



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Doktora Tezi

**TERAPÖTİK PEPTİD YÜKLÜ POLİMERİK NANO İLAÇ
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ ve MOLEKÜLER
MODELLEME ÇALIŞMALARI ile İNCELENMESİ**

Bilge BIÇAK

Fizik Anabilim Dalı

Atom ve Molekül Fiziği Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ

II. DANIŞMAN

Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

Ağustos, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 9.08.2021 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından Fizik Anabilim Dalı, Atom ve Molekül Fiziğı Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayşen E. ÖZEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Çiğdem YOLAÇAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Yasemin AKKAYA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Feray AYDOĞAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2018-32253 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, Yükseköğretim Kurulu (YÖK) Yurtdışı Doktora Araştırma Bursu (YUDAB) ile desteklenmiştir

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Bicak, B., Budama-Kilinc, Y., Kecel-Gunduz, S., Zorlu, T., & Akman, G. (2021). Peptide based nano-drug candidate for cancer treatment: Preparation, characterization, in vitro and in silico evaluation. Journal of Molecular Structure, 1240, 130573.

ÖNSÖZ

Gerek yüksek lisans gerekse doktora çalışmalarım boyunca benden destek ve bilgisini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Fizik Bölümündeki danışmanım Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ'e ve Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik bölümündeki danışmanım Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ'a, yine doktora tez çalışmalarımda benden desteğini esirgemeyen Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Kimya ve Eczacılık Bölümünden Prof. Dr. Petra IMHOF'a ve Berlin Freie Universität Fizik Bölümündeki ekibine, İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümünden Öğr. Gör. Dr. Gizem AKMAN'a, İstanbul Üniversitesi Fizik Bölümündeki lisans, yüksek lisans ve doktora dönemimde eğitim ve öğrenimime katkı sağlayan başta Prof. Dr. Ayşen E. ÖZEL olmak üzere tüm hocalarıma içtenlikle teşekkür ediyorum.

Tüm tez sürecim boyunca bana destek olan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Uygulamalı Nanoteknoloji ve Antikor Üretim Laboratuvarı'nda görev yapan arkadaşlarıma ve yıllardır tüm doktora sürecimde destek olan diğer arkadaşlarıma kucak dolusu sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Ve en önemlisi doğduğum günden bu günlere kadar benden desteğini hiç esirgemeyen, zorlandığım günlerde beni hep dik tutmaya çalışan, benimle ağlayıp benimle gülen, benimle düşünüp benimle yol alan, çözüm üretemeyeceğimi düşündüğümde beni destekleyen bana çözüm önerileri sunan başta dünyadaki meleğim anneme ve arkamda güvendiğim bir dağ gibi duran babama ve baba gibi ağabeylerime, yengelerime ve halalığı bana tattıran güzel yeğenime teşekkür ediyorum. İyi ki varsınız.

Ağustos 2021

Bilge BIÇAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xv
ÖZET	xvi
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. PEPTİDLER.....	4
2.1.1. Peptid Yapılarının İlaç Geliştirmedeki Önemleri	6
2.1.2. YKT Tripeptidi	7
2.2. POLİMERLER.....	7
2.2.1. Polimerlerin Sınıflandırılması	8
2.2.2. Polimer Yapıların İlaç Geliştirmedeki Önemleri	9
2.2.3. Kitosan.....	11
2.2.4. Polikaprolakton (PCL).....	12
2.3. NANOTEKNOLOJİ VE NANOPARTİKÜLLER	13
2.3.1. Kanser Çalışmalarında Nanoteknoloji Tabanlı İlaç Uygulamaları	13
2.3.2. Nano Boyutta İlaç Taşıyıcı Sistemler	14
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	18
3.1. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN MALZEME VE EKİPMANLAR.....	18
3.2. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	19
3.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli	19
3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)	21
3.2.3.KIRMIZI-ALTI SPEKTROSKOPİSİ	22
3.2.3.1.Beer-Lambert Yasası	22
3.2.3.2.Kırmızı-altı spektrometreleri	24
3.2.3.3.Bant Komponent Analizi	30

3.2.4.RAMAN SPEKTROSKOPİSİ	31
3.2.4.1. Raman Olayının Kuantum Mekaniksel Açıklaması	31
3.2.4.2. Raman Olayının Klasik Olarak Açıklaması.....	32
3.2.4.3.Raman Spektrometresi	34
3.2.5. UV SPEKTROSKOPİSİ	36
3.2.5.1. UV Spektrometresi	37
3.3. NANOPARTİKÜL HAZIRLAMA TEKNİKLERİ.....	38
3.3.1. Kitosan Nanopartikül Hazırlama Tekniği	39
3.3.1.1. Boş Nanopartikül Tekniği	39
3.3.1.2. Dolu Nanopartikül Tekniği	40
3.3.2. PCL Nanopartikül Hazırlama Tekniği.....	40
3.3.2.1. Boş Nanopartikül Tekniği	40
3.3.2.2. Dolu Nanopartikül Tekniği	41
3.4. DNA BAĞLANMASI VE BÖLÜNMESİ.....	41
3.4.1.DNA Bağlanması.....	41
3.4.2.DNA Kesme	43
3.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ	44
3.5.1. In Vitro Hücre Kültüründe Etkinlik Testi.....	44
3.5.2.Toksisite	45
3.5.3.İstatistik Çalışmaları	45
3.6. İLAÇ GELİŞTİRMEDE KULLANILAN MOLEKÜLER MODELLEME METODLARI	45
3.6.1. Moleküler Mekanik Metodlar.....	45
3.6.1.1.Teorik Konformasyon Analizi	46
3.6.1.2.Teorik Konformasyon Analizinde Kullanılan Notasyonlar	46
3.6.1.3.Molekülün Toplam Enerjisi	48
3.6.2.Moleküler Dinamik Metodlar	51
3.6.2.1. GROMACS.....	53
3.6.3. Kuantum Mekaniksel Metodlar	54
3.6.3.1. Ab-initio	54
3.6.3.2. Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT)	55
3.6.3.3. Gaussian	55
3.6.4.Moleküler Kenetlenme (Doking) Metodu ve ADME analizi.....	56
3.6.4.1.Moleküler Kenetlenme Yöntemi	56
3.6.4.2. Schrödinger GLIDE Modülü	59

3.6.4.3. AutoDockTools ve AutoDock Vina	60
3.6.4.4. ADME (emilim, dağılım, metabolizma ve atılım)	60
4. BULGULAR.....	63
4.1. YKT TRİPEPTİDİ	63
4.1.1. Teorik Konformasyon Analizi.....	63
4.1.2. Teorik Titreşim Dalga Sayıları Hesaplamaları	66
4.1.3. HOMO-LUMO Analizi	68
4.1.4. Mor-üstü Analizi	72
4.1.5. Moleküler Elektrostatik Potansiyel (MEP) Analizi.....	75
4.1.6. Hiperpolarizibilite Analizi.....	77
4.1.7. Naturel (Doğal) Bağ Orbital (NBO) Analizi	79
4.1.8. YKT Tripeptidine Ait Spektrumlar	80
4.1.9. DNA Bağlanma Analizi	82
4.1.10. DNA Kesme Analizi.....	83
4.1.11. Moleküler Doking (Kenetlenme) Analizi.....	84
4.1.11.1. 1BNA (B-DNA DODECAMER).....	84
4.1.11.2. 2J6M (epidermal büyüme faktör reseptörü), 4OJB (androjen reseptör), 1A52 (östrojen reseptörü) ve 4OAR (progesteron reseptörü)	89
4.1.12. YKT Tripeptidinin Kanser Hücre Hatları Üstündeki Etkisi.....	95
4.1.12.1. YKT Tripeptidi Sitotoksosite Çalışması	96
4.2. YKT YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİNİN KARAKTERİZASYONU	99
4.2.1. Ortalama Partikül Boyutu, Polidispersite ve Zeta Potansiyel Analizi.....	99
4.2.2. Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi Sonuçları	100
4.2.3. In vitro Salım Testi Sonuçları.....	101
4.2.4. SEM Analizi	101
4.2.5. Kitosan nanopartiküllerine ait spektrumlar	102
4.2.6. Kitosan-YKT Sistemi MD Çalışması.....	107
4.2.7. YKT yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Kanser Hücre Hatları Üstündeki Etkisi	110
4.2.7.1. YKT ve YKT Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksosite Çalışmaları	110
4.3. YKT YÜKLÜ PCL NANOPARTİKÜLLERİNİN KARAKTERİZASYONU.....	113
4.3.1. Ortalama Partikül Boyutu, Polidispersite ve Zeta Potansiyel Analizi.....	113
4.3.2. Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi Sonuçları	113
4.3.3. In vitro Salım Testi Sonuçları.....	113

4.3.4. SEM Analizi	114
4.3.5. PCL nanopartiküllerine ait spektrumlar	115
4.3.6. PCL-YKT Sistemi MD Çalışması	120
4.3.7. YKT Yüklü PCL Nanopartiküllerinin Kanser Hücre Hatları Üstündeki Etkisi ...	123
4.3.7.1. YKT ve YKT Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksikite Çalışmaları	123
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	127
KAYNAKLAR.....	147
EKLER	175
EK 1. Tyr-Lys-Thr tripeptidinin optimize olmuş bağ uzunlukları (Å), açısı ve dihedral değerleri.	175
EK 2. YKT Tirpeptidinin focK matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.	176
EK 3. YKT tripeptidine ait deneysel IR, Raman, ATR, hesaplanan dalga sayıları ve potansiyel enerji dağılımları.	183
ÖZGEÇMİŞ	190

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Amino asidin genel yapısı.....	4
Şekil 2.2: Peptid Bağ Oluşumu.	6
Şekil 2.3: Polimer Sınıfları.....	8
Şekil 2.4: Kitosan polimerinin yapısı.....	12
Şekil 2.5: Polikaprolakton polimerinin yapısı.....	13
Şekil 2.6: Nano taşıyıcıların tasarımı için düşünülen özellikler.	15
Şekil 2.7: Nanotaşıyıcı sistemler [74].	15
Şekil 2.8: Polimerik Nanopartikül Tipleri.....	17
Şekil 3.1: Nanopartikül çevresinde zeta potansiyeli dahil farklı bölgeler.	21
Şekil 3.2: Dinamik Işık Saçılma (DLS) için Blok Diyagram [88].....	21
Şekil 3.3: Taramalı Elektron Mikroskobu için Blok Diyagram.	22
Şekil 3.4: FTIR spektrometresi blok diyagramı.	27
Şekil 3.5: ATR spektrometresinde örnek üstüne gelen ışığın yansıması.	30
Şekil 3.6: Stokes ve Anti-Stokes Saçılmaları.....	32
Şekil 3.7: Raman spektrometresi diyagramı [112].....	35
Şekil 3.8: Spektrofotometrenin temel yapısı.	37
Şekil 3.9: Amino Asitlerin Ψ ve Φ Enerji Bölgeleri (a) ve Yan Zincir Bölgeleri (b).	47
Şekil 3.10: Bir moleküldeki bağ (r), açı (θ) ve dihedral (Φ) gösterimleri.	52
Şekil 3.11: Moleküler Kenetlenme Metodu Şeması.	57
Şekil 3.12: Ligand yerleştirme adımları.....	57
Şekil 4.1: YKT tripeptidi, yapısı, atom sayıları ve dihedraller.	63
Şekil 4.2: a) Nötral Tyr-Lys-Thr tripeptidinin Gaussian programına giriş geometrisi ve b) Gaussian programında DFT-RB3LYP/6-311G++(d,p) baz setiyle çalıştırıldıktan sonraki geometrik yapısı.....	66

Şekil 4.3: Tyr-Lys-Thr tripeptidine ait iç hidrojen bağları ve uzunlukları.	67
Şekil 4.4: YKT tripeptidinin metanol, etanol, su ve vakum ortamında HOMO-LUMO bölgeleri.	69
Şekil 4.5: YKT tripeptidinin farklı çözücülerde UV-Vis spektrometresinde ölçülen deneysel absorbans değerleri.	72
Şekil 4.6: YKT tripeptidinin farklı çözücülerde UV-Vis spektrometresinde ölçülen teorik absorbans değerleri.	73
Şekil 4.7: YKT tripeptidinin vakum, su, etanol ve metanol ortamlarında moleküler elektrostatik potansiyel haritaları.	76
Şekil 4.8: YKT tripeptidine ait FT-IR, FTIR-ATR ve Raman spektrumları.	81
Şekil 4.9: YKT tripeptidine ait amid I (a,b), amid II (c) ve amid III (d)'ün bant komponent analizi sonuçları.	82
Şekil 4.10: (a) Tris-HCl / NaCl tamponunda (pH 7.2) artan miktarda CT-DNA varlığında ve yokluğunda (siyah tepe) YKT tripeptidinin absorpsiyon spektrumları. (Koşullar: [YKT] = 30 µM, [DNA] = 0-120 µM. Oklar (↑ ↓), artan DNA konsantrasyonu üzerine absorbans değişikliklerini gösterir.) (b) YKT tarafından pBR322 DNA'nın hidrolitik bölünmesi (1: 400 µM YKT+DNA, 2: 200 µM YKT+DNA, 3: 200 µM YKT+DNA, 4: 50 µM YKT+DNA and 5: 25 µM YKT+DNA) ve oksidatif bölünmesi (6: 400 µM YKT+DNA+H ₂ O ₂ , 7: 200 µM YKT+DNA+H ₂ O ₂ , 8: 100 µM YKT+DNA+H ₂ O ₂ , 9: 50 µM YKT+DNA+H ₂ O ₂ ve 10: 25 µM YKT+DNA+H ₂ O ₂).	83
Şekil 4.11: (a) Moleküler yerleştirme pozu ve (b) YKT tripeptid ve B-DNA Dodecamer yüzey haritası.	85
Şekil 4.12: YKT tripeptidinin B-DNA ile yapmış olduğu yakın etkileşimler.	85
Şekil 4.13: 2J6M (a), 4OJB (b), 1A52 (c) ve 4OAR (d) reseptörlerinin aktif bölgesinde YKT tripeptidinin 2D ligand etkileşimi.	90
Şekil 4.14: YKT tripeptidi ve EBFR (a), AR (b), ÖR (c), PR (d) elektrostatik potansiyel harita yüzeyleri.	93
Şekil 4.15: 24 saat boyunca HeLA, MCF-7 ve MLL hücrelerine uygulanan YKT tripeptidinin farklı konsantrasyonlarında yüzde canlılık grafiği (p<0,05: * (kontrolle göre anlamlılık); p<0,01: ** (kontrolle göre anlamlılık)).	97
Şekil 4.16: 48 saat boyunca HeLA, MCF-7 ve MLL hücrelerine uygulanan YKT tripeptidinin farklı konsantrasyonlarında yüzde canlılık grafiği (p<0,05: * (kontrolle göre anlamlılık); p<0,01: ** (kontrolle göre anlamlılık)).	98
Şekil 4.17: YKT tripeptidinin UV-Visible spektrometresi ile elde edilen standart eğrisi.	100

Şekil 4.18: YKT tripeptidi yüklü kitosan nanopartiküllerinin salım grafiği.	101
Şekil 4.19: 5mg YKT yüklü kitosan nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.	102
Şekil 4.20: Kitosan nanopartikülleri, YKT yüklü kitosan nanopartikülleri ve YKT tripeptidine ait FTIR spektrumları (a), YKT yüklü kitosan nanopartikülleri ve YKT tripeptidine ait 1800-1000 cm ⁻¹ bölgesi ATR spektrumları (b) ve 1100-400 cm ⁻¹ bölgesi ATR spektrumları (c).	104
Şekil 4.21: YKT yüklü kitosan nanopartiküllerine ait ATR spektrumu kullanılarak bant komponent analizi yöntemi ile elde edilen amid pikleri.	105
Şekil 4.22: Kutu içerisindeki kitosan molekülleri (a), Kutu içerisindeki boş nanopartikül sentezinde kullanılan moleküller (b), Kutu içerisindeki dolu nanopartikül sentezinde kullanılan moleküller (c).	108
Şekil 4.23: Moleküler Dinamik çalışması sonucu elde edilen potansiyel, kinetik ve toplam enerji grafikleri.	109
Şekil 4.24: Sistem içindeki YKT molekülüne ait RMSD değerleri.	110
Şekil 4.25: 24 saat boyunca MLL hücrelerine uygulanan YKT, Kitosan ve YKT yüklü Kitosan Nanopartikül konsantrasyonlarında yüzde canlılık grafiği (p<0,05: * (kontrolle göre anlamlılık); p<0,01: ** (kontrolle göre anlamlılık)).	111
Şekil 4.26: 48 saat boyunca MLL hücrelerine uygulanan YKT, Kitosan ve YKT yüklü Kitosan Nanopartikül konsantrasyonlarında canlılık yüzde grafiği (p<0,05: * (kontrolle göre anlamlılık); p<0,01: ** (kontrolle göre anlamlılık)).	112
Şekil 4.27: YKT tripeptidi yüklü PCL nanopartiküllerinin salım grafiği.	114
Şekil 4.28: 5mg YKT yüklü PCL nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.	115
Şekil 4.29: PCL nanopartikülleri, YKT yüklü PCL nanopartikülleri ve YKT tripeptidine ait FTIR spektrumları.	116
Şekil 4.30: PCL nanopartikülleri, YKT yüklü PCL nanopartikülleri ve YKT tripeptidine ait ATR spektrumları.	117
Şekil 4.31: YKT yüklü PCL nanopartiküllerine ait ATR spektrumu kullanılarak bant komponent analizi yöntemi ile elde edilen amid pikleri.	118
Şekil 4.32: Kutu içerisindeki PCL molekülleri (a), Kutu içerisindeki boş nanopartikül sentezinde kullanılan moleküller (b), Kutu içerisindeki dolu nanopartikül sentezinde kullanılan moleküller (c).	121
Şekil 4.33: Moleküler Dinamik çalışması sonucu elde edilen potansiyel, kinetik ve toplam enerji grafikleri.	122
Şekil 4.34: Sistem içindeki YKT molekülüne ait RMSD değerleri.	123

Şekil 4.35: 24 saat boyunca MLL hücrelerine uygulanan YKT, PCL, YKT yüklü PCL Nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarda yüzde canlılık grafiği ($p<0,05$: * (kontrole göre anlamlılık); $p<0,01$: ** (kontrole göre anlamlılık)).....125

Şekil 4.36: 48 saat boyunca MLL hücrelerine uygulanan YKT, PCL, YKT yüklü PCL Nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarda yüzde canlılık grafiği ($p<0,05$: * (kontrole göre anlamlılık); $p<0,01$: ** (kontrole göre anlamlılık)).....125



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: İlaç Dağıtımında Kullanılan Polimerlerin ve Bunlardan Üretilen Nanopartiküllerin Özellikleri [43].	10
Tablo 2.2: İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler.	10
Tablo 3.1: Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzeme ve Ekipmanlar.	18
Tablo 3.2: Kırmızı-altı Bölgeye ait Bilgiler [97,98].	25
Tablo 3.3: Raman spektrometresinde kullanılan lazer tipleri.	35
Tablo 4.1: Tirosin amino asidinin konformasyon bölgeleri.	64
Tablo 4.2: Lizin amino asidinin konformasyon bölgeleri.	64
Tablo 4.3: Treonin amino asidinin konformasyon bölgeleri.	64
Tablo 4.4: Tyr-Lys-Thr tripeptidi için tüm konformasyon bölgelerine göre incelenen konformasyon sayıları ve minimum enerjinin (global enerjinin) bulunduğu konformasyon bölgesi.	65
Tablo 4.5: 6.37 kcal/mol enerjiye sahip Nötral Tyr-Lys-Thr tripeptidinin global konformasyon için dönü açıları.	65
Tablo 4.6: 6.37 kcal/mol enerjiye sahip Nötral Tyr-Lys-Thr tripeptidinin global konformasyona etki eden diğer etkileşme enerjileri.	65
Tablo 4.7: Konformasyon analizi sonucu enerjisi 6.37 kcal/mol olarak belirlenen konformasyonun Gaussian09 programı kullanılarak elde edilen enerji değeri.	66
Tablo 4.8: Tyr-Lys-Thr tripeptidindeki molekül içi H bağları ve uzunlukları.(DFT/B3LYP/6-311G++(d,p)).	67
Tablo 4.9: YKT'nin hesaplanan moleküler orbital enerjileri (eV) ve enerji farklılıkları (TD-DFT/B3LYP / 6311 ++ G (d, p)).	70
Tablo 4.10: YKT tripeptidi için iyonlaşma potansiyeli, elektron ilgisi, elektronegatiflik, kimyasal sertlik, kimyasal yumuşaklık ve Homo-Lumo boşluklarının hesaplanan değerleri.	71
Tablo 4.11: YKT tripeptidinin farklı çözücülerde deneysel olarak elde edilen absorpsiyon dalga boyu (nm), uyarma enerjileri (eV) ve absorbans değerleri.	73

Tablo 4.12: YKT tripeptidinin farklı çözücülerde teorik olarak elde edilen absorpsiyon dalgaboyu (nm), uyarma enerjileri (eV) ve osilatör kuvvetleri (f) ile birlikte çeşitli çözücülerde geçiş seviyeleri ve atamaları.	74
Tablo 4.13: YKT tripeptidinin hesaplanan dipol moment, polarizibilite ve hiperpolarizibilite değerleri.	79
Tablo 4.14: YKT tripeptidinin bağlanma afiniteleri ve RMSD değerleri.	87
Tablo 4.15: Swissadme tarafından ilaç benzerliğini gösteren sentezlenmiş bileşiğin sanal taraması.	88
Tablo 4.16: Doking Skor enerjileri ve YKT tripeptidi ile tüm tercih edilen reseptörlerin olası etkileşimleri.....	91
Tablo 4.17: YKT tripeptidinin farklı reseptörler ile kenetlenmesi sonucunda sahip oldukları doking skor enerjileri ve hesaplanan ADME özellikleri.....	95
Tablo 4.18: YKT tripeptidi için HeLa, MCF-7 ve MAT-Lylü hücrelerine ait 24 saat inkübasyon sonunda yüzde canlılık değerleri.....	98
Tablo 4.19: YKT tripeptidi için HeLa, MCF-7 ve MAT-Lylü hücrelerine ait 48 saat inkübasyon sonunda yüzde canlılık değerleri.....	99
Tablo 4.20: Boş ve YKT tripeptidi yüklü kitosan nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyeli ve Pdl değerleri.	99
Tablo 4.21: YKT yüklü kitosan NP'lerin gözlenen FT-IR ve ATR pikleri ve atamaları. ...	106
Tablo 4.22: Örneklerin MAT-Lylü hücreleri üzerindeki 24 saatlik yüzde canlılık değerleri.....	112
Tablo 4.23: MAT-Lylü hücreleri üzerindeki 48 saatlik yüzde canlılık değerleri.	112
Tablo 4.24: Boş ve YKT tripeptidi yüklü PCL nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyeli ve Pdl değerleri.....	113
Tablo 4.25: YKT yüklü PCL NP'lerin gözlenen FT-IR ve ATR pikleri ve atamaları.....	119
Tablo 4.26: MAT-Lylü hücrelerine ait 24 saatlik yüzde canlılık değerleri.....	126
Tablo 4.27: MAT-Lylü hücrelerine ait 48 saatlik yüzde canlılık değerleri.	126

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

μ	: Dipol Moment
λ	: Dalgaboyu
U	: Potansiyel Enerji
mV	: miliVolt
Å	: Angstrom

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

YKT	: Tyr-Lys-Thr
Tyr	: Tirozin
Lys	: Lizin
Thr	: Treonin
a.u.	: Atomik birim
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektrometre
PCL	: Polikaprolakton
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
RMSD	: Kök-ortalama-kare sapma
ADME	: Emilim, Dağılım, Metabolizma ve Atılım
ATR	: Zayıflatılmış Toplam Yansıtma
HOMO	: En Yüksek Dolu Moleküler Orbital
LUMO	: En Düşük Boş Moleküler Orbital
MD	: Moleküler Dinamik
MEP	: Moleküler Elektrostatik Potansiyel
NBO	: Doğal Bağ Orbital
NP	: Nanopartikül
NPT	: Parçacık Sayısı, Basınç, Sıcaklık
NVT	: Parçacık Sayısı, Hacim, Sıcaklık

ÖZET

DOKTORA TEZİ

TERAPÖTİK PEPTİD YÜKLÜ POLİMERİK NANO İLAÇ FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ ve MOLEKÜLER MODELLEME ÇALIŞMALARI ile İNCELENMESİ

Bilge BIÇAK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ

II. Danışman : Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

Peptitler çeşitli hastalıkların tedavisi için büyük umut vadeden moleküllerdir. Kanser türlerinden bulaşıcı hastalıklara kadar terapötik özellikleri ile etkin şekilde kullanılabilen önemli farmasötik bileşiklerdir. Modifiye edilebilir olmaları ve güçlü bağlanma afinitesi gibi önemli avantajlara sahip olan bu yapılar, özellikle nano-ilaç tasarımı çalışmalarında tercih sebebi olmuşlardır. Bu tez çalışmasında kullanılan YKT tripeptinin yapısında bulunan tirozin, lizin, treonin amino asitleri antibakteriyel, antiviral, antikanser, antioksidan gibi özellikler taşımaktadır. Bu tez çalışmasının teorik hesaplama kısmında ilk başta Tyr-Lys-Thr tripeptidinin moleküler modelleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve daha sonraki aşamada da farklı polimerler kullanılarak nano-ilaç formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Moleküler modelleme çalışmalarında tripeptidin teorik konformasyon analizi kullanılarak en kararlı moleküler geometrisi tespit edilip, optimize edilmiş, tüm temel seviye titreşim modları belirlenmiş, NBO, MEP, hiperpolarizebillite ve HOMO-LUMO analizleri gerçekleştirilmiştir. Tezin deneysel kısmında sentezlenmiş olan YKT yüklü kitosan ve polikaprolakton (PCL)

polimerik nanopartiküllerin en uygun sentez ortamları MD hesaplamaları için oluşturularak, tripeptidin kitosan ve polikaprolakton (PCL) polimerlerinin her ikisiyle etkileşimi ve bu ortamlardaki dinamik davranışı modellenmiştir. Ayrıca YKT'nin ilaç olarak kullanılabilme potansiyelinin belirlendiği çeşitli farmokokinetik özellikleri, ADME analizleri ve östrojen reseptörü, progesteron reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptör, androjen reseptörü ve DNA ile olan etkileşimleri de moleküler kenetlenme (docking) programları ile belirlenmiştir. Tezin deneysel kısmında ise; YKT'nin iki farklı polimer ile nanopartikülleri sentezlenmiş, hem spektroskopik hem de taramalı elektron mikroskobu gibi görüntüleme yöntemleri ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyeli, ortalama partikül boyutu, polidispersite indeksi analizleri gerçekleştirilmiş, *in vitro* salım profili belirlenmiş, enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi hesaplamaları yapılmıştır. Bunlara ek olarak, YKT'nin DNA'ya bağlanma ve DNA' yı kesme kabiliyetleri deneysel çalışmalarla da gösterilmiştir. Son olarak, YKT tripeptidi ve iki farklı yüzey yüküne sahip YKT yüklü nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* hücre kültür ortamında, HeLa, MCF-7 ve MAT-LyLu (MLL) hücreleri ile etkileşimi ile bu hücreler üzerindeki sitotoksitesi değerlendirilmiştir.

Ağustos 2021, 215. sayfa.

Anahtar kelimeler: YKT, Nanopartikül, Kitosan, PCL, DNA bağlanma, Moleküler Modelleme, Spektroskopi, Sitotoksite

SUMMARY

Ph.D. THESIS

DEVELOPMENT of THERAPEUTIC PEPTIDE-LOADED POLYMERIC NANO DRUG FORMULATIONS and INVESTIGATION of THEIR STRUCTURES with MOLECULAR MODELING STUDIES

Bilge BIÇAK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Physics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Serda KECCEL GÜNDÜZ

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

Peptides are molecules that show great promise for the treatment of various diseases. They are important pharmaceutical compounds that can be used effectively with their therapeutic properties from cancer types to infectious diseases. These structures, which have important advantages such as being modifiable and strong binding affinity, have been especially preferred in nano-drug design studies. Tyr-Lys-Thr amino acids in the structure of YKT tripeptide used in this thesis have antibacterial, antiviral, anticancer, antioxidant properties. In the theoretical computation part of this thesis, it is aimed to carry out molecular modelling studies of Tyr-Lys-Thr tripeptide first and to develop nano-drug formulations using different polymers in the next stage. In molecular modelling studies, using the theoretical conformation analysis of the tripeptide, the most stable molecular geometry was determined, optimized and all fundamental vibration modes were determined, NBO, MEP, hyperpolarizability and HOMO-LUMO

analyses were also performed. In the experimental part of the thesis, the optimal synthesis environments of YKT loaded chitosan and polycaprolactone (PCL) polymeric nanoparticles were created for MD calculations, and the interaction of the tripeptide with both chitosan and polycaprolactone (PCL) polymers and its dynamic behaviour in these environments were modelled. In addition, various pharmacokinetic properties of YKT, in which its potential to be used as a drug was determined by ADME analysis and its interactions with estrogen receptor, progesterone receptor, epidermal growth factor receptor, androgen receptor and DNA were determined by molecular docking programs. In the experimental part of the thesis, YKT loaded nanoparticles were synthesized with two different polymers, and characterization studies were carried out with imaging methods such as scanning electron microscopy and spectroscopic methods. Zeta potential, average particle size, polydispersity index analyses were performed, *in vitro* release profile was determined, encapsulation efficiency and loading capacity calculations were performed. In addition to these, the ability of YKT to bind to and cleave DNA was also demonstrated by experimental studies. Finally, the interactions of YKT tripeptide and YKT loaded nanoparticle formulations with two different surface charges with HeLa, MCF-7 and MAT-LyLu (MLL) cells *in vitro* cell culture medium and their cytotoxicity on these cells were evaluated.

August 2021, 215 pages.

