoksiribonükleik asit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ds-DNA	Çift sarmallı DNA yapısı
G	Guanin
g	Gram
int	İntegar
kg	Kilogram
l	Litre
LD50	24 saat içerisinde bir popülasyondaki canlıların yarısını öldüren doz
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm ²	Milimetre kare
mol	Molarite
nm	Nanometre
RNA	Ribonükleik asit
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ss-DNA	Tek sarmallı DNA
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TBS	Tris buffer saline (Tris Tampon Çözeltisi)
TE	Tris-EDTA
TSB	Trytic soy broth
U	Urasil
V	Volt
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. (a) Rosalind Franklin ve (c) Maurice Wilkins tarafından elde edilen (b) DNA molekülünün çekilen ilk X-ray görüntüsü.

Şekil 1.2. Çift sarmallı DNA modelinin keşfi.

Şekil 1.3. DNA molekülünün yapısını oluşturan nükleotit birimi.

Şekil 1.4. DNA molekülünde bulunan pürin ve pirimidin türevli organik bazlar.

Şekil 1.5. DNA molekülünün çift sarmallı yapısı.

Şekil 1.6. DNA sarmalında oluşan küçük ve büyük oluklar.

Şekil 1.7. Guanin-Sitozin ve Adenin-Timin baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları.

Şekil 1.8. DNA molekülünün A, B ve Z formları.

Şekil 1.9. DNA molekülü ve cisplatin bileşiğinin etkileşimi.

Şekil 1.10. DNA sarmalına pozitif yüklü Na⁺ iyonlarının elektrostatik etkileşim ile bağlanması.

Şekil 1.11. İnterkalasyona uğramış DNA sarmalı.

Şekil 1.12. DNA molekülü ve Rutenyum bileşiği arasındaki groove bağlanma.

Şekil 1.13. Melamin, siyanürik asit, ürik asit ve kiromazin bileşiklerinin kimyasal yapıları.

Şekil 1.14. Melaminin hidrojen bağları ile siyanürik asit ve ürik aside bağlanması.

Şekil 1.15. Melamin ve siyanürik asidin hidrojen bağı vasıtasıyla oluşturduğu melaminsiyanürat kristali.

Şekil 1.16. Melamin ve ilgili metabolitlerin deneysel böbrek toksisite şeması.

Şekil 2.1. Nanodrop plate ile DNA saflıklarının ve konsantrasyonlarının ölçümü.

Şekil 3.1. Sığır timus DNA UV-absorbans grafiği.

Şekil 3.2. *Staphylococcus aureus* bakterisi DNA UV-absorbans grafiği.

Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan melamin çözeltilerinin UV-absorbans grafikleri.

Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan siyanürik asit çözeltilerinin UV-absorbans grafikleri.

Şekil 3.5. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ürik asit çözeltilerinin UV-absorbans grafikleri.

Şekil 3.6. Sığır timus DNA'sı ve melamin karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

Şekil 3.7. Sığır timus DNA'sı ve siyanürik asit karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

Şekil 3.8. Sığır timus DNA'sı ve ürik asit karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

Şekil 3.9. *Staphylococcus aureus* DNA'sı ve melamin karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

Şekil 3.10. *Staphylococcus aureus* DNA'sı ve siyanürik asit karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

Şekil 3.11. *Staphylococcus aureus* DNA'sı ve ürik asit karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

Şekil 3.12. Sığır timus DNA'sı ve melamin etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.

Şekil 3.13. Sığır timus DNA'sı ve siyanürik asit etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.

Şekil 3.14. Sığır timus DNA'sı ve ürik asit etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.

Şekil 3.15. *S. aureus* DNA'sı ve melamin etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.

Şekil 3.16. *S. aureus* DNA'sı ve siyanürik asit etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.

Şekil 3.17. *S. aureus* DNA'sı ve ürik asit etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.

Şekil 3.18. Sığır timus DNA ile melamin, siyanürik asit ve ürik asit kombinasyonlarının agaroz jel görüntüsü.

Şekil 3.19. Sığır timus DNA+melamin/metaboliti kombinasyonlarının DNA bant hacmi değerleri

Şekil 3.20. *Staphylococcus aureus* DNA ile melamin, siyanürik asit ve ürik asit kombinasyonlarının agaroz jel görüntüsü.

Şekil 3.21. *Staphylococcus aureus* bakteri DNA+melamin/metaboliti kombinasyonlarının DNA bant hacmi değerleri.

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. DNA formları arasındaki farklılıklar.

Çizelge 2.1. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddelerin listesi.

Çizelge 3.1. Sığır timus dokusundan ve *Staphylococcus aureus* bakteri kültüründen izole edilen genomik DNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri.

Çizelge 3.2. Sığır timus DNA'sı ile melamin ve metabolitleri kombinasyonlarından elde edilen UV-absorbans değerleri.

Çizelge 3.3. *Staphylococcus aureus* DNA ve melamin, siyanürik asit ve ürik asit kombinasyonlarından alınan UV-absorbans verileri.

Çizelge 3.4. Agaroz jel elektroforezinde yüklenen genomik DNA konsantrasyonları.

Çizelge 3.5. Sığır timus DNA ile melamin, siyanürik asit ve ürik asit karışımlarından elde edilen jel görüntüsü piksel ölçüm değerleri.

Çizelge 3.6. *Staphylococcus aureus* bakteri DNA ile melamin, siyanürik asit ve ürik asit karışımlarından elde edilen jel görüntüsü piksel ölçüm değerleri.

ÖZET

DNA molekülü, çift sarmallı yapıya sahip olması nedeni ile ilaçlar, metal kompleksleri ve birçok molekül için potansiyel bağlanma bölgeleri taşımaktadır. Bağlanmak için DNA'yı hedef olarak seçen söz konusu moleküllerin gerek zararsız hale getirilebilmeleri gerekse olası ilaç etkinliklerinin artırılması için moleküller arası etkileşim şekillerinin aydınlatılması oldukça önemlidir. Azotlu organik bir bileşik olan melamin, metabolizmada ürik asit ve siyanürik asit gibi çeşitli metabolitlere dönüşebilmektedir. Melamin ve metabolitlerinin gastrointestinal sistemde emildiği ve hayvanlarda nefrolitiazis, kronik böbrek iltihabı ve mesane karsinomu dahil olmak üzere çeşitli zararlı etkilere sebep olabildiği ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, yüksek azot içeriği sebebiyle süt, süt tozu, bebek mamaları, pet ve çiftlik hayvan yemleri gibi çeşitli gıdalara hile amaçlı katılan melamin ve metabolize olan melaminden oluşan siyanürik asit ve ürik asidin ökaryotik (sığır timus dokusu) ve prokaryotik (*Staphylococcus aureus* bakteri kültürü) kaynaklardan izole edilen genomik DNA ile olan etkileşimlerinin incelenmesi amaçlandı. Söz konusu etkileşimlerin değerlendirilmesinde UV-absorbans spektrofotometri, floresans spektrofotometri ve agaroz jel elektroforezi tekniklerinden yararlanıldı. Sabit DNA konsantrasyonu ile inkübe edilen, beş farklı konsantrasyondaki melamin, siyanürik asit ve ürik asit çözeltilerinin gerçekleştirilen analizleri neticesinde söz konusu bileşiklerin DNA molekülleri ile etkileşim içerisinde olduğu belirlendi. UV-absorbans ve floresans spektrofotometri analizleri ile elde edilen grafiklerde, artan madde konsantrasyonuna karşın dalga piklerinde de artış gözlemlendi. Agaroz jel elektroforez analizleri ile elde edilen jel görüntülerinin piksel ölçümü yapıldığında etkileri incelenen metabolitlerin DNA bant hacminde azalmaya sebep olduğu ve bu durumun, melamin ile hazırlanan kombinasyonlarda daha da belirgin hale geldiği görüldü. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, melamin, siyanürik asit ve ürik asidin incelenen ökaryotik ve prokaryotik genomik DNA materyallerine groove bağlanma ile bağlandığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: DNA, melamin, siyanürik asit, ürik asit, UV-absorbans, floresans spektrofotometri, agaroz jel elektroforezi

SUMMARY

Since the DNA molecule has a double helix structure, it bears potential binding sites for drugs, metal complexes and many molecules. It is very important to enlighten the interactions between molecules choosing DNA as the target to connect in order to make these molecules harmless as well as to increase the drug efficacy. Melamine, an organic compound with nitrogen, can be converted into various metabolites such as uric acid and cyanuric acid in metabolism. It has been suggested that melamine and its metabolites are absorbed in the gastrointestinal tract and can cause various harmful effects in animals, including nephrolithiasis, chronic kidney inflammation and bladder carcinoma. In this study, it was aimed to investigate the interactions of genomic DNA isolated from eukaryotic (bovine thymus tissue) and prokaryotic (bacterial culture of *Staphylococcus aureus*) sources with melamine which is added to various foods such as milk, milk powder, baby food, pet and livestock feed due to its high nitrogen content for cheating purposes and cyanuric and uric acids which occur from metabolised melamine. UV-absorbance spectrophotometry, fluorescence spectrophotometry and agarose gel electrophoresis techniques were used to evaluate these interactions. As a result of the analysis of the five different concentrations of melamine, cyanuric acid and uric acid solutions incubated with fixed DNA concentration, it was determined that the investigated compounds interact with DNA molecules. In the graphics obtained by UV-absorbance and fluorescence spectrophotometry analysis, an increase in wave peaks was also observed despite the increasing substance concentration. When pixel measurement of gel images obtained by agarose gel electrophoresis analysis was performed, it was observed that the metabolites of which the effects were examined caused a decrease in the DNA band volume and this situation became more evident in combinations prepared with melamine. When the findings obtained are evaluated, it was concluded that melamine, cyanuric acid and uric acid were bonded to the eukaryotic and prokaryotic genomic DNA materials examined through groove binding.

Keywords: DNA, melamine, cyanuric acid, uric acid, UV-absorbance, fluorescence spectrophotometry, agarose gel electrophoresis

1. GİRİŞ

Melamin, yüksek azot oranına sahip endüstriyel bir ürün olup kötü niyetli üreticiler tarafından kâr marjının artırılması ve gıdalardaki protein oranının yüksek gösterilmesi amacıyla kullanılmış ve böylelikle hem insan hem de hayvan sağlığı tehlikeye atılmıştır. Melamin özellikle süt ve süt ürünleri, bebek mamaları, pet ve çiftlik hayvanı yemlerinde kullanılmış ve gıdalardaki protein oranı normal seviyelerde gösterilerek kolayca piyasaya sürülmüştür. Bu şekilde maliyeti düşüren üretici firmalar kâr marjını artırmış olsa da, bu ürünleri tüketen bebek ve hayvanlarda ciddi sağlık problemleri hatta ölüm vakaları görülmüştür. Deneysel çalışmalar ile melamine maruz bırakılan deney hayvanlarında, böbrek taşları, kristaller ve epitelde irritasyon ve yangı oluşumundan dolayı ratlarda idrar kesesi ve üreter kanseri, farelerde ise idrar kesesi hiperplazisi gibi patolojik bulgular bildirilmiştir (Melnick ve ark. 1984, IARC 1986, OECD 1998). Bu bileşiğin, insanlar üzerindeki genotoksik etkisine dair verilerin ise sınırlı olduğu belirtilmiştir (IARC 1999).

Yapılan çalışmalarda melaminin canlılarda metabolize edilemediği ve idrarla birlikte atıldığı, buna bağlı olarak da akut toksisitesinin düşük olduğu sonucu ortaya çıkmıştır (Sharma ve Paradakar 2010). Ancak melaminin metabolitleri olan siyanürik asit veya ürik asit varlığında toksik etkisinin daha yüksek olduğu ve üriner sistemde irritasyon, obstrüksiyon ve üremiye yol açtığı kaydedilmiştir (IARC 1999, Brown ve ark. 2007, Dobson ve ark. 2008).

Bu çalışmada, maruz kalındığında organizmadaki canlılık işlevlerini tehdit eden melamin ile metabolitleri olan siyanürik asit ve ürik asidin, biyokimyasal mekanizmaların sürdürülmesi için genetik ve moleküler talimatları taşıyan ve aktaran DNA üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ökaryotik (sığırtimus dokusu) ve prokaryotik (*Staphylococcus aureus* bakteri kültürü) kaynaklardan izole edilen genomik DNA'lar ile söz konusu moleküllerin etkileşimleri, *in vitro* testler (UV-absorbans spektrofotometri, floresans spektrofotometri ve agaroz jel elektroforezi) ile incelenmiştir.

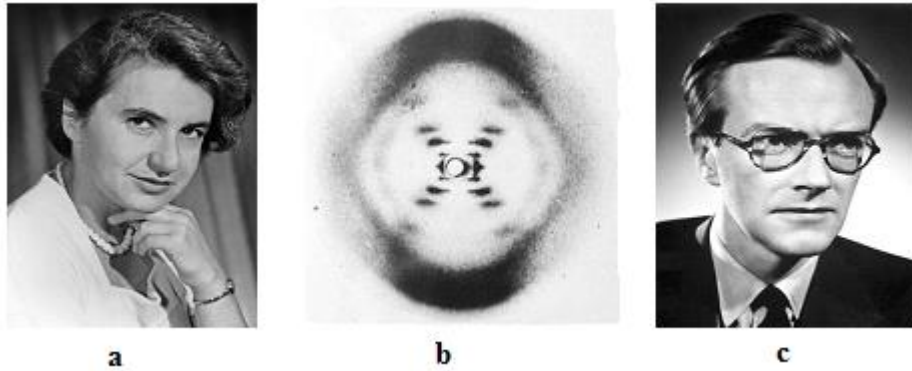
1.1. DNA Molekölünün Tarihçesi

DNA'nın araştırılması ilk olarak 1865 yılında Gregor Mendel'in bezelye bitkisi ile deneyler yapması ve genetik özelliklerin belirli yasalara göre miras kaldığını keşfetmesi ile başlamış olsa da ilk DNA izolasyonu 1869 yılında İsviçreli bilim adamı Friedrich Miescher tarafından gerçekleştirilmiştir (Portugal ve Cohen 1977, Nelson ve Cox 2016). Miescher, çalışmasında hücrelerin kimyasal yapısını belirleyerek yaşamın temel prensibini çözmeyi amaçlamış ve bu amaçla cerrahi sargı bezlerinde bulunan cerahat sıvısındaki lökositleri izole ederek çeşitli proteinleri ortaya çıkarıp sınıflandırma işlemi yapmayı planlamıştır. Ancak hücre çekirdeğinden, çok daha yüksek fosfor içeriğine sahip ve normal proteinden farklı kimyasal özellikleri olan bir maddeyle karşılaştığında yeni bir madde keşfettiğini fark ederek, bu maddeye hücre çekirdeğinde bulunduğu için "nüklein" adını vermiştir (Miescher 1869, Miescher 1871, Portugal ve Cohen 1977). 1871 yılında hocası Felix Hoppe-Seyler ile beraber yaptıkları yayınlar ile çalışma sonuçlarını paylaşan Miescher, büyük kitlelere ulaşarak yeni keşfettiği madde ile ilgili merak uyandırmıştır (Miescher 1871, Dahm 2005).

Söz konusu yayınlardan sonra birçok bilim adamı, yeni ve ilgi çekici olan hücre çekirdeği yapısını araştırmak üzere Miescher ve Hoppe-Seyler ile temasa geçerek araştırmalarına başlamıştır (Dahm 2005). Yapılan araştırmaların artmasıyla yeni bilgiler elde edilmeye başlanmış ve DNA molekülünün yapısı çözülmeye başlamıştır. Alman bilim adamı Richard Altmann, 1899 yılında ilk kez nüklein yerine "nükleik asit" terimini kullanmıştır. İlk yıllarda nükleik asitlerin iki tipte olduğu anlaşılmış; birinci tipin hayvanlar alemine özgü olarak kabul edilen ve timustan izole edilen timonükleik asit, ikinci tipin ise bitkiler alemine özgü sayılan ve bira mayalarından izole edilen zimonükleik asit olduğu bildirilmiştir. 1924 yılında ise bu iki nükleik asit çeşidinin hem hayvan hem de bitki türlerinde bulunduğu Robert Feulgen ve Heinrich Rossenbeck adlı araştırmacılar tarafından ispat edilmiş ve sonrasında da timonükleik asit çekirdeğe, zimonükleik asit ise sitoplazmaya özgü yapı maddeleri olarak belirlenmiştir (Güneş 2006). 1929 yılında Levene ve Mori tarafından timonükleik asit, deoksiribo nükleik asit (DNA), zimonükleik asit de ribonükleik asit (RNA) olarak adlandırılmış ve aynı zamanda DNA ile RNA'nın yapısında bulunan Adenin (A), Guanin (G), Sitozin (C), Timin (T) ve Urasil (U) bazları tanımlanmıştır (Levene ve Mori 1929). 1944 yılında

Avery ve çalışma arkadaşları tarafından da daha önce genetik materyal olarak düşünülmemiş olan DNA'nın genetik özelliklerin taşıyıcısı olabileceği önerilmiş, ancak sadece birincil yapısı hakkında bilgi olan DNA'nın genetik karakteri hakkında yeterli bir açıklama sağlanamamıştır (Avery ve ark. 1944).

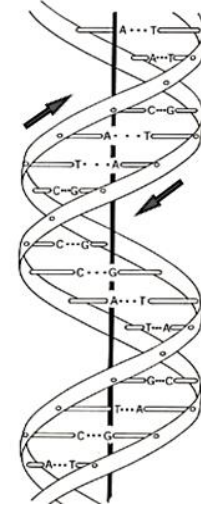
İngiltere'de Cambridge Üniversitesi Cavendish Laboratuvarı'nda DNA'nın yapısıyla ilgili araştırmalar yapan James Watson ve Francis Crick, 1953 yılında DNA molekülünün kendine has özelliklere sahip bir çift sarmal yapı halinde bulunduğunu ileri sürmüştür (Watson ve Crick 1953) ve bu teorilerini ABD'de Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde DNA çalışmalarını sürdüren büyük bilim insanı Linus Pauling'in ekibindeki Maurice Wilkins ve Rosalind Franklin tarafından elde edilmiş DNA fibrillerinin X-ışını kırınım görüntüsüne (Şekil 1.1) dayandırmışlardır (Allison 2012). Elde edilen X-ışını fotoğrafları, bazların diziliş sırasına bağlı olmaksızın, DNA'nın çok düzenli biçimde dönümler yapan bir molekül olduğunu göstermiş (Şekil 1.2) ve 1962 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü Watson, Crick ve Wilkins'e kazandırmıştır. Watson ve Crick tarafından DNA'nın üç boyutlu yapısının belirlenmesi modern moleküler biyoloji ve genetik çalışmalarının başlangıcı olarak görülmektedir.



Şekil 1.1. (a) Rosalind Franklin ve (c) Maurice Wilkins tarafından elde edilen (b) DNA molekülünün çekilen ilk X-ray görüntüsü (Nelson ve Cox 2016).



a



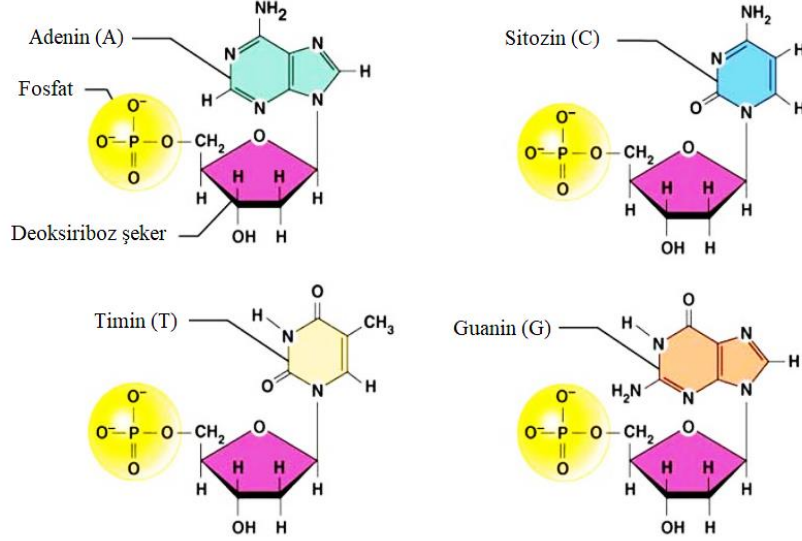
b

Şekil 1.2. Çift sarmallı DNA modelinin keşfi. (a) Francis Crick (sağda) ve James Watson (solda), (b) 1953 yılında Watson ve Crick tarafından önerilen çift sarmallı DNA molekülünün şekli (Edelson 2007, Allison 2012).