Keywords: YKT, Nanoparticle, Chitosan, PCL, DNA binding, Molecular Modeling, Spectroscopy, Cytotoxicity

1. GİRİŞ

Günümüzde oldukça yaygın hastalıklardan olan kanser, hücrelerin kontrolsüzce çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır. Bu hastalığın tedavisinde kullanılan metotların istenmeyen yan etkileri olduğu bilinmektedir. Bu sorunun ortadan kaldırılabilmesi için günümüzde çalışmalar yoğunlukla sürmektedir. Nanoteknolojinin ciddi bir şekilde geliştiği günümüzde, ilaçlardan en iyi şekilde yararlanabilmek ve istenmeyen yan etkilerinden kaçınabilmek için nanopartikül sistemleri öne çıkmaktadır. Bu sistemlerin düşük toksisite, biyobozunurluk gibi özelliklerinin olduğu ve terapötik etken maddeleri kolaylıkla taşıyabildikleri bilinmektedir. Farmasötik bileşiklerden olan peptidler çok fonksiyonlu, modifiye edilebilir, güçlü bağlanma afinitesi, yüksek stabilizasyon, maliyet düşüklüğü gibi özelliklere sahiptir [1-5] ve kanser başta olmak üzere birçok hastalıkta terapötik etken madde olarak kullanılabilir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından da tescilli terapötik özellikli peptidlerin, hedeflerine özel olarak bağlanabilmeleri, etki potansiyelinin yüksek olmasına ve hedef dışı yan etkinin düşük kalmasına yardımcı olur [6]. Ancak peptid ilaçların oral uygulamalarda düşük biyoyararlanım sağlaması sınırlandırmaları beraberinde getirir. Bunun asıl sebebi, mide asitleri ve proteazların ilacı parçalaması ve ilacın bağırsak zarını geçememesidir. İlaç gastrointestinal sisteme girse bile stabilize ve absorpsiyon konusunda zorluk yaşayacaktır. Buna rağmen, yeni geliştirilen nanoteknoloji tabanlı çalışmalarla peptid ilaçların kullanımı konusunda iyileşme süreci başlamıştır [7]. Nanopartikül bazlı peptid ilaçların son yıllarda geliştirilmeye başlanması zorlu gastrointestinal ortamın zorluklarının üstesinden gelmek ve oral uygulamalarda biyoyararlanımın daha fazla sağlanması açısından önemlidir [8].

Bu tez çalışmasında incelenen tyrosyllysylthreonine (YKT) tripeptidi üç temel amino asitten oluşan bir peptid yapısıdır. Tripeptid yapısındaki tirozin amino asidinin bir nörotransmitter öncüsü olduğu ve antioksidan özellik gösterdiği [9-12], lizin amino asidinin de antioksidan özellik göstermesinin yanı sıra antiviral etkisinin olduğu [12,13] ve tripeptid yapısındaki diğer amino asit olan treoninin ise apoptosisi inhibe edici ve antibakteriyel özelliğe sahip olduğu literatür çalışmalarında görülmektedir [14,15]. Ayrıca, gerçekleştirilen literatür çalışma sonuçlarına göre, YKT tripeptidinin, yapısı içindeki YK dipeptidinin analjezik etkiye sahip olduğu ve lösemik hücrelerde nekroza yol açtığı da elde edilen önemli bilgiler arasındadır [16-

18]. Yapısında bulunan amino asitlerin sahip olduğu önemli görevler nedeniyle, bu tripeptid yapısının da önemli görevler üstlenebileceği düşünölmüştür.

Bu çalışmada gerçekleştirilmek istenen; hem YKT tripeptidinin yapısal analizlerini hem de nano-ilaç formölasyonlarını elde etmek ve ayrıntılı karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmek ve bunlara ek olarak hem peptidin saf hali, hem de nanopartiköle yüklenmiş hallerinin kanser hücre hatları üstündeki etkisini araştırmaktır. Tez çalışmasında teorik ve deneysel olmak üzere iki farklı çalışma yürütölmüştür. Teorik çalışmalarda; molekülün yapısı, etkileşimleri ve ADME özellikleri hakkında birçok bilgi elde edilmiş, deneysel çalışmalarda ise YKT'nin spektroskopik çalışmaları, DNA bağlanma ve DNA kesme aktivitesi, YKT yüklü nanopartiköl sentezleri ve karakterizasyon çalışmaları, YKT'nin ve YKT yüklü nanopartiköllerin kanser hücre hatları üstündeki sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tyr-Lys-Thr (YKT) 'e ait teorik çalışmalar molekül mekanik, dinamik ve kuantum mekaniksel metotlar çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda ilk olarak ilaç molekülünün biyolojik aktivite tahmininde ve fizikokimyasal özelliklerde büyük öneme sahip olan [19] kararlı konformasyonlar belirlenmiş ve molekülün sahip olabileceği farklı konformasyonlar içinden en kararlı molekül yapı geometrisi elde edilmiştir. En kararlı konformasyona sahip molekülün titreşim dalga sayıları belirlenmiş, potansiyel enerji dağılım (PED) analizi ile elde edilen dalga sayılarının uygun atamaları yapılmıştır. Ayrıca, YKT tripeptidinin elektriksel özellikleri, kimyasal kararlılığı, bağ analizi, yük transferi gibi özelliklerinin belirlenmesi için HOMO-LUMO, MEP, Hiperpolarizabilite ve NBO analizleri de bu çalışma çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Diğer bir teorik çalışmada da prostat kanseri ile ilişkisi olduğu düşünölen YKT'nin [20] östrojen reseptörü, progesteron reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptör, androjen reseptörü ve DNA ile kenetlenme çalışmaları gerçekleştirilerek bağlanma afinitesi değeri ve bağlanma bölgeleri tespit edilip, ardından dokulara ilacın maruz kalma kinetiğini etkileyen ve farmakokinetik ilaç başarısı için önemli olan ADME profilleri belirlenmiştir. Sentez aşamasında kullanılan polimerlerin ve polimerler ile etkileşen YKT tripeptidinin, etkileşim dinamiği ise molekül dinamik çalışmalar ile gerçekleştirilmiştir.

Peptidlerin biyobozunur yapılarından dolayı, polimerik nanopartiköller yardımıyla peptidlerin vücut içerisindeki bozunmalarını minimuma indirip, aktivitelerinin korunması sağlanır. Vücut içerisinde, peptidi koruyan polimerik nanopartikölün degregasyonu sonucunda peptidin

kontrollü bir şekilde salımı gerçekleştikten sonra ilaç adayı, organizmadaki ilgili protein yapıları ile etkileşir ve tedavi sürecine olan etkisi başlar. Bu sebeple, YKT'nin stabilitesinin korunması ve biyoyararlanımının artırılması için peptid yüklü polimerik nanopartiküllerin üretimi tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiştir. Nano-ilâç geliştirmeyi amaçladığımız deneysel çalışmalarda, biyobozunur ve biyouyumlu doğal bir polimer olan kitosan ve sentetik bir polimer olan PCL kullanılarak YKT yüklü polimerik nanopartiküller elde edilmiş, *in vitro* salım profilleri ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin, YKT'nin Mat-LyLu, MCF-7 ve HeLa hücre hatları arasında en çok etkinlik gösterdiği Mat-LyLu kanser hücre hatları üstünde sitotoksosite analizleri gerçekleştirilmiş ve YKT sonuçları ile karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

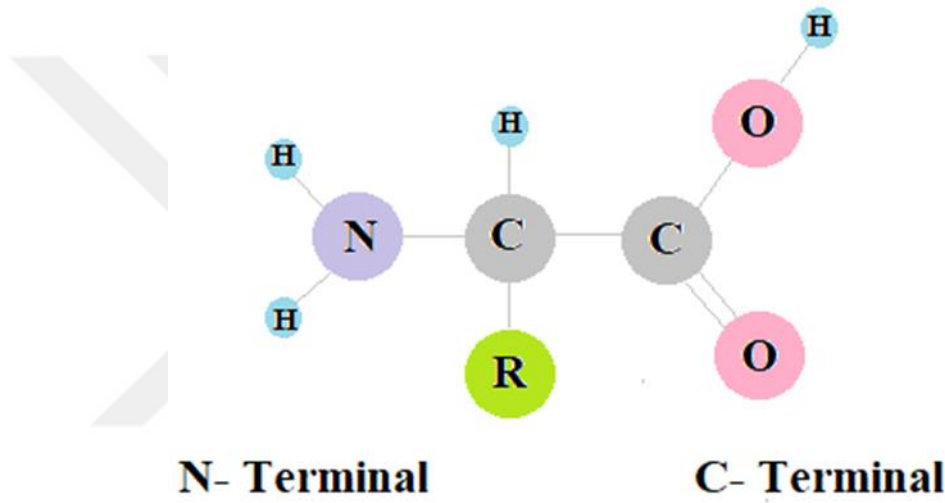
Canlı organizmaların canlılığını sürdürme ve gelişmesi için tüm bilgileri barındıran DNA, antikanser ilâç geliştirme çalışmalarında hedeflenmektedir. Etkin yeni ilâçların elde edilebilmesinde etken maddelerin DNA ile bağlanma çalışmalarının önem arz ettiği ve bu bağlanmanın birçok durumda DNA kesme için önemli olduğu bilinmektedir. Kanser çalışmalarında tümörlerin yerleşim mekanizmasının değerlendirilmesinde önemli bir etkisi vardır [21-23]. Bu doğrultuda, deneysel olarak YKT tripeptidinin DNA'ya bağlanma ve DNA'yı kesme aktiviteleri belirlenmiştir ve teorik DNA doking (kenetlenme) sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Bu tez çalışması YKT tripeptidinin moleküler modelleme çalışmaları, antikanser özellikleri ile terapötik amaçla kullanım potansiyeli yüksek olan YKT yüklü nanopartikül sentezleri ve karakterizasyon çalışmaları, YKT'nin DNA bağlanma-kesme aktivite çalışmaları ve üç farklı kanser hücre hattı üstünde sitotoksosite çalışma sonuçlarının elde edilmesi bakımında özgün bir çalışmadır. Hem teorik hem de deneysel birçok yöntemi bir arada bulunduran ve multidisipliner nitelikte olan bu tez çalışması içeriği ile literatüre önemli katkı sunacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PEPTİDLER

Amino asitler, aynı karbona bağlı (alfa karbon olarak bilinir) amino grubu, karboksil grubu, hidrojen ve her bir amino asidin kendine has olmasını sağlayan bir değişken yan gruptan (R) oluşur. Her amino asit merkezde alfa karbonu olarak bilinen karbon atomuna bağlı hidrojen, amino ve karboksil grupları ile onları özel yapan yan grubun bağlanması ile oluşmaktadır [24].

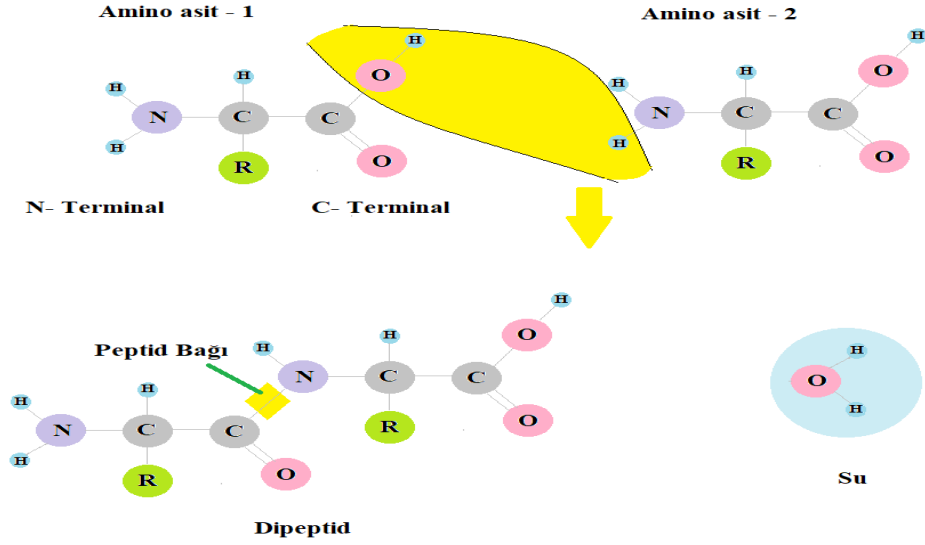


Şekil 2.1: Amino asidin genel yapısı.

Tüm yaşam formları için önemli olan amino asitler, hayati öneme sahip moleküllerin oluşmasında rol oynar. Genlerin kontrolü altında protein sentezi için canlı hücrelerde kullanılan yirmi (20) amino asit özel bir kategoridedir. Peptidler ve proteinler, canlı organizmalarda çok çeşitli roller oynarlar ve bir dizi özellik sergilerler (bazı küçük peptidlerin güçlü hormonal aktivitesinden yapısal desteğe ve çözünmeyen proteinlerin gösterdiği organizma için korumaya kadar) [25].

Peptid bağ oluşumu, iki amino asit bileşeninin birbirlerine bir peptid bağı ile bağlanması ve bir su molekülünün çıkışı ile meydana gelmektedir [26]. Çıkan su molekülü birinci amino asidin karboksil grubundaki oksijen ve hidrojen atomları (OH) ile ikinci amino asidin amino grubundaki bir hidrojenin (H) birleşmesi ile meydana gelir. İki amino asidin peptid (amid) bağı ile bağlanması ile ortaya çıkan yapı dipeptid olarak adlandırılırken, üç amino asidin peptid

bağları ile bağlanması ile ortaya çıkan yapı tripeptid olarak adlandırılır. Bu adlandırma amino asit sayısının artması ile pentapeptid, oligopeptid, polipeptid veya protein gibi farklı isimlerle adlandırılmaktadır. Tipik olarak, peptidler proteinlerden daha küçük ve 5000 Da'dan az moleköl ağırlığına sahiptirler [27]. Di, tri, penta gibi isimlendirilen peptidlere genel olarak oligopeptid de denilmektedir. 20 ile 50 arası amino asit sayısına sahip moleküllere ise polipeptid adı verilmektedir. Proteinler ise 50'den daha fazla amino aside sahiptirler [28]. Peptidler kendilerine has farklı konformasyonel yapılara sahip çeşitlendirilmiş yapılardır. Genellikle benzersiz 3 boyutlu konformasyonlar ile katlanırlar. Peptidlerin ve bunların oluşturduğu proteinlerin biyolojik fonksiyonları, bu moleküllerin yapılarıyla doğrudan ilişkilidir ve bu nedenle, yapılarında meydana gelebilecek herhangi bir değişim işlevlerini önemli ölçüde etkileyebilir. Onlarca amino asitten meydana gelen proteinlerin yapıları 4 sınıfta değerlendirilir. Birincil yapı, belirli amino asitlerin belirli sayı ve diziliş sırasına göre peptid bağları ile birleşmesi ile oluşan doğrusal dizilerdir. İkincil yapı, peptid yapısı içinde bulunan elektronegativitesi yüksek atomlar ve bunlara bağlı hidrojenler aracılığıyla oluşan alfa helix, beta sheet ve sarmal yapılardır. Üçüncül yapı, disülfür bağları, yan zincir etkileşimleri ve çevre ile etkileşimlerin etkisi ile bükülen peptidlerin kendi üstüne yumak gibi katlanması ile oluşur. Dördüncül yapı ise, üçüncül yapıdaki yapıların monomer şekillerinin hidrojen bağları, Van Der Waals etkileşimleri ve iyon çekmeleri etkisi ile polimerize olmaları ile oluşur. Peptidlerin 3 boyutlu yapıları güçlü yapı-aktivite korelasyonu ile ilişkilidir. Peptidlerin biyolojik özellikleri içindeki amino asitlerin tipi, miktarı ve sekansı ile ilişkili iken, bağlanma davranışları ikincil yapıları ile ilişkilidir [27,29].



Şekil 2.2: Peptid Bağ Oluşumu.

2.1.1. Peptid Yapılarının İlaç Geliştirmedeki Önemleri

Benzersiz bir farmasötik bileşik sınıfı olan peptidler, farklı hastalık tiplerinde terapötik müdahaleler için önemli fırsatlar sunmaktadır. Biyoaktif peptid yapıları, antikanser, antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar, immünomodülatör, antidiyabetik gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteleri tetikleyebilme yeteneğine sahiptir [1-4]. Günümüzde FDA tarafından da onay alan terapötik peptidler kanserlerden bulaşıcı hastalıklara kadar farklı hastalık alanlarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır [5]. Bazı biyoaktif peptid yapıları, canlılarda birden çok fizyolojik yanıtı tetikleyebilir ve çok fonksiyonlu yani multifonksiyonel biyolojik yapılar olarak adlandırılır. Çok fonksiyonlu peptidler ilaç geliştirme çalışmaları için önemli adaylardır, çünkü birden çok semptom gösteren multisemptom hastalıkların hedeflenmesinde kullanılabilir [27]. Peptidlerin modifiye edilebilir özellikleri ile birlikte güçlü bağlanma afinitesi, düşük immünojenisite, üretim maliyetinin düşüklüğü, yüksek stabilizasyon ve güvenlik açısından pozitif yönleri ilaç molekülü olabilmesi konusunda önemli adaylar olduğunun göstergesidir [3,6,30]. Ayrıca, düşük biyobirikim özellikleri sebebiyle, memeli sistemlerdeki hücre ve dokularda birikmezler. Bu da sistemik sitotoksitenin azalmasına sebep olabilir [31]. Memelilerin vücudunda bulunan 600 tip proteaz peptidlerin kolayca biyolojik olarak parçalanmasını sağlar [32]. Peptidlerin amino asitlere ayrışması, vücut metabolizması için gerekli olan sentezler için kullanılabilir.

2.1.2. YKT Tripeptidi

YKT tripeptidi yapısında tirozin, lizin ve treonin amino asitlerini barındıran bir tripeptiddir. Tirozin, amino asidi polar yan zincire sahip esansiyel olmayan bir amino asittir. Tirozin amino asidi, özellikle dopamin ve norepinefrin gibi plazma nörotransmitterlerinin seviyelerini arttıran bir nörotransmitter öncüsüdür [9,10]. Ayrıca, tirozin antioksidan özellik gösteren amino asitler arasında yer alır [11,12]. Lizin amino asidi pozitif yüklü amino asitlerden biri olan antioksidan özelliğe sahip [12] esansiyel bir amino asittir. Lizin amino asidi antiviral etkiye sahip olup, dudakta uçuk oluşmasına sebep olan herpes simplex virüsünü (HSV) inhibe edici özelliğe sahiptir [13]. Ayrıca poli-lizin yapıları antimikrobiyal ve antitümör özellikler göstermektedir [33]. Treonin amino asidi polar amino asitler sınıfına dahil, esansiyel bir amino asittir. Treonin, apoptosisin inhibe edilmesinde rol oynayan bir amino asittir [14]. Müsin sentezi ve bağırsak bariyer bütünlüğünün korunmasında önemli bir yere sahiptir [34,35]. Treonin içeren peptidler antibakteriyel özelliğe sahiptir [15]. Yeni doğan bebeklerde bol miktarda bulunan bu amino asit, vücudun protein dengesini korumasına yardım ederek normal büyümeye yardımcı olur. Ayrıca, kardiyovasküler, hepatik, merkezi sinir ve bağışıklık sistem fonksiyonlarını destekler. Kolajen, elastin ve kas dokusunun üretiminde gerekli olan glisin ve serin amino asitlerinin sentezi için gereklidir [36]. YKT (Tyr-Lys-Thr) tripeptidi içinde bulunan Tyr-Lys dipeptidi lösemik T ve B hücre hatlarının nekrozuna sebep olmaktadır [16,17]. Ayrıca analjezik etkisinde olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [18]. YKT tripeptidi yapısında bulunan amino asitlerin tüm olumlu etkilerine rağmen prostat kanseri etiyolojisi ile ilişkilendirilmiştir [20].

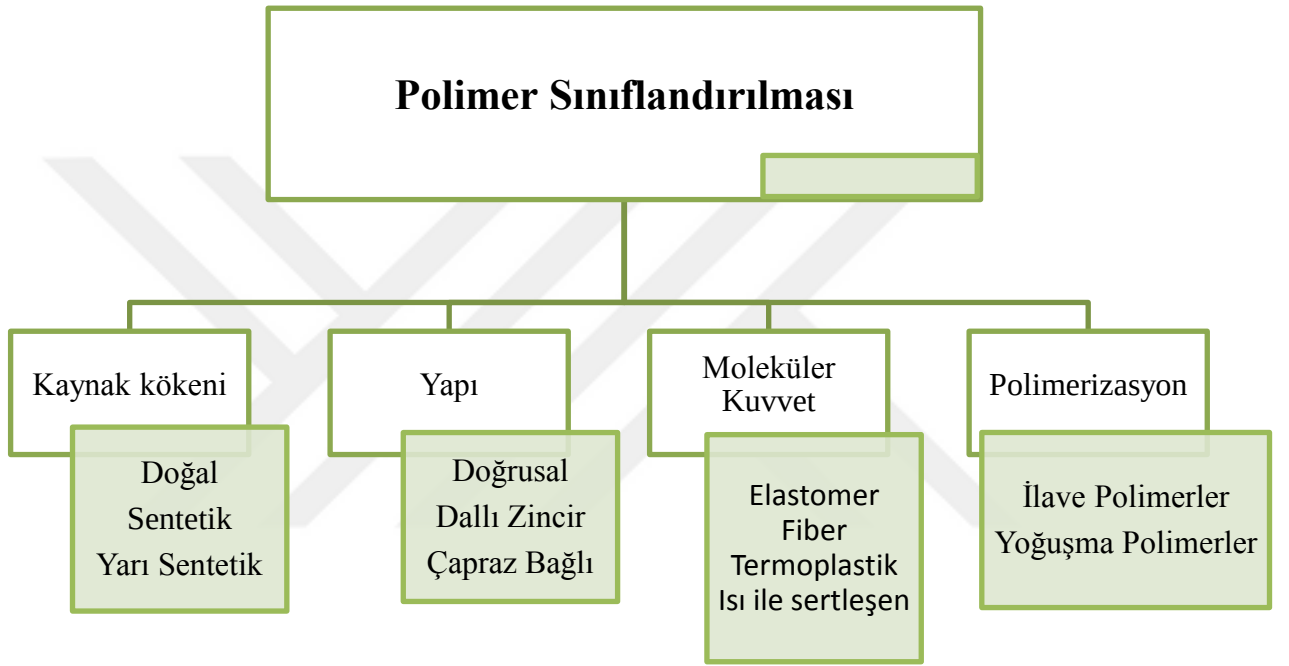
2.2. POLİMERLER

Polimerler, tekrar eden monomerik yapılardan meydana gelen yapılardır. Polimerlerin katı formları parçacıklar oluşturabilirken, sıvı formları akış özelliğini değiştirebilir [37]. Çoğu polimer bir hidrokarbon omurgasından meydana gelir ki bu karbonun dört değerlikli olması sebebiyle mümkün olan uzun bağlı bir karbon ve bunlara bağlı hidrojenler zincirinden oluşur. Karbon dışında başka elementlerinde uzun zincirler oluşturarak polimer oluşturdukları bilinmektedir. Polimerler doğal yollar ya da insan yapımı ile elde edilebilir. Farklı fiziksel/kimyasal özellikler taşıyan polimer yapıları, polimeri oluşturan monomerlerin polimer zinciri oluşturmak için reaksiyona sokulduğu polimerizasyon işlemi ile elde edilir. Biyolojik

olarak, neredeyse tüm makromoleküller polimeriktir veya büyük polimerik zincirlerden oluşur [38].

2.2.1. Polimerlerin Sınıflandırılması

Farklı davranışlara ve geniş uygulama alanlarına sahip olan polimerler kendi içinde sınıflandırılırlar.



Şekil 2.3: Polimer Sınıfları.

Kaynak kökenine göre üç sınıfa ayrılan polimerler doğal olabileceği gibi, sentetik veya yarı sentetik de olabilir. Doğal polimerler, bitkilerden ve hayvanlardan elde edilebilen polimerlerdir. Proteinler, selüloz, kitosan, kauçuk gibi malzemeler doğal polimerlerdendir. Sentetik polimerler, insan yapımı olup, plastik en yaygın bilinen ve kullanılanıdır. Yarı sentetik olanların yapım aşamasında doğal polimerlerden yararlanılır. Ancak daha fazla kimyasal modifikasyona maruz kalırlar. Selüloz nitrat ve selüloz asetat bu tipteki polimerlerdendir. Yapısal olarak üç sınıfta toplanan polimerler, uzun ve düz zincirli (doğrusal), doğrusalların dallanması ile dallı zincirli ve birkaç fonksiyonlu monomerlerin oluşturduğu çapraz bağlı olarak tanımlanır. Moleküler kuvvete göre sınıflandırma zayıf etkileşim kuvvetlerine sahip kauçuk benzeri katılar olan elastomerler, güçlü etkileşim kuvvetlerine sahip fiberler, orta çekme kuvvetine sahip termoplastikler ve geliştirilmiş kimyasal ve ısı direnci sağlayan ısıyla sertleşen polimerler

olarak dört kategoride yapılır. Polimerizasyon şekline göre ise polimerler ikiye ayrılır. İlave polimerler, yapısında ikili (=) ya da üçlü bağlar ($\equiv$) ihtiva eden monomerlerin birbirine eklenmesi ile meydana gelen polimerlerdir. Bu polimerizasyon tekniğinde monomer yapı içindeki ikili, üçlü bağlar açılarak art arda gelen monomerlerin kovalent bağ oluşturmaları sağlanır. Yoğuşma polimerler elde etme tekniğinde ise farklı monomerler arası yoğunlaşma işlemi uygulanır [39].

2.2.2. Polimer Yapıların İlaç Geliştirmedeki Önemleri

Polimerler, terapötik ajanların kontrollü salımı, hidrofilik ve hidrofobik ilaçların kontrollü salımı, geleneksel ilaçlara göre daha iyi dolaşım süresi ile ilaç geliştirme ve uygulama çalışmalarında önemli bir yer edinmiştir. İlaç formülasyonlarının geliştirilmesi ve vücuda ilaç dağıtımı ile ilgili yapılan son dönemdeki çalışmalar, farklı biyolojik fonksiyonları uygulamak için yüzeysel ve hacimsel özellikleri uygun olan polimerler tasarlanarak yürütülmektedir. İlaçlarla ilgili çalışmalarda kullanılan polimerik yapıların en önemli özellikleri biyolojik olarak uyum ve bozunma kabiliyetine sahip olmaları ve toksik yan etkiler göstermemesidir. Geliştirilen bazı nanopartiküllerin kan beyin bariyerini geçebildiğinin belirlenmesi, birçok hastalığın tedavi sürecinde umut verici önemli bir tespittir. Antikorlar ya da özel biyobelirteçler ile konjugasyon işlemi gerçekleştirilen polimerik sistemler, özellikle kanserle ilgili çalışmalarda moleküler hedeflerin saptanmasına yardım eder. Biyouyum özelliğine sahip polimerler, iyi tasarlanmış moleküler yapıları sayesinde ilaç dağıtımında güvenlik açısından önemli elemanlardır. İlaç taşıma çalışmalarında kullanımı uygun polimerlerin, toksik ve immünojenik etki göstermemesi ve suda çözünbilme özelliklerini taşıyor olması gerekir [40,41]. Polimer ilaç taşıyıcılar ilaçların hedef bölgeye ulaşmadan bozulmasını önlemek ve dolaşım süresini uzatmak gibi görevler üstlenmektedir. İlacın taşınma ve salım süreçlerinden sonra polimerin vücuttan atılması da bir diğer önemli husustur. Parçalanıp toksik olmayan ve bağışıklık yanıtı üretmeyecek özelliğe ya da parçalanmıyorsa vücudun herhangi bir bölgesinde birikmeye sebep olmama özelliğine sahip olması gerekir [41]. Bu tip malzemeler mikro ve nano boyutlarda mikroküre, mikrokapsül, nanokapsül ve nanopartikül gibi önemli elemanlarının elde edilmesinde kullanılır.

Biyopolimerler genellikle doğal kaynaklardan ya da ham petrolden üretilen malzemelerdir. Dört kategoride sınıflandırılabilir. Birincisi polisakkarit gibi doğal maddelerden ekstrakt yoluyla, ikincisi biyotürevli monomerlerden kimyasal sentez yoluyla, üçüncüsü

mikroorganizmalar tarafından ve dördüncüsü ham petrolden üretilebilir [42]. Nanopartikül oluşturmak için seçilecek polimerin bazı özellikleri özellikle taşıyor olması gerekir.

Tablo 2.1: İlaç Dağıtımında Kullanılan Polimerlerin ve Bunlardan Üretilen Nanopartiküllerin Özellikleri [43].

İlaç Dağıtım Sistemlerinde Kullanılan Polimer Özellikleri	İlaç Dağıtımı İçin Üretilmek İstenen Nanopartiküllerin Taşıdığı Özellikler
☐ Toksik, Trombojenik, İmmunojenik, İnflamatuar, Trombosit Agregasyonu ve Nötrofillerin Aktivasyonu Olmamalı ☐ •Biyoparçalanabilir ve Geri dönüşümlü ☐ •Retiküloendotelial sistemden kaçınabilme ☐ •Uzun dolaşım süresi ☐ •Birçok moleküle uygulanabilir ☐ •Ölçeklenebilir ve ucuz üretim süreci	☐ Nanopartikülün boyutu ☐ •Polimer içinde kapsüllenebilen ilacın kendine has özellikleri ☐ •Yüzey özellikleri ve işlevlilik ☐ •Biyoyum ve biyobozunma ☐ •Elde edilen ürünün ilaç salım profili

Tablo 2.2: İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler.

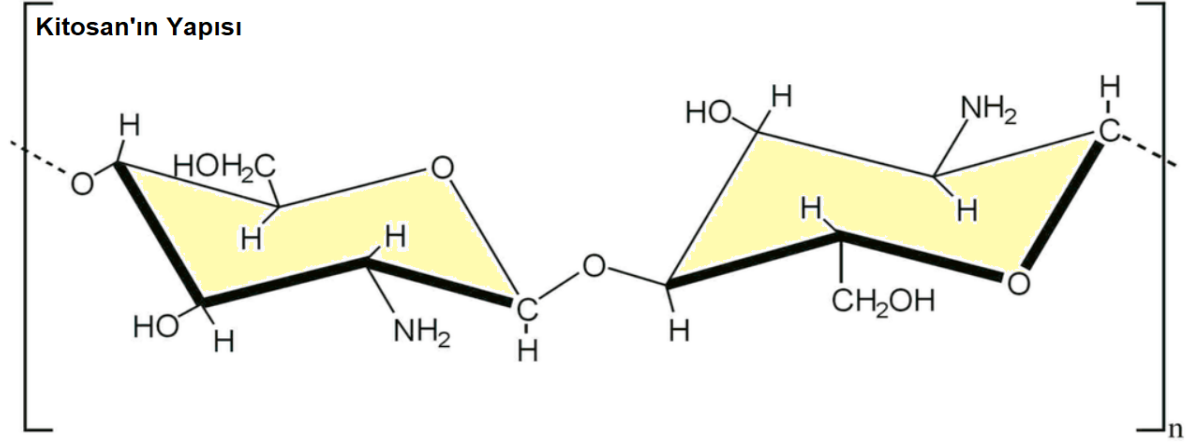
Polimerler	Polimer Grupları	Numuneler
Doğal Polimerler	Proteinler	Albumin, Jelatin
	Polisakkaritler	Aljinat, Kitosan, Dekstran
Sentetik Polimerler	Önceden Sentezlenenler	Polianhidrit, polikaprolakton (PCL), polilaktik asit, polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)
	Nanopartiküllerin hazırlanması sırasında sentezlenenler	Polisiyano-akrilat (PACA), polibütill-siyano-akrilat(PBCA)

2.2.3. Kitosan

Kitosan kitin içindeki asetat grubunun uzaklaştırılması ile elde edilen doğal toksik olmayan önemli bir kitin türevi ve biyolojik olarak uyumlu bir polimerdir [44]. Doğada bol miktarda bulunan kitosan ve türevleri, toksisitesi, biyolojik olarak bozunurluğu ve uyumluluğu, anti-mikrobiyal ve anti-fungal aktiviteleri nedeniyle birçok endüstriyel alanda (ilaç, gıda, kozmetik, tekstil vb.) büyük ilgi gören polimerlerdendir [45,46].

Kitosan molekülü yapısı içinde bulundurduğu OH ve NH₂ grupları ile kararlı olmayan serbest radikaller ile reaksiyon gerçekleştirerek kararlı duruma getirip, metal iyonlarını bağlaması sebebi ile antioksidan aktivitesiyle ilişkilidir [47,48]. pH değerinin 6'nın üstünde olması durumunda kitosanın çözünürlüğünün zayıf olması sebebiyle, anti-mikrobiyal özelliği ancak asidik çözeltilerde görülmektedir [49].

Kitosan nanopartikülleri de anti-mikrobiyal özelliğe sahip malzemelerdir. Çevreye ve insana zarar vermemesi sebebiyle tarım, su kirliliği, antimikrobiyal ajan, biyolojik aktif bileşiklerin enkapsülasyonu, antioksidan aktivite, kanser teşhisi, doku mühendisliği, ilaç dağılımı, yara iyileştirme gibi farklı alanlarda tercih edilirler [45,50]. İlaç verme uygulamaları oral yol ile, nazal, parenteral ya da transdermal yol ile gerçekleştirilebilir. Ayrıca implant ve gen iletimi çalışmalarında da kullanılabilir [51]. Kitosan ve katyonik türevlerinin mukoadesyon özelliği gösterdiği ve nötral pH değerinde ilaçların adsorpsiyonunu olumlu yönde arttırdığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [52,53]. Kitosan, böcek ilacı ve metal kirletici maddelerin uzaklaştırılması için su arıtımında kullanılabilir [54]. Hidrofobik, hidrofilik ya da bakteri olmasına bakılmaksızın herhangi bir bileşen kitosan nanopartikülleri yardımıyla kapsüllenebilir ve proteinler gibi makromoleküllerin biyoaktivitesini kapsüllenme sırasında korur [45,55].



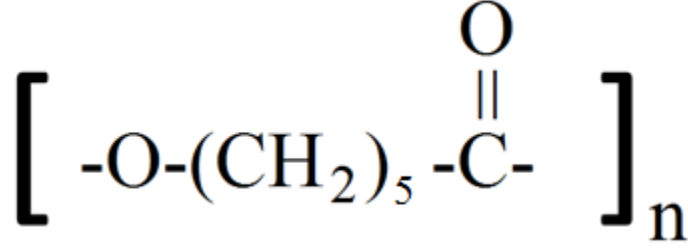
Şekil 2.4: Kitosan polimerinin yapısı.

Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması, pozitif yüklü kitosan ve negatif yüklü tripolifosfat arasındaki iyonik bir jelleşme etkileşimine dayanır. Nanoparçacık süspansiyonunun her bir parçasının ortalama büyüklüğü ve büyüklük dağılımı Zetasizer analizi kullanılarak analiz edilebilir.

2.2.4. Polikaprolakton (PCL)

Sentetik bir polimer olan polikaprolakton (PCL), yavaş bozulma süresi, düşük toksisite, hidrofobik yapı, oda sıcaklığında yüksek oranda çözünebilirlik, düşük bir erime sıcaklığı ve karışım uyumluluğu göstermesi sebebi ile biyomedikal uygulama alanlarında tercih edilmektedir. Ayrıca, birçok biyolojik ilaca mükemmel uyumluluk sağlayan ve biyolojik olarak emildikten sonra vücuttan tamamen atılabilme özelliği taşıması kontrollü ilaç salım sistemlerinde tercih edilmesini sağlar [56,57].

Polikaprolakton (PCL), ilaç taşıma sistemlerinde ve tıbbi araçlarda kullanımı için FDA tarafından onaylanmış ve CE sertifikasına sahip bir polimerdir [56]. PCL'nin, kardiyovasküler uygulamalarda kullanılan malzemelerde [58], mesane tümörü çalışmaları [59], meme kanseri çalışmaları [60,61], kontak lens çalışmaları [62], hipertansiyon çalışmaları [63] gibi birçok farklı tıbbi alanda uygulamalarına rastlamak mümkündür. Ayrıca, çevre, paketlenme, yiyecek gibi tıbbi olmayan farklı alanlarda da PCL kullanımına mevcuttur [56].



Şekil 2.5: Polikaprolakton polimerinin yapısı.

2.3. NANOTEKNOLOJİ VE NANOPARTİKÜLLER

Nano boyutta ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$), kendine has özellikler barındıran malzemelerin geliştirilmesi [64], bilimsel olarak hastalıkların teşhis/tedavi süreçlerine bakış açısının değişmesini sağlamıştır. Önemli teknolojik bir yenilik olan nano-ilaçlar, çeşitli hastalıklar için fayda sağlayıcı potansiyele sahiptir [65]. Biyolojik bir ortama giren nanopartikülün yüzeyi, çeşitli biyomoleküller (tipik olarak proteinler) tarafından hızlıca örtülür. Proteinlerin bu adsorpsiyonu, nanopartiküllerin özelliklerini (büyüklük, stabilizasyon ve yüzey) etkiler ve dağılım, toksisite gibi fizyolojik tepkilerini belirleyen bir kimlik sağlar [66]. İlaç dağıtımında ciddi faydaları bulunan nanopartikül sistemleri, birçok hastalığın tedavi sürecinde kullanılmak üzere tasarlanıp, test edilmişlerdir. Kontrol ile karşılaştırıldığında nanopartiküllerin hedeflenen bölgeye daha fazla ilaç taşıdığı tespit edilirse, ilaçların dozları azaltılarak istenmeyen yan etkiler minimuma indirilebilir. Ek olarak, nanopartikül formülasyonları ile, nanopartiküllerin suda zayıf çözünen etken maddelerin başka bir maddeye gerek kalmadan çözünürlüğünü arttırması da etkinlik açısından olmasa bile güvenlik açısından önem arz etmektedir. Genel olarak özetlenecek olursa, nanoteknolojinin kullanıldığı nano-ilaç çalışmalarında ilaç dağıtım sürecinde biyoyararlanım ve güvenlik öncelikli öneme sahiptir [64].

2.3.1. Kanser Çalışmalarında Nanoteknoloji Tabanlı İlaç Uygulamaları

Kanser, normal hücrelerin, genellikle kanser öncesi bir lezyondan kötü huylu bir tümöre ilerleyen çok aşamalı bir işlemde tümör hücrelerine dönüşmesinden ortaya çıkar. Kanser oluşumunda genetik faktörler ile birlikte UV, tütün dumanı, çeşitli enfeksiyonlar gibi farklı karsinogen sınıflarındaki dış etkenlerin katkısı vardır. DSÖ'nün 2018 kayıtlarına göre ölümlerin 1/6'sı kanser kaynaklıdır [67].

Kanser tedavisinde günümüzde kullanılan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale yöntemlerinde tümörlü dokunun yanı sıra sağlıklı dokunun da zarar görebileceği bilinmektedir. Örneğin, kemoterapide kullanılan ilaçlar, kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelerin ölümüne neden olabilmektedir. Oral ilaçların metabolik yollardan etkilenmesi farmakokinetiği etkiler. Bu sebeple, yüksek dozda alınması gereken ilaçlar vücutta istenmeyen yan etkiler meydana getirebilir [68]. Bu yan etkilerin minimuma indirilmesi ya da kaldırılması için yeni tedavilerin geliştirilme çalışmaları günümüzde öne çıkan konulardandır.

Tedavi sırasında verilen ilaçlardan en iyi şekilde yararlanmak ve olumsuz etkilerden kaçınmak için genelde nanopartiküllere dayanan nanoteknolojik çalışmalar yapılmaktadır [65]. Anti-kanser ilaçların nano taşıyıcılar yardımıyla hedeflenmesi ile yeni tedavi yöntemlerinin oluştuğu literatür çalışmalarında görülmektedir [69,70].

Nanopartiküller, içerisinde fonksiyonel gruplar bulunduran ve terapötik maddelerin bağlanmasına uygun yüzey alanına sahip yapılardır. Ayrıca, hastaların kendi moleküler profil yapılarına uygun teşhis-tedavi için kişisel onkolojiye imkân sağlamaktadır [71].

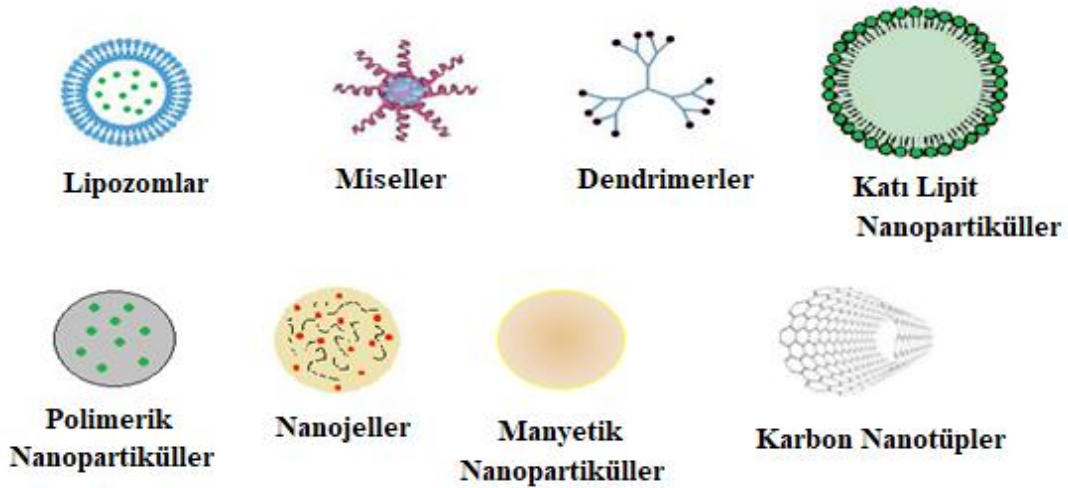
2.3.2. Nano Boyutta İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknolojinin özellikle sağlık alanında uygulanmaya başlaması ile, vasküler sistemde dolaşımı kolay olan küçük boyutlu, biyobozunur ve toksik etkisi düşük nanotaşıyıcı olarak adlandırılan sistemler yapılan araştırma çalışmalarında geliştirilmiştir [72]. Nanomalzemelerden elde edilen nanotaşıyıcılar, hidrofobik ya da hidrofilik olmasına bakmaksızın terapötik maddelerin taşınmasında görev alırlar [73]. Nanotaşıyıcılar taşıma işlemi için farklı mekanizmalara sahiptir ve bunlar; elektrostatik, hidrofobik veya hidrojen bağları ile nanotaşıyıcı içine kapatılarak salıverilme ve kovalent veya elektrostatik etkileşim ile etkin maddenin nanotaşıyıcı yüzeye konjugasyonudur [72].



Şekil 2.6: Nano taşıyıcıların tasarımı için düşünülen özellikler.

Tedavi edici etkinliğin artırılmasında kullanılan ilaç taşıma sistemleri, küçük bileşikler, peptidler, nükleik asitler vb. moleküllerin taşınmasını kolaylaştırmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler arasında lipozomlar, miseller, polimerik nanopartiküller vb. dağıtım tipleri bulunmaktadır.

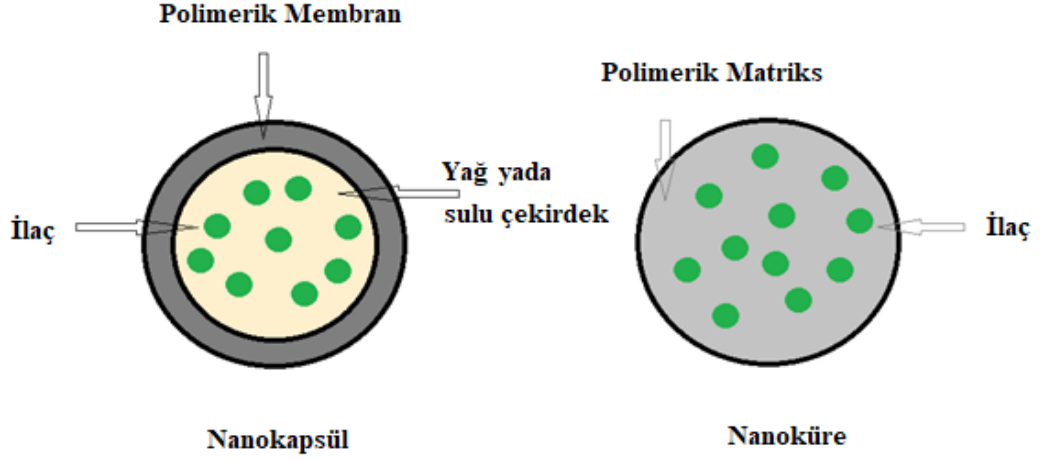


Şekil 2.7: Nanotaşıyıcı sistemler [74].

Lipozomlar hidrofilik ya da hidrofobik olabilen ilaç moleküllerinin kaplanmasını sağlayabilen, fosfolipit bileşenli, içinde ve tabakalar arasında sulu faz bulunduran küresel nanovesiküllerdir. [72,75,76]. Miseller, amfifilik kopolimerlerden oluşan yapılardır. Taşıdığı etkin maddenin

korunmasını ve hastalık bölgesinde salınmasını sağlayabilecek kadar uzun süre vücutta kalabilirler [77]. Tek moleküllü miseller olarak da adlandırılan dendrimerler, sentezinin kolaylığı, stabilitesi, boyutlarının ayarlanabilirliği ve yüklenecek madde kapasitesinin yüksek olması sebebi ile ilaç taşıma sistemlerinde tercih edilen yapılardandır. Bir diğer tercih edilen taşıyıcı sistem ise nanojellerdir. Dendrimerler gibi yüklenecek etkin madde kapasitesi yüksek ve stabil yapıya sahip sistemlerdir. Oluşum mekanizmaları özel poli-anyon ve katyon özellikli polimerlerin bağlanmasına dayanır. Sitotoksik olmayan, modifiye edilebilir bir diğer ilaç taşıma sistemi ise karbon atomlarından oluşan karbon nanotüplerdir. Nanotüpler, ilaç taşıma sistemleri dışında aşı verme sistemlerinde de uygulama alanına sahiptir. Adından da belli olduğu gibi metal ve metal oksitlerden oluşan manyetik nanopartiküller de teşhis/tedavi süreçlerinde kullanılan nano yapılardır. Katı lipid nanopartiküller, ilaç ve gen taşımada kullanılabilen, lipid, steroid, mum gibi maddelerden oluşan nano sistemlerdendir. Suda çözünmesi zor olan etkin maddeleri enkapsüle edip dış etkilere karşı koruma, hedeflendirme ve hedef bölgede kontrollü salımı sağlama gibi roller üstlenir [72,76].

Nano taşıyıcı sistemler arasında yer alan bir başka sistem ise polimerik nanopartiküllerdir. Bu yapılar nanokapsül ya da nanoküre formunda olabilirler. Nanokapsül ve nanoküre arasındaki fark, birinin etkin madde yüklü iç boşluğa sahip bir kabuk olması diğerinin ise polimer matriks içine gömülü etkin madde içeren bir katı polimer olmasıdır [78]. Kitosan, polikaprolakton gibi biyolojik olarak uyumlu ve bozunur doğal ya da sentetik polimerlerden oluşmaktadırlar. Kontrollü ilaç salımı çalışmalarında etkinliğin arttırılması ve toksikliğin engellenmesi için kullanılan terapötik potansiyeli yüksek yapılardır [79,80].



Şekil 2.8: Polimerik Nanopartikül Tipleri.

Polimerik nanopartiküllerin avantajı, partikül boyutlarının küçük olması ve buna bağlı olarak hücre içine girmelerinin kolaylaşmasıdır. Etkin maddenin istenilen bölgeye taşınıp, orada kontrollü salımına aracılık etmeleri de dikkate değer avantajlarındandır. Yapılarından dolayı, vücutta stabilitesi yüksek ve biyoparçalanabilir olup parçalandığında toksik olmayan maddelerdir [81,82].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN MALZEME VE EKİPMANLAR

Tablo 3.1: Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzeme ve Ekipmanlar.

Malzeme	Ekipman
YKT (Bachem-Cas No: 155943-09-2-Cat No: H-5175)	Eppendorf Research Mikropipet (1000-5000 µl)
Asetik asit (Merck-Cas No: 64-19-7-Cat No: 1000562500)	Eppendorf Research Mikropipet (100-1000 µl)
Kitosan (Sigma Aldrich-Cas No: 9012-76-4- Cat No: 448869)	Heidolph MR 3000 Manyetik Karıştırıcı
TPP (Sigma Aldrich-Cas No:7758-29-4-Cat No: 238503)	HETTICH Zentrifugen – UNIVERSAL 320 R Santrifüj Cihazı
PCL (Sigma Aldrich-Cas No: 24980-41-4-Cat No: 440744)	Sartorius CP 225D Hassas Terazi
PVA (Sigma Aldrich-Cas No: 9002-89-5-Cat No: 341584)	Millipore Direct – Q & Direct –Q UV Ultrapure Su Cihazı
DCM (Sigma Aldrich-Cas No: 75-09-2-Cat No: D65100)	LEEC Precision 50 Culture Safe CO2 Etüv
PBS (Fosfat tamponu-Tablet)(Sigma Aldrich-Cat No:P4417)	Shimadzu UV-1280 UV-Vis Spektrofotometre
KBr Tuzu (Sigma Aldrich-Cas No: 7758-02-3)	Witeg Çalkalamalı Su Banyosu
Buzağı timus DNA'sı (Sigma Aldrich)	Sonikatör
Etidyum bromür (Sigma Aldrich)	Jasco 6300E FT-IR spektrometre
Tris bazı, Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), sodyum klorür (NaCl), hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck Millipore)	Jasco NRS-3100 mikro-Raman spektrometre
PBR322 Plazmid DNA, DNA merdiveni ve EcoRI enzimi (Thermo scientific)	
MLL, MCF-7 ve HeLa hücre çizgisi RPMI-1640 Ortamı, Fetal Sığır Serum, L-glutamin (Gibco)	
DMEM, deksometason ve MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolumbromide)) (Sigma Aldrich)	
Penisilin ve streptomisin (I.E. Ulagay)	

3.2. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN YÖNTEMLER

YKT tripeptidinin ve nano-ilaç formülasyonlarının karakterizasyonu için IR, Raman ve UV-Vis spektroskopisi, Dinamik Işık Saçılması (DLS) yöntemi ile de zeta potansiyeli ve boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile sentezlenen nanopartiküllerin morfolojik analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Sıvı içindeki nanoparçacıklar arasında itme ve çekme kuvvetleri zeta potansiyeli ile ilişkilidir. Zeta potansiyeli, sıvı ortamdaki nanoparçacık yüzeyinde etkili olan elektrik yükünün bir ölçüsüdür. Zeta potansiyelinin ölçümü, nanoparçacığın ayrılması ve topaklanması hakkında ayrıntılı bilgiler sunar [83].

Belirli bir yüzey yüküne sahip olan nanoparçacıkların yüzeyinin yakınındaki zıt yüklü iyonlar nanopartikülü çevreler ve artık nanoparçacık ile onun etrafını örten iyonlar ortak hareket etmeye başlar. Yüklü parçacığın etrafını saran güçlü bir iyon tabakası oluşur, bu tabakaya Stern katmanı adı verilir. Bir üst katman, iyonların hareket ettiği, yani, iyonların parçacığın hareketi ile hareket etmeye zorlandığı difüz katmanıdır. Bu katmanın dışındaki iyonlar ise serbest halde hareket edebilirler. Bu yüzeye de slipping plane yani kayma düzlemi adı verilir. Kayma düzlemindeki yük potansiyeline zeta potansiyeli adı verilir. Zeta potansiyeli, hem nanoparçacığın yüzey yapısından hem de nanoparçacığın bulunduğu ortamdan etkilenir [84,85].

Zeta potansiyeli, üstünde iki elektrot bulunan bir hücreye örneğin koyulması ile ölçülür. Elektrota bir voltaj uygulandığında, askıdaki partiküller zıt yüklü elektrota doğru hareket ederler. Parçacığın hızı voltajın bir fonksiyonu olarak bir Doppler tekniği kullanılarak ölçülür. Zeta potansiyeli, elektroforetik mobilitateye Henry denklemi ile bağlıdır (Eşitlik 3.1). Lazer ışını hücrenin içinden geçtiğinde, partiküller lazer ışını boyunca hareket ettikçe, saçılan ışığın yoğunluğu partikül hızıyla orantılı olarak bir frekansta dalgalanır. Çoklu voltajlarda parçacık hızı ölçülüp, zeta potansiyeli ölçümü için kullanılır.

$$U_E = (2\varepsilon Z f(Ka))/3\eta \quad (3.1)$$

Denklemden verilen ifadelerden U_E elektroforetik mobilitateyi, ε , dielektrik sabitini, Z , zeta potansiyelini, η , viskoziteyi ve $f(Ka)$, Henry fonksiyonunu ifade etmektedir. Fonksiyon içindeki Ka ifadesi, parçacık yarıçapının elektriksel çift tabaka kalınlığına oranıdır. Fonksiyon

değeri polar ortamdaki parçacıklar için 1.5 (Smoluchowski yaklaşımı), polar olmayan ortamdaki parçacıklar için 1 (Huckel yaklaşımı) olarak alınır.

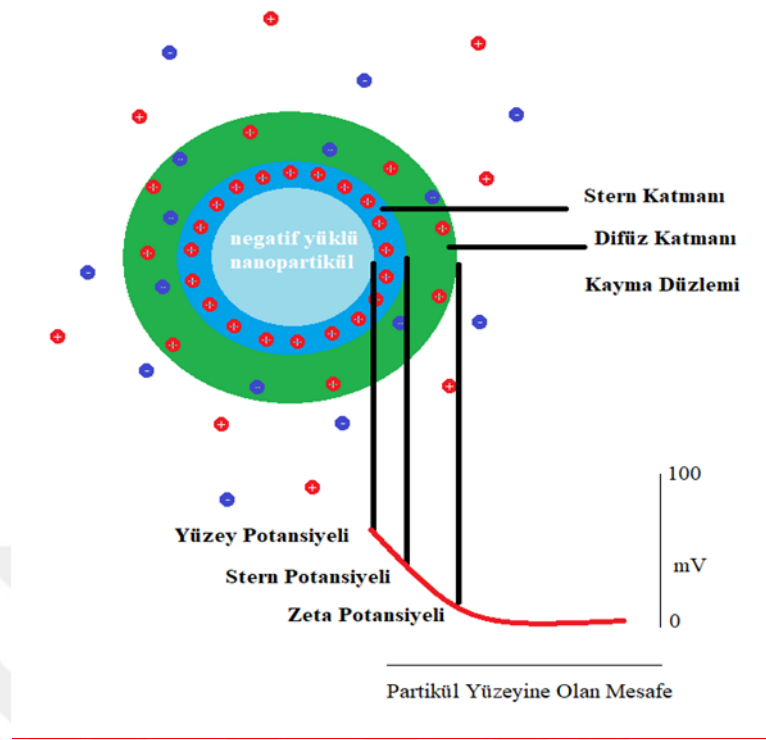
Zeta potansiyeli, belirli bir mV üstünde ise sistem kararlı demektir. Kararlı durumlarda, itme kuvveti baskın olacağı için Van der Waals çekme kuvveti itme kuvvetinden zayıf olacaktır. Bu durum da, parçacıkların bir araya gelmesine fırsat vermeyecektir. Diğer türlü toplanma ve çökelmeye meyilli demektir [84].

Parçacıkların boyutu da Zeta-Sizer ile ölçülür. Lazer ışığının örnek üzerine gönderilmesi ile ışık yansıma ve kırılma yapar. Bu yansıyan ve kırılan ışıklar dedektör yardımıyla incelenir [86]. Saçılan ışığın açısı ve şiddeti, örnekteki parçacıkların boyutları ile ilgili bilgi sağlar. Dinamik Işık Saçılması (DLS) analizinde, Brownian hareketi ölçülerek boyut ile ilişkilendirilir.

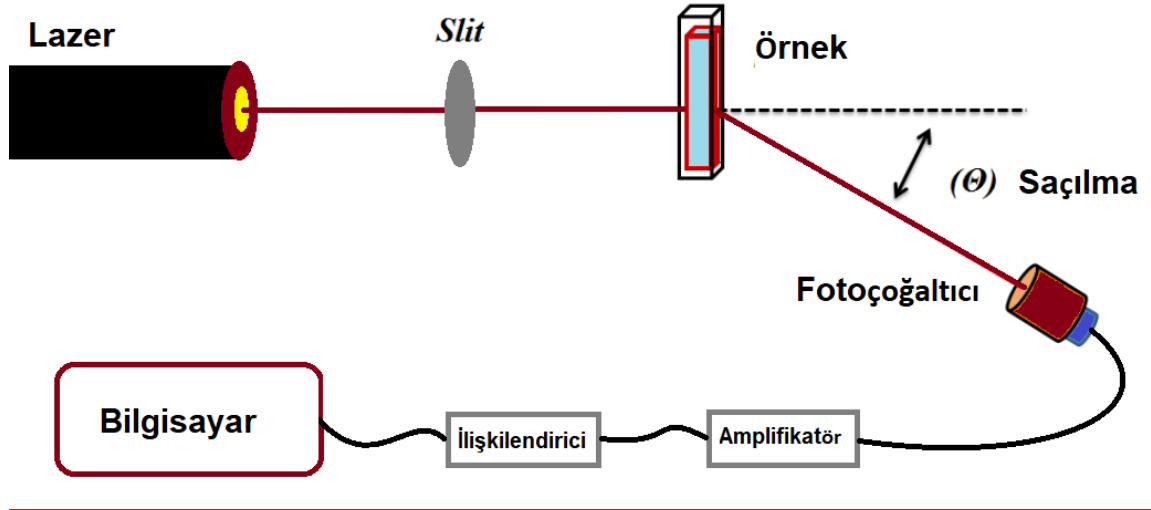
$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (3.2)$$

Denklemdaki $d(H)$ hidrodinamik çapı, k , Boltzman sabitini, T , sıcaklığı, η , vizkoziteyi ve D , difüzyon katsayısını ifade eder. Brownian hareketinin hızı difüzyon katsayısı ile ifade edilir.

Polidispersite ise zetasizer cihazından elde edilen boyut dağılımı ile ilişkili olduğundan agregasyonun (topaklanmanın) belirlenmesi ile ilgili bilgi sağlar [87]. Polidispersite indeksi (PdI), 0 ile 0.05 aralığında ise tek tane boyut, bu değerden daha yüksek olup 0.25 değerine kadar bir değerdeyse monodispers, 0.7 den büyükse çok polidispers yani agregasyonun meydana geldiği ile ilgili bilgi verir.



Şekil 3.1: Nanopartikül çevresinde zeta potansiyeli dahil farklı bölgeler.



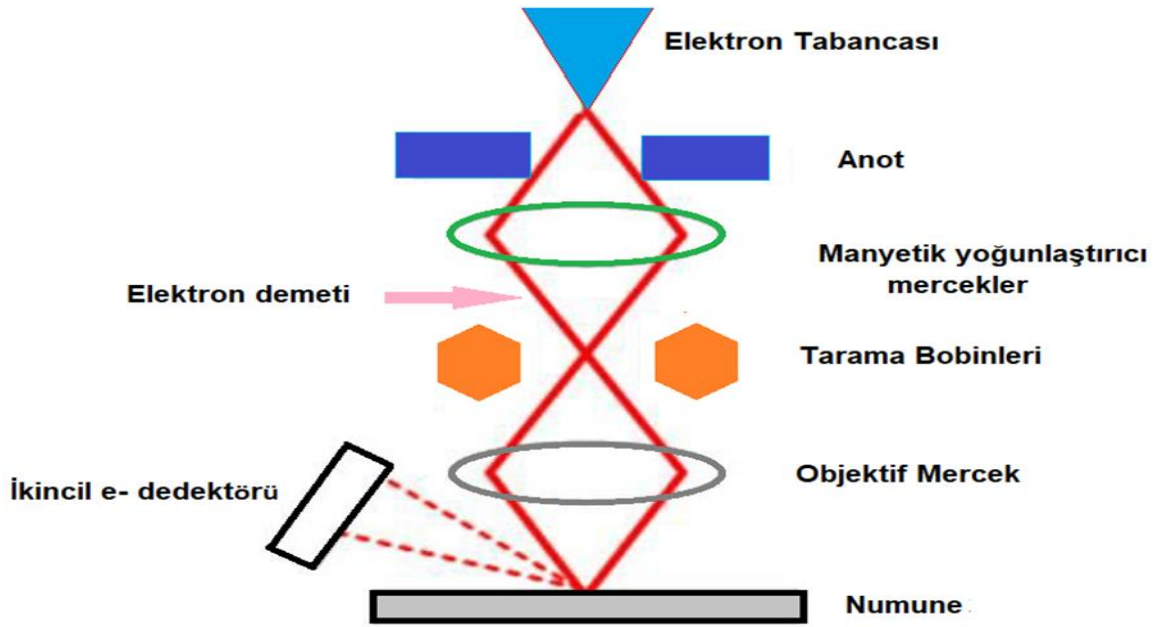
Şekil 3.2: Dinamik Işık Saçılma (DLS) için Blok Diyagram [88].