1.2. DNA Molekülünün Yapısı

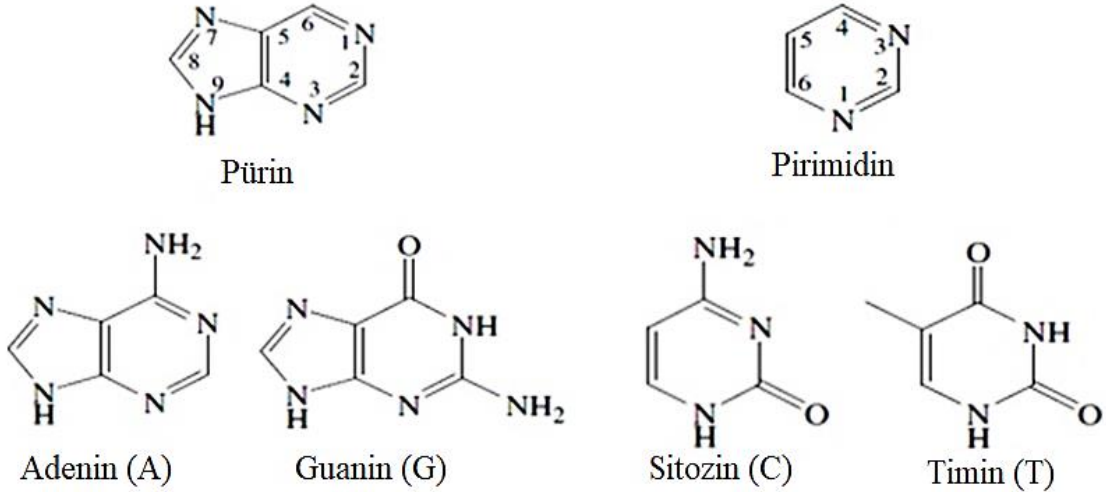
Tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık faaliyetlerini sağlayan yapı ve işlevlerin yerine getirilebilmesi için gerekli olan genetik şifreleri taşıyan DNA, temel olarak karbon, hidrojen, oksijen, azot ve fosfor atomlarından oluşmuştur. Söz konusu atomların belirli bir düzenle bir araya gelmesi sayesinde, DNA'nın genetik bilgi deposu görevi ve genetik bilginin aktarılması işlevleri yerine getirilmiş olur (Murray ve ark. 1998).

DNA'nın biyokimyasal yapısı incelendiğinde, nükleotit olarak adlandırılan basit birimlerin oluşturduğu iki uzun polimer zinciri dikkati çeker. Bu polimerlerin yapı taşı olan nükleotit birimi Şekil 1.3'te gösterildiği gibi, azotlu organik baz (Adenin, Timin, Guanin ve Sitozin), pentoz şeker (2'-deoksiriboz) ve fosfat grubu içeren 3 temel bileşenden oluşmaktadır (Biçen 2011, Allison 2012).



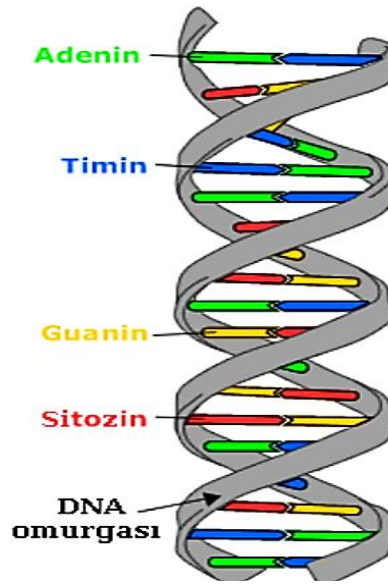
Şekil 1.3. DNA molekülünün yapısını oluşturan nükleotit birimi (Mathews ve Van Holde 1990).

Nükleotit yapısında bulunan bazlar purin ve pirimidin olmak üzere iki çeşittir. Purin yapısındaki heterosiklik bazlar, Adenin ve Guanin iken, pirimidin yapısındaki heterosiklik bazlar ise Sitozin ve Timin'dir (Şekil 1.4) (Watson ve Crick 1953, Klug ve ark. 1997, Allison 2012).

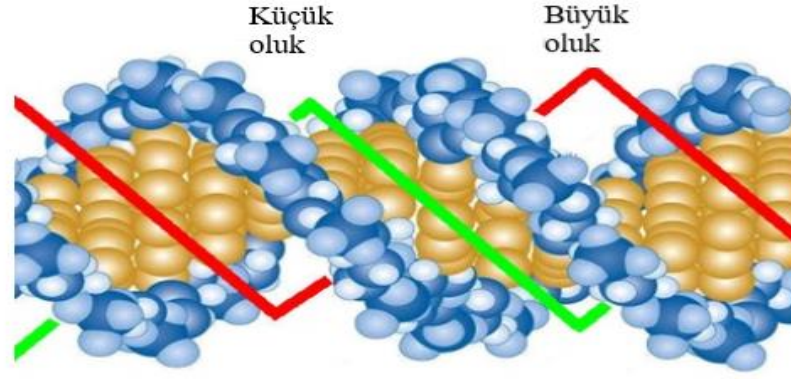


Şekil 1.4. DNA molekülünde bulunan purin ve pirimidin türevli organik bazlar (Nelson ve Cox 2016).

Bir nükleotitdeki pentoz şekerinin 3'-karbonuna bağlı -OH ile sonraki pentoz şekerinin 5'-OH grubu arasında bir fosfodiester bağı oluşur ve böylece şeker birimleri birbirine bağlanır (Allison 2012, Nelson ve Cox 2016). Fosfodiester bağının asimetrik olması nedeniyle DNA ipliğinin bir yönü vardır. Yani DNA zincirlerinden birinin 3' ucu ile diğerinin 5' ucu aynı tarafta bulunmakta ve ortak bir eksen etrafında sağa doğru dönen heliks yapıyı oluşturmaktadır. Watson ve Crick'in önerdiği modelde DNA'nın omurga yapısını oluşturan ve hidrofilik özelliğe sahip olan şeker ve negatif yüklü fosfat omurgası, çift sarmalın dışa bakan yüzünde ve kendilerini saran su moleküllerine dönük olarak yer almaktadır. Hidrofobik özelliğe sahip olan pürin ve pirimidin bazları ise çift sarmalın içe bakan yüzünde ve ana eksene dik olarak yer almışlardır (Şekil 1.5). Heliks yapısındaki bu yerleşim düzeni Şekil 1.6'da görüldüğü gibi sarmallar arasında bir tane büyük, bir tane de küçük oluğun oluşmasına neden olmaktadır (Hantz ve ark. 2001, Güneş 2006, Allison 2012, Nelson ve Cox 2016).

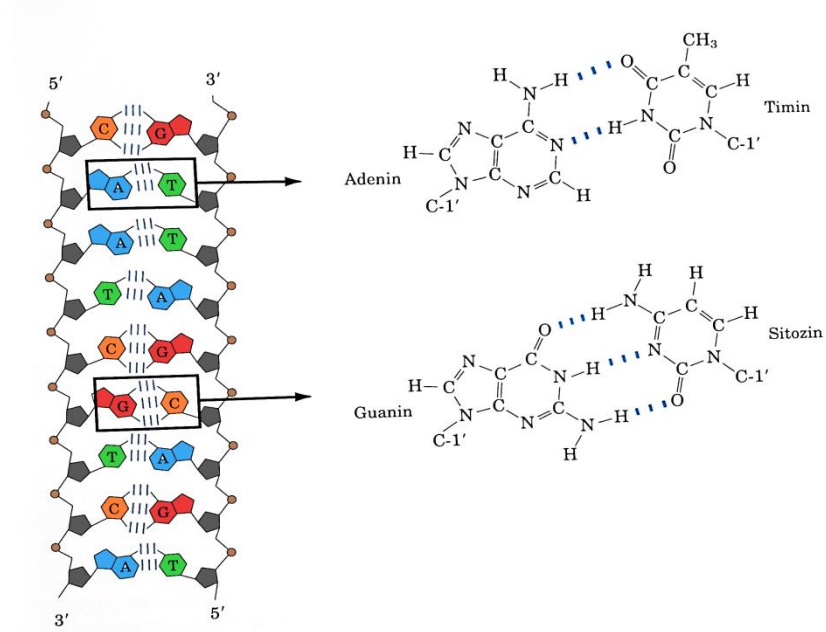


Şekil 1.5. DNA molekülünün çift sarmallı yapısı (Glogster 2015).



Şekil 1.6. DNA sarmalında oluşan küçük ve büyük oluklar (Mutter 2013).

Çift sarmalın çapı 2.0 nm uzunluğunda olup birbirini takip eden bazlar 36° eğim göstererek dizilmekte ve 10.5 bazın arka arkaya gelmesi çift sarmalın bir tam dönüş yapmasını sağlamaktadır. Her baz 0.34 nm'lik bir boy artışı sağlamakta ve bir tam dönüşte çift sarmalın boyu 3.4 nm uzunluğa ulaşmaktadır. Ancak belirli baz çiftleri 2.0 nm çapındaki çift sarmalın içine sığmaktadır. Eğer karşı karşıya duran bazlardan biri pürin ise diğeri mutlaka pirimidin olmalıdır. Çünkü iki pürin bu yapı için büyük, iki pirimidin ise küçüktür. Şekil 1.7'de verildiği gibi DNA yapısındaki Adenin daima iki hidrojen bağı ile Timin'e, Guanin ise daima üç hidrojen bağı ile Sitozin'e bağlanmaktadır (Güneş 2006, Nelson ve Cox 2016). Baz eşleşmesindeki bu yapı DNA'nın replikasyon, onarım, rekombinasyon gibi işlev mekanizmalarının açıklanmasında DNA'nın en önemli özelliklerindedir (Özdemir 2019).



Şekil 1.7. Guanin-Sitozin ve Adenin-Timin baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları (Nelson ve Cox 2016).

1.3. DNA Molekülünün Formları

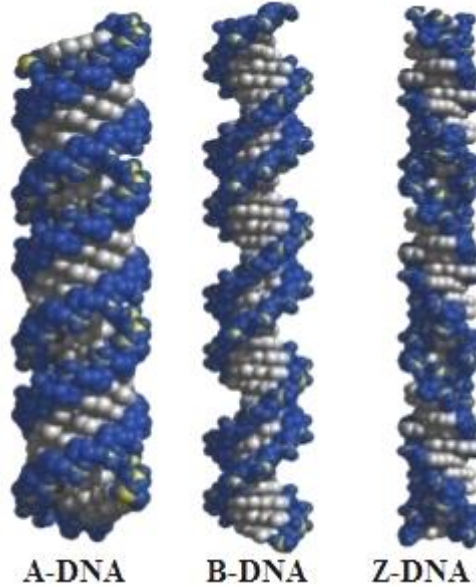
Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda DNA'nın 3 farklı formu belirlenmiş ve A, B ve Z-DNA şeklinde adlandırılarak Şekil 1.8'de olduğu gibi şematize edilmiştir. DNA'daki bu çeşitlilik çift sarmal yapıdaki farklılıktan ileri gelmektedir. DNA moleküllerinin çoğu B-DNA formunda ve sağ el çift sarmal yapısındadırlar (Allison 2012).

Çift zincirin bir tam dönüş yapması için sarmal eksene dik olarak yer alan 10.5 baz çiftine (3.4 nm) ihtiyacı vardır. DNA'nın A formu da sağ el çift sarmal yapısındadır. Bu formda, çift zincirin bir tam dönüş yapması için 11 baz çifti bulunur ve baz çiftleri sarmal eksenine 20°'lik bir açıyla yerleşir. DNA'nın A formu, B formu ile karşılaştırıldığında büyük oluklar daha büyük, küçük oluklar ise daha küçüktür (Murray ve ark. 1998). Z formu ise; DNA'nın ender görülen ve sol el çift sarmal yapısında olan formudur. Çift zincirin tam bir dönüş yapması için yapı 12 baz çifti içermektedir.

DNA'ya ait bahsedilen bu üç form için yapılan analizlerde, A-DNA'nın, B-DNA molekülüne göre daha kısa ve kalın, Z-DNA'nın ise B-DNA molekülüne göre daha ince ve uzun olduğu sonucuna varılmıştır (Mathews ve Van Holde 1990, Murray ve ark. 1998, Allison 2012, Nelson ve Cox 2016).

Çizelge 1.1. DNA formları arasındaki farklılıklar.

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Şekilsel fark	En geniş	Orta	En uzun
Sarmal yönü	Sağ	Sağ	Sol
Tur başına gerekli baz çifti sayısı	11	10.5	12
Sarmal çapı	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Büyük oluk	Dar, derin	Geniş, orta derinlik	Düz ve neredeyse yok denecek kadar sığ
Küçük oluk	Çok geniş, yayvan	Dar, derin	Çok dar, derin



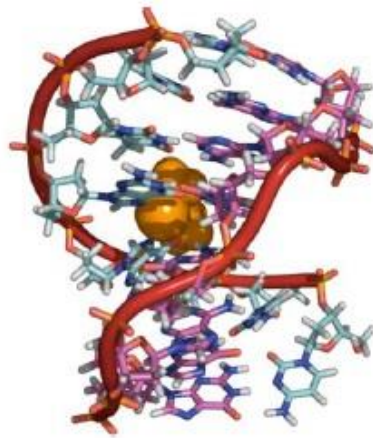
Şekil 1.8. DNA molekülünün A, B ve Z formları (Nelson ve Cox 2016).

1.4. Moleküllerin DNA'ya Bağlanma Yolları

DNA'nın çevresindeki moleküller ile etkileşiminin incelenmesine dair yapılan *in vitro* çalışmalarda, bağlanmak için DNA'yı hedef olarak seçen ilaçlar, moleküller, metal kompleksleri ve bazı zararlı kimyasallar ile DNA'nın kovalent bağlanma, groove bağlanma, elektrostatik etkileşim ve interkalasyon gibi moleküller arası potansiyel bir dizi etkileşimler yapabildiği belirlenmiştir (Long ve Barton 1990, Ye ve ark. 2005, Sirajuddin ve ark. 2013).

1.4.1. Kovalent Bağlanma

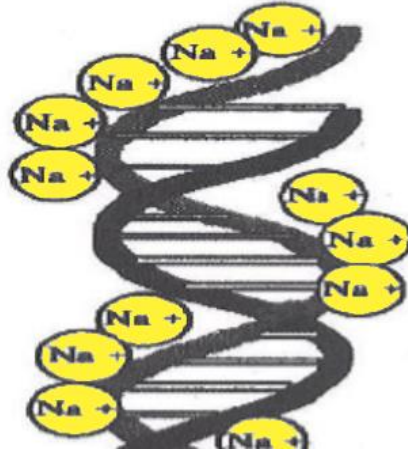
DNA ile kovalent bağlanma şeklinde etkileşim içerisinde olan birçok molekül, hücrede DNA replikasyonu, transkripsiyon, RNA ve protein sentezi gibi olayların tümünü inhibisyona uğratarak apoptozise neden olmaktadır (Sirajuddin ve ark. 2013). Klinik olarak test edilen ilk başarılı DNA kovalent bağlayıcısı Cisplatin bileşiği olmakla birlikte, genellikle antikanser ilaçların DNA ile etkileşim yöntemi Şekil 1.9'da olduğu gibi geri dönüşümsüz kovalent bağlanma şeklindedir (Rosenberg ve ark.1967).



Şekil 1.9. DNA molekülü ve cisplatin bileşiğinin etkileşimi (Sueishi ve ark. 2002).

1.4.2. Elektrostatik Etkileşim

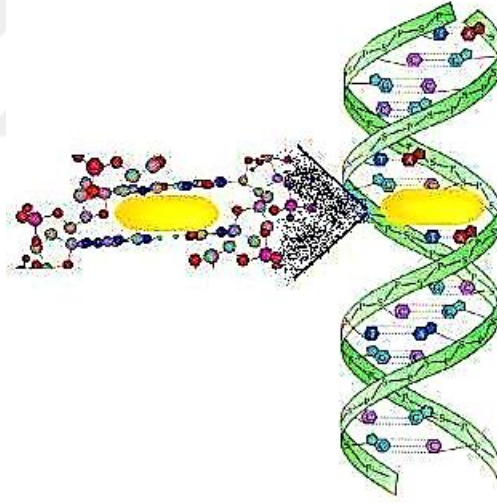
Watson ve Crick tarafından önerilen ve halen güncelliğini koruyan DNA sarmalı dış yüzeyinde fonksiyonlarını ve yapısını etkileyen negatif yüklü fosfat grupları taşır. DNA omurgasını oluşturan bu negatif yüklü iyonlara, Şekil 1.10'da gösterildiği gibi pozitif yüklü iyonlar elektrostatik etkileşim ile bağlanabilirler. DNA ve küçük moleküllü yapılar arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşimler, diğer etkileşim türlerine göre daha zayıftır. Moleküller, DNA çift sarmalına dış bağlanma ile bağlandığında karşı iplikçikteki iyonları uzaklaştırır ve DNA yapısında az da olsa ayrılmalara sebep olabilir (Özdemir, 2019). Ancak bu ayrılma geri dönüşümlü olduğundan dolayı DNA üzerinde kalıcı hasar oluşturmayabilir.



Şekil 1.10. DNA sarmalına pozitif yüklü Na^+ iyonlarının elektrostatik etkileşim ile bağlanması (Özdemir 2019).

1.4.3. İnterkalasyon

DNA'nın baz çiftleri arasına çeşitli moleküllerin girmesi olarak tanımlanan interkalasyon (Şekil 1.11.), sarmal yapıda yer alan baz dizilimiyle ilişkili olmadan gerçekleşmektedir (Sirajuddin ve ark. 2013). DNA molekülünün boyunun uzamasına ve torsiyonunda azalmaya sebep olan bu etkileşim tipi sarmal yapısının sürekliliğini bozmaktadır. DNA ile bu tipte bağlanma yapan maddeler, yapıları ve interkalasyon yetenekleri sebebiyle DNA ile etkileşimleri sonrası UV-absorbans ve floresans spektrofotometri gibi çeşitli yöntemlerle görüntülenebilmekte ve interkalatör temelli antikanser ajan tasarlamada önemli bir rol oynamaktadır. Bu türde interkalatörlere örnek olarak etidyum bromid, akridin oranj ve fenantridin verilebilir (Top ve ark. 2016).

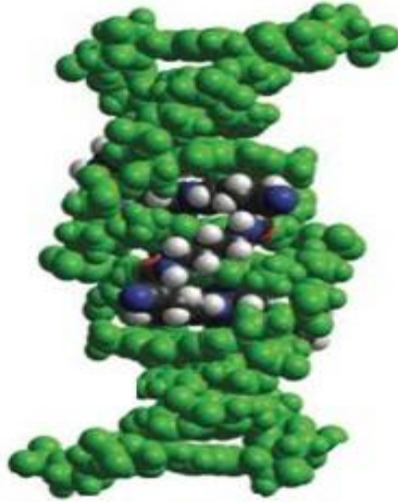


Şekil 1.11. İnterkalasyona uğramış DNA sarmalı (Sirajuddin ve ark. 2013).

1.4.4. Groove Bağlanma

Çift sarmallı DNA molekülünün yapısında bulunan oluklara yerleşebilen moleküllerin hidrojen bağı veya Van der Waals etkileşimi ile DNA'ya bağlanması groove bağlanma olarak ifade edilmektedir (Çelik 2018). Küçük moleküllerin çoğu DNA'nın küçük olukları ile etkileşmeyi tercih ederken, büyük yapılı moleküller (proteinler ve oligonükleotitler gibi) genellikle büyük oluklara bağlanır (Bischoff ve Hoffman 2002). Küçük oluklara bağlanan moleküllerin çoğu A-T oranı zengin dizilere bağlanır. Bunun sebebi A-T bölgelerinin G-C bölgelerinden daha dar olmasıyla birlikte, bu bölgede daha az steirik engel ve daha fazla elektrostatik potansiyelin olmasıdır.

Şekil 1.12'de gösterilmiş olan groove bağlanma, konformasyonel açıdan DNA'da çok büyük farklılıklar meydana getirmemektedir. Ancak molekül yapısı küçük olan bazı oluk bağlayıcılar transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonunu sağlayarak etki edebilmektedir (Palchaudhuri ve Hergenrother 2007, Rajendiran ve ark. 2012).



Şekil 1.12. DNA molekülü ve Rutenyum bileşiği arasındaki groove bağlanma (Pages ve ark. 2015).

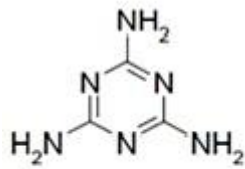
1.5. Melamin, Siyanürik Asit ve Ürik Asit

Melamin (2,4,6-triamino-1,3,5-triazine, $C_3H_6N_6$), ilk olarak 1834 yılında Alman kimyager Justus Von Liebig tarafından potasyum tiyosiyonatın amonyum klorid ile ısıtılması ile sentezlenmiş, siyanüramid veya triaminotriazin olarak da adlandırılan bir kimyasaldır (FDA 2008, WHO 2010). Genel anlamda laminantlar, tutkallar, temizlik ürünleri, yemek kapları ve alev geciktirici ürünlerin yapımında kullanılan uzun ömürlü organik bileşiktir (Bizzari ve Yokose 2008). Zehirli ve yanıcı bir kimyasal olan formaldehit ile birleştiğinde suda çözünmeyen sert ve zor kırılan bir maddeye dönüşürken, reçine ile karıştırıldığında ise yapısındaki serbest azot sayesinde alev geciktirici özellikte bir maddeyi oluşturur. Ayrıca yüksek azot ihtivası sebebiyle melaminden gübre olarak veya gübre üretimi alanında da yararlanılmış, ancak maliyet anlamında daha uygun olan alternatiflerin kullanılmaya başlanmasıyla bu durum son bulmuştur (FDA 2008). Melamin, aynı zamanda veteriner sahada kullanılan pestisitlerde bulunan kiromazinin (cyromazine) de metabolitidir (Şekil 1.13.). İlaç uygulamasını takiben vücuda giren kiromazinin % 10'u melamine dönüşmektedir ve bu durum az da olsa melamine maruz kalınmasına sebep olmaktadır (Patakioutas ve ark. 2007, Muniz-Valencia ve ark. 2008, WHO 2009). Asıl maruziyet ise süt, süt tozu, bebek maması, pet ve çiftlik hayvanı yemleri gibi birçok gıdaya protein oranının yükseltilmesi amacıyla hile olarak katılmasıyla olmaktadır.