3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM odaklanmış yüksek enerjili elektron demeti kullanılarak, numune yüzeyini tarayıp morfolojik görüntülerin elde edilmesini sağlayan bir çeşit elektron mikroskobudur [89]. SEM cihazı, elektron kaynağı, elektromanyetik lenslerle elektronların hareket ettiği sütun, elektron dedektörü, numune odası ve görüntüler için bilgisayar sisteminden oluşur. Numune üstüne odaklanan ışınların numune yüzeyini belirli bir bölgesini taraması sağlanır. Elektron ve

numune etkileşimi ile bir dizi sinyal oluşur ve bu sinyaller dedektörler aracılığıyla tespit edilir [90]. Numune üstüne odaklanan elektronlar numune yüzeyine ulaştığında elastik ve inelastik etkileşimlerde bulunur. Elastik etkileşimlerde ciddi bir enerji kaybı yaşanmazken, numuneye ait atom çekirdekleri ya da aynı enerjideki kabuk elektronları ile elastik etkileşim olur. Elastik etkileşimde bulunan bu elektronlara geri saçılan elektron adı verilir, atomik ve faz farkı ile ilgili bilgiler sağlar. İnelastik etkileşimlerde ise elektron enerjisinin bir bölümünü numune atomuna verir. İyonizasyon aşamasında çıkan elektronlara ikincil elektronlar denir ve görüntüleme çalışmalarında kullanılır. Bu tip elektronların enerjileri 50 eV'dan daha azdır [91].

Bu tez çalışmasında, nanopartikül karakterizasyon aşamalarından biri olan SEM ile morfolojik görüntüleme, FEI Versa 3D- FEG HR-SEM cihazı kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 3.3: Taramalı Elektron Mikroskobu için Blok Diyagramı.

3.2.3.KIRMIZI-ALTI SPEKTROSKOPİSİ

3.2.3.1.Beer-Lambert Yasası

Beer-Lambert yasasına göre, ışığın içinden geçtiği numune ışığın absorpsiyonunu etkiler. Bir numunenin absorpsiyon spektrumu Eşitlik 3.3 tarafından hesaplanır:

$$A = \log (I_0 / I) \quad (3.3)$$

A: Absorbsiyon (Geçirgenlik)

I_0 : örneğe gelen ışın demeti şiddeti

I: örneği terk eden ışın demeti şiddeti

Absorbans, Beer yasası olarak adlandırılan bir eşitlik aracılığıyla bir örnek içindeki moleküllerin konsantrasyonu ile de ilişkilidir.

$$A = \epsilon lc \quad (3.4)$$

A: absorpsiyon

ϵ : absorbtivity (emcılık)

l: yol uzunluğu

c: konsantrasyon

Bir absorpsiyon spektrumunda bir pikin alanı ya da yüksekliği konsantrasyon ile orantılıdır. Bu nedenle, Beer yasası numunelerdeki moleküllerin konsantrasyonunu belirlemek için de kullanılabilir [92].

Transmitans spektrumlarında bir örnekten geçen ışık yüzdesini ölçen yüzde geçiş (%T) oranı aşağıdaki gibi (Eşitlik 3.5) hesaplanır:

$$\%T = 100 \times (I/I_0) \quad (3.5)$$

%T: Geçiş Yüzdesi

I_0 : örneğe gelen ışın demeti şiddeti

I: örneği terk eden ışın demeti şiddeti

Absorbans ve yüzde geçiş matematiksel olarak birbirleriyle ilişkilidir.

$$T = I/I_0 = e^{-\epsilon lc} \quad (3.6)$$

$$\log I/I_0 = \log e^{-\epsilon lc} = \log T = -\epsilon lc \quad (3.7)$$

$$-\log T = \log 1/T = \epsilon lc \quad (3.8)$$

$$A = \log 1/T = \epsilon lc \quad (3.9)$$

Kırmızıaltı radyasyon organik moleküller tarafından absorblanır ve moleküler titreşim enerjisine dönüştürülür. Radyan enerji belirli bir moleküler titreşim enerjisiyle eşleştiğinde, absorpsiyon gerçekleşir [93]. Kırmızıaltı (IR) spektrumlarının oluşabilmesi için, moleküle ait değişen bir dipol momentin olması gerekir. Spektrum grafiğinde x eksenini dalgasayısını ifade ederken y eksenini absorbans ya da transmitansı ifade eder.

3.2.3.2. Kırmızı-altı spektrometreleri

Kırmızı-altı spektrometrelerinde kaynak olarak, elektriksel olarak 1500-2000 K aralığında bir sıcaklığa kadar ısıtılabilen ve kaynağın şiddeti 5000-5900 cm^{-1} aralığında olan malzemeler kullanılmaktadır. [94]. Örneğin; Nernst-Glower çubuğu, nadir toprak oksitlerinden oluşan, sıcaklığı 1200-2200 K arasında olabilen malzemelerdir. Globar çubuğu, genellikle silisyum karbür veya kompozit bir malzeme olan seramik malzemelerden yapılan 1000 K'den fazla ısıtılabilen malzemelerdir. Modern FTIR cihazlarının hassasiyeti daha düşük kaynak sıcaklıklarının (1000 ila 1300 K) kullanılabileceği ve böylece daha uzun kaynak ömrü sağlayabilir. Akkor tel kaynağı, 1100 K'ye ısıtılan bir nikrom tel sıkıca sarılmış sarmaldır. Globar, Nernst gibi çubuklara göre parlaklığı daha uzun ömürlüdür. Cıva arkı, uzak IR bölgeler için daha uygundur. Bu cihaz, 1 atmosferden daha yüksek bir basınçta cıva buharı bulunduran kuvars kaplı bir tüpten oluşur. Tungsten Flaman lambası ise yakın IR bölgesi için uygun bir kaynaktır. Bunlar dışında, CO_2 lazer kaynağı, amonyak, benzen, etanol, azot dioksit gibi bazı önemli türlerin nicel olarak belirlenmesi için faydalıdır. Yarıiletken IR lazer kaynakları da yakın ve orta IR bölgelerinde kaynak olarak kullanılabilir.

Kırmızı-altı spektrometrelerinde, numunenin IR spektrumunu elde etmek için 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} bölgeleri arasında soğurma yapmayan KBr (potasyum bromür) ile KBr nin %1'i kadar örnek karıştırılarak 10 ton basınç altında şeffaf bir tablet hazırlanır. KBr malzemesi, örneği tutmak için ya da seyreltmek için kullanılır. Alkali halojenitler ~0.7-1 GPa basınçta preslenerek şeffaf tabletler oluşturulabilir [95]. Eğer malzeme sıvı ise, aynı cins iki tuz diski arasına bir damla damlatılarak ince bir film haline getirilir ve spektrum çekilir. En çok kullanılan disk NaCl'dür. Bu diskler CaF_2 , CsBr, AgCl'dan da yapılabilir.

Kırmızı altı spektrometreleri, dispersif ve Fourier Transform (FT) olarak iki çeşittir. IR kaynaktan çıkan ve örnek üzerine gönderilen radyasyon, analizör (monokromatör) aracılığıyla dalgaboylarına ayrılır. Prizma ya da kırınım ağı kullanan bir spektrometre dispersif spektrometre olarak adlandırılır. Prizma ya da kırınım ağı yerine Michelson interferometresi kullanan spektrometrelere ise Fourier Transform interferometresi adı verilir.

Dedektörler optik sinyalin elektrik sinyallerine dönüştürülmesini sağlayan aletlerdir [95]. Sıcaklığa dayanıklı bir alkali halid penceresinde, döteryum triglisin sülfat (DTGS) içeren piroelektrik dedektörler, orta kırmızı altı bölge için yaygın olarak kullanılır.

Daha hassas işler için cıva kadmiyum tellürür (MCT) kullanılabilir, ancak bunun sıvı azot ile soğutulması gerekir. Uzak kırmızı altı bölgede, germanyum veya indiyum antimon, yakın kırmızı altı bölgede kurşun sülfid fotoiletken dedektörler tercih edilir [96].

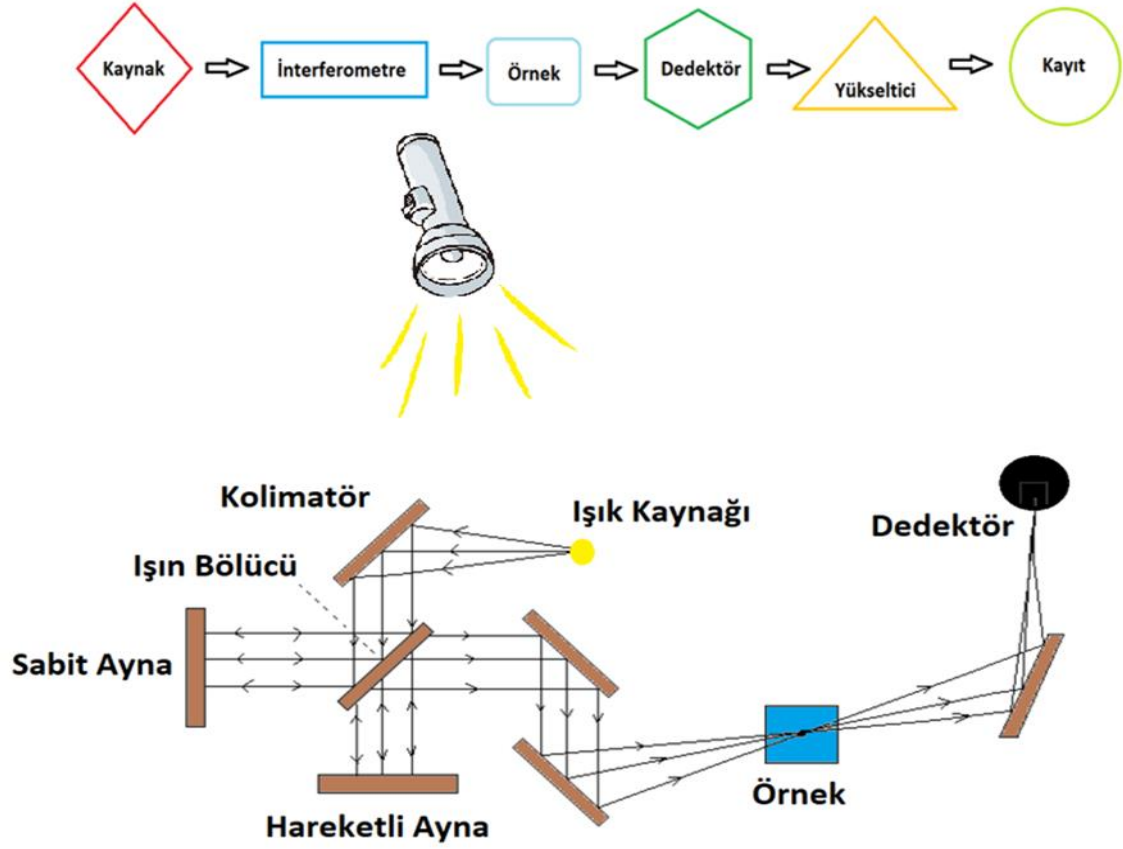
Dedektör tarafından elektrik sinyaline dönüştürülen optik sinyaller (ışınlar), yükseltici tarafından şiddetlendirilir. Yükselticide şiddeti arttırılan ışınların frekans şiddetleri kaydedilip, çizilir.

Tablo 3.2: Kırmızı-altı Bölgeye ait Bilgiler [97,98].

<i>Bölge</i>	<i>Dalga boyu (μm)</i>	<i>Dalga sayısı (cm^{-1})</i>	<i>Frekans (Hz)</i>	<i>İnceleme</i>
<i>Yakın Kırmızıaltı</i>	0.78-2.5	12800-4000	3.8×10^{14} - 1.2×10^{14}	Moleküllerin üst ton ve kombinasyon titreşimleri
<i>Orta Kırmızıaltı</i>	2.5-50	4000-200	1.2×10^{14} - 6.0×10^{12}	Çoğu moleküle ait temel titreşimler
<i>Uzak Kırmızıaltı</i>	50-1000	200-10	6.0×10^{12} - 3.0×10^{11}	Büyük moleküllerin omurga titreşimlerinin hem de ağır atomları içeren temel molekül titreşimlerinin (örneğin inorganik veya organometalik bileşikler) titreşim

FT-IR Spektrometresi

FT-IR spektrometresinde, interferometre sistemi bir kaynak, ışın ayırıcı, iki ayna, bir lazer ve bir dedektörden oluşur. Kaynaktan gelen ışın, ışın ayırıcıya giderek iki parçaya ayrılır. Işının bir kısmı hareketli bir aynaya iletilir; bir kısım sabit bir aynaya yansır. Hareketli ayna sabit bir hızla ileri ayrıca geri hareket eder. Bu hız, sistemde dahili bir dalga boyu kalibrasyonu görevi gören çok hassas lazer dalga boyuna göre zamanlanır. İki ışın aynalardan yansıtılır ve ışın dağıtıcısında yeniden birleştirilir. Hareketli aynadan gelen ışın, sabit aynadan gelen ışıandan farklı bir mesafe kateder. Işınlr birleştirildiğinde, dalga boylarının bir kısmı yapıcı, bir kısmı yok edici bir şekilde birleştikten bir girişim deseni yaratılır. Bu girişim düzenine interferogram denir. Bu interferogram daha sonra ışın dağıtıcıdan bir miktar enerjinin absorblandığı ve bir kısmının geçtiği numuneye gider. Geçen kısım dedektöre ulaşır. Dedektör, kırmızı altı aralıktaki her dalga boyu hakkındaki bilgileri aynı anda okur.



Şekil 3.4: FTIR spektrometresi blok diyagramı.

Daha sonra dedektör sinyali bilgisayara gönderilir ve interferogram Fourier dönüşümü ile spektruma dönüştürülür. Bir referans veya arka plan ışını aynı zamanda bir örnek olmadan toplanır ve örnek ışını bir transmitans veya "% T" spektrumu üretmek için arka plandaki ışınla oranlanır. Bu transmitans spektrumu, veri noktalarının negatif log'unu alarak, absorbansa dönüştürülebilir. FT-IR spektrumunun x eksenini tipik olarak "dalga sayısı" veya cm^{-1} ile gösterilir. Bu ünite, interferogram üzerinde çalışan Fourier dönüşüm algoritmasının bir ürünüdür ve kırmızı altı spektrumdaki bir noktada cm cinsinden ölçülen gerçek ışık dalga boyunun tersidir.

Orta kırmızı altı bölgede çoğunlukla, FT cihazlarının sinyal-gürültü oranları iyi bir dispersif cihazkinden daha iyidir. Gelişmiş sinyal-gürültü oranı, kısa sürede iyi spektrumlar elde etmek için önemlidir. FT cihazlarının bir diğer avantajı, dispersif cihazlardan çok daha büyük bir enerji çıkışı sağlamasıdır. Bununla birlikte, verimdeki potansiyel kazanç, interferometrik

ölçümler için gerekli olan hızlı yanıt detektörünün düşük hassasiyetiyle kısmen dengelenebilir [94].

Fourier Dönüşümü ile Spektrum Elde Etme

Kaynaktan gelen ışın interferometre içindeki ilk olarak ışın bölücüye ulaşır. Bu ışın bölücü %50 geçirgendir. Işın bölücüye gelen ışının bir kısmı sabit aynaya doğru yansır. Diğer kısmı ise ışın bölücüden geçerek hareketli aynaya ulaşır. Sabit aynaya giden ışının aldığı yol, gidiş-geliş $2L$ kadardır. Ancak hareketli aynaya ulaşan ışının gidiş-geliş $2L+2x$ kadardır. Böylece, ışının iki kısmı ışın bölücüde yeniden birleştiğinde, $2x$ 'lik bir optik yol farkı (δ) oluşur. Monokromatör bir ışın söz konusu olduğunda, iki optik radyasyon demeti, eğer optik gecikmeleri dalga boyunun bir katı ise, yapıcı girişim oluşur.

$$\delta = 2x = n\lambda \quad n: 0,1,2,3,\dots \quad (3.10)$$

Eğer dalgaboyunun yarısının katları ise, yıkıcı girişim oluşur.

$$\delta = 2x = (2n+1) \lambda/2 \quad n: 0,1,2,3,\dots \quad (3.11)$$

Hareketli aynanın hareketi ile modülasyona uğrayan ışın, interferometreden çıkar ve son olarak detektöre ulaşır. Buna göre, detektör tarafından kaydedilen sinyal, yol farkının bir fonksiyonu olarak birleşen ışınların radyasyon şiddetidir. Frekans ya da dalgasayısı ile monokromatik radyasyonun (ışının) bir kaynağı için, dedektördeki şiddet Eşitlik 3.12 ile verilir;

$$I(\delta) = S(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) \quad (3.12)$$

Burada $S(\bar{\nu})$ monokromatik ışının şiddetidir. $I(\delta)$ nin bir sabit (dc) bileşen ve bir modüle edilmiş (ac) bileşenden oluştuğu görülebilir. Sadece ac bileşenin önemli olduğu spektroskopik ölçümlerde ve bu modüle edilen bileşen interferogram olarak adlandırılır.

$$I(\delta) = S(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) \quad (3.13)$$

Yol farkı zamanın bir fonksiyonu olup, interferogram zamana bağlı fonksiyon olarak tanımlanmıştır. Hareketli ayna sabit bir hızda tarandığında yol farkı kolaydır.

$$\delta = 2vt \quad (3.14)$$

İnterferogram $I(t)$ Eşitlik 3.15'deki şekilde gibidir.

$$I(t) = S(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu}2vt) \quad (3.15)$$

Bu yüzden, dedektördeki sinyal sinüsoidal olarak frekans ile çeşitlenir;

$$f_{\bar{\nu}} = 2\nu\bar{\nu} \quad (3.16)$$

Çok renkli bir radyasyon kaynağı için girişim deseni;

$$I(\delta) = \int_0^{\infty} S(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) d\bar{\nu} \quad (3.17)$$

$S(\bar{\nu})$, kaynağın spektral güç yoğunluğunu ifade eder. Sıfır optik yol farkında, tüm frekanslardaki radyasyon interferometreden geçer. Yol farkı sıfırdan farklı olduğunda, radyasyonun sadece bir kısmı geçecektir. Bu nedenle, bir interferogram, sıfır yol farkında bir "merkezi açıklık" ve bunun etrafında simetrik dağılmış bir dalga modeli ile tanımlanır.

Bir interferogramın spektruma dönüştürülmesi Fourier dönüşümüdür (FT) ile sağlanır. Buna göre, spektrum;

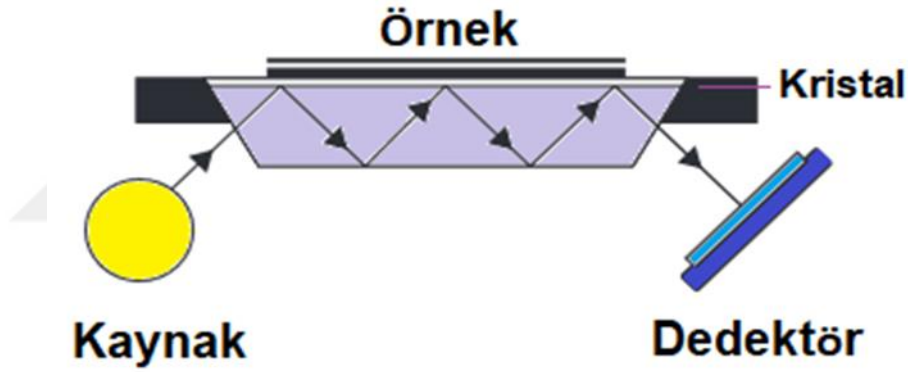
$$S(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} I(\delta) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) d\delta \quad (3.18)$$

Denklemleri ile elde edilir. Yukarıdaki Eşitlik 3.17 ve 3.18 Fourier çifti olarak adlandırılmaktadır [99,100].

FTIR spektrometrelerde dedektör çok hassas olmadığından ya da diğer bir deyişle IR bölge ışınlarını hassasiyetle dedekte edecek bir dedektör bulunmadığından interferometre kullanılması gerekmektedir. Interferometrede faz ve frekans modülasyonu gerçekleştirilir [101]. Faz modülasyonu, frekans modülasyonunu sağlamada bir ara adımdır. Faz modülasyonunda, taşıyan sinyal fazı, mesaj sinyalinin (gönderilen ışın) değişen genliğini (sinyal seviyesi) takip etmesi için ayarlanır. Taşıyıcının genlik-frekans ikilisi sabit tutulup, mesajın genlik değişimi ile beraber taşıyıcının fazı değişir [102,103]. Frekans modülasyonlu sinyal üretmek için faz modülasyonlu sinyalle ilişki kurulur [103,104]. Fourier analizi ile sinyaller işlenip [105,106], dedektöre ulaştırılır. Dedektöre ulaşan modüle edilmiş ışınım interferogramdır.

ATR

Zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) spektroskopisi, örnek hazırlama aşaması olmadan kullanılan örnekleme tekniklerindendir. Bir infrared (IR) ışını kırılma indisi büyük olan bir ortamdan küçük kırılma indisine sahip bir ortama geçtiğinde, ışığın bir kısmı küçük kırılma indisine sahip ortama geri yansıtılır. Belirli bir açıda gelen ışık dalgalarının büyük bir oranı geri yansıtılır ve buna iç yansıma adı verilir. İç yansımanın olduğu durumda, ışık enerjisinin bir kısmı kristalden kaçır ve yüzeyin ötesinde dalga şeklinde küçük bir mesafede ($0.1-5 \mu\text{m}$) yayılır. Bu görünmez dalgaya kaybolan dalga adı verilir. Yansıyan ışığın yoğunluğu bu noktada azalır. Buna da zayıflatılmış toplam yansıma adı verilir. Numune kristal üzerine uygulandığında, kristalin ötesine geçen bir miktar IR radyasyonu numune tarafından emilir. Bu absorbans, numunenin IR spektrumuna çevrilir.



Şekil 3.5: ATR spektrometresinde örnek üstüne gelen ışığın yansıması.

ATR cihazlarında farklı tipte kristal malzemeler bulunabilir. Kristal malzemelerden en çok kullanılanları çinko selenid, germanyum, silikon, elmas ve KRS-5 (talyum iyodür veya talyum bromür)'dür [107].

3.2.3.3. Bant Komponent Analizi

Bant komponent analizi, spektroskopik çalışma sonucunda elde edilen çok değişkenli sinyallerin alt bileşenlerine ayrılması için kullanılan bir hesaplama metodudur. Bu analizde, çoklu sinyalin Gauss olmayan birbirinden ayrı sinyallere ayrılması işlemi gerçekleştirilir. Bant komponent analizine geçmeden önce baseline düzeltmesi ve smooth işlemleri gerçekleştirilir [108].

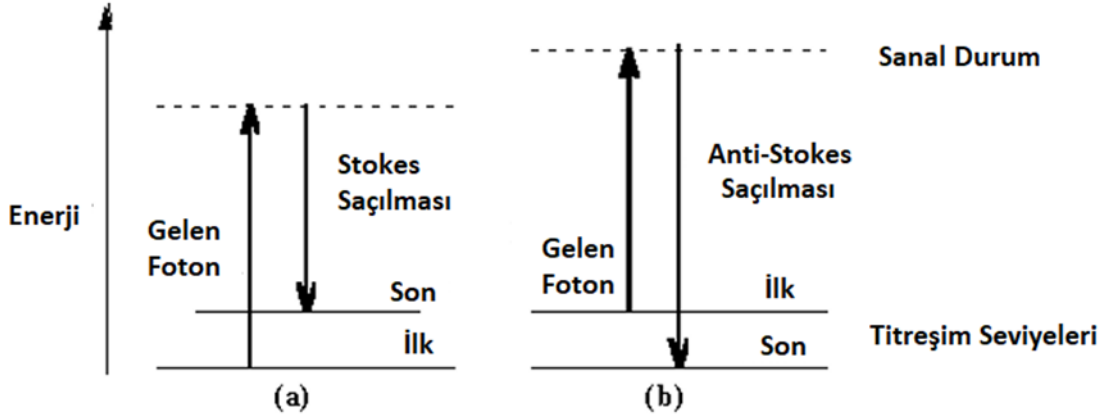
Savitzky-Golay filtresi, bazı veri noktalarına uygulanarak, sinyal eğilimine fazla etki etmeden verilerin kesinliğini arttırmak için kullanılır. Bu uygulama, evrişim olarak bilinen bir işlemde, bitişik veri noktalarının peşpeşe alt kümelerinin, doğrusal en küçük kareler (linear least squares) yöntemi aracılığıyla düşük dereceli bir polinom ile ayarlanması ile elde edilir. Veri noktaları eşit aralıklar ile dizildiğinde, her bir alt grubun merkez noktasında smooth edilmiş yani düzeltilmiş tahminleri ya da türevlerini vermek için tüm veri alt kümelerine uygulanabilen tek bir evrişim katsayısı kümesi biçiminde, en küçük kareler denklemlerine analitik bir çözüm bulunabilir [109].

3.2.4.RAMAN SPEKTROSKOPİSİ

Raman spektroskopisi, moleküler spektroskopinin temellerinden biridir. IR spektroskopisi ile birlikte moleküllerin titreşim geçişlerinden yararlanarak moleküllerin özellikleri ve yapıları hakkında bilgi elde etmek için kullanılır. Aralarındaki farklardan en öne çıkanı IR spektroskopisinin temeli absorpsiyona, Raman spektroskopisinin ise saçılmaya dayanıyor olmasıdır.

3.2.4.1. *Raman Olayının Kuantum Mekaniksel Açıklaması*

ν_0 frekanslı ışık, maddeye $h\nu_0$ enerjisine sahip küçük dalga paketleri olan fotonlar gönderir. Gelen ışığa ait fotonlar madde üstünden saçıldığında, fotonların çoğu elastik olarak saçılır. Saçılmış fotonlar, aynı enerjiye ve dolayısıyla gelen fotonlarla aynı dalga boyuna sahiptir. Bununla birlikte, ışığın küçük bir kısmı (yaklaşık 10^7 fotondan 1'i), gelen fotonların frekansından farklı olarak daha düşük ya da daha yüksek optik frekanslarda saçılır. Bu esnek olmayan saçılmaya yol açan sürece Raman etkisi veya Raman kayması adı verilir. Saçılma elastik ise, işleme Rayleigh saçılması adı verilir. Elastik değilse, işleme Raman saçılması denir [110]. Bu saçılma durumunda fotonun enerjisi $h(\nu_0 \pm \nu_{it})$ olur.



Şekil 3.6: Stokes ve Anti-Stokes Saçılmaları.

Oda sıcaklığında, titreşimli uyarılmış durumlardaki termal popülasyon, oldukça düşüktür. Bu nedenle, başlangıç durumu temel durumdur. Saçılan fotonun, uyarıcı fotondan daha düşük enerjiye sahip olduğu durum Stokes saçılması olarak adlandırılır ve genelde Raman spektroskopisinde gözlemlenen şeydir. Şekil 3.6 (a)'da da görülmektedir. Diğer bir durumda, moleküllerin küçük bir kısmı titreşimsel olarak uyarılmış durumda olup, titreşimli uyarılmış moleküllerden saçılan foton, molekülü temel durumda bırakır. Saçılmış foton, Şekil 3.6 (b) 'de gösterildiği gibi daha yüksek enerjide görünür. Anti-Stokes Raman spektrumu, Stokes spektrumundan her zaman daha zayıftır, ancak oda sıcaklığında, yaklaşık 1500 cm^{-1} 'den daha düşük titreşim frekansları için yararlı olacak kadar güçlüdür [110]. Hem Stokes hem de anti-Stokes spektrumları aynı frekans bilgilerini verirler. Anti-Stokes spektrumu, Stokes spektrumu düşük frekanslarda zayıf dedektör algılaması sebebi ile doğrudan gözlenemediğinde kullanılabilir [110].

3.2.4.2. Raman Olayının Klasik Olarak Açıklaması

Raman etkisi, bir fotonun bir molekül üzerine gelip, molekülün elektrik dipolü ile etkileşime girmesiyle oluşur. Gelen ışık, elektrik alan vektörü $\vec{E}$ ile salınan bir elektromanyetik dalga olarak düşünülür. Gelen ışığın elektrik alanı maddenin pozitif-negatif yük merkezleri ile etkileştiğinde, başlangıçta dipol moment yoksa pozitif-negatif yük merkezleri ayrılarak bir dipol moment oluşacaktır. Eğer başlangıçta bir dipol moment mevcutsa, elektrik dipol moment $\mu = \alpha E$ indüklenir.

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E}$$

indüklenmiş
dipol moment
molekülün
kutuplanma
yatkınlığı
gelen elektromanyetik
dalganın elektrik alanı

(3.19)

ile verilir.

Klasik yaklaşıklığa göre, Raman saçılması aşağıdaki şekilde açıklanabilir;

Elektromanyetik dalganın elektrik alan bileşeni zamana bağlı olarak;

$$E = E_0 \sin 2\pi\nu_0 t \quad (3.20)$$

şeklinde ifade edilir. Burada E_0 titreşim genliği ve ν_0 gelen ışığın frekansıdır.

İndüklenmiş dipol moment ifadesinde yerine koyarsak;

$$\mu = \alpha E = \alpha E_0 \sin 2\pi\nu_0 t \quad (3.21)$$

elde edilir. α burada polarizabilite yani kutuplanma yatkınlığı katsayısıdır. Eğer molekül belirli bir ν_{tit} frekansında titreşiyorsa, q titreşim koordinatı zamanın bir fonksiyonu olarak;

$$q = q_0 \sin 2\pi\nu_{tit} t \quad (3.22)$$

şeklinde yazılır. Burada q_0 titreşim genliğini ifade eder. Titreşimin küçük bir büyüklüğü için, α polarizabilite ifadesi, q nun bir lineer fonksiyonudur.

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 q + \left(\frac{\partial^2 \alpha}{\partial q^2}\right)_0 q^2 + \dots \quad (3.23)$$

Burada α_0 , molekülün denge konumunda polarizabilitesi, q , titreşim koordinatı ($r-r_0$), r ise verilen bir anda çekirdekler arası mesafeyi ifade etmektedir. Bu ifade de ilk iki terimden sonrası çok küçük katkılar sağladığı için ihmal edilirse;

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \sin 2\pi\nu_{tit} t \quad (3.24)$$

şeklinde yazılabilir. Bu ifade indüklenmiş dipol moment ifadesinde yerine yazılırsa;

$$\mu = \alpha_o E_o \sin(2\pi\nu_o t) + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_o q_o E_o [\sin(2\pi\nu_{tit} t) \cdot \sin(2\pi\nu_o t)] \quad (3.25)$$

$$\mu = \underbrace{\alpha_o E_o \sin(2\pi\nu_o t)}_{\text{Rayleigh}} + \frac{1}{2} q_o E_o \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_o [\cos 2\pi(\nu_{tit} - \nu_o) t - \cos 2\pi(\nu_{tit} + \nu_o) t] \quad (3.26)$$

Rayleigh Saçılması

Stokes Saçılması

Anti-Stokes Saçılması

şeklinde ifade edilir [111].

$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_o$ ifadesi sıfır ise titreşim Raman aktif değildir. Raman aktif olabilmesi için yani Raman spektrumunu görebilmek için polarizabilite (α) değişim oranının titreşim sırasında sıfır olmaması gerekir. Bu kural da Raman aktiflik şartı olarak bilinir. H_2 , O_2 gibi aynı atomlardan oluşan diatomik sistemlerde değişen bir dipol momentin olmaması sebebi ile IR aktif değildir. Ancak polarizabilite, atomlar arası uzaklığa bağlı olduğu için, mesafe ne kadar büyükse polarizabilite o kadar fazladır ve Raman aktiftir.

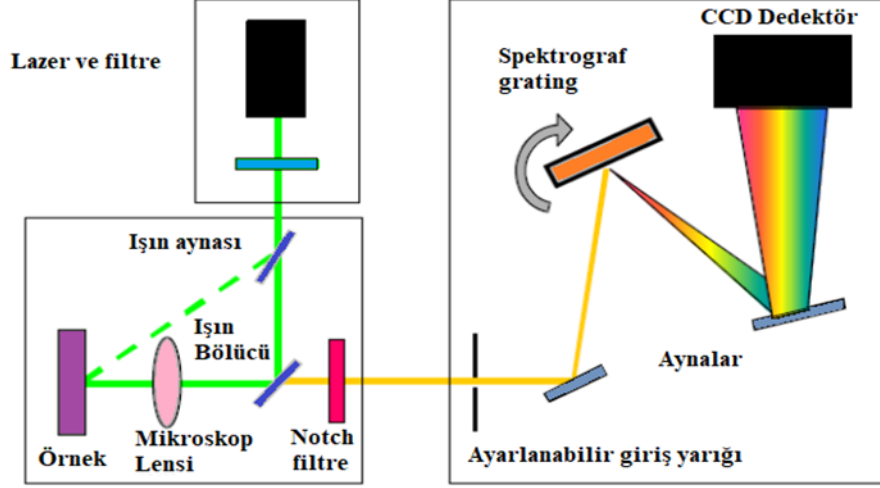
3.2.4.3. Raman Spektrometresi

Raman spektroskopik ölçümleri için numune kullanımı IR spektroskopisine göre daha basittir. Lazer kaynağı kolayca küçük bir örnek alana odaklanır ve yayılan ışın, bir spektrometrenin yarığına veya giriş açıklığına verimli bir şekilde taşınır. Sonuç olarak, çok küçük numuneler de bu spektrometre kullanılarak incelenebilir.

Raman spektroskopisinde, nispeten zayıf Raman çizgilerini yoğun Rayleigh saçılmış radyasyondan ayırmak için yüksek kaliteli bir dalga boyu seçim cihazı gerekir. Dispersif Raman spektrometreleri, bu amaçla çift veya üçlü gratingler kullanır. Son yıllarda, notch filtreleri adı verilen holografik girişim filtreleri ve holografik ızgaralar, çok gratingli monokromatörlere olan gereksinimi neredeyse tamamen ortadan kaldırmıştır. Kullandığımız spektrometrede 1800 çizgi/mm, 1200 çizgi/mm ve 600 çizgi/mm olmak üzere 3 grating sistemi mevcuttur.

Monokromatörlü cihazlar, ölçülen zayıf sinyaller nedeniyle her zaman foto-çoğaltıcı tüpleri transdüser olarak kullanırlar. Kullandığımız spektrometre cihazında dedektör olarak CCD dedektörler kullanılmaktadır. CCD dedektörler, diğer bir adla yük birleştirilen cihaz, hassas foton dedektörleridir.

Fourier dönüşümü Raman (FT-Raman) cihazlarında, FTIR spektrometrelerinde olduğu gibi bir Michelson interferometresi ve Nd-YAG lazeri kullanır. Raman spektrometresine ait diyagram Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7: Raman spektrometresi diyagramı [112].

Modern Raman spektrometrelerinde genelde kaynak olarak lazerler tercih edilir. Çünkü uygun bir sinyal-gürültü oranıyla ölçülecek yeterli şiddetteki Raman saçılması için yüksek şiddetler gereklidir. Raman spektroskopisi için kullanılan en yaygın lazerlerden beşi aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.3: Raman spektrometresinde kullanılan lazer tipleri.

Lazer Tipi	Dalgaboyu, nm
Argon İyon	488 ya da 514.5
Kripton İyon	413.1, 530.9, 647.1
Helyum-Neon	632.8
Diyot	660-880
Nd-YAG	1064

3.2.5. UV SPEKTROSKOPİSİ

100-400 nm dalgaboyu aralığında olan UV ışıması, elektromanyetik spektrumun X-ışınları ile görünür bölgesi arasında bulunmaktadır. Mor-üstü ile görünür bölge spektroskopilerinin ikisi birlikte elektronik spektroskopi olarak ifade edilir ve biyomoleküllerde, konjugasyon derecesi ve aromatiklik gibi özellikler hakkında bilgi sağlar.

Bir molekül tarafından soğurulan UV ışımasını, molekül içinde elektronik uyarılmaya sebep olur. Uyarılan elektron düşük enerjiye sahip bir düzeyden daha yüksek enerjideki elektronik düzeye geçiş yapar. En olası geçiş, temel düzeyden uyarılmış düzeye geçiştir, yani HOMO-LUMO geçişine karşılık gelir. Fakat, her bir elektronik düzeye titreşim düzeyleri, her titreşim düzeyine de dönme düzeyleri karşılık geldiğinden, elektronik uyarma titreşim ve dönü uyarmasına da yol açar. Sonuç olarak ince bir UV soğurma piki yerine, geniş bir UV soğurma bandı elde edilir [113,114].

Biyomoleküllerde dört çeşit elektronik geçiş olabilir. Her bir geçişin özellikleri birbirlerinden farklı olup aşağıda tanımlanmıştır.

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ Geçişleri: Yüksek enerji gerektiren s bağ orbitalleri arasındaki geçişlerdir. 125-150 nm UV bölge aralığında gözlenen pikler verir [113,114].

$n \rightarrow \sigma^*$ Geçişleri: Bu geçişler 150-250 nm aralığında görülmektedir [113,114].

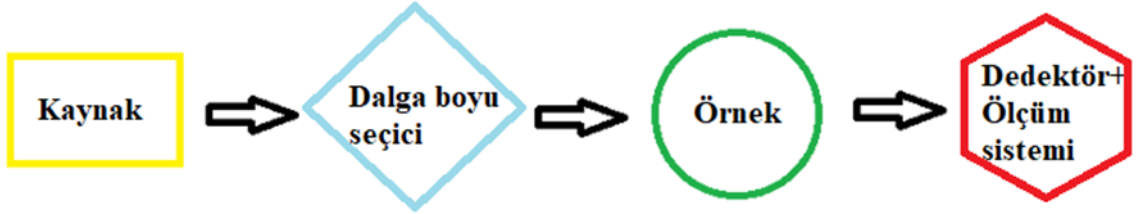
$n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ Geçişleri: UV spektroskopisinde en sık görülen geçiş tipi olup 200-700 nm aralığında gözlenebilir. Bu geçişler doymamış organik bileşiklerde gözlenir. Çözücülerin polaritesi absorpsiyon piklerinde maviye ya da kırmızıya kaymaya sebep olabilir [113,114].

Proteinlerde Gözlenen Soğurma: Protein ana zincirindeki peptid grupları “uzak-UV” (180-220 nm) aralığında ışığı absorbe eder. UV spektrumundaki peptid absorbansında peptid bağları, aromatik amino asit yan zincirleri gibi gruplar ön plana çıkar. En güçlü absorblama genelde peptid bağı omurgasındadır. 190 nm ye yakın bir maksimum ve 220 nm de zayıf bir omuz ile absorblanır. Aromatik amino asitler (Tyr, Trp, Phe) bu bölgedeki ışığı absorbe edip, bir de 240-300 nm bölgesinde absorpsiyon yaparlar. Bu bölge "aromatik" ya da “yakın-UV” bölge olarak adlandırılır. Sisteinler arasında oluşan disülfür bağları da 260 nm civarında bir absorbans bandı göstermektedir. Asp, Glu, Asn, Gln, Arg ve His'in yan zincirleri uzak UV bölgesinde zayıf bir şekilde emilir, ancak çoğu peptid spektrumunda daha yoğun peptid bağı absorbansı hakimdir.

Aromatik amino asitlerin absorpsiyon spektrumu, çevrelerindeki değişime duyarlıdır. Bu durumda, genel olarak maksimum absorpsiyon dalgaboyundaki kaymalar ağırlık kazanır: çözücünün polaritesi arttığında spektrumlarda maviye kayma gözlemlenir. Örneğin, çözücü karbon tetraklorürden suya değiştirildiğinde, tirozin absorpsiyonunun azami, 277 nm'den 274 nm'ye, yaklaşık 3 nm kaydığı gözlenir. Aromatik halka bulunduran amino asitler UV spektrumunda sırasıyla 275, 280 ve 258 nm maksimum dalgaboyunda gözlenirler [115].

3.2.5.1. UV Spektrometresi

UV-görünür bölge spektrometreleri çalıştığı aralık 200-900 nm'dir. Bir spektrofotometrenin yapısı Şekil 3.8 de verilmiştir.



Şekil 3.8: Spektrofotometrenin temel yapısı.

Spektrofotometrelerde temel elemanlar ile çeşitli yan elemanlar da mevcuttur. Bunlar, ışığın odaklanması, yansıtması, bölünmesi ve örnek üstüne gönderilecek ışık şiddetini ayarlamayı sağlayan mercek, ayna, ışık bölücü ve yarıklardır.

UV-görünür bölge için tek ve çift ışın yollu spektrofotometreler mevcuttur. Tek ışın yolluda geçirgenlik ayarlamaları yapılır ya da çözücünün spektrumu alınarak, örnek spektrumunda çıkarılıp çözücü kaynaklı absorbans girişi engellenir. Çift ışın yolluda bu ayara gerek yoktur. Monokromatörden gelen ışın iki demete ayrılıp biri örnek üstüne diğeri çözücü üstüne gönderilerek örneğin geçirgenliği çözücünün geçirgenliği ile sürekli olarak karşılaştırılır [116].

UV-görünür bölgede ışık kaynakları, belirli dalgaboyu aralıklarında ışık yayarlar. Tungsten flaman lambası, görünür ve yakın-IR bölgede, hidrojen ve döteryum lambaları 180-380 nm aralığında, Xe ark ve civa lambaları UV ve görünür bölgede ışık yayınlatabilir [117].

Spektrofotometrelerde dedektörler, maddenin ışığı absorplamasını anlamada kullanılır, ışık enerjisinden elektrik enerjisine dönüşümü sağlayan düzeneklerdir [118]. UV ve görünür bölgelerde kullanılmakta olan dedektör tipleri aşağıdaki gibidir.

Fotovoltaik dedektörler: Akım, yarı-iletken bir tabakada oluşturulur. Fotovoltaik hücreler görünür bölgedeki ışığın belirlenmesi ve ölçümünde kullanılmaktadır [119].

Fototüp: Vakumlu tüpün iç kenarlarına monte edilmiş yarı-silindirik katot ile anot görevi üstlenen telden oluşur. Fotohassas maddelerden elektronların saçılmasına göre çalışırlar [119].

Fotoçoğaltıcı tüpler: Fotoçoğaltıcı tüp, sezyum-antimon intermetalik bileşiklerden elde edilen fotokatotlardan yapılır ve UV-Görünür bölgede oldukça hassas ve hızlı cevaplama özelliğine sahiptir [119].

3.3. NANOPARTİKÜL HAZIRLAMA TEKNİKLERİ

Nanopartiküller, biyolojik olarak parçalanabilme özelliğine sahip albümin, kolajen, jelatin gibi proteinler, kitosan, selüloz gibi polisakkaritler ve poli (laktik-ko-glikolik asit), poli (kaprolakton) gibi polyesterlerden oluşan doğal ya da sentetik çeşitli materyallerden hazırlanmaktadır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerle ilgili bazı bilgiler aşağıda verilmiştir.

Çözücü buharlaştırma yöntemi: Bu yöntemde polimer ve hidrofobik ilaç çözdürmek için diklorometan gibi bir çözücü kullanılır. Polimer-ilac çözeltisinin emülsifikasyon işlemi, su emülsiyonunda bir yağ oluşturmak için (o / w) bir sürfaktan veya emülsifiye edici madde içeren sulu bir çözeltide gerçekleştirilir. Kararlı emülsiyon oluşumundan sonra, organik çözücü ortamdan uzaklaştırılır (basınç düşürme/ karıştırıp buharlaştırma ile). Küçük partikül boyutunun üretilmesi için, genellikle yüksek hızlı bir homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılabilir [120-122].

Kendiliğinden emülsifikasyon veya çözücü difüzyon yöntemi (Nanopresipitasyon): Bu yöntemde, az miktarda suyla karışmayan organik çözücünün yanı sıra su ile karışabilen çözücü, bir yağ fazı olarak kullanılır. Solventlerin kendiliğinden difüzyonu nedeniyle, iki faz arasında bir ara yüzey türbülansı oluşturulur ve bu durum küçük partiküllerin oluşumuna neden olur. Su ile karışabilen solventin konsantrasyonu arttıkça, partikül boyutunda bir azalma elde edilebilir. Hem çözücü buharlaşma hem de bunun bir modifikasyonu olan çözücü difüzyon yöntemlerinin hidrofobik veya hidrofilik ilaçlar için kullanılabilmesi önemli avantajlardır [123,124]. Bu tez çalışmasında PCL nanopartiküllerinin hazırlamasında bu yöntem kullanılmıştır.

Polimerizasyon Yöntemi: Bu yöntemde, monomerlerin polimerizasyonu ile sulu ortamda nanopartiküller elde edilir. İlaçlar, polimerizasyonun gerçekleştiği ortamda çözündürülür ya da polimerizasyon gerçekleştikten sonra adsorpsiyon ile nanopartiküllere dahil edilirler. Elde edilen nanopartikül süspansiyonunun saflaştırılma aşamasında da ultrasantrifüj işlemi ve izotonik sürfaktan (yüzey aktif madde) bulundurmeyen bir ortamda tekrar süspansiyonlama ile stabilizatör ve sürfaktan çeşitleri ortamdaki uzaklaştırılır. Polibutilsiyanoakrilat/poli (alkilkanoakrilat) nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılır [125-127].

İyonik jelasyon yöntemi: Bu yöntem, karşıt yüklü malzemelerin birbirleri ile etkileşmesi sonucu jelleşmesine dayanmaktadır. Oda sıcaklığında oluşan jelleşme için, karşıt yüklü malzemelerin konsantrasyonu ve sıcaklığı önemlidir. Genellikle kitosan nanopartikülü hazırlamada kullanılan bu yöntemde, kitosan asidik sulu ortamda çözündürülür ve katyonik bir hal alır. Diğer yandan sulu ortamdaki TPP ise anyonik özelliktedir. Katyonik özelliğe sahip kitosan, anyonik özelliğe sahip TPP ile elektrostatik etkileşime girer. İyonik etkileşim sonucu malzeme sıvıdan jele geçer [126]. Bu yöntemin kolay uygulanabilir ve laboratuvar ortamında modifiye edilebilir olması önemli avantajlardır. Öte yandan, suda çözünebilir malzemelerde etkili olması sınırlı avantaj sağladığının bir göstergesidir [128,129]. Bu tez çalışmasında kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında bu yöntem kullanılmıştır.

3.3.1. Kitosan Nanopartikül Hazırlama Tekniği

3.3.1.1. Boş Nanopartikül Tekniği

100 mL su ve asetik asit çözeltisi hazırlanmış, üstüne 30 mg kitosan konularak, 2 saat 70 °C da manyetik karıştırıcıda kitosan tamamen çözülene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra pH değeri NaOH eklenerek uygun değere çekilmiştir. pH ayarı yapıldıktan sonra kitosan çözeltisi 0.45 µm lik şırınga filtresinden geçirilmiştir.

Kitosan nanopartikülünün hazırlanmasında kullanılan çapraz bağlayıcı TPP (tripolifosfat) çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 15 mg TPP ve 50 mL distile su vorteks yardımıyla TPP su içinde tamamen çözünene kadar karıştırılmıştır. Ardından 0.22 µm lik şırınga filtresinden geçirilerek +4 °C de bekletilmiştir.

Boş kitosan nanopartikülü için 70 °C' ye ısıtılan kitosan çözeltisinden 15 mL kitosan çekip, bu çözelti üstüne +4 °C de bekletilen TPP den 3.3 mL eklenmiştir. Bu karışım 10 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

3.3.1.2. Dolu Nanopartikül Tekniği

100 mL su ve asetik asit çözeltisi hazırlanmış, üstüne 30 mg kitosan konularak 2 saat 70 ° C da kitosan tamamen çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra pH değeri NaOH eklenerek uygun değere çekilmiştir. pH ayarı yapıldıktan sonra kitosan çözeltisi 0.45 µm lik şırınga filtresinden geçirilmiştir.

Kitosan nanopartikülünün hazırlanmasında kullanılan çapraz bağlayıcı TPP (tripolifosfat) çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 15 mg TPP ve 50 mL distile su vorteks yardımıyla TPP su içinde tamamen çözünene kadar karıştırılmıştır. Ardından 0.22 µm lik şırınga filtresinden geçirilerek +4 ° C de bekletilmiştir.

Dolu nanopartikül sentezi için 5 mg YKT 1 mL distile su ile vortekste karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan peptid çözeltisi üstüne TPP eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, ardından üstlerine 70 °C' ye ısıtılmış 10 mL kitosan eklenmiştir. Bu karışım 10 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

3.3.2. PCL Nanopartikül Hazırlama Tekniği

3.3.2.1. Boş Nanopartikül Tekniği

PVA çözeltisi için 1 gr PVA 10 mL su ile 80 ° C de manyetik karıştırıcıda yarım saat karıştırılmıştır. PCL çözeltisi için 60 mg PCL ve 4 mL DCM (diklorometan) manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırılmıştır.

Boş PCL nanopartikülü için manyetik karıştırıcıda beherde bulunan PVA içine damla damla PCL eklenmiştir. Ardında 5 dk boyunca 80 power da sonikasyon basamağı gerçekleştirilmiştir. Sonikasyondan basamağından sonra 26 ° C 7000 rpm de 20 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Çöken pelet üstündeki sıvı dökülüp, pelet üstü 15 mL ye tamamlanmış, ardından vorteks yardımı ile karıştırmıştır.

3.3.2.2. Dolu Nanopartikül Tekniği

PVA çözeltisi için 1 gr PVA 10 mL su ile 80 ° C de yarım saat karıştırılmıştır. PCL çözeltisi için 60 mg PCL ve 4 mL DCM (diklorometan) manyetik karıştırıcıda çözünene kadar 1 saat karıştırılmıştır.

Dolu nanopartikül sentezi için 5 mg YKT tripeptidi üstüne 2 mL su bir penisilin şişesinde karıştırılmıştır. Bu çözelti üstüne 2 mL PCL eklenip 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından 5 dk 80 power da sonike edilmiştir. Elde ettiğimiz çözelti üstüne manyetik karıştırıcıda PVA damla damla eklenmiştir. Ardından 5 dk 80 power da sonike edilmiştir. Sonikasyondan basamağından sonra 26 ° C 7000 rpm de 20 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Çöken pelet üstündeki sıvı dökülüp ya da enkapsülasyon verim hesapları için ayrılıp geri kalan pelet üstü 15 mL ye tamamlanmış, ardından vorteks yardımı ile karıştırmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri için 0.45 µl'lik filtreden geçirilmiştir.

3.4. DNA BAĞLANMASI VE BÖLÜNMESİ

DNA, her organizmanın kendine has olup, yaşam süreçlerini yöneten önemli bir moleküldür. DNA'nın transkripsiyon ve replikasyon olmak üzere iki temel işlevi vardır. Bu işlevler, hücrelerin yaşama ve çoğalması ile birlikte vücuttaki diğer süreçlerin doğru bir şekilde çalışmasında önemli bir yere sahiptir.

DNA'ya bağlanan bir düzenleyici protein ile transkripsiyon ve replikasyonun başlayabileceği bilinmektedir. Eğer, bu proteini taklit edebilen sentetik ya da doğal küçük bir molekül belirlenirse, DNA fonksiyonlarının modülasyonu, inhibisyonu ve aktivasyonu sağlanabilir. Buna göre, belirlenen küçük molekül, bir hastalığın iyileştirilebilmesi veya kontrol edilebilmesi için DNA fonksiyonlarının aktivasyonu ya da inhibisyonu gerektiğinde bir ilaç görevi üstlenebilir. Örneğin, gerekli proteinin daha fazla üretilmesi sağlanabilir veya replikasyon indüklenebilir (DNA aktivasyonu) ya da hem protein hem de replikasyon indüklenip hücre ölümü sağlanabilir. Antitümör çalışmalarında özellikle DNA inhibisyon işlemi için hedeflenir [127].

3.4.1.DNA Bağlanması

DNA bağlanma çalışmalarında UV-Vis absorpsiyon yöntemi kullanılır. DNA ve ilacın etkileşmesi ile UV spektrumundaki absorbans değerlerinde gözle görülür bir değişim meydana

gelir. Absorbanstaki ve dalgaboyundaki değişimler incelenerek DNA-ilaç etkileşimleri hakkında bilgi elde edilir. Absorbansın artış göstermesi hiperkromik, azalması ise hipokromik etki olarak bilinmektedir. Dalgaboyundaki değişimlerde ise düşük dalgaboyuna kayma hipsokromik ya da maviye kayma olarak adlandırılırken, yüksek dalgaboyuna kayma batokromik ya da kırmızıya kayma olarak adlandırılır [23]. DNA ile ilaç arasındaki kovalent olmayan bağlanma çeşitleri interkalasyon, elektrostatik ve oluğa bağlanmadır. İnterkalasyon etkileşim türünde, bitişik DNA baz çiftleri arasına girip, orada istiflenme meydana gelir. Kompleks yapının DNA-etkin molekül arasındaki pi-pi istifleme (stacking) etkileşimleri ile stabilizasyonunun sağlandığı varsayılmaktadır [130]. Bu durum heliks yapısını bozar. Elektrostatik etkileşim türünde, DNA'nın fosfat grupları ile etkileşme söz konusudur. DNA ile bağlanan etkin moleküllerin bağlanma enerjisine katkıda bulunur. DNA ile etkin molekülün güçlü bir bağlanması söz konusu ise, elektrostatik etkileşimin de olduğu söylenebilir [131]. Diğer bağlanmalara göre daha zayıftır. Oluğa bağlanmada ise ilaç DNA'nın majör-minör oluklarından çıkan fonksiyonel gruplarla etkileşime girer. Hidrojen bağları ve Van Der Waals etkileşimleri bunlara örnektir [23]. DNA'nın konformasyonel değişikliğine sebep olabilir [131]. İlaç ile DNA'nın elektrostatik etkileşimleri meydana gelirse hiperkromik etki, interkalasyon ya da oluğa bağlanma etkileşimi meydana gelmişse hipokromik etki ve batokromik kayma oluşmuştur. HOMO-LUMO enerji farkı azaldığında, maksimum absorbanslarda batokromik kayma ve ilaç-DNA bağlanması meydana gelir [23,132].

YKT tripeptid ile CT-DNA arasındaki etkileşimi araştırmak için UV-Vis absorpsiyon yöntemi kullanılmıştır. Deney oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir ve Tris-HCl / NaCl tamponu (pH 7.2) kullanılmıştır. Tris-HCl / NaCl tamponundaki CT-DNA solüsyonunun UV-Vis absorbansı, DNA'nın protein içermediğini gösteren 1.8-1.9 oranını vermektedir [133].

Deney, YKT tripeptid konsantrasyonu (30 µM) sabit tutularak ve 0-120 µM arasında artan miktarlarda CT-DNA konsantrasyonu eklenerek gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin oda sıcaklığında 5 dakika süreyle DNA ile inkübasyonundan sonra absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir. Absorbans yoğunluğundaki değişikliklerin yüzde oranları Eşitlik 3.27 ile hesaplanmıştır.

$$\% H = [(A_i - A_s) / (A_i)] \times 100 \quad (3.27)$$

Bu denklemde A_i , bileşiğin serbest absorbans yoğunluğunu belirtir ve A_s , maksimum konsantrasyonda DNA ekledikten sonra bileşiğin absorbans yoğunluğunu gösterir. YKT tripeptidinin DNA'ya bağlanma gücünü araştırmak için kullanılan içsel bağlanma sabiti (K_b), Denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$[DNA] / (\epsilon_A - \epsilon_f) = [DNA] / (\epsilon_B - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_B - \epsilon_f) \quad (3.28)$$

Formülde, ϵ_A ; ölçülen konsantrasyonda sönüm katsayısı, ϵ_B ; Tüm bileşiklerin DNA'ya bağlanmasından sonra sönüm katsayısı ve ϵ_f ; serbest bileşiğin sönüm katsayısıdır. $[DNA] / (\epsilon_A - \epsilon_f)$ ve $[DNA]$ grafiğinde, eğimin kesişme noktasına oranı K_b 'yi verir.

3.4.2.DNA Kesme

YKT'nin DNA kesme yeteneğini izlemek için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. DNA 'nın tanımlama, saflaştırma ve ayrılması için kullanılan bu yöntem, elektrik alan altında moleküllerin hareketinin incelenmesine dayanır [134]. Birçok biyolojik molekül + ve – yüklü olabilir. Örneğin nötr bir pH'daki jelde DNA'nın – yüklü fosfat grupları anota doğru hareketlenir.

Agaroz bir polisakkarit olup, bir tampon içine konulduktan sonra kaynatılmasıyla berrak agaroz jel oluşur ve bu jel büyük moleküllerin (>200 kDa) ayrılmasında kullanılır. Elektroforez tamponunun iyonik gücü ise DNA'nın elektroforetik hareketliliği için önemlidir. Markör DNA ise elektroforez aşamasında jelde bir bozulma olduğu takdirde bilinmeyen DNA büyüklüğünü belirlemeyi sağlar [134].

YKT tripeptidinin DNA kesme özellikleri, oksitleyici maddenin (H_2O_2) hem varlığında (oksidatif klevaj) hem de yokluğunda (hidrolitik klevaj) pBR322 DNA kullanılarak incelenmiştir. Pozitif kontrol, EcoRI restriksiyon enzimidir ve markör, 1 kb DNA merdivenidir. Deney, Tris-HCl tamponu (10 M, pH: 7.2) içerisinde pBR322 DNA ($0.1 \mu g / \mu L$), YKT tripeptit ve su / H_2O_2 ilave edilerek gerçekleştirildi. Çözeltilerin inkübasyonu 3 saat ve 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. Daha sonra numuneler TBE (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8.0) tamponunda 60 V'de 1 saat süreyle çalıştırılmıştır. Son olarak, bantlar UV ile görselleştirilmiştir.

3.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ

HeLa (insan serviks kanser hücresi) ve MCF-7 (insan meme adenokarsinom hücre hattı) hücreleri %10 FBS (Fötal Bovine Serum, Gibco), 100 IU/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin bulunduran DMEM besiyeri içerisinde kültüre alınmıştır. Yüksek metastatik karaktere sahip MAT-LyLu (MLL) hücresi (sıçan prostat adenokarsinom hücre hattı) ise %1 FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 2 mM L-glutamin (Gibco) ve 250 nM Dexamethasone (Sigma) eklenmiş Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Gibco) besiyerinde kültüre alınmıştır. Her üç hücre de 37 °C de %5 lik karbondioksit (CO₂) ortamında inkübe edilmiştir. Kültürde tek tabaka olacak kadar çoğalan hücreler, tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden ayrılmış ve 1500 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından, dipteki hücre pelletinden tripan mavisi ile sayım yapılarak, gereken hücre miktarı ayrılmış ve toksisite çalışmalarında kullanılmıştır.

3.5.1. *In Vitro* Hücre Kültüründe Etkinlik Testi

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hücre kültür besiyerinde hazırlanan HeLa ve MCF-7 hücreleri, 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde, RPMI hücre kültür besiyerinde yetiştirilen MAT-LyLu hücreleri ise 0.5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde mikrolakalara eklenmiştir. 24 saat boyunca 37 °C ve %5 lik CO₂ lik ortamda hücrelerin çoğalması ve yüzeyi kaplaması için bırakılmıştır.