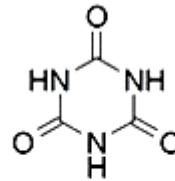
Siyanürik asit (2,4,6-trihidroksi-1,3,5-triazin, $C_3H_3N_3O_3$), melaminin yapısal metaboliti olan oksitriazin türevidir. Genel olarak temizlik ürünleri, çamaşır suları, endüstriyel temizlik maddeleri ve bulaşık makinesi bileşiklerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan önemli bir endüstriyel bileşendir (Miao ve ark. 2009, Kirk 1993). Ayrıca 1958'den beri havuz sularındaki hipoklorit iyonu ve klorun fotokimyasal indirgenme hızını azaltmak için kullanılan siyanürik asit, sudaki serbest klorun güneş ışığı tarafından parçalanma süresini uzatmaktadır (Canelli 1974). Ancak bu amaç için kullanıldığında, serbest klorun oksidan ve dezenfektan özelliğini azaltması ve bu durumu tamponlamak için daha fazla miktarda klorun havuz suyuna eklenmesine sebep olması siyanürik asit kullanımının dezavantajlarından biridir. Diğer bir dezavantajı ise, temas halinde gözde tahriş edici etkisinin olmasıdır (Karns 1999). Yapılan bir araştırma siyanürik asidin ağız yoluyla günlük alımının hayvanlar için ciddi hasarlara neden

olduğunu göstermiştir (Hammond 1986). Siyanürik aside olan maruziyet, azot içeriğinden dolayı pet ve çiftlik hayvanı yemleri ile gıdalara sahte protein yüksekliği için kasıtlı olarak katılmasıyla, stabilizatör olarak kullanıldığı havuz sularının yutulmasıyla ya da havuzlu sistem balık yetiştiriciliğinde bu duruma maruz kalan balıkların tüketilmesiyle olabileceği gibi melaminin yan ürünü olarak ortaya çıkmasıyla da mümkündür (WHO 2008).

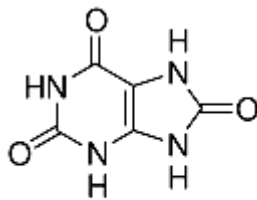
Ürik asit (2,6,8-trihidroksipürin, $C_5H_4N_4O_3$), ilk olarak 1776 yılında İsveçli kimyager Carl Wilhelm Scheele tarafından yapılan çalışmada böbrek taşlarından izole edilmiştir (Scheele 1776). Melaminin yapısal metaboliti olan ürik asit aynı zamanda canlı vücudundaki pürin metabolizmasının bir sonucu olarak da ortaya çıkmaktadır. Fizyolojik şartlarda metabolizmada yer alan ürik asit, canlı için tek başına toksik ya da iritan özellikte değildir. Ancak kasıtlı bir şekilde gıdalara katılan melamine uzun süre maruziyeti olan canlı vücudunda melamin ve ürik asidin oluşturduğu komplekse bağlı olarak zararlı etkiler görülebilmektedir (Dorne ve ark. 2013).



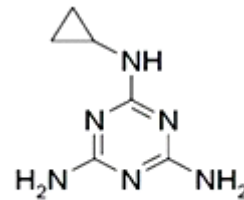
Melamin



Siyanürik Asit



Ürik Asit

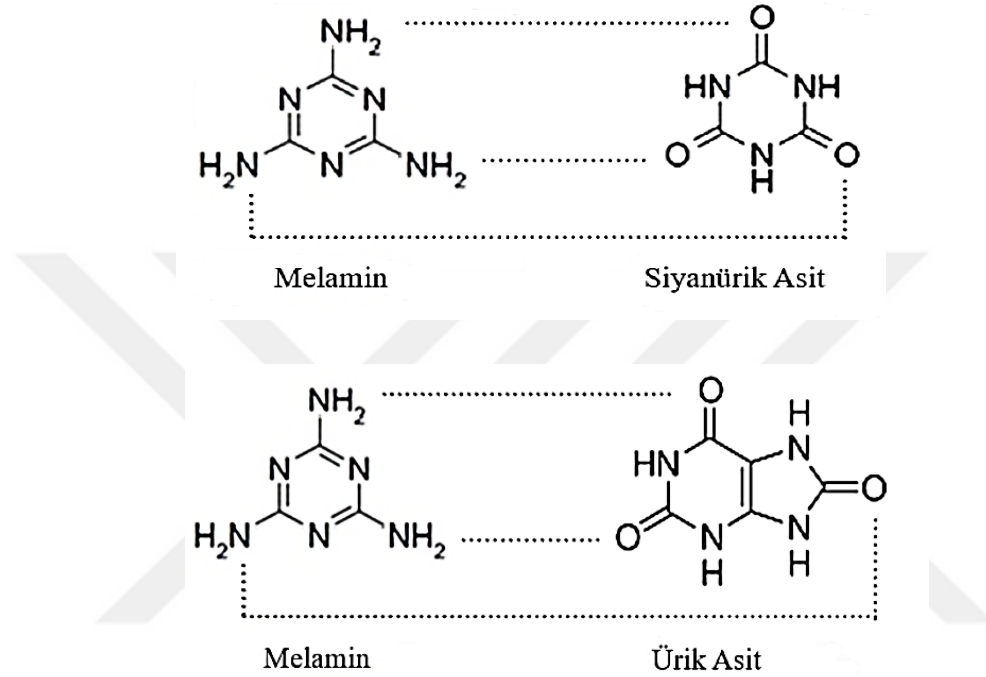


Kiromazin

Şekil 1.13. Melamin, Siyanürik Asit, Ürik Asit ve Kiromazin bileşiklerinin kimyasal yapıları (WHO 2009).

Deneysel olarak daha önce yapılmış çalışmalarda, melaminin tek başına akut toksisitesinin memelilerde düşük olduğu gösterilmiştir (Melnick ve ark. 1984, Brown ve ark. 2007, Baynes ve ark. 2008) olsa da uzun vade de melamine maruz kalma durumlarında farelerde ve ratlarda, idrar kesesi taşı oluşumu, idrar kesesinde inflamasyon ve hiperplazi gibi patolojik durumların görüldüğü (Melnick ve ark. 1984, IARC 1986, OECD 1998), köpeklerde ise kristalürinin ortaya çıktığı belirtilmiştir (Bingham ve ark. 2001). Melamin ve metabolitleri ile ilgili deneysel çalışmalar devam ederken söz konusu bileşiklerin tüketilebilir gıda değeri olmamasına rağmen, azot içeriklerinin yüksek olmasından dolayı üretici firmalar tarafından yasa dışı kullanılarak süt, süt ürünleri, bebek ve evcil hayvan mamaları ve çiftlik hayvanı yemleri gibi birçok gıdaya protein oranını yükseltmek amacıyla hile olarak katıldığı bilinmektedir. Söz konusu gıdalarda gerçekleştirilen protein ölçümleri, içerikteki azot miktarının tayinine dayanan Kjeldahl metoduna göre yapıldığından protein değerleri normal seviyede belirlenmiş ve üretici firmalar hileli gıdaları tüketime kolayca sunabilmiştir. Bunun sonucunda özellikle bu gıdaları tüketen bebekler ve hayvanlar açısından birtakım sorunlar görülmeye başlanmıştır. Bu durum, 2007 yılında ABD’de kedi ve köpeklerde böbrek yetmezliğine bağlı ani ölümlerin görülmesiyle yapılan araştırmalar sonucu, kedi ve köpek mamalarının hazırlanmasında kullanılmak üzere Çin’den ithal edilen pirinç ve buğday protein konsantrlerinde % 0.8 ile % 26 arasında değişen seviyelerde melamin ve ilgili yapısal metabolitlerin tespit edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu olay sonrasında, ABD ve Çin’de bebek mamaları, hayvan yemleri, yoğurt, toz kahve, süt ve süt tozlarında yapılan araştırmalarda melamin varlığı tespit edilmiştir. Kedi-köpek mamalarının % 0.001-7 düzeyinde içerdiği melamin ve metabolitlerinin varlığı nedeniyle 1154 kedi ve köpek maması çeşidi geri toplatılmıştır. Ancak bu süreçte 1000’den fazla kedi ve köpeğin, melaminin yol açtığı böbrek yetmezliğinden dolayı öldüğü tahmin edilmektedir (WHO 2009, Puschner ve Reimschuessel 2011). Ayrıca ratlar ile yapılan çalışmalarda yeme katılan ve uzun süre maruz bırakılan melaminin, yüksek dozlarda kanserojen olabileceği belirtilmiştir. Bu durumun sadece idrar kesesinde taş oluşan hayvanlarda görülmesi, taşa bağlı gelişen epitelyal tahriş ve hiperplazinin sonucu olarak ortaya çıkmış olabileceği ve kimyasalın genotoksik etkisinden kaynaklanmamış olabileceği ileri sürülmüştür (IARC 1999). İdrar kesesinde oluşan taşların analizi yapıldığında, sadece melamin verilmesine rağmen melamin ve ürik asidin aynı oranlarda bulunduğu ve fizyolojik şartlarda da pürin metabolizması sonucu olarak belli bir miktarda vücutta oluşan ürik asidin, melamin ile hidrojen

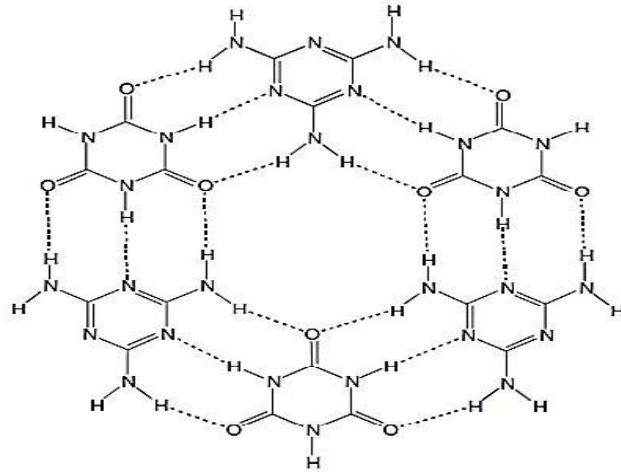
bağlarıyla birleşmesi sonucu taş oluşumunu hızlandırdığı ve toksisiteyi artırdığı rapor edilmiştir. Benzer durumun melamin ve siyanürik asit arasında da olduğu (Şekil 1.14) bildirilmiştir (Natl Toxicol Prog. 1983, Melnick ve ark. 1984, Heck ve Tyl 1985, Okumura ve ark. 1992, Ogasawara ve ark. 1995, Cremonuzzi ve ark. 2004).



Şekil 1.14. Melaminin hidrojen bağları ile siyanürik asit ve ürik aside bağlanması (Dorne ve ark. 2013).

Melamin katkısı bulunan süt, süt tozu ve bebek mamalarının tüketilmesiyle melaminden etkilenen ilk bebek, 2008 yılı Mart ayında Çin'in Nanjing bölgesinde teşhis edilmiştir. İlk vakanın görülmesinden birkaç ay sonra Çin'deki bir firmanın, süt ve süt tozunun protein oranını yapay olarak artırmak amacıyla melamin kattığını kabul etmesi üzerine vakaların bununla sınırlı kalmayıp devamının gelebileceği anlaşılmıştır. Çok geçmeden vaka sayısı artmaya başlamış ve toplamda 54.000 Çin'li bebek melamin ve metabolitlerinden etkilenmiştir. Bu bebeklerden 6000'i ciddi şekilde rahatsızlanmış ve 6'sı ölmüştür (WHO 2009, Puschner ve Reimschuessel 2011). Birçok bebeğin ve hayvanın (kedi-köpek) etkilendiği melamin skandalının yaşanmasının ardından Çin'de

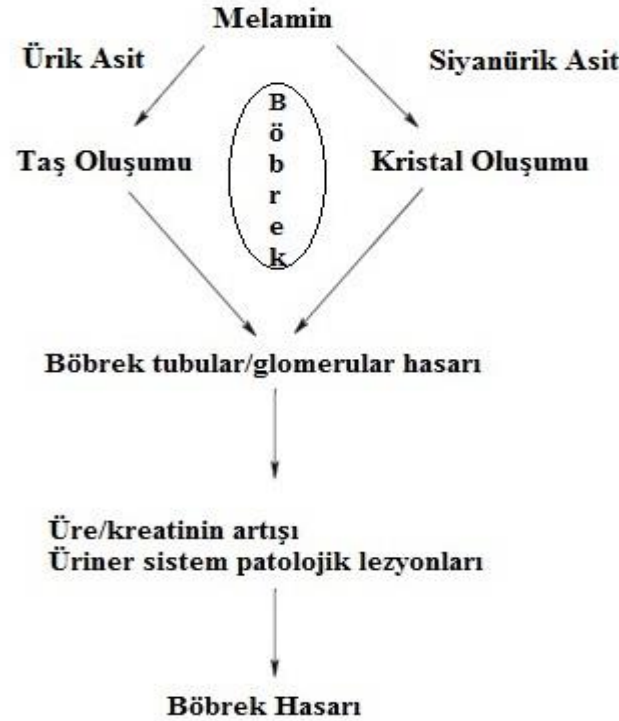
süt ve süt ürünleri tüketimi ciddi şekilde düşmüş ve melaminden kaynaklı ortaya çıkabilecek toksik etkilere dair araştırmalar hızlanmıştır. Bu bağlamda Hong-Kong'da en az bir ay düşük miktarda melamin içeren süt ürünlerini tüketen 12 yaşından küçük 3170 çocuk üzerinde yapılan bir araştırmada, 1 çocukta böbrek taşı, 7 çocukta böbreklerde tortu, 208 çocukta hematüri ve 59 çocukta proteinüri ile karşılaşmıştır. Semptom göstermeyen çocuklarda ise uzun süreli melamin ve metabolitlerine maruz kalma sebebiyle bileşiklerin birbiri ile yaptığı kristallenme (melaminsiyaniürat kompleksi) sonucu yaşamın erken dönemlerinde böbrek hastalıklarının gelişebileceği bildirilmiştir (Lam ve ark. 2009). Ayrıca söz konusu çalışma, ortaya çıkan klinik bulguların şiddetinin maruz kalınan melamin konsantrasyonuyla doğru orantılı olduğunu ileri sürmüştür (Lam ve ark. 2009).



Şekil 1.15. Melamin ve siyanürik asidin hidrojen bağı vasıtasıyla oluşturduğu melaminsiyaniürat kristali (Skinner ve ark. 2010).

2010 yılında ise melamin ve siyanürik asidin insanlarda ağızdan alındığında metabolize olmadığı ve büyük oranda (% 98) idrar ile dışarı atıldığı, bu yüzden de düşük akut toksisiteye sahip olduğu ileri sürülmüştür (Sharma ve Paradakar 2010). Bu bağlamda Zheng ve ark. (2011) tarafından yürütülen deneysel bir çalışmada, laktasyon dönemindeki Holstein ırkı ineklerin rasyonlarına melamin ilave edilerek, melaminin süt, plazma, rumen sıvısı, idrar ve dışkıya geçme oranlarına bakılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 16 inek, 4 gruba ayrılarak sırası ile 20, 40, 60 ve 80 gram melamin içeren rasyon

ile beslenmiş ve 10 günün sonunda söz konusu biyolojik materyallerdeki melamin miktarı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, süt, plazma, rumen sıvısı, idrar ve dışkıya μg cinsinden melamin geçişi olduğu ve bu oranın en fazla idrarda olduğu tespit edilmiştir (Zheng ve ark. 2011). Deneysel olarak ratlar ile yapılan akut toksisite çalışmalarında melaminin oral LD50 değeri vücutta 3.161 mg/kg, siyanürik asidin oral LD50 değeri ise 7.700 mg/kg olarak bulunmuştur (OECD 1999). Yapılan bu çalışmalarda özellikle uzun süreli maruziyet sonunda oluşan toksik etki, vücutta pürin metabolizması sonucu var olan ürik asit ile melamin arasında hidrojen bağlarının şekillenmesi ve siyanürik asit ile melaminin birleşmesiyle melaminsiyanürat kristallerinin oluşması temellerine dayandırılmıştır (Sharma ve Paradakar 2010). Şekil 1.15'te gösterilen ve sudaki çözünürlüğü oldukça düşük olan melaminsiyanürat kristali, böbrek tubülüslerinde birikerek tubüler blokaj ve dejenerasyona neden olmakta ve böbrek yetmezliği ile ölüme kadar gidebilen sonuçlara sebep olabilmektedir (Dobson ve ark. 2008). Bu kapsamda Dorne ve ark. (2013), melaminin, siyanürik asit ve ürik asit ile birleştiğinde meydana getirdiği toksikolojik durumu Şekil 1.16'deki gibi ifade etmişlerdir.



Şekil 1.16. Melamin ve ilgili metabolitlerin deneysel böbrek toksisite şeması (Dorne ve ark. 2013).

1.6. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının temel amacı; melamin ve metabolitleri olan siyanürik ve ürik asitlerin DNA ile moleküler etkileşimlerinin belirlenmesidir. Bu temel amacın yanında, söz konusu etkilerin ökaryotik ve prokaryotik DNA'larda farklılık taşıyıp taşımadığının belirlenmesi de hedeflenmiştir. Bu kapsamda melamin, siyanürik asit ve ürik asidin DNA üzerindeki etkisi, ökaryotik sığır timus DNA'sı ve prokaryotik *S. aureus* bakteri DNA'sı üzerinde *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bu amaçla; söz konusu moleküller arası etkileşimin değerlendirilmesinde UV-absorbans spektrofotometri, floresans spektrofotometri ve agaroz jel elektroforezi teknikleri uygulanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada uygulanan UV-absorbans spektrofotometri ve agaroz jel elektroforez analizleri Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı bünyesindeki Moleküler Biyokimya Laboratuvarları'nda, floresans spektrofotometri tekniği ise Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi KİT-ARGEM Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

2.1. Kullanılan Materyaller

Sığır timus dokusu nükleik asit molekülleri bakımından zengin olması ve daha fazla DNA izolasyonuna imkan tanınması sebebiyle ökaryotik DNA'nın değerlendirilmesi bakımından çalışmamız kapsamında tercih edildi. Tercih edilen timus doku materyalinin toplanması için Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alındı (Karar tarih ve sayısı: 24/12/2019-E.9895). Bu kapsamda söz konusu doku materyali Kırıkkale İli, Hasandede Belediyesi Mezbahanesi'nden temin edilerek soğuk zincir ile Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Moleküler Biyokimya Laboratuvarı'na getirildi. DNA izolasyonu için kullanılacak olan timus dokusu çalışma yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Çalışmamızda prokaryotik DNA'nın melamin ve metabolitleri ile ilişkisinin değerlendirilmesi için ise *Staphylococcus aureus* bakterisi DNA'sı tercih edildi. Bu kapsamdaki DNA izolasyonunda Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi KİT-ARGEM Laboratuvarları'nda üretilmiş olan *Staphylococcus aureus* bakterisi kültürü kullanıldı (Sudağdan ve ark. 2008).

2.2. Kullanılan Malzemeler ve Sterilizasyon İşlemi

Çalışma kapsamında kullanılan otomatik pipet uçları ve eppendorf tüpler 120 °C’de 20 dakika boyunca otoklav cihazı (Nüve steamArt OT-40L) ile steril edildi. Cam malzemeler ise % 10’luk nitrik asit (Tekkim®, Türkiye) ile kimyasal dezenfeksiyonları yapıldıktan sonra 3 kez distile sudan geçirildi ve 120 °C’de 60 dakika boyunca etüv (Memmert UN-110) cihazında kurutuldu.

2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.1’de verildi.

Çizelge 2.1. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddelerin listesi

<u>Kimyasal Madde Adı</u>	<u>Kod, Firma, Ülke</u>
Melamin % 99 (C ₃ H ₆ N ₆)	M2659, Sigma Aldrich®, ABD
Siyanürik asit % 98 (C ₃ H ₃ N ₃ O ₃)	185809, Sigma Aldrich®, ABD
Ürik asit % 99 (C ₅ H ₄ N ₄ O ₃)	U2625, Sigma Aldrich®, ABD
Agaroz	D00103, Pronadisa®, Spain
Borik asit (H ₃ BO ₃)	K30746365, Merck®, Almanya
Tris (H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃)	K31626787, Merck®, Almanya
EDTA	3A27866, BioShop®, Kanada
6x DNA yükleme boyası	00158610, Thermo Scientific®, ABD
6x Ez-vision	1576C339, Vwr Life Science-Biotechnology®, ABD
Sodyum klorür (NaCl)	17D204105, Vwr Chemicals®, Belçika

Hidroklorik asit (HCl)	K50227117, Merck®, Almanya
Nitrik asit (HNO ₃)	030914, Tekkim®, Türkiye
Trytic soy broth	CM0129, Oxoid®, İngiltere
Proteinaz-K	P2308, Sigma Aldrich®, ABD
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	S36628, Merck®, Almanya
Fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı	P3803, Sigma Aldrich®, ABD
100x tris-EDTA çözeltisi	T9285, Sigma Aldrich®, ABD
Lizozim	A3711, Applichem®, İspanya
Lizostafin	L-7386, Sigma Aldrich®, ABD
2-propanol	K29459195, Merck®, Almanya
Etanol	SZBC1160V, Sigma Aldrich®, ABD
Safeview nükleik asit boyası	G108, abm®, Canada

2.4. Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması

Melamin ve metabolitleri olan siyanürik asit ile ürik asit bileşiklerinin sulu çözeltilerinin hazırlanması için 50 mM'lık tris tampon çözeltisi (Xie ve ark. 2015), agaroz jel elektroforez tekniğinin uygulanmasında ise 1x tris-borik asit-EDTA tampon çözeltisi kullanıldı (Devrim ve ark. 2007).

2.4.1. Tris Tampon Çözeltisi (TBS)

Tris, hidroklorik asit ve sodyum klorür karışımından oluşan TBS tampon çözeltisi 50 mM'lık konsantrasyonda hazırlandı. 6.05 g tris, 8.76 g sodyum klorür hassas terazi (Radwaq PS 510-R1) ile tartılıp, 120 °C'de 20 dakika boyunca otoklav cihazı (Nüve steamArt OT-40L) ile sterilize edilen 800 ml ultra saf suda manyetik karıştırıcı kullanılarak (Isotex SH-4) çözdürüldü. Üzerine pH: 7.4 olana kadar 1 M'lık hidroklorik

asit çözeltisi eklendi ve total hacim 1000 ml'ye sterilize ultra saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti koyu renkli şişelerde ve oda ısısında saklandı.

2.4.2. Melamin, Siyanürik Asit ve Ürik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması

Melamin, siyanürik asit ve ürik asit bileşiklerinin, TBS tampon çözelti içerisindeki çözünme durumları değerlendirilerek her bir bileşiğin optimum çözünürlükteki konsantrasyonları tercih edildi. Bu kapsamda melamin 10, 5, 2.5, 1.25 ve 0.62 mM, siyanürik asit 15, 7.5, 3.75, 1.86 ve 0.94 mM, ürik asit ise 1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.062 mM'a denk gelecek şekilde çözelti haline getirildi ve koyu renkli şişeler içerisinde saklandı.

2.4.3. Tris-Borik Asit-EDTA Tampon Çözeltisi (TBE)

Agaroz jel elektroforez tekniğinde kullanılmak üzere, 10x stok TBE tampon çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla 108 g tris, 55 g borik asit ve 9.3 g EDTA hassas terazi (Radwaq PS 510-R1) ile tartıldı ve 800 ml sterilize ultra saf su ile balon joje içerisinde çözdürüldü. Çözdürme işlemi bittiğinde sterilize ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlanan stok çözelti, oda ısısında ve ışık almayan dolapta saklandı. Yapılacak olan elektroforez çalışmalarında stok çözelti, ultra saf su ile dilüe edilerek 1x konsantrasyonda kullanıldı. 100 ml 10x'lik stok TBE ve 900 ml ultra saf suyun karıştırılması ile hazırlanan 1x TBS tampon çözeltisi agarozun çözdürülmesinde ve elektroforez tankı içerisinde iletkenliği sağlamak amacıyla kullanıldı.

2.5. Sığır Timus Dokusu DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (A1120, Promega, ABD) kullanıldı.

Kit protokolünün uygulanmasında kullanılan sarflar;

- Hücre lizis solüsyonu (A1120, Promega, ABD)
- DNA rehidrasyon solüsyonu (A1120, Promega, ABD)
- Çekirdek lizis solüsyonu (A1120, Promega, ABD)
- Protein çöktürme solüsyonu (A1120, Promega, ABD)
- RNaz solüsyonu (A1120, Promega, ABD)
- 2-propanol (K29459195, Merck®, Almanya)
- % 70'lik etanol (SZBC1160V, Sigma Aldrich®, ABD)

Timus dokusundan DNA izolasyon işlemi, kit protokolüne göre yapıldı ve sırasıyla aşağıdaki adımlar izlendi.

- 1- 20 mg sığır timus dokusu tartılıp, 3 ml'lik steril tüplere alındı ve üzerine +4 °C'deki çekirdek lizis solüsyonundan 600 µl eklenerek 20 saniye kadar homojenizatör (Stuart Homogeniser-SHM1) ile homojenize edildi.
- 2- Homojen hâle getirilen doku ve çekirdek lizis solüsyon karışımı 1.5 ml'lik steril eppendorf tüp içerisine alındı ve üzerine 3 µl RNaz solüsyonundan eklendi. Ardından 37 °C'de 30 dakika boyunca blok inkübatörde (Benchmark BSH1001-E) inkübasyona bırakıldı.
- 3- İnkübasyon bitiminde 5 dakika kadar oda ısısında bekletildikten sonra üzerine 200 µl protein çöktürme solüsyonu eklendi. Tüp içeriği vorteks cihazı (Velp Scientifico-ZX3) ile 30 saniye karıştırıldı ve sonrasında 5 dakika buz içerisinde bekletildi.
- 4- 15000 xg'de 4 dakika boyunca santrifüj işlemi (ISOLAB Laborgerate, 603.02.001) uygulandı.

- 5- Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant başka bir eppendorf tüpe alındı. Üzerine oda ısısında olan 2-propanol'den 600 µl eklendi ve yavaşça alt-üst yaparak karıştırıldı.
- 6- 15000 xg'de 1 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulandı.
- 7- Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve eppendorf tüpün dip kısmında kalan tortunun üzerine oda ısısındaki % 70'lik etanol'den 600 µl eklendi.
- 8- 15000 xg'de 1 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulandı.
- 9- Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Eppendorf tüpün dip kısmında kalan ve DNA içeren beyaz tortu kalan etanolün uçması için hava ile kurumaya bırakıldı.
- 10- Beyaz tortu kuruduktan sonra üzerine DNA rehidrasyon solüsyonundan 100 µl eklendi ve etüve (Mettler UN-110) alınarak 65 °C'de 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresince belli aralıklar ile eppendorf tüpler yavaşça karıştırıldı ve sonunda DNA izolasyonu tamamlandı.

2.6. *Staphylococcus aureus* Bakteri Kültürü DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için literatürde daha önce belirtilmiş protokol kullanıldı (Sudağdan ve ark. 2008).

Protokolün uygulanmasında kullanılan sarflar;

- Trytic soy broth (CM0129, Oxoid®, İngiltere)
- Proteinaz-K (P2308, Sigma Aldrich®, ABD)
- Sodyum dodesil sülfat (S36628, Merck®, Almanya)
- Fenol-kloroform-izoamil Alkol karışımı (P3803, Sigma Aldrich®, ABD)
- 100x tris-EDTA çözeltisi (T9285, Sigma Aldrich®, ABD)
- Lizozim (A3711, AppliChem®, İspanya)
- Lizostafin (L-7386, Sigma Aldrich®, ABD)
- 5 M'lik Sodyum klorür çözeltisi (17D204105, Vwr Chemicals®, Belçika)
- 2-propanol (K29459195, Merck®, Almanya)
- % 70'lik etanol (SZBC1160V, Sigma Aldrich®, ABD)

Staphylococcus aureus bakterisi kùltürü DNA izolasyon işleminin için sırasıyla aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

- 1- DNA izolasyonu yapılacak olan *Staphylococcus aureus* bakterisinin, 5 ml Tryptic soy broth (TSB) içerisinde 37 °C'de 1 gece 200 rpm'de çalkalama (WiseShake-SHO SP-110) suretiyle bekletilerek büyümesi sağlandı.
- 2- Bakteri kùltüründen 1 ml alınıp 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj (ISOLAB Laborgerate GmbH model :603.02.001) edildi.
- 3- Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı.
- 4- Pelet üzerine 500 µl 1x tris-EDTA (TE) eklenerek çözdürüldü. Üzerine 1 mg/l lizozim ile 3.4 mg/l lizostafin, bakteri hücre duvarının parçalanması amacıyla katıldı.
- 5- 37 °C'de 3 saat boyunca etüvde (Memmert UN-110) inkübe edildi.
- 6- Üzerine 10 µl proteinaz-K (20 mg/ml) ve 250 µl % 10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) eklendi.
- 7- 56 °C'de 2 saat boyunca etüvde (Memmert UN-110) inkübe edildi.
- 8- Eppendorf tüpteki toplam hacim kadar, fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı (Karışım oranı 25:24:1) eklendi ve eppendorf tüp alt-üst yaparak yavaşça karıştırıldı.
- 9- 14000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 10- Santrifüjden sonra üst faz yeni bir eppendorf tüp içerisine alınarak üzerine 150 µl 5 M'lik sodyum klorür ve eppendorf tüpteki toplam hacim kadar 2-propanol eklendi.
- 11- 14000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 12- Üstte kalan süpernatant atıldı.
- 13- 750 µl % 70'lik etanol eklendi ve 10 saniye boyunca vorteks yapıldı.
- 14- 14000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 15- Üstte kalan süpernatant atıldı.
- 16- 750 µl % 70'lik etanol eklendi ve 10 saniye boyunca vorteks yapıldı.
- 17- 14000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 18- Üstte kalan süpernatant atıldı.
- 19- Pelet 50 °C'de 30 dakika boyunca blok inkübatörde (Benchmark BSH1001-E) kurutuldu.
- 20- Tamamen kurumuş olan pelet, 100 µl ultra saf su ile çözdürüldü ve DNA izolasyonu tamamlandı.

Wizard[®] genomik DNA purification kit ile elde edilen sığır timus ve Sudağıdan ve ark. (2008) çalışması referans alınarak elde edilen *S. aureus* DNA'larının saflık ve konsantrasyon tayinleri Thermo Scientific Multiskan GO spektrofotometre (Şekil 2.1) cihazı ile gerçekleştirildi. Ölçümler 3'er µl DNA kullanılarak nanodrop plate ile yapıldı ve numunelerin 260/280 absorbans değerleri ile konsantrasyonları (ng/µl) belirlendi. İlgili veriler sağlandıktan sonra stok DNA'lar -80 °C'de saklandı.



Şekil 2.1. Nanodrop plate ile DNA saflıklarının ve konsantrasyonlarının ölçümü.

2.7. UV-absorbans Spektrofotometri Tekniği

Moleküllerin DNA ile olan etkileşimlerinin incelendiği tekniklerden biri olan UV-absorbans spektrofotometri tekniğinin gerçekleştirilmesi için *BioTek Epoch-2* UV-absorbans spektrofotometre cihazı kullanıldı. Nanodrop plate ile yapılan ölçümlerde nükleaz bulundurmayan su ile cihazın kalibrasyonu yapıldıktan sonra çalışmamız

kapsamında kullanılan ökaryotik ve prokaryotik DNA'lar ile farklı konsantrasyonları hazırlanan melamin ve metabolitlerinin tek başlarına ölçümleri yapıldı. Söz konusu moleküller arasındaki etkileşiminin belirlenmesi için hem sığır timus hem de *S. aureus* bakteri DNA'ları ile kombinasyonları yapılan melamin ve metabolitleri 0.2 ml'lik steril eppendorf tüp içerisinde 1:1 oranında karıştırıldı ve 37 °C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi. Sonrasında DNA+melamin/metaboliti kombinasyonlarının absorban ölçümü yapılarak ilgili grafikler elde edildi.

2.8. Floresans Spektrofotometri Tekniği

Bölüm 2.4.1'de anlatılan TBS tampon çözeltisi (50 mM ph: 7.4) içerisinde hazırlanan melamin, siyanürik asit ve ürik asit çözeltilerinin DNA ile olan etkileşimleri ile oluşan floresans şiddeti değişimlerinin izlenmesi için floresans spektrofotometre cihazı (*Berthold Mithras² LB-943*) ve cihaz uyumlu plate'ler (*Thermo-237105*) kullanıldı. Yapılan ön çalışmada, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan melamin ve metabolitleri ile genomik DNA'ların tek başına düşük floresans verdiği görüldü. Çalışmamız kapsamında floresans spektrumlarının belirgin hale getirilmesi için floresans özelliği olan *Safeview (G108, abm[®], Canada)* DNA boyası tercih edildi. Kullanılan DNA boya konsantrasyonunun optimize edilmesi için farklı dilüsyonlar (1-1/10 aralığında) hazırlanarak floresans ölçümler gerçekleştirildi ve en ideal floresans yoğunluğunun 1/4'lik dilüsyonda olduğu belirlendi. Her iki DNA türü için de DNA+melamin/metaboliti kombinasyonları hazırlandı ve 37 °C'de 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde örnekler 10'ar µl boya ile boyanarak floresans okumaları gerçekleştirildi. Ölçüm için eksitasyon değeri (λ_{ex}) 485 nm, dalga boyu aralığı (λ_{range}) 500-600 nm olarak ayarlandı. Elde edilen veriler ile floresans şiddetindeki değişimi ifade eden grafikler oluşturuldu.

2.9. Agaroz Jel Elektrofrez Tekniği

Agaroz jel elektrofrez çalışmamızda, *Cleaver Scientific nanoPAC-300* agaroz jel elektrofrez düzeneği kullanıldı. Uygulanan teknikte, elektrofrez koşullarından jel yoğunluğu, elektrik akımı ve koşturma süresi değerleri ön çalışmalar ile optimize edildi. Bu kapsamda, jel yoğunluğu % 1.5, elektrik akımı 100 Volt ve koşturma süresi de 1.5 saat olarak belirlendi.

2.9.1. Örneklerin Hazırlanması

Elektrofrez işlemleri için örneklerin hazırlanmasında, öncelikle genomik DNA'lar ile melamin, siyanürik asit ve ürik asidin farklı konsantrasyonları 0.2 ml'lik steril eppendorf tüp içerisinde 1:1 oranında bir araya getirildi. Bu amaç ile 7 µl DNA ve 7 µl melamin/metaboliti tüp içerisinde pipetlenerek karıştırdı. Oluşturulan karışım, 37 °C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi.

2.9.2. Agaroz Jelin Hazırlanması

Jelin hazırlanması için ticari olarak satın alınan agaroz (Pronadisa, Spain) kullanıldı. 1.5 g agaroz tartılıp 100 ml 1x TBE tampon solüsyonu (bölüm 2.4.2.) ile erlen mayer içerisinde karıştırdıktan sonra 2 dakika süreyle mikrodalga fırında (Vestel MD-20MB) yüksek ısı uygulanarak çözdürüldü. Tamamen homojen olan ve berrak bir görünüm alan

jelin sıcaklığının, 40 °C'ye gelmesi için erlen mayer musluk altında çalkalandı ve jelin soğuması sağlandı. Uygun sıcaklığa gelen jel, katılaşması için jel tepsisine döküldü ve taraklar uygun konumda takıldıktan sonra 30 dakika oda ısısında bekletildi. Jel hazır olduğunda taraklar çıkarılarak jel tepsi ile birlikte elektroforez tankına (*Cleaver Scientific nanoPAC-300*) yerleştirildi.

2.9.3. Örneklerin Yüklenmesi

Elektroforezi yapılacak olan örneklerin inkübasyon işlemleri sonucunda DNA+melamin/metaboliti kombinasyonları (14 µl), 2 µl DNA yükleme boyası ve 2 µl Ez-vision boya ile karıştırıldıktan sonra jel kuyucuklarına yüklendi.

2.9.4. Elektroforez İşlemi ve DNA Bantlarının Görüntülenmesi

Yükleme işleminin ardından gerçekleştirilen elektroforez işlemleri, 100 V'da 1.5 saat süreyle uygulandı. Süre sonunda jellerde oluşan bantlaşmayı görüntülemek için UV-translümünatör (WiseUV WUV-L2O) kullanıldı. Jel fotoğrafları *Gel Doc™ EZ Imager* görüntüleme sistemi ile kaydedilerek DNA bantlarının yoğunlukları *Biorad image lab 6.0* programı ile değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. DNA İzolasyonu

Çalışma kapsamında izole edilen ökaryotik ve prokaryotik genomik DNA'ların konsantrasyon verileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

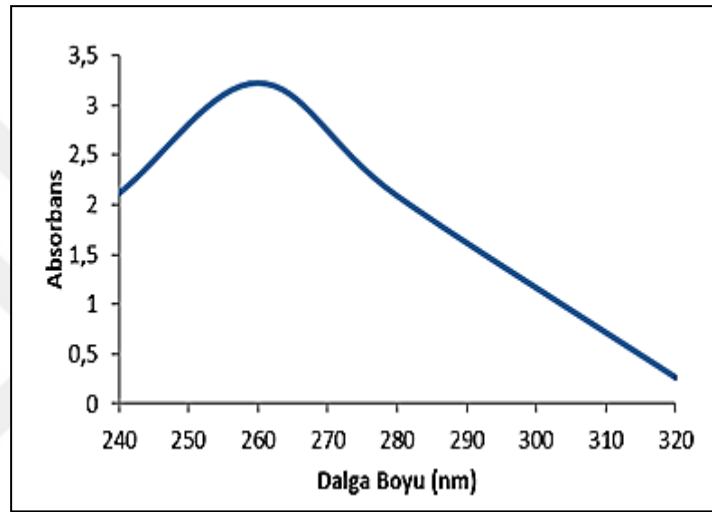
Çizelge 3.1. Sığır timus dokusundan ve *S. aureus* bakteri kültüründen izole edilen genomik DNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri.

DNA	Ölçülen DNA Konsantrasyonu (ng/µl)	260/280
Sığır timus DNA'sı	2800.08	1.80
<i>Staphylococcus aureus</i> DNA'sı	430.73	2.00

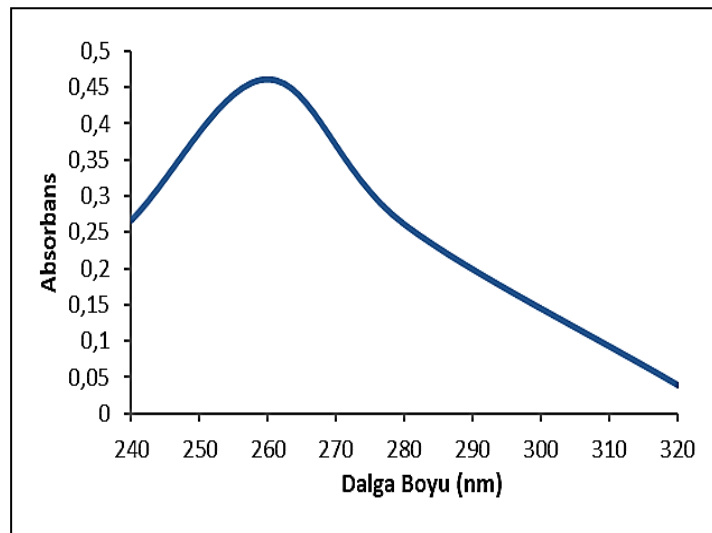
DNA konsantrasyon ve saflık tayinlerinde 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülmekte ve iki dalga boyu absorbans değer oranının 1.8-2 arasında olması tercih edilmektedir. Yapılan DNA izolasyon işlemleri sonunda elde edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyon değerlerinin UV-absorbans spektrofotometri, floresans spektrofotometri ve agaroz jel elektroforezi tekniklerinin gerçekleştirilmesi için uygun olduğu görüldü. Uygulanan tekniklerde ökaryotik ve prokaryotik genomik DNA'ların konsantrasyonları birbirine denk gelecek şekilde ayarlandı.

3.2.UV-absorbans Spektrofotometri Bulguları

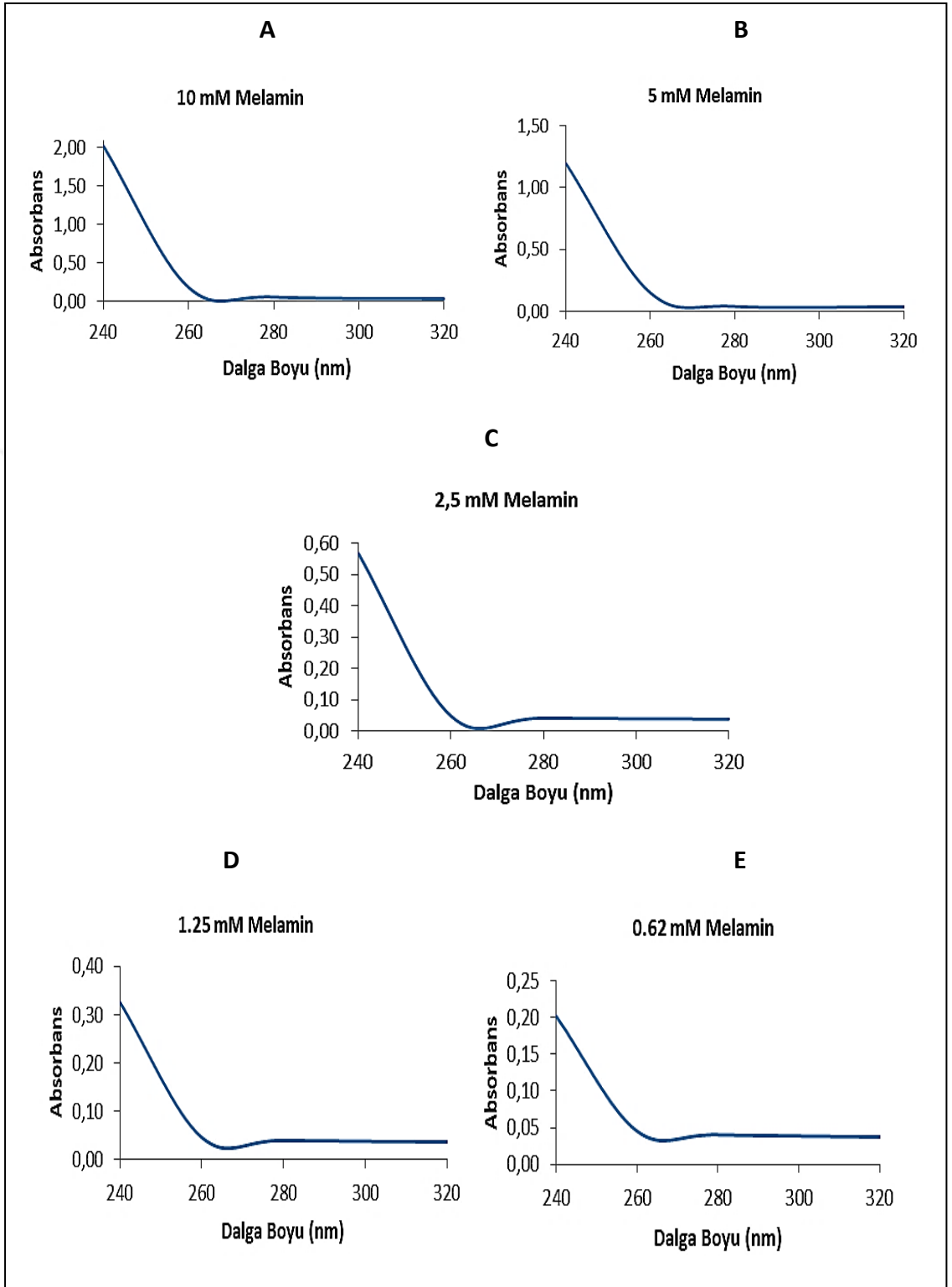
Çalışmada kullanılan sığır timus ve *S. aureus* bakteri DNA'ları ile melamin, siyanürik asit ve ürik asit çözeltilerinin 37 °C'de 60 dakika boyunca gerçekleştirilen inkübasyonları sonunda absorbans ölçümleri *BioTek Epoch-2* spektrofotometre cihazı ile ayrı ayrı yapıldı. Elde edilen verilere ait grafikler Şekil 3.1–3.5'te verildi.