Literatür baz alınarak [135-139], YKT tripeptidi 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL konsantrasyonlarda hücrelere eklenmiş, 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi için kolorimetrik bir test olan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolumbromide) uygulanmıştır. YKT yüklü nanopartiküller de 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 mg/mL konsantrasyonlarda hücrelere eklenmiş, 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra MTT testi uygulanmıştır. MTT çözeltisi 5 mg/ml olacak şekilde PBS (Gibco) içerisinde çözdürülerek, 0.22 µm'lik filtre ile steril edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen absorbans değerleri % canlılık formülünde yerine koyularak belirlenen canlılık yüzdeleri elde edilmiştir.

$$\% \text{Canlılık} = (\text{örneğin absorbans değeri}) / (\text{kontrolün absorbans değeri}) \times 100 \quad (3.29)$$

3.5.2.Toksisite

YKT tripeptidi ve YKT yüklü nanopartiküllerin 24 ve 48 saat aralıklarla uygulanması sonucunda oluşan sitotoksik etki MTT testi kullanılarak tanımlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakalara ekim işlemi gerçekleştirilen hücrelerin üstündeki peptid ve peptid içeren nanopartikül bulunan besiyerleri inkübe edilme süreleri sonucunda uzaklaştırılarak, tüm kuyucuklara 40 µL steril MTT eklenerek (Sigma), ışık almadan 4 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 160 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek 1 gece ışık almaksızın inkübasyona bırakılmıştır. Deney gruplarının absorbans değerleri 690 nm dalga boyu referans alınarak, 570 nm dalga boyunda ELISA Plate Reader ile ölçülmüştür (BioTek, ELx800) [140].

3.5.3.İstatistik Çalışmaları

İstatistiksel değerlendirmelerin yapılması kontrol grupları baz alınarak deney gruplarının anlamlılığı ile mümkün olmuştur. Değerlendirmelerden elde edilen sonuçlara tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. Deney gruplarının kontrol gruplarına göre anlamlılığı Dunnett’s testi ile değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ seviyesi anlamlılık değeri olarak baz alınmıştır. (Graphpad Prism version 7.00, Graphpad Software, San Diego California USA).

3.6. İLAÇ GELİŞTİRMEDE KULLANILAN MOLEKÜLER MODELLEME METODLARI

Moleküler modelleme, protein, ilaç molekülü gibi birçok molekülün kimyasal yapı ve reaksiyonlarına bağlı özelliklerini, üç boyutlu yapılarına bağlı olarak araştırmak, incelemek, karşılaştırmak ve görmek için kullanılan bilgisayar tabanlı tekniklerden oluşur [141].

3.6.1. Moleküler Mekanik Metodlar

Moleküler mekanik yöntemler klasik fizik yasalarını kullanarak istenen modelleme çalışmalarının yapılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu metod, yapılması istenen hesaplamaların semi empirik ya da kuantum mekaniksel metodları etkin bir şekilde kullanarak yapılamayan büyük moleküllerin modellemelerini gerçekleştirmeyi mümkün kılar.

Moleküler mekanik yöntemler, kuantum mekaniğinde olduğu gibi dalga fonksiyonu hesaplamak ya da toplam elektron yoğunluğu hesaplamalarını yapmak zorunda değildir. Bu metodda, basit cebirsel ifadeler yardımı ile hesaplamalar yapılır. Modelleme çalışması yapılan

bir molekülün toplam enerjisi, çeşitli okunabilir şekilde tanımlanabilen kısımlara bölünebilir. En genel ifade ile enerji, bağ gerilmesi, açı bükülmesi, torsiyon ile van der Waals ve elektrostatik etkileşimler gibi moleküller arası kuvvetlerin toplamı ile ifade edilir [142,143].

Moleküler mekanik yöntem, proteinler, organo-metalikler, polimer vb. gibi belirli molekül sınıfları için kullanılabilir bir yöntemdir. Moleküler mekanik, DNA segmentleri, proteinler gibi çok büyük moleküllerin modellenmesine izin verir. Bu metotta en önemli problem yapılan çalışmalarda elektron etkileşimlerini dikkate almamasıdır.

3.6.1.1. Teorik Konformasyon Analizi

Moleküllerin konformasyonel yapısı, elektronik ve titreşimsel özellikleri de etkilemektedir. Hem molekülün biyolojik fonksiyonlarını yerini getirip getirememesi hem de elektronik ve titreşimsel özellikler üstünde büyük öneme sahip olan konformasyonel yapının incelenmesi moleküler çalışmalar için önem arz etmektedir.

Teorik konformasyon analizi, moleküler mekanik metodlar kullanılarak, molekülün üç boyutlu yapısına ait tüm konformasyonlarının incelenip, aralarından en kararlı olanların belirlendiği bir yöntemdir. Molekülün kararlı yapıya sahip olması, biyolojik fonksiyonların yerine getirilmesi ile ilişkilidir. Teorik konformasyon analizi yöntemi, molekülün kararlı yapısal durumlarını ortaya çıkarmakta ve enerji değerlerini hesaplarken bağ uzunluğu, açı bükülmesi gibi bazı deneysel parametreleri kullanmaktadır.

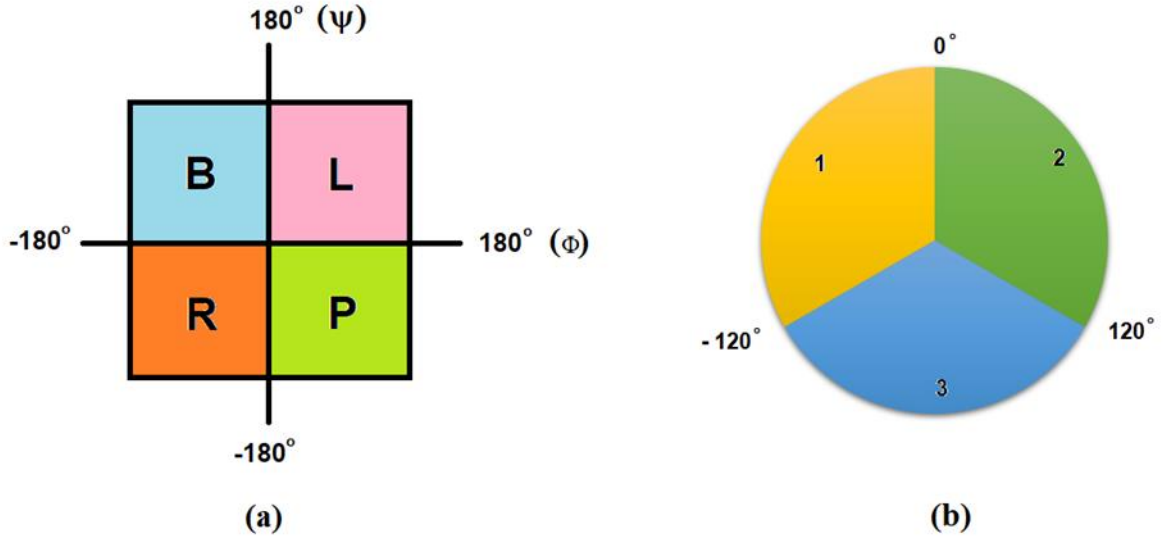
3.6.1.2. Teorik Konformasyon Analizinde Kullanılan Notasyonlar

Konformasyon, molekül içindeki tüm atomların tamamen x, y ve z kartezyen koordinatları ile tanımlanmasıdır. Peptid analizine yönelik hesaplamalı yaklaşımların birçoğu, genel konformasyonu tanımlayan değişkenlerin sayısını azaltmak için yaklaşımlar yapar. Bu sebeple, bağ uzunları ve açıları sabit kabul edilip, konformasyon tekli kovalent bağların etrafındaki dihedral açılarla tanımlanabilir. Herhangi bir dihedral açı, 2 farkı düzlemdeki dört atomun pozisyonu ile tanımlanabilir. Peptid konformasyonu bağlamında en önemli dihedral açılar Φ , Ψ ve ω dır. Φ dihedral açısı, $C' - N - C^\alpha - C'$ atomları ile tanımlanan torsiyon açısıdır. Yani $N - C^\alpha$ atomları arasındaki bağ etrafında döner. Ψ dihedral açısı, $N - C^\alpha - C' - N$ atomları ile tanımlanan torsiyon açısıdır. Yani $C^\alpha - C'$ atomları arasındaki bağ etrafında döner. Peptid bağı etrafındaki dönme (ω), peptid bağının çift bağ karakterine yakın olmasından dolayı (bir buçuk bağ özelliği

(~1.36 Å), genellikle 180° kabul edilir veya nadir de olsa 0° kabul edildiği durumlarda mevcuttur [144].

Peptidlerin konformasyonlarının hesaplanması için metodların geliştirilmesi 1960 lara kadar dayanmaktadır. Bir dizi denklem ve parametre göz önüne alındığında, konformasyonel enerji uygun şekilde seçilen konformasyonlar için hesaplanabilir. Tüm olası ya da tüm makul uyumlulukların bağıl enerjilerini karşılaştırarak, en düşük enerjili konformer (ler) daha sonra tercih edilen ya da en muhtemel yapı (lar) olarak tanımlanabilir.

Molekülün konformasyonu, yapı içindeki diziliş sırasına göre her bir amino asit rezidüsünün kendine has enerji bölgesi kullanılarak yazılır. Teorik konformasyon analizi, Ramachandran ve arkadaşları tarafından 1960lı yıllarda belirlenen konformasyon haritalarını esas almaktadır [145,146].



Şekil 3.9: Amino Asitlerin Ψ ve Φ Enerji Bölgeleri (a) ve Yan Zincir Bölgeleri (b).

Ana ve yan zincirler ile tanımlanan konformasyon bölgeleri, B,L,R,P harfleri ile ana zinciri, 1,2,3 sayıları ile yan zinciri ifade etmektedir. Örneğin; $B_{12}R_{123}L_{12}$ ifadesi, bir tripeptidin ilk amino asidinin B bölgesinde ve iki yan zincir açısına sahip olduğunu, ikinci amino asidin R bölgesinde ve üç yan zincir açısına sahip olduğunu ve üçüncü amino asidin ise L bölgesinde ve iki yan zincire sahip olduğunu ifade etmektedir [147,148].

Peptidleri oluşturan amino asitler

$$\theta = \Psi_i + \Phi_{i+1} \quad (3.30)$$

formülü ile Ψ - Φ iki yüzlü dihedral açılarına bağlı olarak gerilmiş (e) ya da katlanmış (f) formlardan hangisinde bulunduğu belirlenebilir. Moleküle ait θ değeri; $\theta = \pm 180^\circ$ ise katlanmış (f) formda, $\theta = 0^\circ$ ise gerilmiş (e) formda olduğu belirlenir. Bu değerleri elde etmek için Ψ - ϕ bölgelerinin orta değerleri olan 90° ve -90° alınarak, formülde yerine konulup yapının formu belirlenir.

3.6.1.3. Molekülün Toplam Enerjisi

Karbon, oksijen, azot ve hidrojenlerden oluşan birçok biyolojik molekül, vücut içine alındığında sulu bir ortam içine girdiği için çeşitli etkileşimlere maruz kalmaktadır. Elektronegativitesi yüksek atomlara sahip olan biyolojik moleküller vücuttaki su molekülleri ile birçok hidrojen bağı yapma eğilimine girer. Bu durum sistemin toplam enerjisi için büyük önem taşımaktadır. Molekül içindeki atomların farklı yüklere sahip olması atomlar arasında elektrostatik etkileşimlere sebep olup, moleküle ait toplam enerjide belirgin bir şekilde değişiklik yaratabilmektedir. Bir diğer önemli enerji ise van der Waals dediğimiz, aralarında kimyasal bağ bulunmayan atomlar arasında oluşur. Bu enerji de, sistemin toplam enerjisine önemli katkılarda bulunur. Torsiyon enerjisi ise, moleküllerin farklı konformasyonlarına sebep olarak bu sayede de toplam enerji değişiminde etkisi bulunan bir enerjidir.

Teorik konformasyon analizinde molekülün toplam enerjisi;

$$U_{\text{top}} = U_{\text{hb}} + U_{\text{elek}} + U_{\text{vdw}} + U_{\text{tor}} \quad (3.31)$$

şeklinde ifade edilir.

Hidrojen Bağ Enerjisi

Hidrojen bağları peptidlerin konformasyonel yapılarında önemli bir role sahiptir. Bir hidrojen bağı, molekülün elektronegatif bir atomuna kovalent bağ ile bağlı hidrojen atomu ile molekül içinde bir başka elektronegatif atom ya da başka bir moleküldeki bir elektronegatif atom arasındaki çekici kuvvettir. Elektronegativitesi yüksek atomlar bir veya birden çok paylaşılmamış elektron çiftine ve kısmi negatif bir yüke sahiptir. Elektronegativitesi yüksek

olan atom bağ yaptığı hidrojen atomunun elektronunu kendine doğru çektiği için hidrojen atomu kısmi pozitif yüklenir [149]. Biyolojik moleküller ile yapılan çalışmalarda en çok etkinlik gösteren hidrojen bağları O.... H ve N.....H dir.

Hidrojen bağ enerjisi hesabı için, hidrojen bağının kovalent bağ özelliklerine yaklaştığı varsayımı ile, hidrojen bağ atomları arasındaki bağlanmamış enerjiyi hesaplamak için Mors potansiyelini kullanabilir [144].

$$U_{hb} = D [1 - \exp(-n\Delta r)]^2 \quad (3.32)$$

İfade içindeki D, hidrojen bağının ayrışma enerjisini, n molekülün kutuplanma yatkınlığına bağlı bir sabiti ve Δr ise hidrojen bağının denge konumundan sapmasını ifade etmektedir.

Genelde alıcı ve verici arasında oluşan 15-40 kcal/mol arası enerjiye sahip hidrojen bağları oldukça güçlüdür [150], bağ uzunlukları 1,2 - 1,5 Å aralığındadır. 4-15 kcal/mol arası enerjiye sahip olan hidrojen bağlarının, 1,5 - 2,2 Å aralığında bağ uzunlukları mevcuttur. 1-4 kcal/mol arası enerjiye sahip olanlar ise 2,2 – 3,2 Å aralığında bir bağ uzunluğuna sahiptir [147,148].

Hidrojen bağları biyolojik moleküller için (örneğin protein, nükleik asit vb.) konformasyonel yapılarının oluşmasında büyük öneme sahiptir.

Elektrostatik Enerji

Flory ve arkadaşları [151], van der Waals etkileşimlerinin deneysel sonuçlarla uyumlu bir konformasyonel enerji haritası ortaya koyabilmek için yeterli olmadığını göstermiştir. Elektrostatik enerjinin hesaplamalara katılması ile, deneysel daha yakın enerji haritaları oluşturulmuştur. Bu durum, dipol-dipol etkileşimlerinin konformasyonel enerji için önemli olduğunu göstermiştir. Bu sebeple, peptidlerin konformasyon analizlerinde, elektrostatik enerji terimi hesaba katılır. Bu hesaplamalarda Coulomb potansiyeli ifadesi kullanılır.

$$U_e = K \sum_{i,j=1}^N \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (3.33)$$

Enerji ifadesindeki K, enerjiyi kcal/mol cinsine çevirmek için kullanılan bir katsayı, ϵ ifadesi ortamın dielektrik katsayısı, r_{ij} ifadesi atomlar arası mesafeyi ve q_i q_j de etkileşen i. ve j. atomların yüklerini ifade etmektedir.

Dielektrik katsayısı ϵ nun, peptidler için teorik konformasyon analizi yapılırken, suyun dielektrik katsayısından küçük olması beklenir. Teorik konformasyon analizinde yüksüz ortamlar için bu değer 4 alınırken iyonik ortamlar için 10 değeri seçilir [152].

Torsiyon Enerjisi

Torsiyon terimi, organik yapıdaki moleküllerin yapılarının belirlenmesinde oldukça önemlidir ve birbirine bağlı dört atom arasındaki kovalent bağın dönmesi ile tanımlanır [153,154].

Tekli bağ etrafındaki dönme hareketi, elektrostatik ve van der Waals enerjilerinin yanı sıra ihmal edilemeyecek büyüklükte bir başka enerji ifadesini ortaya çıkarır. Bu enerji terimi torsiyon enerjisi adı ile toplam enerji ifadesi içinde yer alır. Torsiyon enerjisi aşağıda belirtilen formda ifade edilir.

$$U_{\text{tor}} = U_o / 2 (1 \pm \cos n\theta) \quad (3.34)$$

Bu ifade içindeki U_o dönme potansiyel engeli, θ dihedral açının değeri ve n engelin simetrisini ifade eden terimlerdir. İfade içindeki pozitif-negatif seçimi, dönme engelini maksimum olduğu θ değerinde $U_{\text{tor}} = U_o$ olacak şekilde yapılır [144].

Van der Waals Enerjisi

Van der Waals etkileşimi, herhangi bir kimyasal bağ olmadan atomlar arası mesafenin 2,5- 2,7 Å aralığına ulaşması ile gerçekleşen bir etkileşimdir. Molekülün toplam enerjisine önemli katkılarda bulunan bu terim, çekici (uzun menzilli) ve itici (kısa menzilli) bileşenlerden oluşur. Çekici bileşen, moleküler elektronik dağılımdaki dalgalanmalardan kaynaklı olarak anlık dipollerin oluşması ile van der Waals etkileşme terimine katkıda bulunur. İtici bileşen, çok kısa mesafelerde atomların birbirlerini güçlü bir şekilde itmesi ile oluşup, van der Waals terimine katkıda bulunur [155].

Van der Waals enerjisi çok küçük olmasına rağmen molekül içinde birden çok atom van der Waals etkileşimlerine maruz kalır. Bu enerji, toplam enerji ifadesi içinde göz ardı edilemeyecek bir katkı sağlar. Van der Waals enerjisinin ifade edilmesinde Lennard-Jones potansiyeli kullanılır.

$$U_{vdw} = - \frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}} \quad (3.35)$$

Çekme ve itme ifadeleri yukarıdaki şekilde gibidir. A ve B terimleri molekülün polarizabilitesi ile ilgili terimler olup, r etkileşen atomlar arası mesafeyi ifade etmektedir. İtme ifadesinde r nin üssünün büyük olması atomların çok yaklaşması sebebiyle büyük bir itme kuvvetinin varlığını göstermektedir [147].

3.6.2.Moleküler Dinamik Metodlar

Moleküler dinamik (MD) metodlar, Newton'un hareket denklemleri ile moleküler sistemlerin kinetik ve termodinamik özelliklerini simüle etmek için kullanılır [156]. Moleküler dinamik simülasyonlar, atomik seviyede moleküler sistemlerin yapısını ve etkileşimlerini öngörmeye ve anlamada önemli bir rol oynar. Prediktif moleküler tasarımı mümkün kılan önemli araçlardır [157].

Bu bilgisayar simülasyonları hem teorik hem de deneysel modeller arasında ve mikroskobik uzunluk ve zaman ölçekleri ile laboratuvarın makroskopik dünyası arasında köprü görevi görmektedir [158].

Moleküler dinamik simülasyonu, klasik hareket denklemlerinin sayısal, adım adım çözümlerinden oluşur. Bu simülasyon, molekül içindeki her bir atom üstündeki net kuvveti ve ivmeyi belirlemek için Newton'un denklemlerini kullanarak moleküllerin bir moleküler düzeneğindeki hareketini hesaplar. r_i konumundaki her bir atom i, kütle m_i ve sabit bir yük q_i olan bir nokta olarak muamele edilir [159].

Potansiyel Enerji Fonksiyonu:

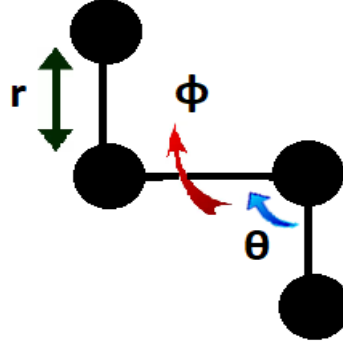
$$U = (r_1, r_2, \dots, r_N) = U(\vec{R}) \quad (3.36)$$

her atom üzerindeki kuvveti belirlemek için kullanılır:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i = -\vec{\nabla} U(\vec{R}) \quad (3.37)$$

Moleküler dinamik simülasyon çalışmalarda kilit rol oynayan potansiyel enerji, molekül içi ve moleküller arası etkileşim enerjilerinin toplamı olarak ifade edilir.

Moleküller arası potansiyel enerjiler, elektrostatik ve Lennard-Jones potansiyellerinden oluşurken, molekül içi enerjiler ise, gerilme enerjisini, bükülme enerjisini ve burulma enerjisini içeren bağlanma etkileşimlerinden oluşur.



Şekil 3.10: Bir moleküldeki bağ (r), açı (θ) ve dihedral (Φ) gösterimleri.

Potansiyel enerji fonksiyonu;

$$\begin{aligned}
 U(\vec{R}) &= U_{bağ} + U_{açı} + U_{dihedral} + U_{vdw} + U_{elek} = \\
 &= \sum_{bağ} k_i^{bağ} (r_i - r_o)^2 + \sum_{açı} k_i^{açı} (\theta_i - \theta_o)^2 + \\
 &+ \sum_{dihedral} k_i^{dihedral} (1 + \cos(n_i \phi_i + \delta_i)) \\
 &+ \sum_i \sum_{j \neq i} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{3.38}$$

Moleküler dinamik simülasyonlarında izlenen temelde 4 adım mevcuttur. Bunlar; sistemin hazırlanması, minimizasyon, dengeleme ve ürettir.

Sistem hazırlama, bir başlangıç yapısının oluşturulması, çözdürme (gerekirse), bir kuvvet alanı uygulanması, vb. dahil olmak üzere uygun bir simülasyon paketine girdi için istenen sistemin başlangıç durumunu hazırlama üzerine odaklanır.

Minimizasyonun amacı “çarpışmalardan” kurtulmak, yani yapıyı bir minimuma doğru rahatlatmaktır. Böylece simülasyonda herhangi bir atom üstündeki kuvvetler, atomları tek bir zaman adımı mantıksız bir mesafeye taşıyacak kadar büyük olmaz. Bu adımda Steepest Descent gibi standart minimizasyon algoritmaları kullanılır [157].

Moleküler dinamik toplulukları (NVE, NVT, NPT), moleküler simülasyon çalışmalarında sistem içindeki parçacıkların farklı konum ve farklı hızlara sahip olmasından dolayı oluşan farklı durumların toplanması ile meydana gelirler [160,161].

Toplam atom sayısı N ve V hacmi de sabit tutulursa, MD simülasyonlarının mikrokanoik (NVE) toplulukta yapıldığı söylenir. Büyük NVE sistemlerinde sıcaklıktaki dalgalanmalar küçüktür ve yaklaşık olarak sabit kabul edilebilir. Sıcaklığın ve basıncın sabit tutulması gereken durumlar da vardır. Bu nedenle, bu sınıflar için MD, partikül sayısının, hacminin ve sıcaklığın sabitlendiği kanonik NVT topluluğu gibi izotermal bir topluluğu ve partikül sayısının, basıncın ve sıcaklığın sabitlendiği izotermal-izobarik NPT topluluğunu yeniden üretmek zorundadır [156,161].

Moleküler simülasyon çalışmalarında, NVT (parçacık sayısı- N , hacim- V ve Sıcaklık- T) ve NPT (parçacık sayısı- N , basınç- P ve sıcaklık- T) sistemi belirli bir sıcaklık ya da basınçta dengelenmesi gibi deneysel ortama uygun hazırlanmasında önem arz eden topluluklardır.

Sistemin hazırlanması, minimizasyon ve dengeleme adımlarından sonra, üretim adımına geçilerek istenilen şartlarda simülasyon gerçekleştirilir.

3.6.2.1. GROMACS

Moleküler dinamik simülasyonları, proteinler, nükleik asitler ve membranlar gibi biyolojik sistemler de dahil olmak üzere büyük makromoleküllerin konformasyonel çalışmalarını incelemeye yardımcı olur. Bilimsel araştırma ve simülasyonlar için moleküler dinamik yazılım paketleri mevcuttur [162].

GROningen MACHine for Chemical Simulations (GROMACS), Newton hareket denklemlerini kullanarak çok sayıda etkileşime sahip protein, lipid ve nükleik asit gibi onlarca atomdan oluşan biyolojik moleküler yapıların moleküler dinamik çalışmalarını gerçekleştirmek için kullanılan bir pakettir. Ayrıca, GROMACS bağlanmamış etkileşimleri hesaplamakta oldukça hızlı olduğu için (genellikle simülasyonları baskın yapan), birçok grup tarafından örneğin polimerler gibi biyolojik olmayan sistemler üstündeki araştırmalar için de kullanılmaktadır [163].

GROMACS, hızlı bir simülasyon programı olup, GROMOS, AMBER, CHARMM gibi farklı kuvvet alanlarına yönelik destek sağlamaktadır.

3.6.3. Kuantum Mekaniksel Metodlar

Schrödinger eşitliğine dayanan kuantum mekaniksel metodlar yardımı ile, kuvvet alanı parametrelerine sahip olmayan küçük moleküllerin optimizasyon çalışmaları, polarizasyon ya da olağandışı elektron dağılımından etkilenen moleküler geometrilerin belirlenmesi, geçiş durumları ve reaksiyon yollarının belirlenmesi gibi hesaplamalar gerçekleştirilmektedir [164].

Schrödinger denklemi, tek elektronlu bir sistem için tam olarak çözülebilirken, diğer sistemler için varyasyon ve pertürbasyon yöntemleri uygulanır. Kuantum mekaniksel hesaplamalar bu sebeple moleküler mekaniksel hesaplamalara göre daha uzun zaman almaktadır [148].

3.6.3.1. *Ab-initio*

Moleküler mekanik ve yarı ampirik yöntemlerden farklı olarak *ab initio* kuantum mekaniksel yöntemi, deneysel verileri ampirik parametreler kullanmadan üretebilmektedir. *Ab initio* hesaplamalarında, kullanılan fonksiyonun ya da denklemin çözümü için bazı yaklaşıklıklar kullanılır ve bu yaklaşıklıklara göre *ab initio* yöntemleri kendi içinde çeşitlenir. En yaygın kullanılan *ab initio* yöntemleri Hartree-Fock Öz Uyumlu Alan Teorisi (HF-SCF) ve Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT) dir. Hartree-Fock (HF) yaklaşımında merkezi alan yaklaşımı sebebiyle, enerji gerçek enerji değerinden daima büyük ya da büyük eşit çıkar. Yoğunluk fonksiyonel teorisi yaklaşımının Hartree-Fock (HF) yaklaşımından en önemli farkı, bu yaklaşımın elektron yoğunluğunu hesaplamalara dahil etmesidir [147,148].

Ab initio hesaplamalarının niteliği, kullanılan hesaplama yöntemi ve seçilen baz setine göre belirlenir. Baz set seçimi, hesaplamanın amacı ve çalışılacak molekül ile ilişkilidir. Baz setleri moleküler orbital fonksiyonları ile tanımlanmaktadır. Bu fonksiyonlar, Slater tipi ve Gaussian tipi atomik orbital fonksiyonlarından oluşmaktadır [164].

Örneğin Gaussian tipi atomik orbitallerin kullanıldığı m-npG baz setinde m, kapalı kabuk içindeki her atomik orbital primitif fonksiyon adedini ifade ederken n ve p açık kabuk için belirlenen fonksiyon sayılarını ifade etmektedir. Çoğu zaman atomik orbitaller yetersiz kalabilmektedir. Uzaysal ve kutupsal (polarizasyon) olarak sistemin doğru bir şekilde tanımlanabilmesi için ek primitif gaussian fonksiyonları eklenebilmektedir. Polarizasyon için d karbon atomları, p hidrojen atomları ve f geçiş metalleri için kullanılan fonksiyon sembolleridir. Uzaysal boyut sorunlarında ise dağılım (diffuse) fonksiyonları kullanılmaktadır. Bu

fonksiyonlar da + ve ++ sembolleri ile ifade edilir. Tek + hidrojen atomları dışındaki ağır atomlar için, ++ ise hem hidrojen atomları hem de ağır atomlar için kullanılan fonksiyonları ifade etmektedir [147].

3.6.3.2. Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT)

Yoğunluk fonksiyonel teorisi, Kohn ve Hohenberg tarafından geliştirilen iki temel matematiksel teoreme ve 1960lı yılların ortalarında Kohn ve Sham tarafından türetilen bir eşitlikler kümesine dayanmaktadır [165].

Yoğunluk fonksiyonel teorisi dalga fonksiyonuna değil, daha çok $\rho(x,y,z)$ ile gösterilen elektron yoğunluğu olarak adlandırılan elektron olasılık yoğunluğuna dayanır [166]. Yoğunluk fonksiyonel teoreminde, temel düzey enerji fonksiyonu

$$E[\rho(r)] = E_V[\rho(r)] + E_{kin}[\rho(r)] + E_{xc}[\rho(r)] \quad (3.39)$$

şeklinde ifade edilir.

İlk ifade potansiyel ifadesi olup çekirdek ve elektronlara ait itme çekme durumlarını ifade ederken, ikinci ifade elektronlara ait kinetik enerjiyi, üçüncü ifade Hartree terimi olarak bilenen ve elektronlar arası etkileşimleri verir. Son ifade ise exchange (değiş-tokuş) ifadesi olup, elektronlar arası değiş tokuş ile bağlantılı olan enerji, Coulomb etkileşme enerjisi ve kinetik enerji düzenlemeleri için kullanılır [148].

Yoğunluk fonksiyonel teorisi metodları kendi içinde yukarıdaki son ifade olan değiş tokuş ifade ile farklılaşır. Örneğin; BLYP metodu Becke, Lee, Yang ve Parr isimli bilim insanlarının çalışmaları ile ortaya çıkan bir metoddur. B3LYP metodu ise Becke'in BLYP metoduna 3 hibrit fonksiyonu eklemesiyle oluşmuş bir diğer metoddur.

3.6.3.3. Gaussian

Kuantum mekaniğinin temel yasalarını kullanarak çeşitli molekül sistemlerini modellemeyi sağlayan Gaussian programı, 1970 yılında John Pople ve Carnegie Mellon Üniversitesindeki grubu [167] tarafından yayınlanmış bir yazılım paketidir.