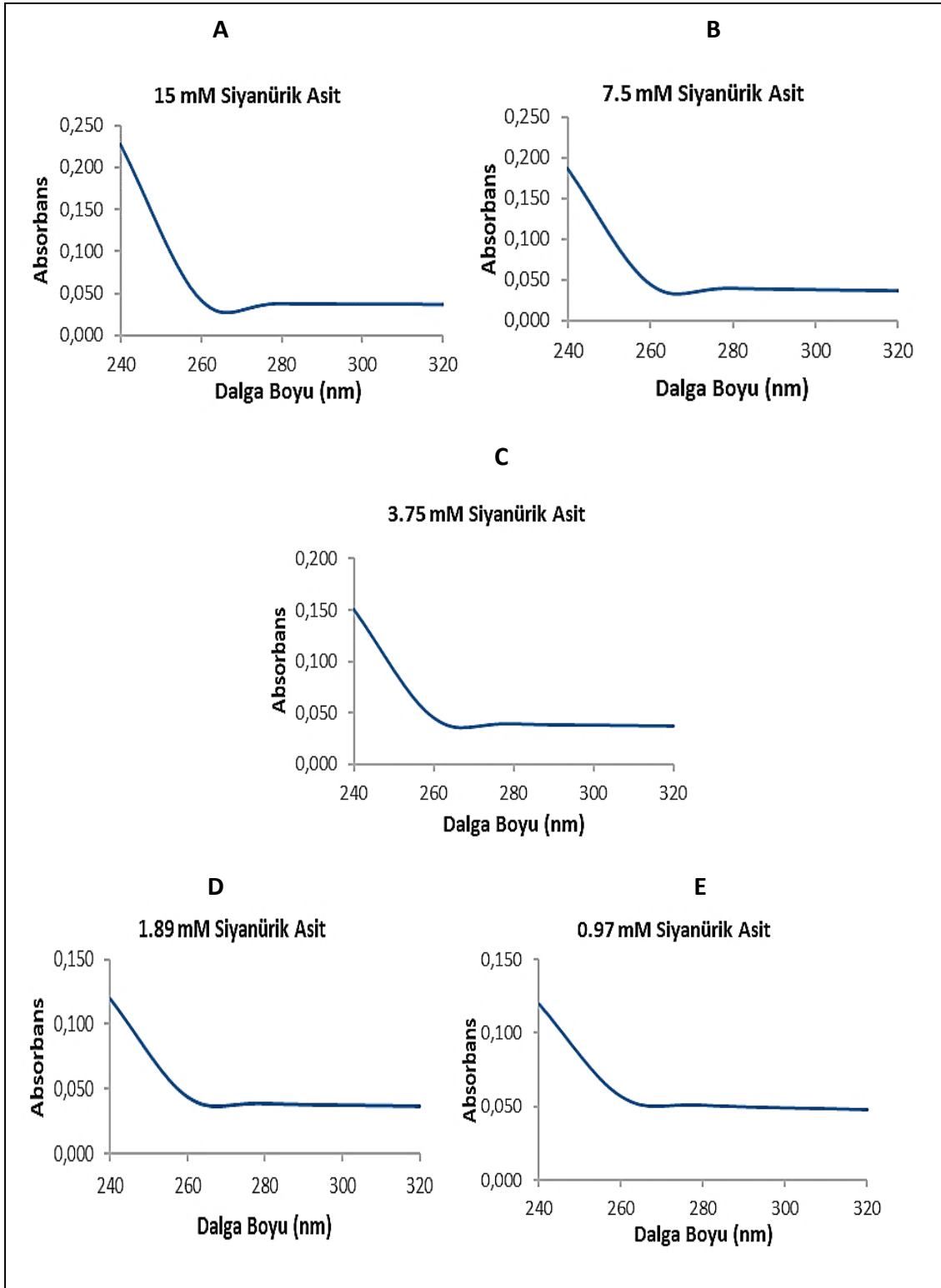
Şekil 3.1. Sığır timus DNA UV-absorbans grafiği.



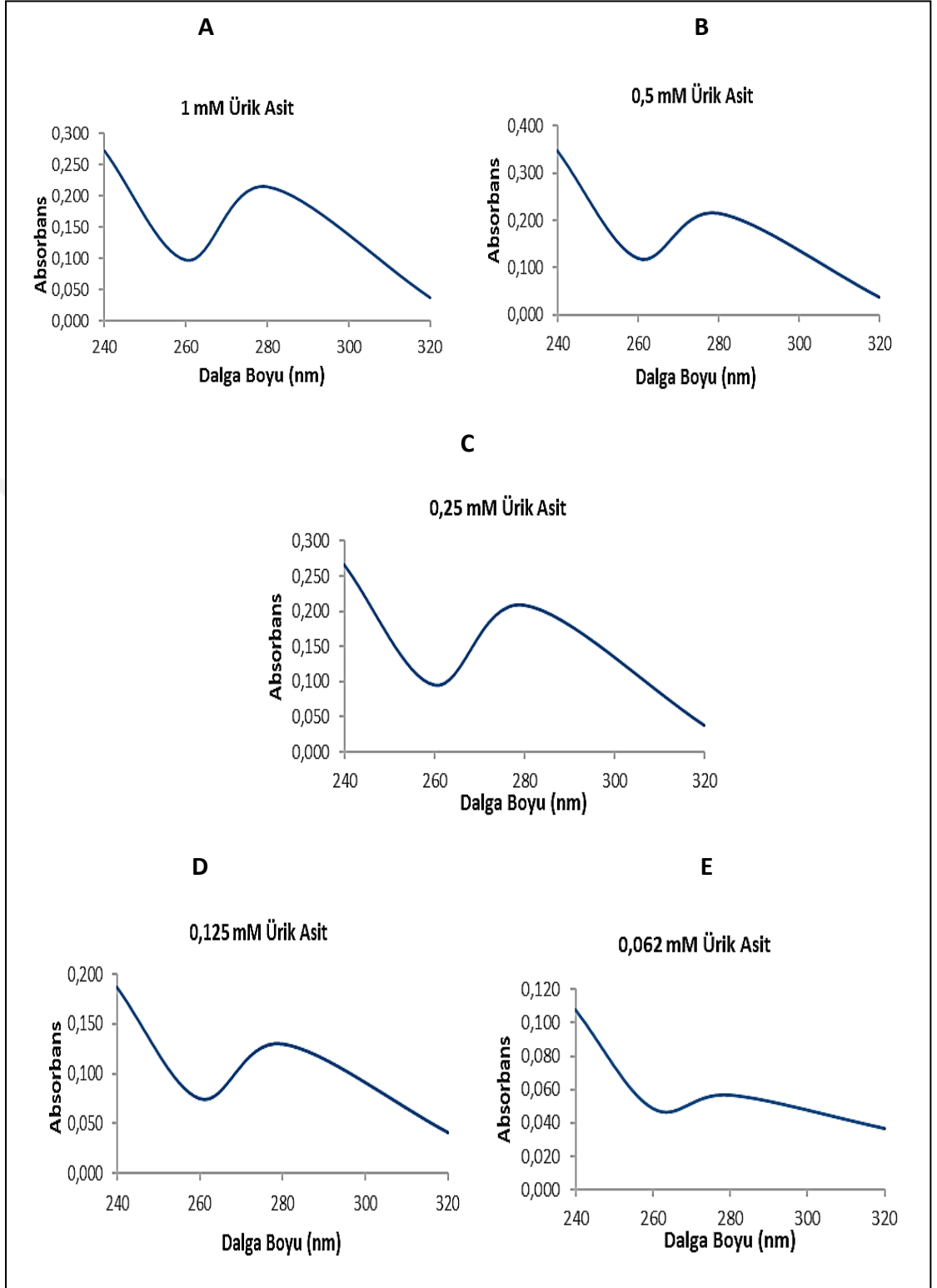
Şekil 3.2. *S. aureus* bakteri DNA UV-absorbans grafiği.



Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan melamin çözeltilerinin UV-absorbans grafikleri: ((A) 10 mM, (B) 5mM, (C) 2.5 mM, (D) 1.25 mM, (E) 0.62 mM).



Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan siyanürik asit çözeltilerinin UV-absorbans grafikleri: ((A) 15 mM, (B) 7.5 mM, (C) 3.75 mM, (D) 1.89 mM, (E) 0.97 mM).

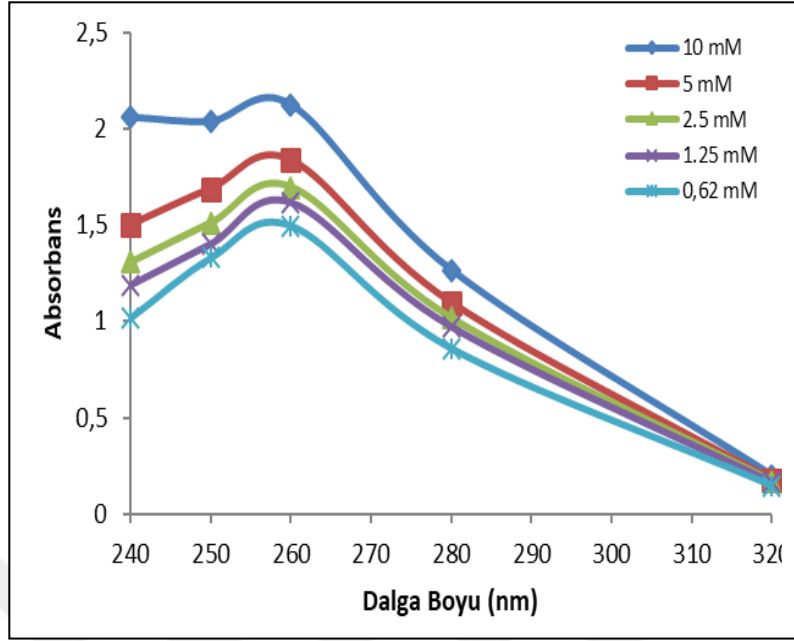


Şekil 3.5. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ürik asit çözeltilerinin UV-absorbans grafikleri: ((A) 1 mM, (B) 0.5 mM, (C) 0.25 mM, (D) 0.125 mM, (E) 0.062 mM).

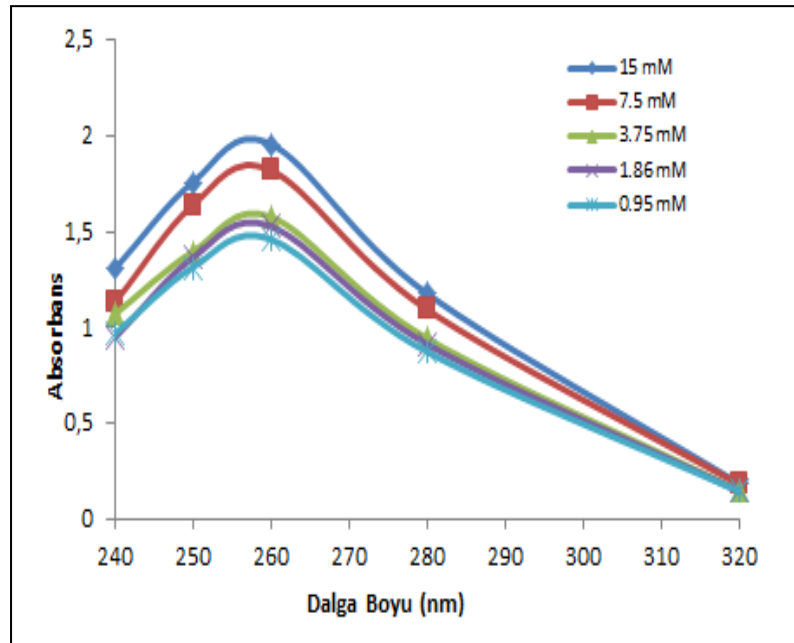
Tek başına ölçümü yapılan sığır timus dokusu ve *S. aureus* bakteri DNA'larının 260 nm dalga boyunda absorbands piki verdiği görüldü. Melamin, siyanürik asit ve ürik asit çözeltilerinin ayrı ayrı absorbands ölçümleri sonucunda elde edilen grafiklerde melamin ve siyanürik asidin birbiri ile benzer şekilde 240 nm dalga boyunda yüksek dalga piki verdiği, ürik asidin ise hem 240 hem de 280 nm dalga boylarında çift dalga piki yaptığı görüldü. DNA+melamin/metaboliti kombinasyonları ile yapılan analiz verileri Çizelge 3.2-3.3'te, elde edilen grafikler ise Şekil 3.6–3.11 arasında gösterildi.

Çizelge 3.2. Sığır timus DNA'sı ile melamin ve metabolitleri kombinasyonlarından elde edilen UV-absorbans değerleri.

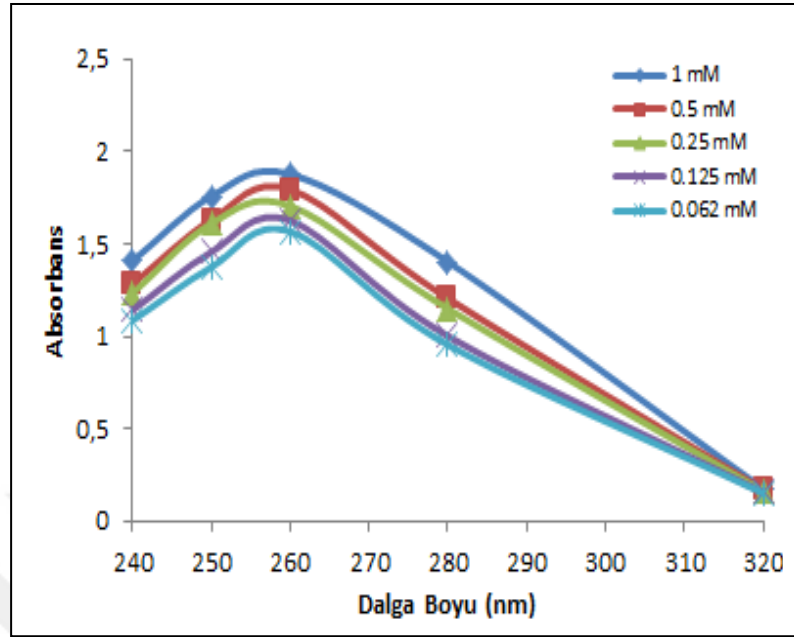
DNA+melamin/metaboliti	Dalga Boyu (nm)				
	240	250	260	280	320
DNA + 10 mM Melamin	2.057	2.036	2.121	1.264	0.198
DNA + 5 mM Melamin	1.501	1.688	1.834	1.095	0.177
DNA + 2.5 mM Melamin	1.306	1.511	1.695	1.016	0.169
DNA + 1.25 mM Melamin	1.190	1.403	1.616	0.973	0.167
DNA + 0.62 mM Melamin	1.017	1.329	1.495	0.859	0.147
DNA + 15 mM Siyanürik asit	1.304	1.757	1.956	1.177	0.186
DNA + 7.5 mM Siyanürik asit	1.127	1.637	1.819	1.094	0.181
DNA + 3.75 mM Siyanürik asit	1.068	1.395	1.576	0.943	0.149
DNA + 1.86 mM Siyanürik asit	0.945	1.363	1.527	0.913	0.146
DNA + 0.95 mM Siyanürik asit	0.966	1.313	1.459	0.873	0.145
DNA + 1 mM Ürik asit	1.407	1.758	1.877	1.403	0.174
DNA + 0.5 mM Ürik asit	1.282	1.631	1.795	1.205	0.168
DNA + 0.25 mM Ürik asit	1.232	1.611	1.706	1.149	0.160
DNA + 0.125 mM Ürik asit	1.140	1.456	1.626	1.001	0.154
DNA + 0.062 mM Ürik asit	1.085	1.374	1.567	0.953	0.150



Şekil 3.6. Sığır timus DNA'sı ve melamin karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.



Şekil 3.7. Sığır timus DNA'sı ve siyanürik asit karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

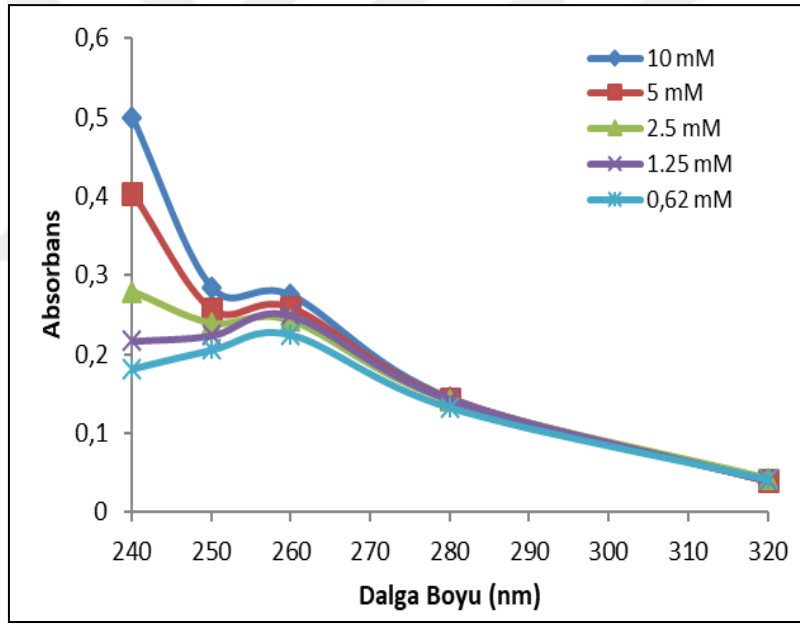


Şekil 3.8. Sığır timus DNA'sı ve ürik asit karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

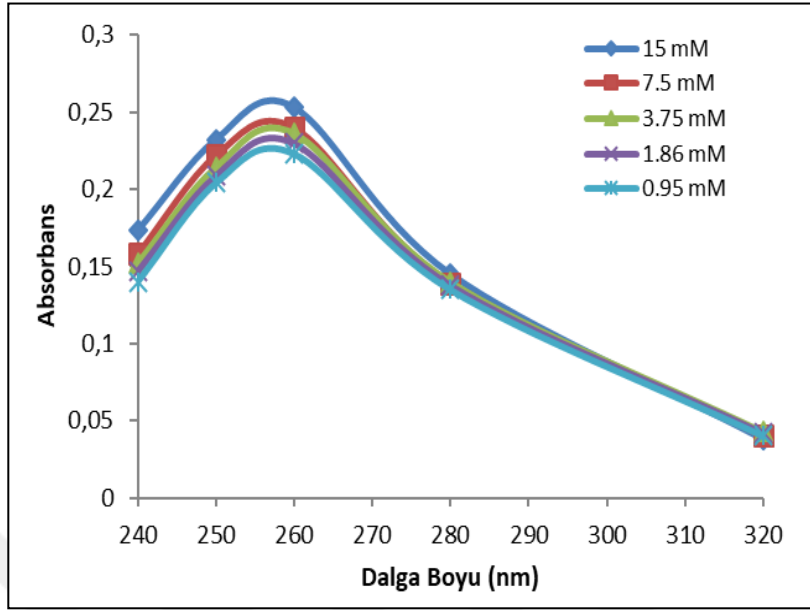
Çizelge 3.3. S. aureus DNA(dna konsantrasyon) ve melamin, siyanürik asit ve ürik asit kombinasyonlarından alınan UV-absorbans verileri.

DNA+melamin/metaboliti	Dalga Boyu (nm)				
	240	250	260	280	320
DNA + 10 mM Melamin	0.700	0.285	0.255	0.145	0.04
DNA + 5 mM Melamin	0.404	0.257	0.251	0.144	0.04
DNA + 2.5 mM Melamin	0.279	0.239	0.242	0.141	0.043
DNA + 1.25 mM Melamin	0.217	0.224	0.249	0.143	0.04
DNA + 0.62 mM Melamin	0.182	0.206	0.225	0.133	0.042
DNA + 15 mM Siyanürik asit	0.173	0.232	0.253	0.145	0.038
DNA + 7.5 mM Siyanürik asit	0.153	0.212	0.240	0.139	0.04

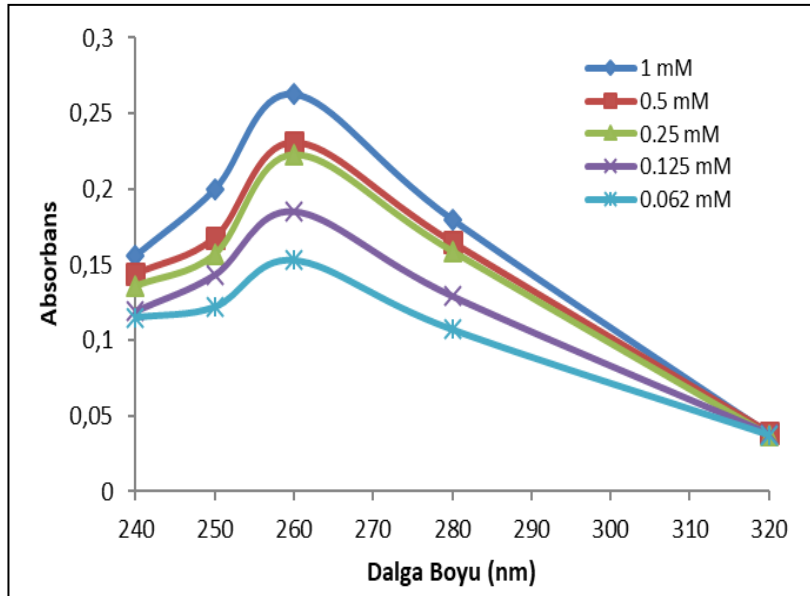
DNA + 3.75 mM Siyanürük asit	0.152	0.210	0.236	0.140	0.043
DNA + 1.86 mM Siyanürük asit	0.151	0.209	0.236	0.138	0.042
DNA + 0.95 mM Siyanürük asit	0.150	0.208	0.230	0.135	0.04
DNA + 1 mM Ürik asit	0.156	0.170	0.263	0.220	0.038
DNA + 0.5 mM Ürik asit	0.144	0.168	0.231	0.175	0.039
DNA + 0.25 mM Ürik asit	0.136	0.157	0.223	0.169	0.037
DNA + 0.125 mM Ürik asit	0.119	0.143	0.185	0.119	0.038
DNA + 0.062 mM Ürik asit	0.115	0.122	0.133	0.082	0.037



Şekil 3.9. *S. aureus* DNA'sı ve melamin karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.



Şekil 3.10. *S. aureus* DNA'sı ve siyanürik asit karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

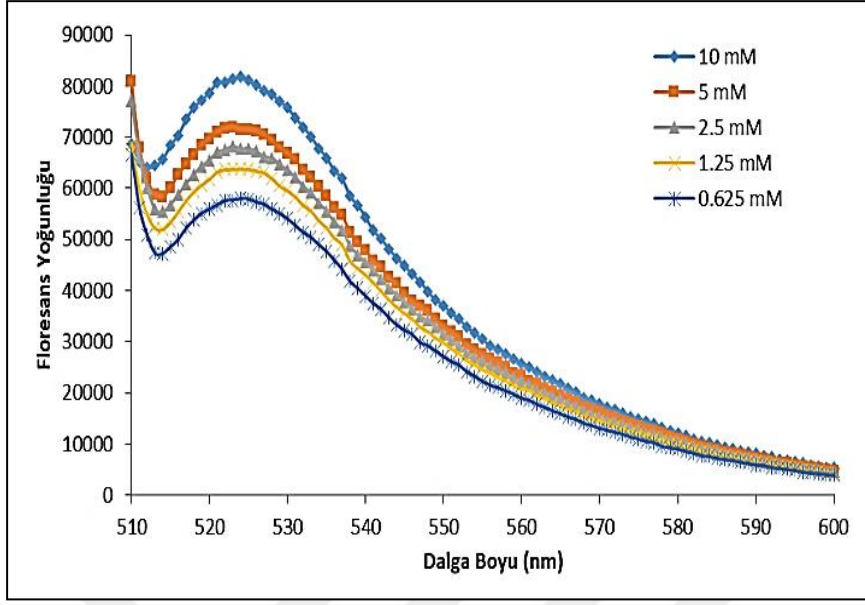


Şekil 3.11. *S. aureus* DNA'sı ve ürik asit karışımından elde edilen UV-absorbans grafiği.

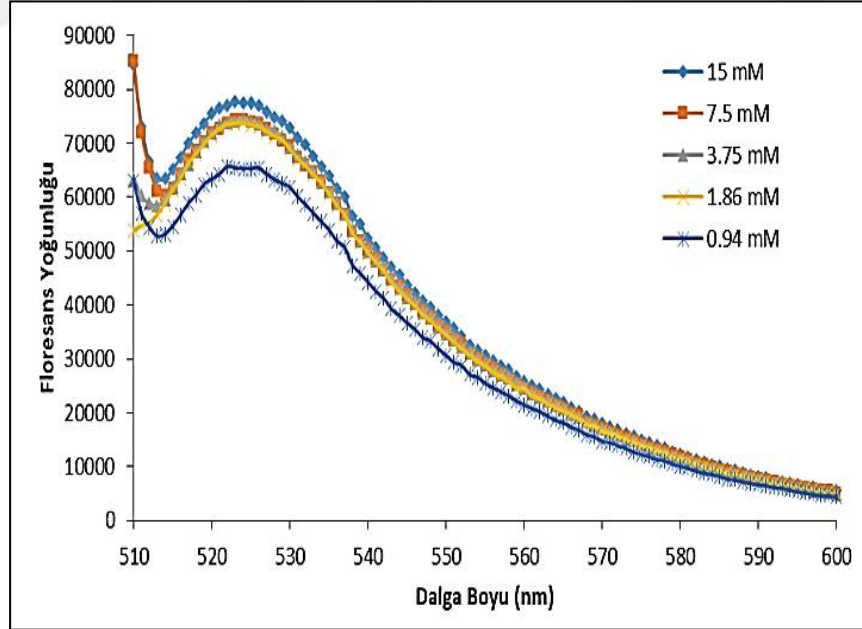
DNA+melamin/metaboliti kombinasyonları ile yapılan ölçümler sonunda elde edilen absorbans verileriyle oluşturulan grafiklerde, tek başına ölçüldüğünde DNA'dan farklı dalga boyunda pik veren melamin ve metabolitlerinin bu özelliğini sürdürmediği ve alınan dalga piklerinin 260 nm'de toplandığı görülmüştür. Hem sığır timus hem de *S. aureus* bakteri DNA'ları ile yapılan kombinasyonlardan alınan grafiklerin genel anlamda birbirini desteklediği tespit edildi. Her iki DNA türünde de paralel seyirler izleyen dalga piklerinin ökaryotik olan sığır timus DNA'sında daha yüksek olduğu belirlendi. Bu durumun analizde kullanılan ökaryotik DNA konsantrasyonunun daha fazla olmasından kaynaklı olabileceği ve ökaryotik ya da prokaryotik genomik DNA farkına bağlı olmadığı değerlendirildi. Metabolitler arasında bir değerlendirme yapıldığında ise melamin etkisinde alınan 260 nm dalga piklerinin diğerlerine göre daha yüksek olduğu görüldü. DNA'ya özgü 260 nm dalga piklerinin DNA+melamin karışımlarında daha yüksek düzeyde seyretmesinin; melaminin, siyanürik ve ürik aside göre DNA molekülüne bağlanma düzeyinin daha fazla olmasından kaynaklı olabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca elde edilen tüm grafiklerde, metabolitlerin artan konsantrasyonlarında dalga pikindeki artışı ifade eden hiperkromik etkinin de arttığı belirlendi.

3.3. Floresans Spektrofotometri Bulguları

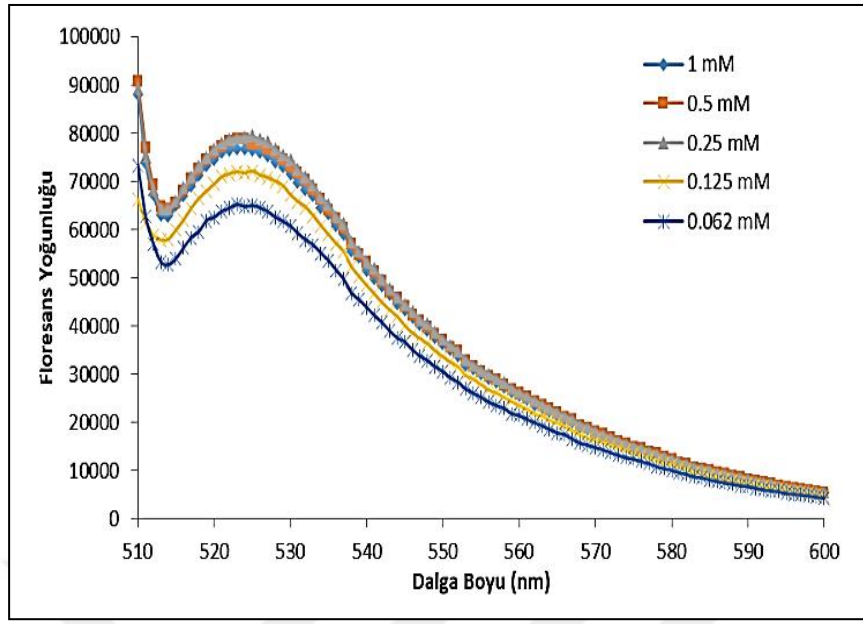
TBS tampon çözeltisi içinde hazırlanan melamin, siyanürik asit ve ürik asit çözeltilerinin DNA ile olan etkileşiminde floresans yoğunluğundaki değişimlerin izlenmesi için *Berthold Mithras² LB-943* floresans spektrofotometre cihazı kullanıldı. Hem sığır timus hem de *S. aureus* bakteri DNA'ları ile gerçekleştirilen ölçümler ile elde edilen grafikler Şekil 3.12-3.17 arasında verilmiştir.



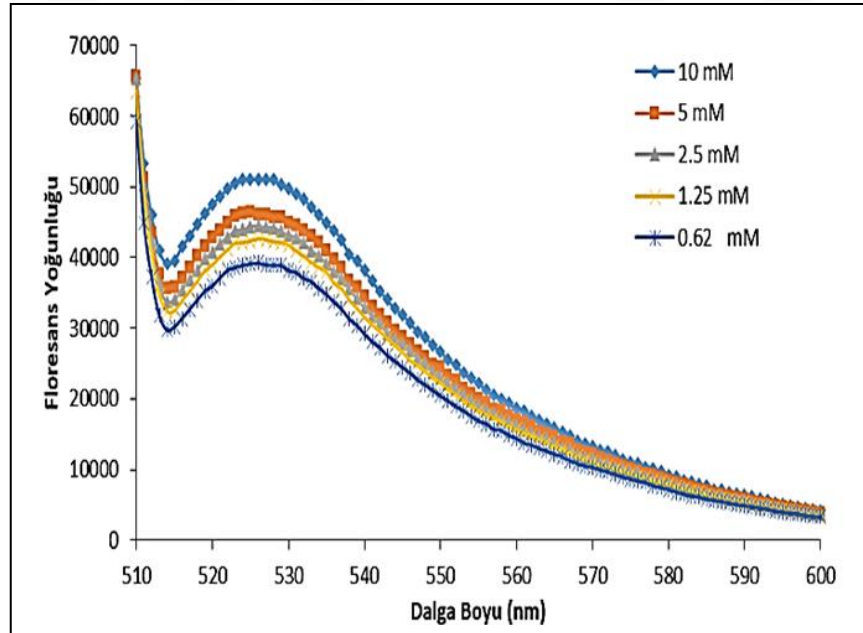
Şekil 3.12. Sığır timus DNA'sı ve melamin etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.



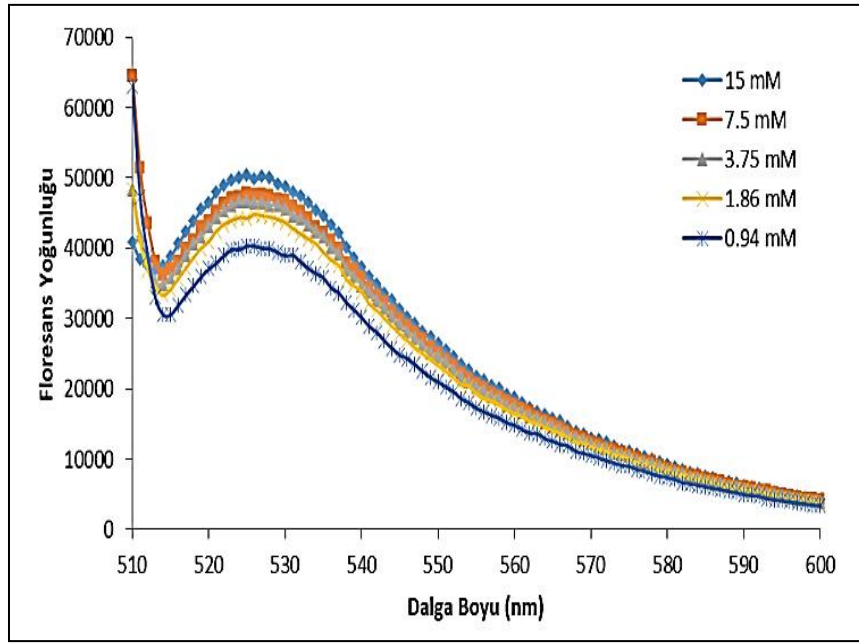
Şekil 3.13. Sığır timus DNA'sı ve siyanürik asit etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.



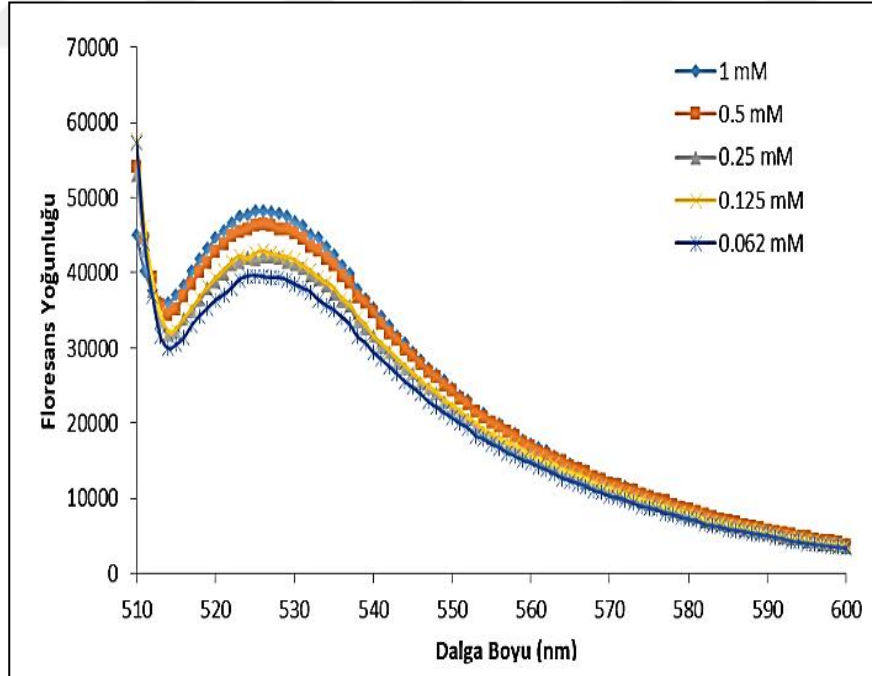
Şekil 3.14. Sığır timus DNA'sı ve ürik asit etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.



Şekil 3.15. *S. aureus* DNA'sı ve melamin etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.



Şekil 3.16. *S. aureus* DNA'sı ve siyanürik asit etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.



Şekil 3.17. *S. aureus* DNA'sı ve ürik asit etkileşiminden elde edilen floresans spektrofotometri grafiği.

Çalışmamız kapsamında uygulanan floresans spektrofotometri tekniği ile melamin ve metabolitlerinin DNA'ya bağlanma şekli değerlendirildiğinde, hem sığır timus hem de *S. aureus* bakteri DNA'ları ile farklı konsantrasyonlardaki melamin ve metabolitlerinin floresans ölçümünde elde edilen grafiklerin birbiri ile benzerlik gösterdiği görüldü. DNA türleri arasından sığır timus DNA ile yapılan kombinasyonların, *S. aureus* bakteri DNA'sı ile yapılanlara göre daha yüksek floresans etki yaptığı anlaşılmıştır. Sabit DNA ve boya konsantrasyonuna karşı farklı konsantrasyonlardaki melamin ve metabolitlerinin artan konsantrasyonlarının floresans şiddetinde artışa sebep olduğu görüldü. Hiperkromik etki olarak adlandırılan, dalga boyu artışının görülmesi UV-absorbans spektrofotometri sonuçlarımızla uyum göstermekte ve birbirini desteklemektedir.

3.4. Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları

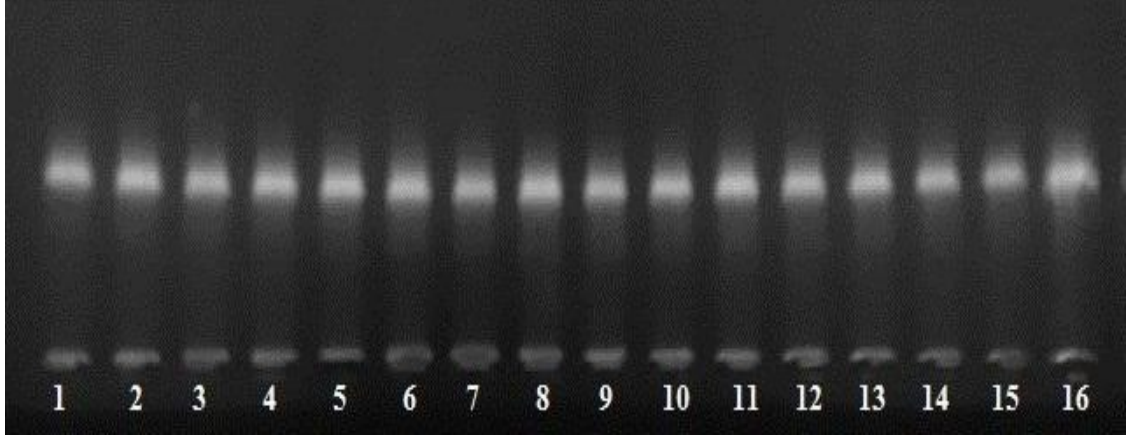
Yapılan ön çalışma ile kullanılacak olan ökaryotik ve prokaryotik genomik DNA'ların bant bütünlüğünün kontrolü yapıldığında beklenen DNA bantlarının oluşmadığı ve kuyucuk dışında olması beklenen bant parlaklığının kuyu içerisinde olduğu görüldü. Bu durum, DNA'nın konsantrasyonunun yoğun olması ve DNA fragmentlerinin büyüklüğünden dolayı jel porlarından geçemediğini düşündürdü. DNA konsantrasyonunun azaltılması amacıyla nükleaz free su ile yapılan farklı dilüsyon miktarları aynı koşullarda jele yüklenerek, uygun DNA bandını veren konsantrasyon belirlendi. DNA+melamin/metaboliti etkileşimini en iyi seviyede gösterebilecek ökaryotik ve prokaryotik DNA bantlarının elde edilmesi için yapılan optimizasyon denemelerinde, en iyi DNA bantlaşmasının sığır timus DNA'sı için 30x, *S. aureus* DNA'sı için ise 3x dilüsyonda (Çizelge 3.4.) olduğu belirlendi.

Çizelge 3.4. Agaroz jel elektroforezinde yüklenen genomik DNA konsantrasyonları

DNA Konsantrasyonları		
(ng/µl)		
	Stok DNA konsantrasyonu	Yüklenen DNA konsantrasyonu
Sığır timus DNA'sı	2800.08	(30x dilüe)
		160.74
<i>Staphylococcus aureus</i> DNA'sı	430.73	(3x dilüe)
		135.65

3.4.1. Sığır Timus DNA'sı Kullanılarak Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları

Optimize edilen sığır timus DNA örnekleri ile beşer farklı konsantrasyonda hazırlanmış olan melamin, siyanürik asit ve ürik asit çözeltilerinin gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezi işlemi sonrasında elde edilen jelin görüntüsü ve bant etkileşimleri Şekil 3.18.'de, piksel ölçüm verileri ise Çizelge 3.5 ve Şekil 3.19'da gösterildi.

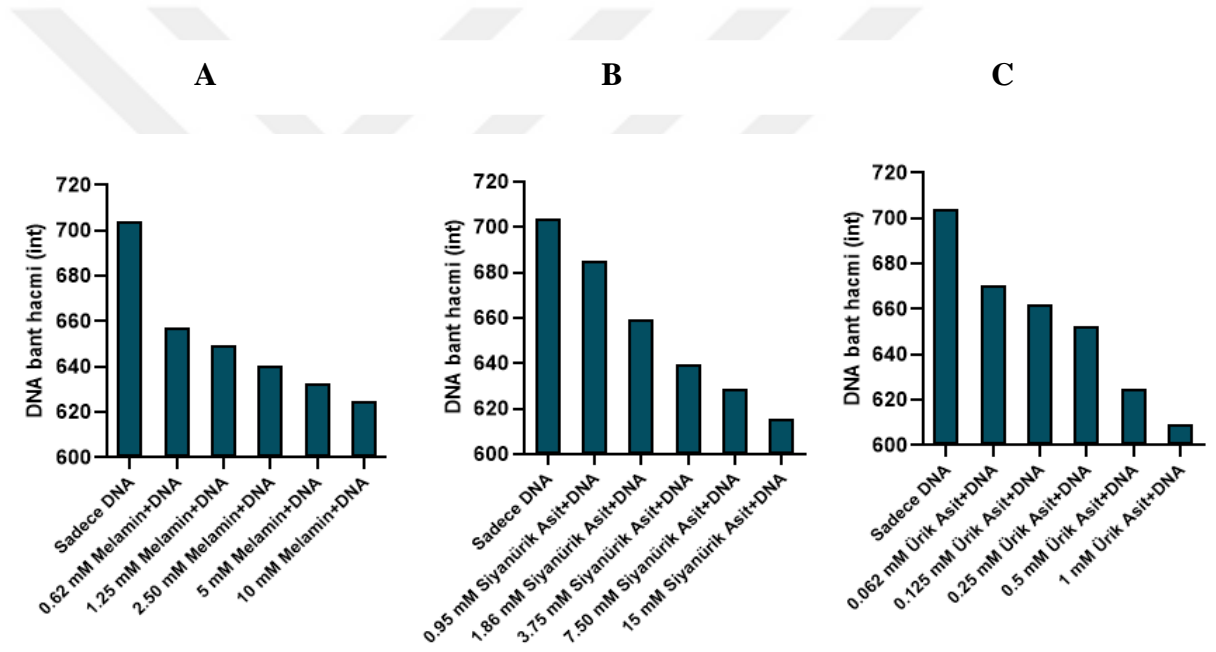


Şekil 3.18. Sığır timus DNA ile melamin, siyanürik asit ve ürik asit kombinasyonlarının agaroz jel görüntüsü. Bant numaraları, 1. DNA+0.62 mM melamin, 2. DNA+1.25 mM Melamin, 3. DNA+2.50 mM Melamin, 4. DNA+5.00 mM Melamin, 5. DNA+10 mM Melamin, 6. DNA+0.95 mM Siyanürik asit, 7. DNA+1.86 mM Siyanürik asit, 8. DNA+3.75 mM Siyanürik asit, 9. DNA+7.50 mM Siyanürik asit, 10. DNA+15 mM Siyanürik asit, 11. DNA+0.062 mM Ürik asit, 12. DNA+0.125 mM Ürik asit, 13. DNA+0.25 mM Ürik asit, 14. DNA+0.50 mM Ürik asit, 15. DNA+1 mM Ürik asit, 16. Sığır timus DNA)

Çizelge 3.5. Sığır timus DNA ile melamin, siyanürik asit ve ürik asit karışımlarından elde edilen jel görüntüsü piksel ölçüm değerleri.