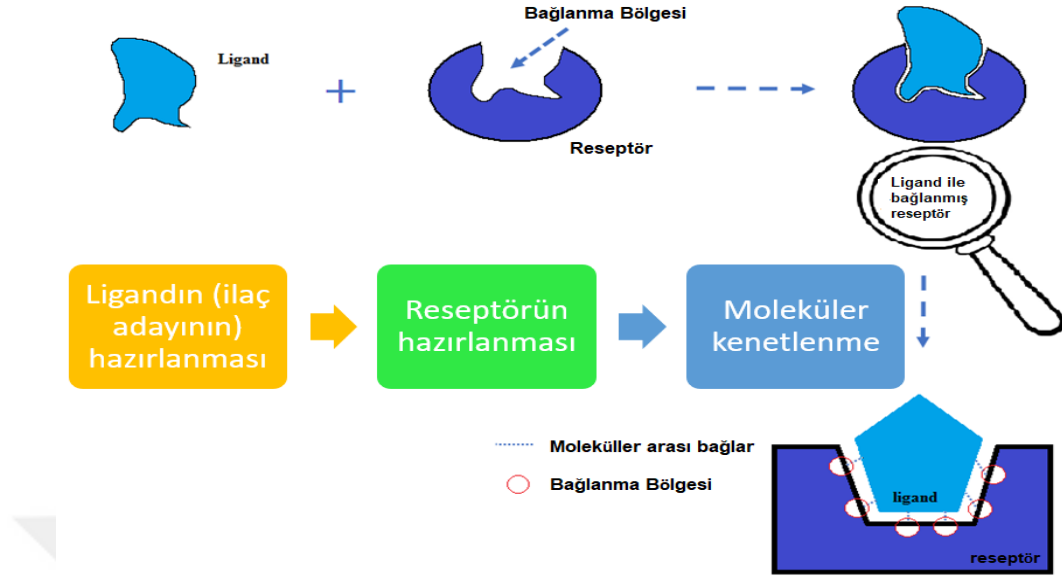
Gaussian programı, molekülerin optimizasyonu, bağ, açı, dihedral bilgileri, titreşim frekansları, teorik IR ve Raman spektrumlarını, polarizebilite, elektrostatik potansiyel gibi bilgileri elde etmeyi sağlayan hesaplamalı kimya programıdır [148].

GaussView ise Gaussian programında hesaplamaları gerçekleştirilmiş olan molekül ile ilgili sonuçları ve üç boyutlu yapısını görüntülememizi sağlayan bir programdır [147].

3.6.4.Moleküler Kenetlenme (Doking) Metodu ve ADME analizi

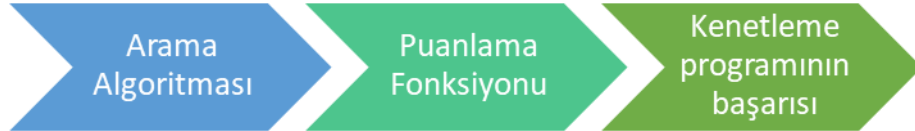
3.6.4.1.Moleküler Kenetlenme Yöntemi

İlaç olma potansiyeli taşıyan moleküllerin uygun reseptörler ile atomik düzeydeki etkileşimlerini modelleyip, davranışını karakterize eden, biyokimyasal süreçlerin aydınlatılmasında önemli bir yere sahip olan moleküler kenetlenme metodu, ligand-reseptör kompleks yapısının bir tahminini sağlamayı ve hesaplama yöntemlerini kullanarak en düşük enerjili ligand-reseptör kompleksini elde etmek için ligandın en iyi pozunu belirlemeyi amaçlamaktadır [168-170]. Burada, hedef makromolekül (protein, DNA gibi) ve ilaç adayı arasındaki hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleri oldukça önemlidir. Bu etkileşimlerle, ligand molekülünün hedef makromolekül ile etkileşim kurup bağlanması sonucunda aktivite-seçicilik ile ilgili etkiler araştırılmaktadır [171].



Şekil 3.11: Moleküler Kenetlenme Metodu Şeması.

Arama algoritmaları ve puanlama fonksiyonları, moleküler kenetleme programlarını çeşitlendirerek birbirlerinden ayırır. Moleküler kenetleme çalışmalarında öncelikle ligandın mümkün konformasyonları belirlenir ve yönlendirme (poz) arama algoritmaları ile sağlanır. Daha sonra bağlanma afinitesi puanlama fonksiyonlarıyla değerlendirilir.



Şekil 3.12: Ligand yerleştirme adımları.

Arama Algoritmaları

Kenetleme işleminde, en iyi ligand pozlarını bulma aşamasında arama algoritmaları öne çıkar. Burada, ligandın serbestliğini araştırmak için arama algoritmaları üç ana gruba ayrılır. Bunlar; sistematik, stokastik (veya rastgele) ve deterministik aramalardır.

Sistematik arama algoritmaları ile ligandın tüm serbestlik dereceleri araştırılır. Dönebilir bağların sayısı, kombinasyon sayısını etkileyebilir. Bundan dolayı, yerleştirme işleminin kolaylığı için, ligand pozlarının başlangıçta bazı kısıtlamalar uygulanır ve filtrelenen ligand konformasyonları daha kesin düzeltme işlemlerine tabi tutulur [172]. Glide [173] ve Dock [174] gibi programlarda bu arama algoritmalar kullanılmaktadır.

Stokastik veya Rastgele yöntemlerde de, her adımda ligandın ötelenme, dönme ve konformasyonu dahil, rastgele değişken serbestlik dereceleri oluşturulabilmektedir. Bu ligand pozları, her birinin reddedilip edilmemesine karar vermek için olasılık kriterlerine göre değerlendirilir [172,175]. AutoDock [176] ve Molegro Virtual Docker [177] gibi programlarda bu tip algoritmalar kullanılmaktadır.

Üçüncü kategori olan deterministik yöntemler, ligandı esnek bir gövde olarak düşünerek moleküler simülasyonlar gibi deterministik yöntemleri içerir [178]. Simülasyonlar, bireysel parçacıkların hareketinin zamanın bir fonksiyonu olarak ayrıntılarını sağlar [179]. Bu yöntemler Newton'un hareket denklemleri ile yapılan hesaplamalara dayanmaktadır.

Puanlama Fonksiyonları

Arama algoritmaları liganda ait konformasyonları belirledikten sonra, puanlama fonksiyonları devreye girer ve bu konformasyonları pozların doğruğuna göre eler. Puanlama fonksiyonlarının temelde hedefi, kenetlenme gerçekleştikten sonra bağlanma afinitesini fonksiyonlar aracılığıyla belirlemektir [180]. Puanlama fonksiyonları alan tabanlı, ampirik tabanlı ve bilgi tabanlı puanlama fonksiyonları olmak üzere üçe ayrılır.

Alan tabanlı puanlama fonksiyonları, MM yöntemlerle etkileşim enerjisini, bağ terimleri, elektrostatik ve Van der Waals etkileşimlerinin toplamı ile hesaplanır [181]. Burada solvasyon ve entropi katkı hesaplamaları problemdir. En basiti, kuvvet alanı puanlama fonksiyonu gibi mesafeye bağlı bir dielektrik sabiti $\epsilon(r_{ij})$ kullanmaktır:

$$E = \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \right) \quad (3.40)$$

Bu tip puanlama fonksiyonlarına H-bağ, solvasyon ve entropi katkıları eklendiğinde genişletilebilir [169,172]. AutoDock programında puanlama fonksiyonu olarak alan tabanlı puanlama fonksiyonları kullanılır.

Ampirik puanlama fonksiyonlarında ise bağlanma enerjisi, vdw, elektrostatik, H-bağ ve farklı enerji bileşenlerini (örn: çözülme terimleri, hidrofobik etki ve bağlanma entropisi) içerir. Basit enerji terimlerinin kullanıldığı ampirik fonksiyonlar, kuvvet alanına dayalı yöntemlerden daha hızlıdır [181].

$$\Delta G = \sum_i W_i \Delta G_i \quad (3.41)$$

Burada ΔG_i ampirik enerji terimlerini sembolize eder ve W_i ye karşılık gelen katsayılar ise üç boyutlu yapıları bilinen reseptör-ligand kompleks çalışmalarının bağlanma afinite verilerinin ayarlanması ile tanımlanmaktadır [182-191]. Glide programı tarafından kullanılan puanlama fonksiyonlarıdır.

Üçüncü yaklaşım ise bilgiye dayalı olan puanlama fonksiyonlarıdır. Ligand-makromolekül (protein, DNA vb.) arasındaki atomik mesafeleri belirlemede ligand-reseptör komplekslerinin kristal yapılarının istatistiksel analizini kullanır. Bu yaklaşımın prensibi, ortalama kuvvet potansiyelinin ters Boltzmann ilişkisi ile elde edilmesine dayanmaktadır.

$$w(r) = -k_B T \ln\left(\frac{\rho(r)}{\rho^*(r)}\right) \quad (3.42)$$

Potansiyelin belirlendiği bu denklemde, k_B Boltzmann sabiti, T sistemin sıcaklığı, $\rho(r)$ çalışmada r mesafesindeki reseptör-ligand atom çiftinin sayıca yoğunluğunu ifade ederken, $\rho^*(r)$ atomlar arası etkileşimlerin sıfır olduğu referans durumudur.

Bilgi tabanlı puanlama fonksiyonları, diğer puanlama fonksiyonlarına göre doğruluk ve hız arasında daha iyi bir denge sağlar [169,172,181,192].

3.6.4.2. *Schrödinger GLIDE Modülü*

Glide (Enerjetik ile Grid Tabanlı Ligand Yerleştirme), hesaplama hızı yüksek ve ligandın kullanabileceği konumsal, oryantasyon ve konformasyonel alanın araştırılmasını sağlayan bir modüldür. Glide'ın amacı, bir dizi hiyerarşik filtre kullanarak reseptörün aktif bölgesinde ligandın olası pozisyonlarını araştırmaktır.

Glide, HTVS'den (Yüksek verimli sanal ekranlama) SP'ye (standart hassasiyet) kadar tüm hızlı ve doğru seçenekleri sunar. HTVS ve SP yerleştirme aynı puanlama fonksiyonunu kullanır. HTVS, ara konformasyonların sayısını ve son torsiyonel düzeltme ve örnekleme bütünlüğünü azaltır. Ek olarak, XP (ekstra hassasiyet) SP ile karşılaştırıldığında daha kapsamlı örnekleme yapar. XP Glide metodolojisinin amacı, aday ligandların reseptörün belirli bir konformasyonuna bağlanma kabiliyetini yarı kantitatif olarak sıralamaktır [173,193,194].

3.6.4.3. *AutoDockTools ve AutoDock Vina*

Moleküler kenetleme çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılan bir program olan AutoDock Vina, önceki geliştirilen AutoDock 4'e göre daha hızlı olup, grid haritalarını hızlıca hesaplar ve sonuçları kümeleyerek kullanıcıyı ayrıtırlara boğmadan sunar. Birden fazla CPU çekirdeği kullanabildiği için daha hızlı olması avantajlıdır [195]. AutoDockTools ise AutoDock Vina programında hesaplamaların gerçekleştirilmesi için ligandın, reseptörün ve grid kutusunun hazırlandığı, program sonucunda afinite değeri ve yakın etkileşimlerle ilgili sonuçları görüntülememizi sağlayan programdır.

3.6.4.4. *ADME (emilim, dağılım, metabolizma ve atılım)*

İlaç aday moleküllerinin vücuda alındığında ADME özellikleri gibi farmakokinetik bilgilerinin belirlenmesi, biyolojik sistemlerde farklı noktalarda ilaç geliştirme çalışmaları sırasında göz önüne alınarak, önemli katkılar sağlamaktadır.

Oral alınabilen ilaç adaylarından faz II klinik aşamasına gelebilmiş olanların çoğunluğuna bağlı olarak Lipinski tarafından 4 fizikokimyasal parametre belirlenmiştir. Lipinskinin 5'ler kuralı olarak da adlandırılan bu parametreler, ilaç olabilme potansiyeli ile ilgili bilgi verir. Bu parametreler şu şekildedir [196,197]:

- ✓ Hidrojen bağ donör sayısı en fazla 5 olabilir (OH'lerin ve NH'lerin toplamı olarak ifade edilir)
- ✓ Hidrojen bağ akseptör sayısı en fazla 10 olabilir (O ve N atomlarının toplamı olarak ifade edilir)
- ✓ Moleküler ağırlığın 500 Dalton'dan daha az olması beklenir
- ✓ Oktanol-su bölme katsayısı log P'nin 5' den büyük olmaması beklenir

ADME hesaplamalarında verilen bazı parametreler ayrıntılıları ile aşağıda anlatılmıştır.

Molekül Ağırlığı: Moleküler ağırlık, molekülü oluşturan atomların kütlelerinin toplanması ile belirlenebilir. Molekül ağırlığı, ilaç geliştirme sürecinde önemli bir parametredir [198]. Literatürde yapılan bir çalışmada, hedeflendirilen peptid ilacın moleküler ağırlığının, etkinliği artırma ve toksisiteyi azaltmada önemli olduğu bildirilmiştir [199]. Başarılı olan ilaçların 500 dalton'dan daha az moleküler ağırlıklığa sahip olduğu bilinmektedir [200].

Oktanol / Su Bölme Katsayısı (ClogP): İki konsantrasyonun oranı ile elde edilen bu değer, molekülün hidrofilik mi yoksa hidrofobik mi olduğu ile ilgili tahmin sunar. Bu katsayının bir başka önemi ise sulu ortamda Kan-Beyin bariyeri için yapılan hesaplamalarda tanımlayıcı olarak kullanılmasıdır [201].

Polar Yüzey Alanı (PSA): Polar yüzey alanı, oktanol-su bölme katsayısı, ilaç moleküllerinin taşınması ve emilimi ile ilişkilendirilebilir [202]. Polar yüzey alanı, polar atom ve bağlı hidrojenlerin yüzey alanlarının toplanması ile hesaplanır. Polar yüzey alanının belirlenmesi ile ilacın hücre geçirgenliği için taşıyıcı ($<140 \text{ Å}^2$) ve/veya kan beyin bariyerinde taşıyıcı ($<90 \text{ Å}^2$) olup olmadığı ile yorum yapılabilir [198,203,204]. Polar yüzey alanı kullanılarak yapılan çalışmalarda Caco-2 geçirgenliği tahmini ile ilgili de yorumlarda bulunulmuştur [205,206]. Polar yüzey alanı belirlemede moleküle ait 3 boyutlu konformasyon bilinmelidir. Bunun belirlenmesi uzun sürebileceğinden, Ertl ve ark. bir topoloji dosyasına ihtiyaç duyan öngörücü Topolojik Polar Yüzey Alanı (TPSA) modelini geliştirmiştir [207].

Caco-2 hücre geçirgenliği ve MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) hücre geçirgenliği: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan, insan kolonik adenokarsinomundan elde edilen ve intestinal epitel hücre bariyerinin birçok morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine sahip olan Caco-2 [201], ilaç adayının bağırsak geçirgenliğinin tahmini için kullanılır [208]. Literatürde Caco-2 geçirgenliği aralığı sırasıyla $<1 \times 10^{-6}$ (% 0-20 zayıf), $1-10 \times 10^{-6}$ (% 20-70 orta derecede), $> 10 \times 10^{-6}$ (% 70-100 iyi) dir [209,210]. Caco-2'ye alternatif ve daha hızlı büyüyen, hücre çalışmalarında kullanılan MDCK hücre hatları [211], insan intestinal emilimine karşı gözlenen geçirgenliğe ilişkin caco-2 hücre çizgileri ile benzer özellikler göstermektedir [201,212].

Cilt geçirgenliği: Cilt geçirgenliği parametresi, ciltten uygulanan ilaçlar için kullanılır. cm/s birimi ile verilen K_p geçirgenlik katsayısı, cilt geçirgenliği hakkında bilgi sağlar. Herhangi bir ilacın cilt geçirgenlik tahmini, cilt tipi ile ilişkilidir. Örneğin, K_p aralığı insan derisi için genellikle $10^{-5} - 10^{-3} \text{ cm} / \text{s}$ 'dir [213].

Cilt geçirgenliğinin tahmini için en çok kullanılan model Potts-Guy ilişkisidir. Bu modeldeki cilt geçirgenliği tahmini aşağıdaki denklem ile elde edilir.

$$\text{Log } K_p = -2.74 + (0.71 \times \text{Log } P_{o/w}) - (0.0061 \times \text{moleküler ağırlık}) \quad (3.43)$$

Bir ilaç adayı için deneysel cilde nüfuz etme verisi yoksa transdermal uygulamalar için cilt geçirgenliği ile ilgili tahmin yukardaki denklem ile sağlanabilir [213].

Kan-Beyin Bariyeri (BBB): Kan-Beyin bariyeri beyine kan yoluyla zararlı maddelerin girmesini önler. Merkezi sinir sistemi hastalıkları için kullanılan ilaçların kan-beyin bariyerini geçmesi önemlidir [214].

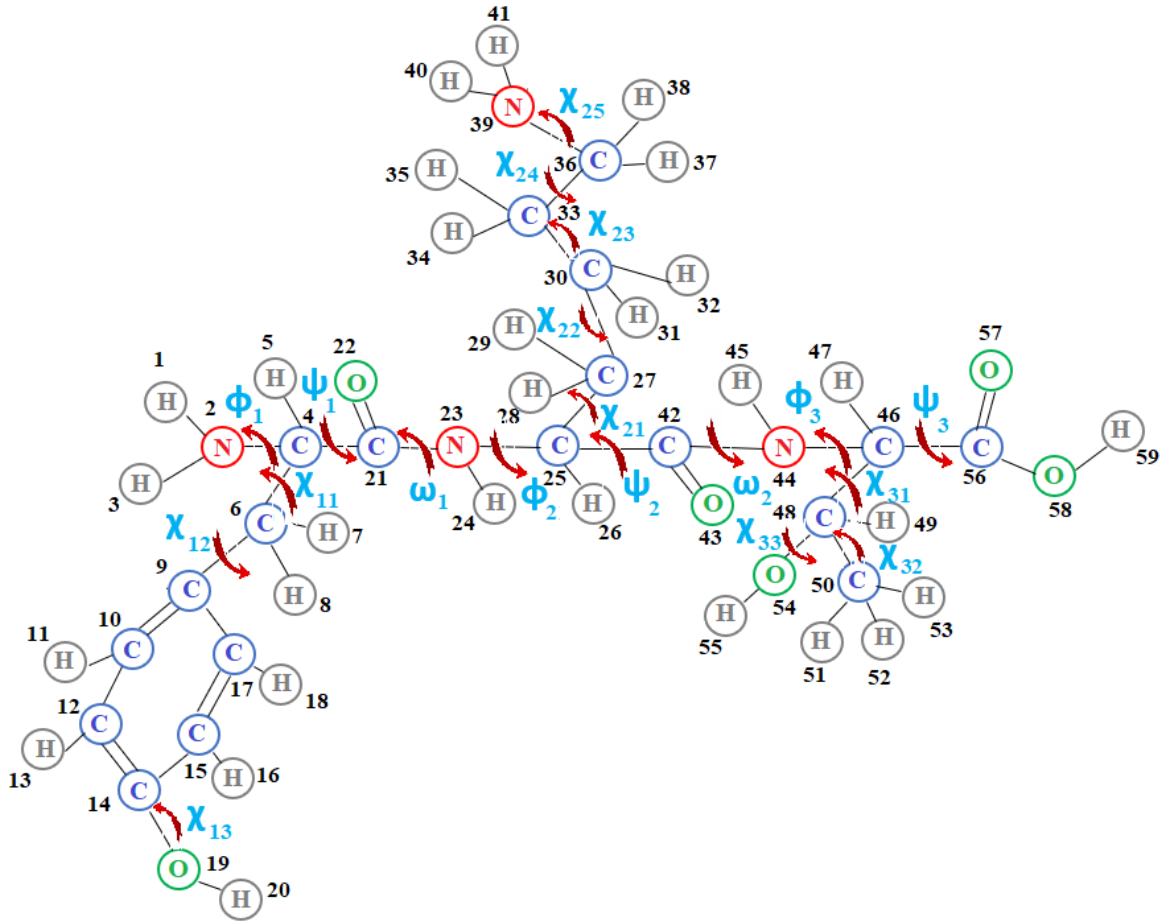
HSA (İnsan Serum Albumin) Serum Protein Bağlanması: Taşıyıcı bir protein olan insan serum albümini kan plazmasındaki protein miktarının çoğunluğuna sahiptir [215,216]. İnsan serum albümini, hormonlar, yağ asitleri gibi bileşiklerin kan dolaşımından taşınmasından sorumludur [217]. Plazma Protein Bağlanması, ilaçların plazmadan hedef dokuya dağılımını etkiler [218]. Serum protein etkileşimleri dağıtım hacmini etkiler. İnsan serum albuminin, kan-beyin bariyeri nüfuzu ile ilişkisi vardır [219]. Dolayısıyla, insan serum albumin ve etken maddenin etkileşimi, maddeye ait ADME profilini etkiler [220,221].

4. BULGULAR

4.1. YKT TRIPEPTİDİ

4.1.1. Teorik Konformasyon Analizi

Ramachandran tarafından belirlenen konformasyon bölgelerinden yararlanılarak, YKT tripeptidinin mümkün olan konformerleri Teorik Konformasyon Analizi ile incelenmiştir. En düşük enerji ve en kararlı yapıya sahip tripeptid yapısı elde edilmiştir.



Şekil 4.1: YKT tripeptidi, yapısı, atom sayıları ve dihedraller.

YKT tripeptidini oluşturan tirozin, lisin ve treonin amino asitlerinin konformasyon bölgeleri Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Tirozin amino asidinin konformasyon bölgeleri.

Tirozin	ϕ	ψ	χ_1	χ_2	χ_3
R	-100.000	-33.000	60.000 180.000 -60.000	90.000 -90.000	60.000 180.000 -60.000
	-110.000	-60.000			
	-140.000	-60.000			
B	-115.000	160.000			
	-110.000	150.000			
	-120.000	150.000			
L	40.000	40.000			
	50.000	80.000			
	50.000	60.000			

Tablo 4.2: Lizin amino asidinin konformasyon bölgeleri.

Lizin	ϕ	ψ	χ_1	χ_2	χ_3 χ_4 χ_5
R	-110.000	-50.000	60.000 180.000 -60.000		180.000
	-110.000	-60.000			
	-115.000	-60.000			
B	-120.000	150.000			
	-120.000	115.000			
	-120.000	100.000			
L	40.000	60.000			
	60.000	70.000			
	60.000	70.000			

Tablo 4.3: Treonin amino asidinin konformasyon bölgeleri.

Treonin	ϕ	ψ	χ_1	χ_2	χ_3
B	-100.000	150.000	60.000 180.000 -60.000	90.000 -90.000	180.000
	-115.000	155.000			
	-130.000	110.000			
R	-80.000	-50.000			
	-80.000	-40.000			
	-75.000	-55.000			
L	45.000	60.000			
	40.000	60.000			
	60.000	70.000			

Tablo 4.4: Tyr-Lys-Thr tripeptidi için tüm konformasyon bölgelerine göre incelenen konformasyon sayıları ve minimum enerjinin (global enerjinin) bulunduğu konformasyon bölgesi.

Konformasyon bölgeleri	Konformasyon sayısı	Global enerji (kcal/mol)
BBB	13122	6.37 kcal/mol
BBR	13122	6.99 kcal/mol
BRB	13122	8.38 kcal/mol
BRL	486	12.04 kcal/mol
BRR	13122	9.21 kcal/mol
RRB	13122	8.90 kcal/mol
RRR	13122	9.53 kcal/mol
RBB	13122	7.25 kcal/mol
RBR	13122	8.08 kcal/mol
	Toplam: 105462	

Teorik konformasyon analizi yöntemi, molekül içi etkileşimleri dikkate alarak molekülün toplam enerjisini veren ve kararlı konformasyonları belirleyen bir yöntemdir. Bu yöntemle göre, en düşük enerjili konformasyon BBB bölgesinde 6.37 kcal/mol enerjiye sahiptir.

Tablo 4.5: 6.37 kcal/mol enerjiye sahip Nötral Tyr-Lys-Thr tripeptidinin global konformasyon için dönü açıları.

Açılar	PHI ₁	CH ₁₁	CH ₁₂	CH ₁₃	PSI ₁	W ₂
Giriş	-115.00	180.000	-90.000	-60.000	160.000	180.00
Çıkış	-117.045	179.449	-98.510	-1.950	149.699	181.981

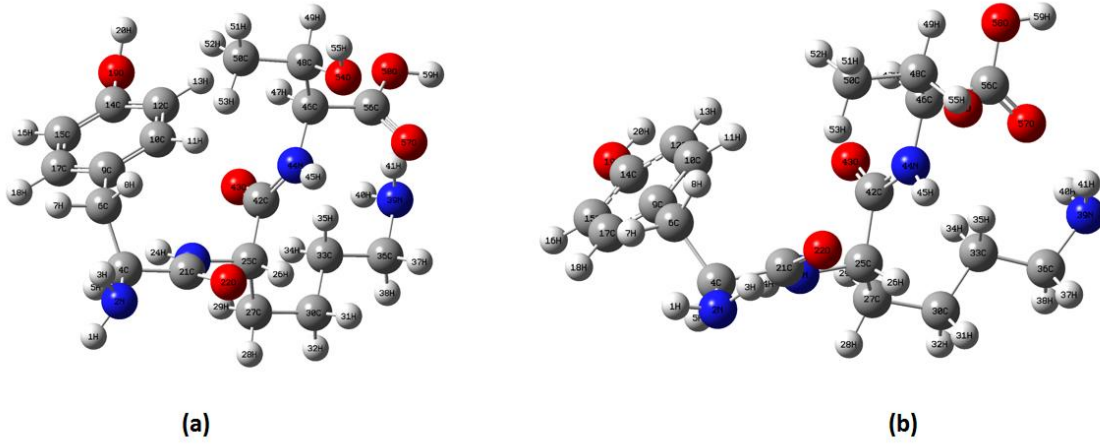
Açılar	PHI ₂	CH ₂₁	CH ₂₂	CH ₂₃	CH ₂₄	CH ₂₅	PSI ₂	W ₃
Giriş	-120.00	180.000	-60.000	180.000	180.000	180.000	100.000	180.000
Çıkış	-101.809	200.667	-61.846	188.926	183.543	177.249	107.552	181.429

Açılar	PHI ₃	CH ₂₁	CH ₂₂	CH ₂₃	PSI ₂
Giriş	-100.00	60.000	180.000	180.000	150.00
Çıkış	-83.190	57.482	182.432	177.413	136.429

Tablo 4.6: 6.37 kcal/mol enerjiye sahip Nötral Tyr-Lys-Thr tripeptidinin global konformasyona etki eden diğer etkileşme enerjileri.

Evan der walls	Elektrostatik	Etorsiyon	Etoplam
-11.34 kcal/mol	15.63 kcal/mol	2.08 kcal/mol	6.37 kcal/mol

4.1.2. Teorik Titreşim Dalga Sayıları Hesaplamaları

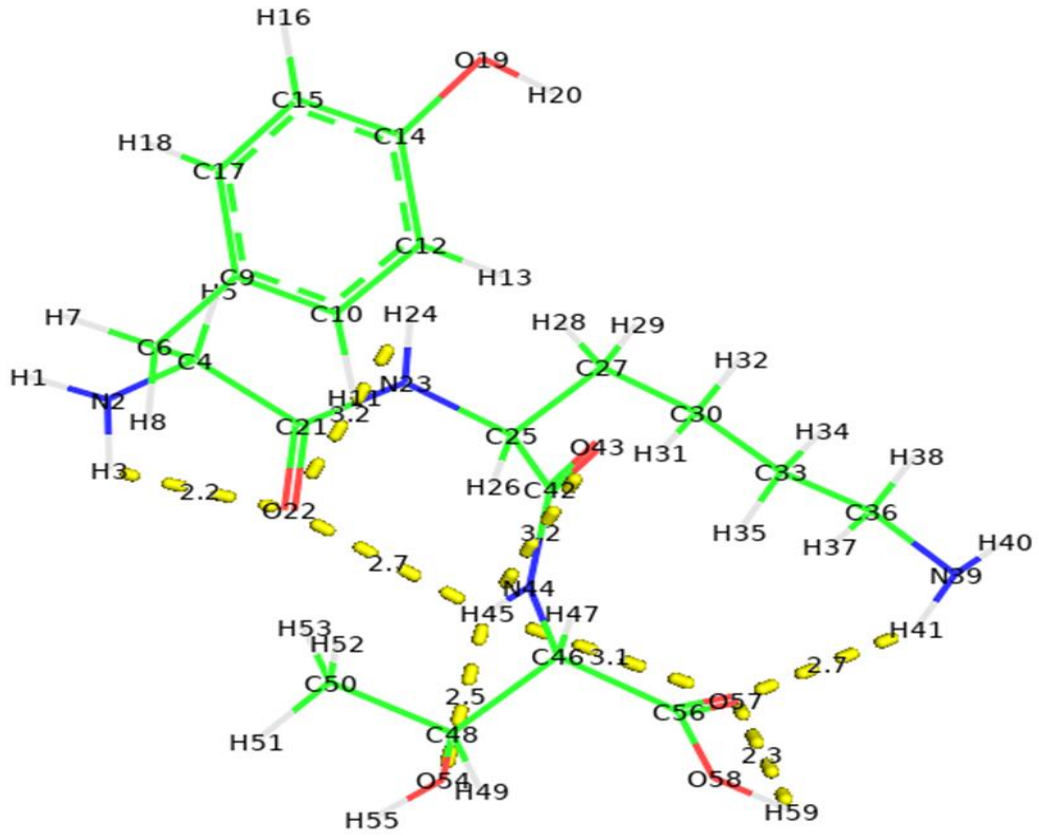


Şekil 4.2: a) Nötral Tyr-Lys-Thr tripeptidinin Gaussian programına giriş geometrisi ve b) Gaussian programında DFT-RB3LYP/6-311G++(d,p) baz setiyle çalıştırıldıktan sonraki geometrik yapısı.

Tyr-Lys-Thr (YKT) tripeptidi 59 atomdan oluşmaktadır. Buna göre $3N-6$ formülünden yola çıkılarak 171 tane titreşim frekansına sahip olduğu belirlenmiştir. Konformasyon analizi ile elde edilen en düşük enerjiye sahip konformasyon Gaussian 09 yazılım paket programına tanıtılarak DFT metodu ile en yüksek baz set olan 6-311++G(d,p) kullanılarak titreşim dalga sayıları hesaplanmıştır (bkznz. EK3).

Tablo 4.7: Konformasyon analizi sonucu enerjisi 6.37 kcal/mol olarak belirlenen konformasyonun Gaussian09 programı kullanılarak elde edilen enerji değeri.

DFT/B3LYP		
Monomer	Enerji (a.u.)	Enerji (kcal/mol)
6-311++ G (d,p)	-1412.91298118	-886616.471001598



Şekil 4.3: Tyr-Lys-Thr tripeptidine ait iç hidrojen bağları ve uzunlukları.