	DNA bant hacim miktarı (integer)	Ortalama piksel yoğunluğu (integer)	Alan (mm ²)	
1	0.62 mM DNA + melamin	657.382	162.6	507.9
2	1.25 mM DNA + melamin	649.452	159.1	507.9
3	2.50 mM DNA + melamin	640.297	158.8	506.1
4	5.00 mM DNA + melamin	632.599	155.0	507.8
5	10 mM DNA + melamin	624.729	153.1	507.9
6	0.95 mM DNA + siyanürik asit	685.224	165.9	509.1
7	1.86 mM DNA + siyanürik asit	659.309	157.2	506.1
8	3.75 mM DNA + siyanürik asit	639.364	154.7	509.6
9	7.50 mM DNA + siyanürik asit	628.879	154.4	507.8
10	15 mM DNA + siyanürik asit	615.407	151.2	506.5

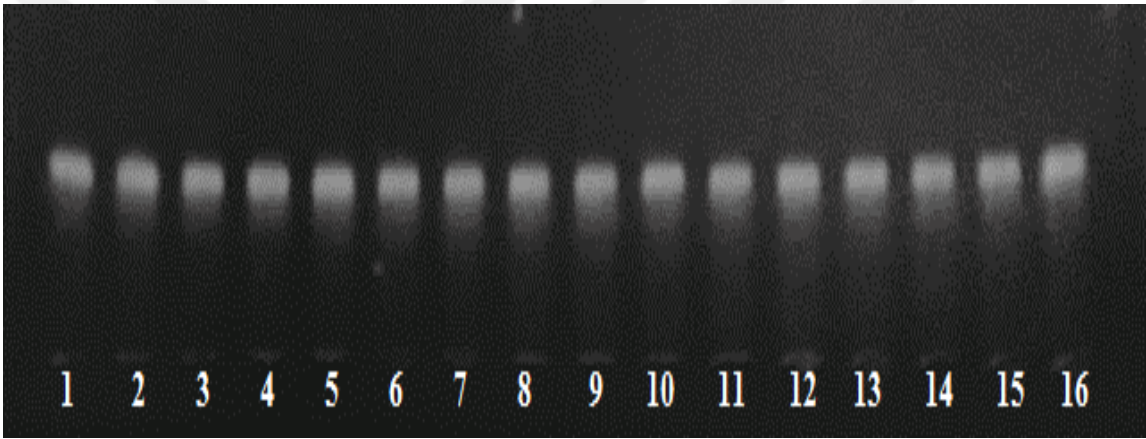
11	0.062 mM DNA + ürik asit	670.541	164.3	507.8
12	0.125 mM DNA + ürik asit	662.153	163.5	506.0
13	0.25 mM DNA + ürik asit	652.726	161.2	506.8
14	0.50 mM DNA + ürik asit	624.714	154.3	506.1
15	1 mM DNA + ürik asit	609.478	151.3	506.3
16	DNA	704.081	173.1	506.1



Şekil 3.19. Sığır timus DNA+melamin/metaboliti kombinasyonlarının DNA bant hacmi değerleri ((A) Melamin, (B) Siyanürük asit, (C) Ürik asit).

3.4.2. *Staphylococcus aureus* DNA'sı Kullanılarak Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları

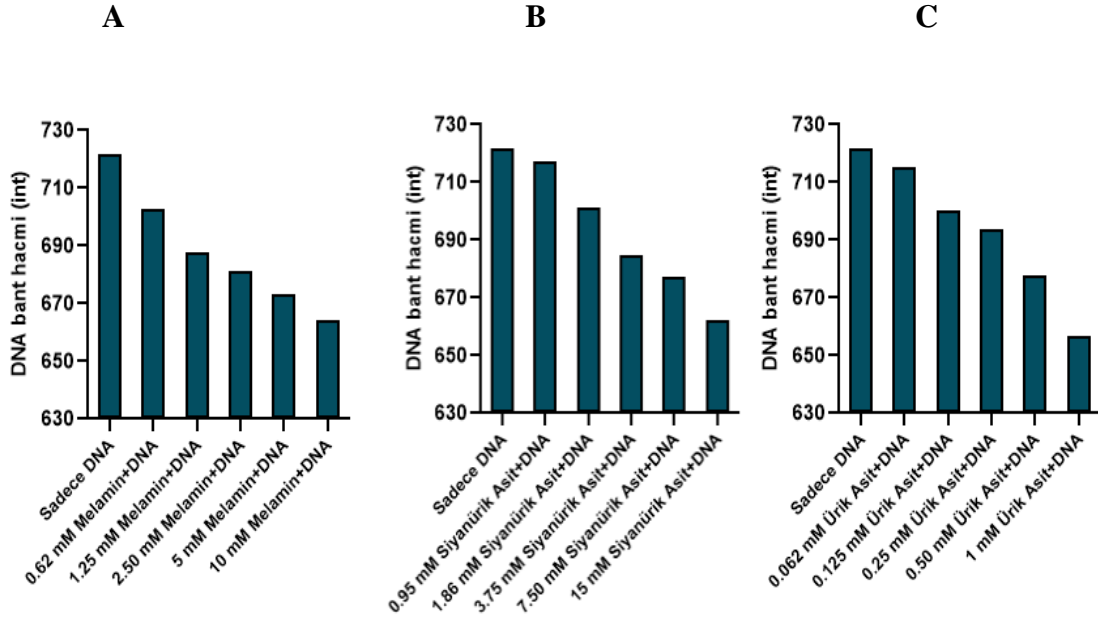
S. aureus DNA örnekleri ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış melamin, siyanürik asit ve ürik asit çözeltilerinin gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezi işlemi sonrasında elde edilen jel görüntüsü Şekil 3.20'de, piksel ölçüm verileri ise Çizelge 3.6 ve Şekil 3.21'de gösterildi.



Şekil 3.20. *S. aureus* DNA ile melamin, siyanürik asit ve ürik asit kombinasyonlarının agaroz jel görüntüsü. Bant numaraları, 1. DNA+0.62 mM melamin, 2. DNA+1.25 mM Melamin, 3. DNA+2.50 mM Melamin, 4. DNA+5.00 mM Melamin, 5. DNA+10 mM Melamin, 6. DNA+0.95 mM Siyanürik asit, 7. DNA+1.86 mM Siyanürik asit, 8. DNA+3.75 mM Siyanürik asit, 9. DNA+7.50 mM Siyanürik asit, 10. DNA+15 mM Siyanürik asit, 11. DNA+0.062 mM Ürik asit, 12. DNA+0.125 mM Ürik asit, 13. DNA+0.25 mM Ürik asit, 14. DNA+0.50 mM Ürik asit, 15. DNA+1 mM Ürik asit, 16. *S. aureus* DNA)

Çizelge 3.6. *S. aureus* bakterisi DNA ile melamin, siyanürik asit ve ürik asit karışımlarından elde edilen jel görüntüsü piksel ölçüm değerleri.

		DNA bant hacim miktarı (integer)	Ortalama piksel yoğunluğu (integer)	Alan (mm²)
1	0.62 mM DNA + melamin	702.633	169.0	517.5
2	1.25 mM DNA + melamin	697.729	168.7	514.7
3	2.50 mM DNA + melamin	695.318	167.9	515.4
4	5.00 mM DNA + melamin	678.158	164.2	514.1
5	10 mM DNA + melamin	664.451	160.8	514.1
6	0.95 mM DNA + siyanürik asit	717.173	173.4	514.7
7	1.86 mM DNA + siyanürik asit	711.245	171.1	517.5
8	3.75 mM DNA + siyanürik asit	704.806	170.6	514.1
9	7.50 mM DNA + siyanürik asit	697.210	168.6	514.7
10	15 mM DNA + siyanürik asit	672.491	162.6	514.7
11	0.062 mM DNA + ürik asit	715.276	172.9	514.7
12	0.125 mM DNA + ürik asit	711.371	171.1	517.5
13	0.25 mM DNA + ürik asit	703.618	170.1	514.7
14	0.50 mM DNA + ürik asit	702.949	171.9	514.9
15	1 mM DNA + ürik asit	696.917	168.7	514.1
16	DNA	721.820	174.7	514.1



Şekil 3.21. *S. aureus* bakterisi DNA+melamin/metaboliti kombinasyonlarının DNA bant hacmi değerleri ((A) Melamin, (B) Siyanürik asit, (C) Ürik asit).

Sığır timus dokusu ve *S. aureus* genomik DNA'ları ile gerçekleştirilen elektroforez çalışmaları sonucunda elde edilen agaroz jel görüntülerinde makroskobik olarak belirgin farklılıklar gözlenmedi. Elde edilen jel görüntüleri *Biorad image lab 6.0* programına yüklenerek jel üzerinde oluşan DNA bantlarının piksel ölçümleri gerçekleştirildi (Çizelge 3.5. ve 3.6.). Ölçümler sonucunda metabolit konsantrasyonu arttıkça, DNA bant hacimlerinde azalmalar olduğu görüldü. Çizelge 3.5 ve 3.6'da verilen analiz sonuçlarından ve Şekil 3.19 ile Şekil 3.21'de verilen ilgili görsellerden de görüldüğü üzere en fazla bant hacminin ve piksel yoğunluğunun etkileşime sokulmamış kontrol DNA olarak kullanılan 16 numaralı örnekte olduğu ve DNA ile kombinasyonu yapılan her üç bileşiğin de tüm konsantrasyonlarının bant hacminde ve piksel yoğunluğunda azalmalara sebep olduğu görüldü.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

DNA canlının yaşam sürecinde ihtiyaç duyduğu tüm genetik bilgiyi taşıyan nükleotit polimeridir. Hücrelerde genetik bilginin kopyalanması yoluyla proteinlerin, enzimlerin ve bir takım hormonların biyokimyasal sentezine öncülük ederek hücrenel düzenlemeleri kontrol etmektedir (Güneş 2006). DNA'da meydana gelebilecek bozukluklar hayati fonksiyonlarda değişikliklere sebep olabilmektedir. Çift sarmallı yapısı itibariyle birçok küçük molekül için potansiyel bağlanma bölgeleri bulunduran DNA'nın, yapısal değişikliklerinin temelinde fiziksel olarak DNA'ya bağlanan zararlı moleküller, oksidatif baz hasarı ve genlerde meydana gelen mutasyonlar yer almaktadır (Fidan 2008). Bu sebeple DNA ile etkileşime giren zararlı moleküllerin, DNA yapısından ayrılması veya daha zararsız hale getirilmesine yönelik yapılan çalışmalara ilgi artmaktadır. Söz konusu çalışmalardaki başarı şansının artırılması için zararlı moleküllerin DNA ile etkileşim mekanizmasının belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu bağlamda yürütülen çalışmalarda moleküller arası etkileşimin değerlendirilmesinde viskozimetri, dairesel dikroizm spektrofotometri, agaroz jel elektroforezi, UV-absorbans spektrofotometri ve floresans spektrofotometri gibi tekniklerden yararlanılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında gıda sektöründe hile amaçlı kullanılan melamin ve metabolitleri ele alınmıştır. Endüstriyel ürünler olan melamin ve metabolitleri, yapılarındaki yüksek azot içeriğinden dolayı gıdalarda görünür protein oranını yüksek göstermek amacıyla üretici firmalar tarafından kullanılmıştır. Tüketilebilir gıda değeri olmayan bu bileşikler süt ve süt ürünleri, süt tozu, toz kahve, pet ve çiftlik hayvan yemleri gibi birçok ürüne katılmış ve bu ürünleri tüketen bebek ve hayvanlarda çeşitli sağlık problemlerine yol açmıştır. Özellikle bebekler ve pet hayvanlarının etkilendiği bu durumda idrar kesesinde taş oluşumu, inflamasyon ve hiperplazi başta olmak üzere tubuler blokaj ve böbrek yetmezliği gibi nefrolojik bozukluklar görülürken, çok sayıda insan ve hayvan ölümü rapor edilmiştir (WHO 2009, Puschner ve Reimschuessel 2011). Akut toksisitesinin düşük olduğu belirlenen melamin ve metabolitlerinin, kanserojenik etkisi ve *in vitro* olarak genomik DNA ile etkileşimi hakkında, literatürdeki veriler oldukça sınırlıdır (IARC 1999, WHO 2008). Yapılan bu çalışma ile maruz kalındığında

canlı organizmalar için zararlı etkiler oluşturan melamin, siyanürik asit ve ürik asidin DNA üzerinde göstermiş olduğu etkiler, *in vitro* olarak UV-absorbans spektrofotometri, floresans spektrofotometri ve agaroz jel elektroforez teknikleri ile incelendi.

Küçük moleküller ile genomik DNA arasında gerçekleşen moleküler etkileşimin incelendiği çalışmalarda önemli bir yeri olan UV-absorbans spektrofotometri yöntemi, moleküller arası etkileşimlerin belirlenmesinde önemli bilgiler sunmaktadır. UV-absorbans grafiklerinde görülen, dalga piki düşüşü diğer bir ifade ile hipokromik etki interkalasyon etkileşimini yansıtırken (Barton ve Raphael 1984, Kelly ve ark. 1985), hiperkromik etki olarak bilinen dalga pikindeki artışların ise groove bağlanma ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (Pasternack ve ark. 1983). Sun ve ark. (2010), melaminin DNA ile olan etkileşimini araştırdıkları bir çalışmada, sabit tutulan melamin konsantrasyonuna karşı değişen DNA konsantrasyonlarında söz konusu moleküllerin etkileşimlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, sadece genomik DNA bulunan örneklerinde 260 nm dalga boyunda tek absorbans piki elde ederken sadece melamin içeren çözeltilerinde ise hem 208 hem de 235 nm dalga boylarında çift pik elde ettiklerini belirtmişlerdir. Çalışma ekibi, DNA ve melaminden kombine olarak hazırladıkları örneklerde ise melaminden kaynaklı 208 ve 235 nm dalga boylarındaki piklerin kaybolarak, 260 nm dalga boyunda tek bir pikte toplandığını ifade etmişlerdir. Bu durum, melaminin genomik DNA'ya bağlandığını göstermektedir. Melamin ve DNA arasındaki etkileşiminin daha sağlıklı olarak değerlendirilebilmesi için aynı protokolü DNA'nın ss- formu için de uygulayan araştırmacılar, hem ds-DNA hem de ss-DNA formunda UV-absorbans ölçümü sonucunda hipokromik etkinin varlığını belirlemişlerdir. Belirlenen hipokromik etki her ne kadar moleküller arası etkileşimde interkalasyonu işaret etse de ss-DNA formunun tek zincirli yapıda olması ve bileşiklerin girebileceği baz çiftlerini bulundurmaması sebebi ile DNA'nın ds- ve ss- formlarında benzer bulguların alınması interkalasyon için bir kanıt değildir. Ancak melaminin, DNA molekülünün omurgasını oluşturan negatif yüklü fosfat gruplarını nötralize edebilen kation görevi görmesinden dolayı söz konusu moleküller arası bağlanmanın elektrostatik etkileşim ile oluşabileceği bildirilmiştir (Sun ve ark. 2010). Shen ve ark. (2011) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, araştırmacılar, sabit DNA konsantrasyonuna karşı değişen konsantrasyonlardaki melamin ve metabolitlerinin etkileşimini incelemiş ve artan madde konsantrasyonlarının dalga pikinde azalmaya sebep olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, hipokromik etki olarak ifade edilen dalga

piki düşüşünün, moleküller arası interkalasyon etkileşimi ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Sun ve ark. (2010) ile uyumlu olarak DNA'nın ss- formu ile yapılan UV-absorbans ölçümleri sonucunda alınan dalga piklerinin, ds-DNA ile benzerlik taşıması moleküller arası etkileşimin interkalasyon şeklinde olamayacağını gösterdiği ve tek başına farklı dalga piki veren bileşiklerin DNA ile kombinasyonundan 260 nm dalga pikinin alınması bileşiklerin DNA'ya bağlandığının göstergesi olduğu ifade edilmiştir. Xie ve ark. (2015) ise, farklı konsantrasyonlarda hazırladıkları melamin ve metabolitlerinin, sabit konsantrasyondaki DNA ile etkileşimini inceledikleri çalışmalarında, yararlandıkları UV-absorbans yönteminde artan madde konsantrasyonuna bağlı olarak dalga piklerinde hiperkromik etkinin görüldüğünü ve bu durumun moleküller arasında görülen groove bağlanma ile ilişkili olabileceğini ifade etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise, melamin, siyanürik asit ve ürik asidin tek başına UV-absorbans ölçümleri yapıldığında farklı dalga boylarında pik verdikleri belirlenmiştir. Söz konusu piklerin DNA molekülü için spesifik olan 260 nm'deki dalga pikinden farklı oldukları görüldü. Yapılan DNA+melamin/metaboliti kombinasyonlarının absorbansı ölçüldüğünde tek başına farklı dalga boylarında pik veren melamin ve metabolitlerinin DNA ile etkileşimi sonrasında absorbans spektrumlarının 260 nm dalga boyunda toplandığı belirlendi. Bu durum, Sun ve ark. (2010) çalışması ile uyum göstermiş, melamin ve metabolitlerinin DNA ile etkileşime girdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca çalışmamızda, Xie ve ark.'nın (2015) çalışması ile uyumlu olarak sabit konsantrasyondaki DNA ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan melamin ve metabolitleri incelendiğinde, artan madde konsantrasyonu ile dalga piklerinin artış gösterdiği belirlenmiştir. Hem sıgır timus DNA hem de *S. aureus* bakteri DNA'sı ile gerçekleştirilen analiz sonucunda görülen bu hiperkromik etki, söz konusu moleküller arasındaki etkileşimin groove bağlanma ile gerçekleştiği sonucunu ortaya koymuştur.

Çalışmamız kapsamında, UV-absorbans spektrofotometri ile belirlenen groove bağlanma bulgusunun, desteklenmesi için floresans spektrofotometri ve agaroz jel elektroforez teknikleri de uygulandı. Floresans spektrofotometri yönteminde elde edilen floresans spektrumlarının şekil ve konumunda bir değişiklik olmaması durumu, gerçekleşen etkileşimin moleküller arası kovalent olmayan etkileşimlerden olan interkalasyon, elektrostatik etkileşim veya groove bağlanma etkileşimlerinden biri olduğu anlamına gelmektedir (Sun ve ark. 2010). Aynı formda elde edilen floresans

spektrumları, UV-absorbans yönteminde olduğu gibi azalan yönde ise hipokromik, artan yönde ise hiperkromik olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, düşük floresansa sahip olan DNA molekülünün etkileşime girdiği molekül ile vermiş olduğu floresans emisyonunun belirlenmesi için DNA'ya olan bağlanma şekli iyi bilinen etidyum bromid yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanan etidyum bromid, güçlü bir floresans özellik göstererek floresans spektrumlarında artışa sebep olmaktadır (Meyer-Almes ve Porschke 1993). Etidyum bromid moleküllerinin DNA ile etkileşimi test edilen molekülün etkisiyle, yerleşmiş olduğu DNA baz çiftlerinin arasından ayrılması floresans şiddetinde azalmaya sebep olmakta ve bu sayede etkileşimi incelenen molekülün DNA'ya interkalasyon yapıp yapmadığı belirlenebilmektedir. Etidyum bromid'in bu özelliğinden faydalanarak birçok molekülün DNA ile olan etkileşimi açıklığa kavuşturulmuş ve bilinmeyene ışık tutulmuş olsa da güçlü kanserojenik etkisi olduğu bilinmektedir. Etidyum bromid'in istenmeyen bu özelliğinden dolayı akridin oranj, metilen blue, berberin hidroklorid ve safeview nükleik asit boyları gibi farklı alternatif boylar floresans prob olarak tercih edilmekte ve başarılı sonuçlar vermektedir (Wang ve ark. 2011, Wang ve ark. 2014). Floresans spektrofotometri çalışmalarında etidyum bromid gibi kanserojen bir boya yerine metilen blue boyası tercih eden Shen ve ark. (2011), metilen blue'nun da tıpkı etidyum bromid gibi interkalasyon yolu ile DNA'ya bağlandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, metilen blue ve DNA karışımı üzerine, farklı konsantrasyonlarda melamin ve metabolitlerinin eklenmesiyle meydana gelebilecek değişimin, moleküller arası etkileşimde önemli olduğunu belirtmiş ve artan madde konsantrasyonlarında floresans spektrumlarının arttığını, şekil ve konumunda bir değişiklik olmadığını belirleyerek söz konusu etkileşimin groove bağlanma olduğunu ifade etmişlerdir (Shen ve ark. 2011). Xie ve ark. (2015), floresans prob olarak berberin hidroklorit kullandıkları çalışmalarında, DNA ile melamin ve metabolitleri arasındaki etkileşimin groove bağlanma şeklinde olabileceğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan melamin, siyanürik asit ve ürik asit bileşiklerinin, genomik DNA ile hazırlanan kombinasyonlarının üzerine safeview boya eklendikten sonra floresans ölçümü yapıldı ve UV-absorbans tekniğinde olduğu gibi artan madde konsantrasyonu ile floresans spektrumlarının arttığı görüldü. Aynı konumda alınan floresans spektrumlarının artan şekilde olması, ilgili bileşiklerin DNA ile etkileşimin interkalasyon olmadığını doğrularken, moleküller arası etkileşimin groove bağlanma

yönünde olduğunu göstermiş Shen ve ark. (2011) ile Xie ve ark.'nın (2015) çalışmaları ile uyum sergilemiştir.

Moleküller arası etkileşimin incelenmesinde yararlanılan yöntemlerden bir diğeri olan agaroz jel elektroforez tekniğinde ise, DNA'ya bağlanan moleküllerin bantlaşma ve bandın elektroforetik mobilitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmektedir. Elektriksel bir alan içerisinde DNA molekülünün göç etmesi prensibine dayanan söz konusu yöntemde, DNA'ya bağlanması sebebi ile bağlanan moleküllerin DNA göçünü yavaşlattığı ve/veya yapısal değişikliklere sebep olarak bantlaşmada bozulmalara yol açtığı bilinmektedir (Xie ve ark. 2015). Çalışmamızda gerçekleştirilen agaroz jel elektroforez analizleri ile elde edilen jellerde oluşan bantlar üzerinde piksel ölçümü yapıldığında konsantrasyon arttıkça bant hacminde ve piksel yoğunluğunda azalmalar olduğu gözlenmiş ve bu azalmaların melamin etkisinde daha belirgin hale geldiği görülmüştür. Xie ve ark. (2015), melamin ve metabolitlerinin, DNA'ya bağlandıktan sonra bant hacminde farkedilebilir bir değişiklik belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Ancak, bizim bulgularımızla oluşan farkın, söz konusu araştırmacıların bu değerlendirmelerini piksel ölçümleri ile desteklememiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Elektroforetik mobilite yönünden bir değerlendirme yapıldığında, özellikle melamin etkisinde artan konsantrasyonlarda oluşan bantların diğer metabolitlere göre geride kaldığı görüldü. Bu durum, bant mobiliteleri bakımından jel üzerinde en yavaş yürümeyi, sırası ile melamin+DNA, siyanürük asit+DNA ve ürik asit+DNA örneklerinde tespit ettiklerini bildiren Xie ve ark. (2015) ile uyum göstermiştir.

Çalışma kapsamında uygulanan agaroz jel elektroforezi, UV-absorbans ve floresans spektrofotometri teknikleri ile elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, hem sığır timus hem de *S. aureus* DNA'sının, etkileşimleri incelenen metabolitler ile groove bağlanma gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Prokaryotik ve ökaryotik DNA'lar ile hazırlanan örneklerde farklı DNA+melamin/metaboliti konsantrasyonlarının, agaroz jel elektroforezi ve floresans spektrofotometri teknikleri bakımından verdikleri sonuçlar DNA türüne bağlı olmaksızın aynı yönde seyirler izledi. Ancak, UV-absorbans spektrofotometri tekniğinde, sığır timus DNA'sı ile elde edilen grafiklerin *S. aureus* DNA'sına göre daha yüksek absorbans verdiği ve pik seyri anlamında daha düzenli olduğu (Şekil 3.8-11) görülmüştür.

Sonuç olarak, yapılan bu *in vitro* çalışma ile hem insan tüketimine sunulan gıdalara hem de hayvan yemlerine protein oranının yüksek gösterilmesi için hile amacıyla ilave edilen melamin ve metabolitlerinin, prokaryotik ve ökaryotik DNA molekülleriyle groove bağlanma gösterdiği belirlendi. Söz konusu bağlanmanın, DNA üzerinde yapısal hasara sebep olabileceği literatürde bildirilmiş olmakla birlikte, oluşabilecek mutajenik etkisine dair çalışmaların sınırlı olduğu ve insanlar üzerinde mutajeniteye dair bir verinin olmaması araştırmaya açık bir alan olduğunu işaret etmektedir. Bu çalışmada melamin, siyanürik asit ve ürik asidin DNA ile groove bağlandığı *in vitro* olarak ortaya konmuştur. Her üç metabolitin de DNA ile göstermiş olduğu etkileşim dikkate alındığında, ileride gerçekleştirilecek deneysel *in vivo* çalışmalar ile melamin, siyanürik asit ve ürik asidin genotoksik etkilerinin belirlenmesinin faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- ALLISON L (2012) Fundamental Molecular Biology. Temel Moleküler Biyoloji. 2th ed. Çeviren : Beldüz AO, Palme Yayıncılık Ltd. Sti., Ankara, s:1-17.
- AVERY OT, MACLEOD CM ve MCCARTY M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. The Journal of Experimental Medicine, 79(2), 137-158
- BARTON JK, RAPHAEL AL (1984) Photoactivated stereospecific cleavage of double-helical DNA by cobalt(III) complexes. Journal of The American Chemical Society, 106, 2466-2468.
- BAYNES RE, SMİTH G, MASON SE, BARRETT E, BARLOW BM, RIVIERE JE (2008) Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration. Food and Chemical Toxicology 46(3), 1196-200.
- BINGHAM E, COHRSEN B, POWELL CH (2001) Patty's Toxicology. Volumes 1-9 5th Ed. John Wiley & Sons. New York, p. 4:1335.
- BISCHOFF G, HOFFMAN S (2002) DNA binding of drugs used in medicinal therapies. Current Medicinal Chemistry, 9(3), 312-48.
- BİÇEN M (2011) Experimental and Computational Studies of Interaction Between Small Molecules and DNA. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. İstanbul.
- BIZZARI S, YOKOSE K (2008) Melamine. In: Chemical economics handbook. Menlo Park, CA, SRI Consulting, Inc. Accessed 12th Nov 2019. <http://www.sriconsulting.com/CEH/Public/Reports/673.3000/>

- BROWN CA, JEONG KS, POPPENGHA RH, PUSCHNER B, MILLER DM, ELLIS AE, KANG KI, SUM S, CISTOLA AM, BROWN SA (2007) Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19(5), 525–531.
- CANELLI E (1974) Chemical, bacteriological and toxicological properties of cyanuric acid and chlorinated isocyanurates as applied to swimming pool disinfection. *American Journal of Public Health*, 64(2), 155-162.
- CREMONEZZI DC, DIAZ MP, VALENTICH MA, EYNARD AR (2004) Neoplastic and preneoplastic lesions induced by melamine in rat urothelium are modulated by dietary polyunsaturated fatty acids. *Food and Chemical Toxicology*, 42(12),1999–2007.
- ÇELİK SP (2018) Bis-ferrosenil-sübstitüe siklotetrafosfazen türevlerinin antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri ve dna etkileşimleri. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Ankara*.
- DAHM R (2005) Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, 278(2): 274–288.
- DEVİRİM AK, ARSLANTAŞ A, KAYA N, NECEFOĞLU H (2007) Effect of cobalt-hydroxybenzoate complex on genomic DNA. *Asian Journal of Chemistry*, 19(3), 2374-2380.
- DOBSON RL, MOTLAGH S, QUIJANO M, CAMBRON RT, BAKER TR, PULLEN AM, REGG BT, BIGALOW-KERN AS, VENNARD T, FIX A, REIMSCHUESSEL R, OVERMANN G, SHAN Y, DASTON GP (2008) Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicological Sciences*, 106(1), 251-262.
- DORNE JL, DOERGE DR, VANDENBROECK M, FINK-GREMELS J, MENNES W, KNUTSEN HK,VERNAZZA F, CASTLE L, EDLER L, BENFORD D (2013) Recent advances in the risk assessment of melamine and cyanuric acid in animal feed. *Toxicology and Applied Pharmacology* 270(3), 218-229.

EDELSON E (2007) F.Crick ve J.Watson-Hayatın Yapıtaşları 1.Baskı TÜBİTAK.

GLOGSTER (2015) Nükleik asit. Erişim adresi:

<https://edu.glogster.com/glog/untitled-glog-2728/23uc73d3hse>. Erişim tarihi:
25.01.2020

FDA (Food and Drug Administration), 2008. The Government of Canada responds to reports of melamine in food products. Erişim Tarihi: 23.12.2012. Kanada Sağlık Bakanlığı Web Sitesi: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chemchim/melamine/background-contexteng.php>.

FİDAN AF (2008). DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. AKU-Journal of Science, 8(1), 41-52.

GÜNEŞ HV (2006) Moleküler Hücre Biyolojisi, 2. baskı Kaan kitapevi, ESKİŞEHİR Bölüm 8, s:163-176.

HAMMOND BG, BARBEE SJ, INOUE T, ISHIDA N, LEVINSKAS GJ, STEVENS MW, WHEELER AG, CASCIERİ T (1986) A Review of toxicology studies on cyanurate and its chlorinated derivatives. Environmental Health Perspectives, 69, 287-92.

HANTZ E, LARUE V, LADAM P, LE MOYEC L, GOUYETTE C, HUYNH DT (2001) Solution conformation of an RNA-DNA hybrid duplex containing a pyrimidine RNA strand and a purine DNA strand. International Journal of Biological Macromolecules, 28(4), 273-284.

HECK HD, TYL RW (1985) The induction of bladder stones by terephthalic acid, dimethyl terephthalate, and melamine (2,4,6-triamino-s-triazine) and its relevance to risk assessment. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 5(3): 294-313.

IARC (1986) IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol. 39, Some Chemicals Used in Plastics and Elastomers, Lyon, pp. 333-346. Erişim adresi: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol39/melamine.html>.

- IARC (1999). Melamine. In: Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 73:1–674. Erişim adresi: <http://publications.iarc.fr/91>.
- KARNS JS (1999) Gene sequence and properties of an s-triazine ring-cleavage enzyme from *Pseudomonas* sp strain NRRLB-12227. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3512-7.
- KELLY JM, TOSSI AB, MCDONNELL DJ, OHUIGIN C (1985). A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Research*, 13(17): 6017–6034.
- Kirk O (1993) *Encyclopedia of Chemical Technology* (Vol. 7), 4th ed. John Wiley & Sons, New York, 834–851.
- KLUG WS, CUMMINGS MR, SPENCER CA, PALLADINO MA, KILLIAN D (1997) *Concepts of genetics*. 12th Edition New York: Prentice Hall Englewood Cliffs.
- LAM HS, NG PC, CHU WCW, WONG W, CHAN DFY, HO SS, WONG KT, AHUJA AT, LI CK, (2009) Renal screening in children after exposure to low dose melamine in Hong Kong: Cross Sectional Study *BMJ*, 337-2991.
- LEVENE PA, MORI T (1929) The carbohydrate group of ovomucoid. *The Journal of Biological Chemistry*, 84: 49-61.
- LONG EC, BARTON JK (1990). On demonstrating DNA intercalation. *Accounts of Chemical Research* 23,271-273.
- MATHEWS CK, VAN HOLDE KE (1990) *Biochemistry*. Biochemical Education, 18(3) p:154 Redwood City, California, The Benjamin /Cummings Publishing Company.

- MELNICK RL, BOORMAN GA, HASEMAN JK, MONTALI RJ, HUFF J (1984) Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents. *Toxicology Applied Pharmacology*, 72(2):292–303.
- MEYER-ALMES FJ, PORSCHKE D (1993) Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium. *Biochemistry*, 32(16): 4246–4253.
- MIAO H, FAN S, WU YN, ZHANG L, ZHOU PP, LI JG, CHEN HJ, ZHAO YF (2009) Simultaneous determination of melamine, ammeline, ammelide, and cyanuric acid in milk and milk products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22(2), 87-94.
- MIESCHER F (1869) Letter I: to Wilhelm His; Tübingen, February 26th, 1869. In: His W et al. (Eds.), *Die histochemischen und physiologischen arbeiten von Friedrich Miescher-Aus dem wissenschaftlichen briefwechsel von F. Miescher*, vol. 1. FCW Vogel, Leipzig, pp. 33- 38.
- MIESCHER F (1871) Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Med. Chem. Unters.* 4, 441– 460.
- MUNIZ-VALENCIA R, CEBALLOS-MAGANA SG, ROSALES MARTINEZ D, GONZALO-LUMBRERAS R, SANTOS-MONTES A, CUBEDO-FERNANDEZ-TRAPIELLA A, IZQUIERDO-HORNILLOS RC (2008) Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(3):523-531.
- MURRAY KR, GRANNER KD, MAYES PA, RODWELL VW (1998) Harper's Biochemistry. Harper'in Biyokimyası. 24. Baskı. Çeviri: Dikmen N, Özgüven T, Barış Kitapevi, İstanbul.
- MUTTER ST (2013) Theoretical studies of interactions of transition metal anticancer complexes with DNA. Doktora tezi. İngiltere - Cardiff Üniversitesi.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (1983) NTP carcinogenesis bioassay of melamine (CAS No.108-78-1) in F344/N rats and B6C3F1 Mice (Feed Study). National Toxicology Program 245:1–171.

NELSON DL, COX MM (2016) Principles of Biochemistry: Lehninger. Biyokimyanın İlkeleri:Lehninger. 5th ed. Çeviri: Elçin YM, Palme Yayıncılık Ltd. Sti., Ankara, s:271-298.

OECD (1998) Screening Information Dataset (SIDS) for Melamine. (CAS No. 108-78- 1) Erişim tarihi: 01.01.2012. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development.<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/108781.pdf>

OECD (1999) Screening Information Data Set for Isocyanuric acid CAS No 108-80-5 read at. <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSEIDS/108805.pdf>

OGASAWARA H, IMAIDA K, ISHIWATA H, TOYODA K, KAWANISHI T, UNEYAMA C, HAYASHI S, TAKAHASHI M, HAYASHI Y (1995) Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats: correlation between carcinogenicity and urolith formation. Carcinogenesis 16(11):2773–2777.

OKUMURA M, HASEGAWA R, SHIRAI T, ITO M, YAMADA S, FUKUSHIMA S (1992) Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic agents thymine or melamine. Carcinogenesis 13(6):1043-1045.

ÖZDEMİR ATABEY B (2019) Hypericum Montbretii Spach. Bitkisinden Elde Edilen Rutin, Kuersitrin ve Mirisitrin Flavanoidlerinin DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi – Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enst.

PAGES BJ, ANG DL, WRIGHT EP, ALDRICH-WRIGHT JR (2015) Metal complex interactions with DNA. Dalton Transactions, 44, 3505–3526.

- PALCHAUDHURI R, HERGENROTHER PJ (2007) DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 497-503.
- PASTERNAK RF, GIBBS EJ, VILAFRANCA JJ (1983). Interaction of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry*, 22(10), 2406-14.
- PORTUGAL FH, COHEN JS (1977) A century of DNA: A history of the discovery of the structure and function of the genetic substance. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, pp: 384.
- PUSCHNER B, REIMSCHUESSEL R (2011) Toxicosis caused by melamine and cyanuric acid in dogs and cats: uncovering the mystery and subsequent global implications. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), 181-199.
- RAJENDIRAN V, PALANIANDAVAR M, PERIASAMY VS ve AKBARSHA MA (2012) New $[\text{Ru}(5,6\text{-dmp}/3,4,7,8\text{-tmp})_2(\text{diimine})]^{2+}$ complexes: non-covalent DNA and protein binding, anticancer activity and fluorescent probes for nuclear and protein components. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 116, 151-162.
- ROSENBERG B, VAN CAMP L, GRIMLEY EB, THOMSON AJ (1967) Inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 242(6): 1347–1350.
- SCHEELE CW (1776) *Examen Chemicum Calculi Urinari* (A chemical examination of kidney stones). *Opuscula*, 2: 73.
- SHARMA K, PARADAKAR M (2010) The melamine adulteration scandal. *Food Security*, 2:97-107.
- SHEN HY, LIU YQ, GAO J, ZHEN HM, ZHU N, LI J (2011) In vitro study of DNA interaction with melamine and its related compounds. *DNA and Cell Biology*, 30(4): 255-264.

- SIRAJUDDIN M, ALI S, BADSHAH A (2013) Drug-DNA interactions and their study by UV-visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124: 1-19.
- SKINNER CG, THOMAS JD, OSTERLOH JD (2010) Melamine Toxicity. *Journal of Medical Toxicology*, 6:50-55.
- SUDAĞIDAN M, ÇAVUŞOĞLU C, BACAĞOĞLU F (2008) Biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında virülans genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bül*, 42: 29-3.
- SUEISHI K, MISHIMA K, MAKINO K, ITOH Y, TSURUYA K, HIRAKATA H, OISHI R (2002) Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *European Journal Pharmacology*, 451(2): 203-208.
- SUN Y, LIU R, CHI Z, QIN P, FANG X, MOU Y (2010) Spectroscopic investigation on the toxic interaction of melamine with herring sperm DNA. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24(5): 323-329.
- TOP M, ER O, CONGUR G, ERDEM A, LAMBRECHT FY (2016) Intracellular uptake study of radiolabeled anticancer drug and impedimetric detection of its interaction with DNA. *Talanta*, 160(1): 157-163.
- WANG L, LIU R, TENG Y (2011) Study on the toxic interactions of Ni²⁺ with DNA using neutral red dye as a fluorescence probe. *Journal of Luminescence*, Volume 131, Issue 4, April 2011, Pages 705-709.
- WANG Q, WU Q, WANG J, CHEN D, FAN P, WANG B (2014) Spectroscopic investigation on interaction and sonodynamic damage of Riboflavin to DNA under ultrasonic irradiation by using Methylene Blue as fluorescent probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, 754-762.

WATSON JD ve CRICK FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737-738.

WHO (2008) Melamine and cyanuric acid: Toxicity, preliminary risk assessment and guidance on levels in food. Erişim adresi: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine.pdf. Erişim tarihi: 11.10.2019.

WHO (2009) Toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid. Erişim: https://www.who.int/foodsafety/publications/chem/Melamine_report09.pdf, Erişim tarihi: 10.12.2019.

WHO (2010) Questions and answers on melamine. Erişim adresi: <https://www.who.int/csr/media/faq/QAmelamine/en/> Erişim Tarihi: 10.12.2019.

XIE J, CHEN D, WU Q, WANG J, QIAO H (2015) Spectroscopic analyses on interaction of melamine, cyanuric acid and uric acid with DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149: 714-721.

YE BF, ZHANG ZJ, JU HX (2005) Fluorescence study on the interaction between naproxen and yeast DNA. *Chinese Journal of Chemistry*, 23, 58-62.

ZHENG BW, LI SL, HE PL, JIN X, WANG YJ (2011) Effects of different doses of melamine in the diet on melamine concentrations in milk, plasma, rumen fluid, urine and feces in lactating dairy cows. *African Journal of Biotechnology*, 10(17), 3475-3479.

ÖZGEÇMİŞ

A- KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad : ALİ ŞENOL
Doğum tarihi : 01.12.1993
Doğum yeri : Kalecik
E-posta : alisenol712@gmail.com

B- EĞİTİM DURUMU

Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Tezli Yüksek Lisans Programı (Devam ediyor)
Lisans : Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2012-2017)
Lise : Altındağ M.Ali Hasan Çoşkun Anadolu Lisesi (2009-2012)
Yabancı Dil : İngilizce

C- MESLEKİ DENEYİM

- 1- Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi, (2019- devam ediyor)
- 2- Kavacık Veteriner Kliniği, Veteriner Hekim, (2017-2019)

D- BİLİMSEL ARAŞTIRMA FAALİYETLERİ

1- DEVRİM AK, EKİCİ H, SÖZMEN M, ŞENOL A, DEVRİM T (2019). Long-term effects of single dose 3-methylcholanthrene application on oxidative stress markers in kidney and liver tissues of mice. 2nd International Conference on "Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry: Advances and Challenges in Understanding the Mechanisms of Diseases" OCTOBER 24-26, 2019 ANKARA / TURKEY.

- 2- DURU Ö, ŞENOL A, DEVRİM AK, YASA DURU S, PARLATIR Y (2019). Assessment of alterations in some blood biochemical parameters in sarcoptic sheeps. 2nd International Conference on "Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry: Advances and Challenges in Understanding the Mechanisms of Diseases" OCTOBER 24-26, 2019 ANKARA / TURKEY.
- 3- DURU O, ŞENOL A, DEVRİM AK, YASA DURU S, PARLATIR Y (2019). Investigation of Serum Leptin, Thyroid Hormones and Some Biochemical Parameters in Sarcoptic Sheeps: A Preliminary Study. International Journal of Veterinary and Animal Research 2(3): 60-63.
- 4- ŞENOL A, DEVRİM AK (2020). Melaminin DNA ile etkileşiminin incelenmesi. 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), MARCH 19-20, 2020 ANKARA, TURKEY.
- 5- DEVRİM T, EKİCİ H, DEVRİM AK, SÖZMEN M, ŞENOL A, BOZKURT KK, DURU Ö, YALÇIN S (2020). Late effects of cutaneous 3-methylcholanthrene exposure on DNA damage-related pleiotropic growth factors and oxidative stress markers in mice. British Medical Journal 121(5):329-334.