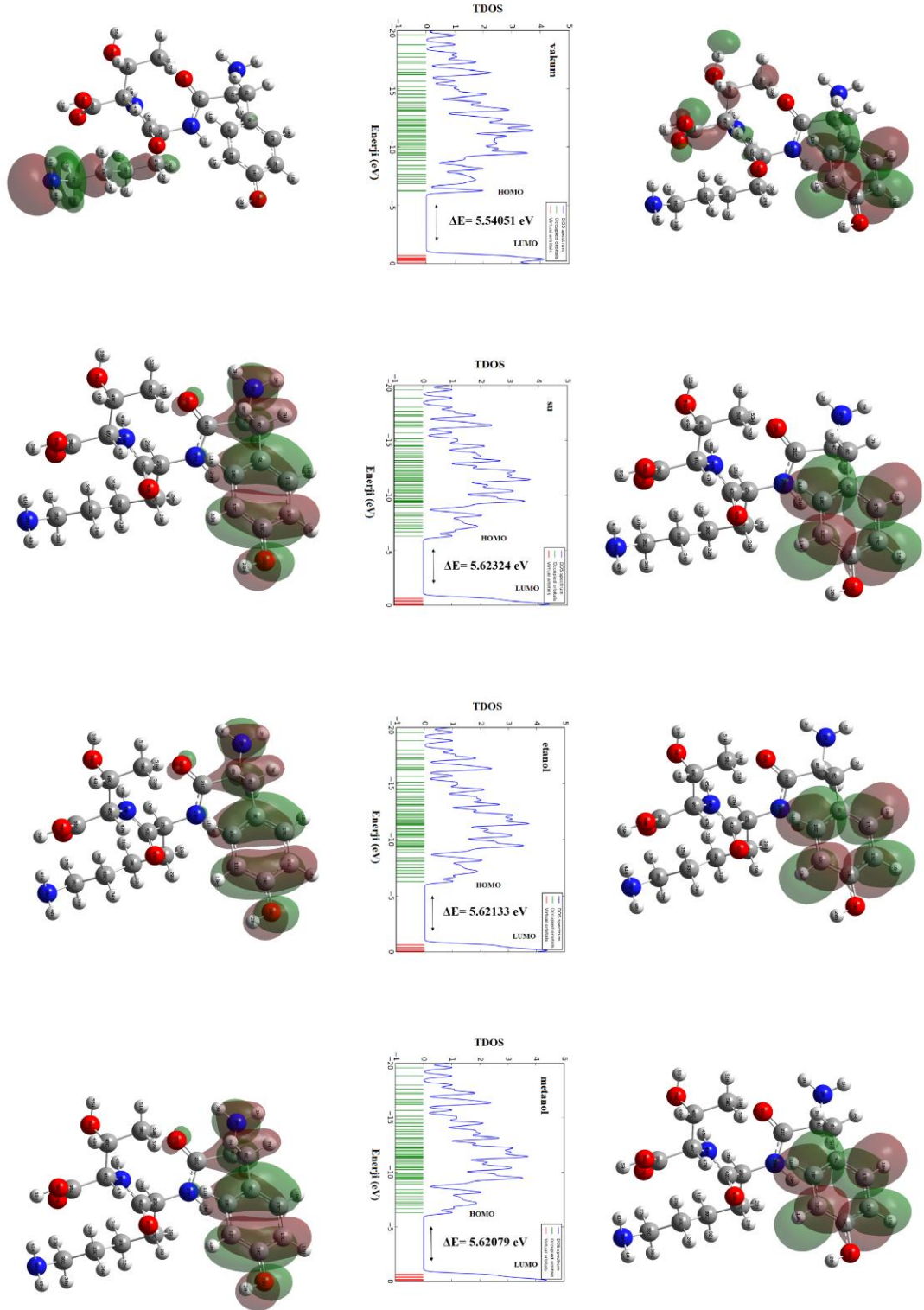
Tablo 4.8: Tyr-Lys-Thr tripeptidindeki molekül içi H bağları ve uzunlukları.(DFT/B3LYP/6-311G++(d,p)).

Atomlar	Bağlar (Å)
O22-H3	2.2
O22-H24	3.2
O22-H45	2.7
O54-H45	2.5
O43-H45	3.2
O57-H45	3.1
O57-H41	2.7
O57-H59	2.3

4.1.3. HOMO-LUMO Analizi

Sınır moleküler orbitaller olarak bilinen, en yüksek-en düşük doluluğa sahip moleküler orbitaller (HOMO-LUMO) sırasıyla iyonlaşma potansiyeli ve elektron ilgisi ile bağlantılıdır [222]. Elektronlarca dolu olan HOMO, bu elektronları bir elektron donörü olarak vermeye yatkındır. LUMO ise HOMO'nun aksine elektron akseptörü olarak bilinmektedir. HOMO-LUMO enerji farkı (ΔE), molekülün elektriksel özellikleri, kimyasal kararlılığı ve yük transferi ile ilgili de bilgi sağlar. ΔE enerji farkı, molekül içindeki en kararlı durumdan, uyarılmış bir duruma geçmek için sahip olunması gereken enerjiyi belirler [223].

TD-DFT metodu kullanılarak B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti ile YKT tripeptidinin vakum, su, etanol ve metanol ortamlarındaki HOMO, LUMO ve HOMO-LUMO farkları ve GaussSUM programı ile elde edilen DOS spektrumları, Tablo 4.9 ve Şekil 4.4'de verilmiştir. Vakum ortamında HOMO, YKT tripeptidinin içinde bulunan lizin amino asidinde yoğunlaşmış ve enerjisi -6.23249 eV olarak hesaplanmıştır. LUMO ise, tripeptiddeki tirozin ve treonin amino asitleri üstünde yoğunlaşmış ve enerjisi -0.69198 eV olarak hesaplanmıştır. Su, etanol ve metanol ortamlarında HOMO ve LUMO tirozin amino asidi üstünde yoğunlaşmıştır. HOMO enerjileri birbirlerine yakın olup, sırasıyla, -6.27658 eV, -6.27576 eV ve -6.27549 eV'tur. LUMO enerjileri de birbirlerine yakın olup, sırasıyla -0.65334 eV, -0.65443 eV ve -0.65470 eV'tur.



Şekil 4.4: YKT tripeptidinin metanol, etanol, su ve vakum ortamında HOMO-LUMO bölgeleri.

Tablo 4.9: YKT'nin hesaplanan moleküler orbital enerjileri (eV) ve enerji farklılıkları (TD-DFT/B3LYP / 6311 ++ G (d, p)).

	$E_{\text{LUMO}+1}$	E_{LUMO}	E_{HOMO}	$E_{\text{HOMO}-1}$	$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$	$\Delta E_{(\text{HOMO})-(\text{LUMO}+1)}$	$\Delta E_{(\text{HOMO}-1)-(\text{LUMO})}$
Vakum	-0.67321	-0.69198	-6.23249	-6.26188	5.54051	5.55928	5.56990
Su	-0.58722	-0.65334	-6.27658	-6.67658	5.62324	5.68936	6.02324
Metanol	-0.58477	-0.65443	-6.27576	-6.66216	5.62133	5.69099	6.00773
Etanol	-0.58368	-0.65470	-6.27549	-6.65454	5.62079	5.69181	5.99984

HOMO-LUMO hesaplamalarının yanı sıra YKT tripeptidinin elektronik ve kimyasal özellikleri hakkında bilgiler Tablo 4.10'da belirtilmiştir. Tablo 4.10'da, HOMO-LUMO enerjileri, enerji farkı, iyonizasyon potansiyeli, elektron afinitesi, kimyasal potansiyeli ve kimyasal sertlik ile ilgili değerler YKT tripeptidinin farklı ortamlar bulunduğu durum için hesaplanmıştır.

Tablo 4.10: YKT tripeptidi için iyonlaşma potansiyeli, elektron ilgisi, elektronegatiflik, kimyasal sertlik, kimyasal yumuşaklık ve Homo-Lumo boşluklarının hesaplanan değerleri.

Vakum	TD-DFT/6311++G(d,p)	Enerji (a.u.)	Enerji (eV)
Homo Enerjisi	E_{HOMO}	-0.22904	-6.23249
Lumo Enerjisi	E_{LUMO}	-0.02543	-0.69198
İyonlaşma potansiyeli	$I = -E_{HOMO}$	0.22904	6.23249
Elektron ilgisi	$A = -E_{LUMO}$	0.02543	0.69198
Elektronegatiflik	$\chi = (I+A)/2$	0.12724	3.46238
Kimyasal potansiyeli	$\mu = -(I+A)/2$	-0.12724	-3.46238
Kimyasal sertlik	$\eta = (I-A)/2$	0.10181	2.77039
$\Delta E(\text{boşluk})$	$E_{LUMO} - E_{HOMO}$	0.20361	5.54051

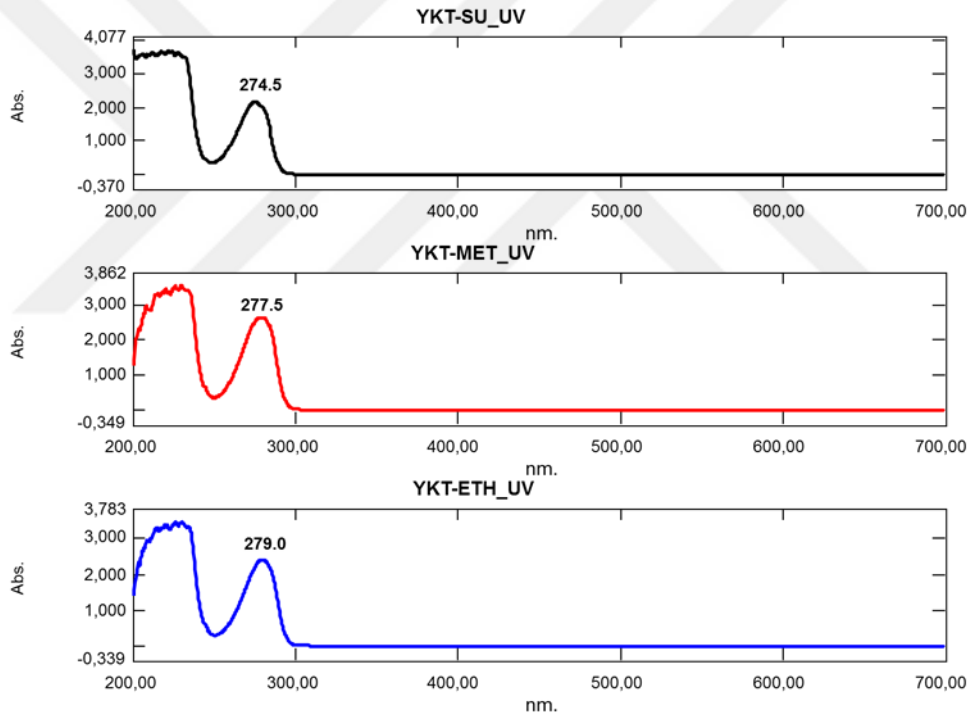
Su	TD-DFT/6311++G(d,p)	Enerji (a.u.)	Enerji (eV)
Homo Enerjisi	E_{HOMO}	-0.23066	-6.27658
Lumo Enerjisi	E_{LUMO}	-0.02401	-0.65334
İyonlaşma potansiyeli	$I = -E_{HOMO}$	0.23066	6.27658
Elektron ilgisi	$A = -E_{LUMO}$	0.02401	0.65334
Elektronegatiflik	$\chi = (I+A)/2$	0.12734	3.46510
Kimyasal potansiyeli	$\mu = -(I+A)/2$	-0.12734	-3.46510
Kimyasal sertlik	$\eta = (I-A)/2$	0.10333	2.81175
$\Delta E(\text{boşluk})$	$E_{LUMO} - E_{HOMO}$	0.20665	5.62324

Metanol	TD-DFT/6311++G(d,p)	Enerji (a.u.)	Enerji (eV)
Homo Enerjisi	E_{HOMO}	-0.23063	-6.27576
Lumo Enerjisi	E_{LUMO}	-0.02405	-0.65443
İyonlaşma potansiyeli	$I = -E_{HOMO}$	0.23063	6.27576
Elektron ilgisi	$A = -E_{LUMO}$	0.02405	0.65443
Elektronegatiflik	$\chi = (I+A)/2$	0.12734	3.46510
Kimyasal potansiyeli	$\mu = -(I+A)/2$	-0.12734	-3.46510
Kimyasal sertlik	$\eta = (I-A)/2$	0.10329	2.81067
$\Delta E(\text{boşluk})$	$E_{LUMO} - E_{HOMO}$	0.20658	5.62133

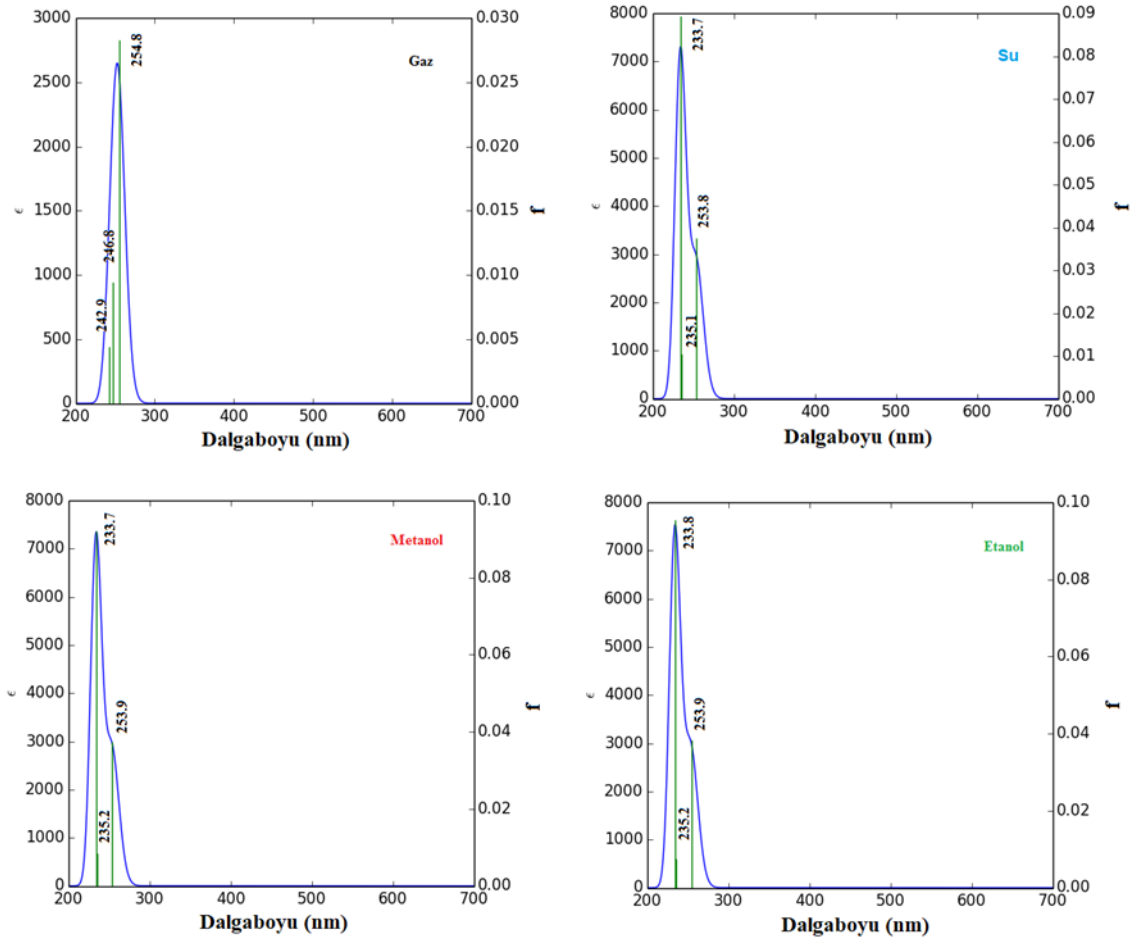
Etanol	TD-DFT/6311++G(d,p)	Enerji (a.u.)	Enerji (eV)
Homo Enerjisi	E_{HOMO}	-0.23062	-6.27549
Lumo Enerjisi	E_{LUMO}	-0.02406	-0.65470
İyonlaşma potansiyeli	$I = -E_{HOMO}$	0.23062	6.27549
Elektron ilgisi	$A = -E_{LUMO}$	0.02406	0.65470
Elektronegatiflik	$\chi = (I+A)/2$	0.12734	3.46510
Kimyasal potansiyeli	$\mu = -(I+A)/2$	-0.12734	-3.46510
Kimyasal sertlik	$\eta = (I-A)/2$	0.10328	2.81039
$\Delta E(\text{boşluk})$	$E_{LUMO} - E_{HOMO}$	0.20656	5.62079

4.1.4. Mor-üstü Analizi

YKT tripeptidi için gerçekleştirilen UV analizinde, deneysel ve teorik spektrumlar 200-700 nm aralığında sunulmuştur (Tablo 4.11 ve 4.12). UV spektrumları, oda sıcaklığında su, etanol ve metanolde çözdürülmüş YKT için elde edilmiştir. Deneysel UV değerleri ve şekilleri Shimadzu UV-Vis Spektrometresi kullanılarak elde edilmiş ve Tablo 4.11 ve Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Teorik çalışmalar Gaussian09 paket programı kullanılarak B3LYP / 6-311++G(d,p) metodu ile TD-DFT [224] hesaplamaları çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Büyük katkı oranları GaussSUM programı ile elde edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, taban durumda optimize edilmiş geometrideki YKT molekülü için uyarma enerjileri, absorbans ve osilatör gücü (f) elde edilmiş, Tablo 4.12 ve Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.5: YKT tripeptidinin farklı çözücülerde UV-Vis spektrometresinde ölçülen deneysel absorbans değerleri.



Şekil 4.6: YKT tripeptidinin farklı çözücülerde UV-Vis spektrometresinde ölçülen teorik absorbands değerleri.

Tablo 4.11: YKT tripeptidinin farklı çözücülerde deneysel olarak elde edilen absorbsiyon dalgaboyu (nm), uyarma enerjileri (eV) ve absorbands değerleri.

	E (eV)	λ (nm)	Abs.
Metanol	4.4679	277.5	2.645
	5.4142	229.0	3.511
Etanol	4.4439	279.0	2.411
	5.5104	225.0	3.439
	5.5849	222.0	3.228
	5.6743	218.5	3.351
Su	4.5167	274.5	2.189

Tablo 4.12: YKT tripeptidinin farklı çözücülerde teorik olarak elde edilen absorpsiyon dalgaboyu (nm), uyarma enerjileri (eV) ve osilatör kuvvetleri (f) ile birlikte çeşitli çözücülerde geçiş seviyeleri ve atamaları.

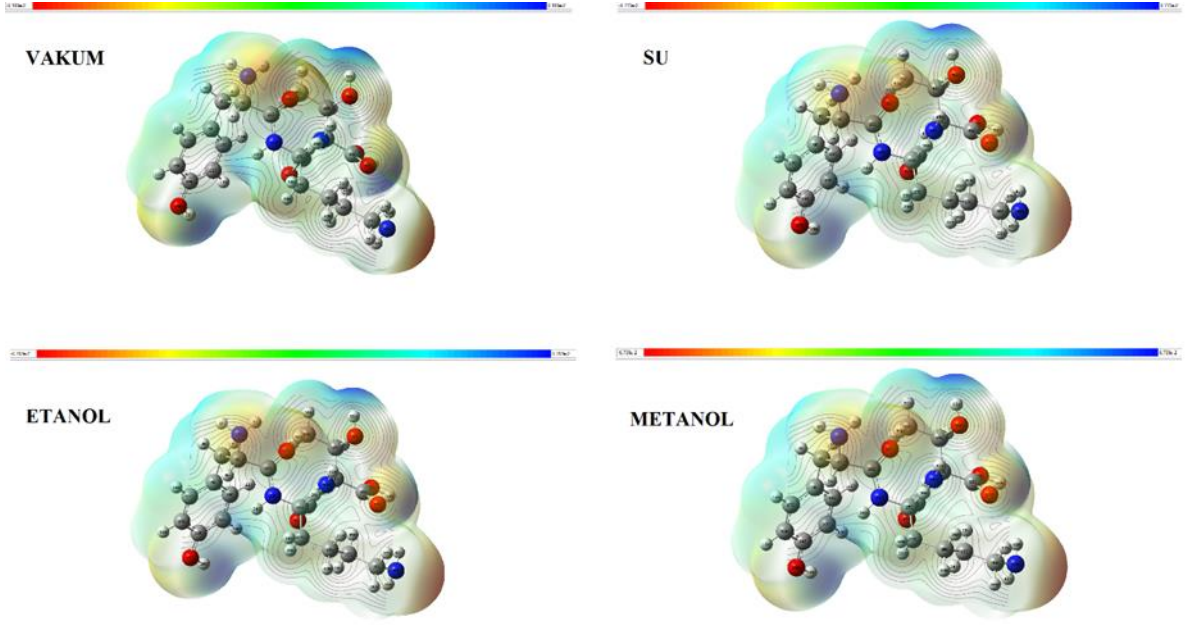
TD-B3LYP/6-311++G(d,p)					
	E (eV)	λ (nm)	f	büyük katkı	
Metanol	4.8830	253.9098	0.0375	H→L	(85%)
	5.2703	235.2507	0.0084	H→L+1	(55%)
				H→L+3	(14%)
				H→L+4	(12%)
				H→L+5	(11%)
	5.3037	233.7692	0.092	H→L+2	(69%)
Etanol	4.8813	253.9983	0.0384	H→L	(85%)
	5.2693	235.2953	0.0076	H→L+1	(54%)
				H→L+3	(15%)
				H→L+4	(13%)
				H→L+5	(10%)
	5.3025	233.8221	0.0954	H→L+1	(70%)
Su	4.8839	253.8630	0.0376	H→L	(85%)
	5.2715	235.1971	0.0105	H→L+1	(55%)
				H→L+3	(13%)
				H→L+5	(12%)
	5.3040	233.7560	0.0893	H→L+2	(68%)
Vakum	4.8648	254.8598	0.0283	H-1→L	(59%)
				H-1→L+1	(23%)
	5.0221	246.8772	0.0094	H→L+1	(47%)
				H→L+2	(24%)
				H→L	(23%)
	5.1038	242.9253	0.0044	H-1→L+1	(37%)
				H-1→L+4	(35%)
				H-1→L	(15%)

TD-DFT/B3LYP/ 6-311++G(d,p) ile hesaplanan dalgaboyu değerleri, Şekil 4.6'da gösterildiği gibi 254.8, 246.8, 242.9 nm (vakum içinde), 253.8, 235.1 ve 233.7 nm (su içinde), 253.9, 235.2, 233.8 nm (etanol içinde) ve 253.9, 235.2, 233.7 nm (metanol içinde) dir. Deneysel olarak elde edilen değerler ise su için 274.5 nm, etanol için 279.0 nm, 225.0 nm, 222.0 nm ve 218.5 nm,

metanol için 277.5 nm ve 229.0 nm dir. Deneysel ve teorik UV çalışmaları karşılaştırıldığında su, etanol ve metanol için en büyük dalga boyu farkları sırasıyla ~21 nm, ~25 nm, ~23 nm dir.

4.1.5. Moleküler Elektrostatik Potansiyel (MEP) Analizi

Moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) eş zamanlı olarak molekülün şeklini, büyüklüğünü ve renk değerlendirmesi açısından elektrostatik potansiyelini gösterir [225]. Elektrostatik potansiyel dipol moment, Linus Pauling tarafından bir moleküldeki atomun elektronları kendine çekme gücü olarak tanımladığı elektronegativite ve kısmi yüklerle ilişkilidir. Kısmi yüklerin muhtemel bulunma yerlerini gösteren moleküldeki atomların elektronegativitesidir. MEP, molekülün yük dağılımı ile ilgili bilgi vermesinin yanı sıra kimyasal reaktivitenin yorumlanması ve tahmininde de kullanılan önemli bir araçtır. Moleküler elektrostatik potansiyel analizinde pozitif, negatif ve nötr elektrostatik potansiyel bölgelerinin belirlenmesi oldukça önemli olup, molekül yapısının araştırılmasında ve hidrojen bağlanma etkileşimleri ile ilgili bilgilerin elde edilmesinde fayda sağlamaktadır. MEP haritalarında kırmızı renk elektrofilik kısmı yani maksimum negatif bölgeyi gösterirken, mavi renk nükleofilik kısmı yani azami pozitif bölgeyi göstermektedir. Bir pozitif yük birimi olan proton molekülün pozitif bir bölgesine yaklaştığında, itme etkileşimi artan bir pozitif potansiyel enerjiyle (mavi renkli bölge) sonuçlanır. Negatif bir bölgeye yaklaştığında ise çekici bir etkileşimle negatif potansiyel enerjiyle sonuçlanır (kırmızı renkli bölge). Kırmızı ve mavi farkları arttıkça molekül de polarize olur. Yüzey daha açık renk tonlarındaysa, molekül çoğunlukla polar değildir. Yüzeydeki elektrostatik potansiyelin farklı değerleri, farklı renklerle gösterilir. Eğer potansiyel negatifse kırmızı ve kırmızıya yakın renklerle, pozitifse maviye yakın renklerle gösterilir [225-229].



Şekil 4.7: YKT tripeptidinin vakum, su, etanol ve metanol ortamlarında moleküler elektrostatik potansiyel haritaları.

Vakum ve su ortamlarının yanı sıra etanol ve metanol gibi farklı ortamlarda da yapılan moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) hesaplamaları sonucunda elde edilen haritalar Şekil 4.7’de verilmiştir.

YKT tripeptidi için vakum ortamında yapılan çalışmada elektronlarca zengin bölge olan kırmızı bölge -0.06189 a.u. ve elektronlarca fakir olan mavi bölge ise 0.06189 a.u. enerji değeri aralığında elde edilmiştir. Elektronlarca en fakir bölgeler tripeptit içinde bulunan treonin amino asidinin yan dalındaki -OH grubu ve karboksil grubu ile tirozin amino asidinin halka grubunun ucunda bulunan -OH grubu üstünde yoğunlaşmıştır. Treonin amino asidinin yan dalındaki -OH grubundaki H55, 0.0566714 a.u., karboksil grubundaki H59, 0.0613608 a.u. enerji değerine, ayrıca tirozin amino asidindeki halkaya bağlı -OH grubundaki H20, 0.0593732 a.u. enerji değerine sahiptir. Elektronlarca zengin olan kırmızı bölgeler ise, lizin ve tirozin amino asitlerinin -NH₂ grupları ile tirozin ile lizini bağlayan peptid bağı üstünde yoğunlaşmıştır. Elektronlarca en yoğun bölge lizine ait -NH₂ grubundaki N39 olup, enerjisi -0.0564202 a.u.’dur. Diğer gruplar ise tirozin amino asidindeki -NH₂ grubundaki N2 ve peptid grubundaki O22’dir. Enerji değerleri sırasıyla -0.0445616 a.u. ve -0.0402084 a.u.’dur.

Su ortamı için yapılan çalışmada elektronlarca zengin bölge olan kırmızı bölge ve elektronlarca fakir olan mavi bölge için elde edilen enerji değerleri sırasıyla -0.06773 a.u. ve 0.06773

a.u.'dur. Elektronlarca en zengin bölge olan kırmızı bölgeler, vakumda olduğu gibi lizin ve tirozin amino asitlerinin $-NH_2$ grupları ile tirozin ile lizini bağlayan peptid bağı üstünde yoğunlaşmıştır. Lizine ait $-NH_2$ grubundaki N39 olup, enerjisi -0.0488212 a.u.'dur. Diğer gruplar ise tirozin amino asidindeki $-NH_2$ grubundaki N2 ve peptid grubundaki O22'dir. Enerji değerleri sırasıyla -0.0488883 a.u. ve -0.0463164 a.u.'dur. Elektronlarca en fakir bölgeler tripeptit içinde bulunan treonin amino asidinin yan dalındaki $-OH$ grubu ve karboksil grubu ile tirozin amino asidinin halka grubunun ucunda bulunan $-OH$ grubu üstünde yoğunlaşmıştır. Treonin amino asidinin yan dalındaki $-OH$ grubundaki H55, 0.0636846 a.u., karboksil grubundaki H59, 0.0674761 a.u. enerji değerine, ayrıca tirozin amino asidindeki halkaya bağlı $-OH$ grubundaki H20'de, 0.065919 a.u. enerji değerine sahiptir.

Etanol ve metanol ortamlarında YKT tripeptidinin yine aynı bölgelerinde kırmızı ve mavi bölge yoğunluğu gözlenmiştir. Etanolde kırmızı ve mavi bölge için elde edilen enerji değerleri ± 0.06752 a.u., metanol ortamı için ise ± 0.06759 a.u.'dur. Elektronlarca zengin bölge olarak bilenen kırmızı bölgeler incelendiğinde en kırmızı bölgenin YKT tripeptidinin N39 atomu üstünde yoğunlaştığını ve etanol ve metanol ortamlarında enerji değerleri sırasıyla -0.0614755 a.u. ve -0.0623705 a.u. elde edilmiştir. Daha az kırmızı bölgelere bakıldığında N2 ve O22 atomları üstünde elektron zenginliğinin çoğu bölgeye göre yoğun olduğu gözlenmiştir. Enerji değerleri etanol için sırasıyla -0.0486767 a.u. ve -0.0459354 a.u., metanol için -0.0487489 a.u. ve -0.0460688 a.u.'dur. Elektronlarca fakir olan mavi bölgelere bakıldığında H20, H59 ve H55 atomları üstünde mavi bölgelerin yoğunlaştığı görülmektedir. Etanol için enerji değerleri sırasıyla 0.0656348 a.u., 0.0672397 a.u. ve 0.0633921 a.u.'dur. Metanol için de 0.0657316 a.u., 0.0673217 a.u. ve 0.0634926 a.u.'dur.

4.1.6. Hiperpolarizabilite Analizi

YKT tripeptidine ait birinci derece hiperpolarizabilite (β_0), polarizabilite (α) ve dipol moment (μ) bilgileri DFT/B3LYP(Becke-3-Lee-Yang-Parr) metodu ile 6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak elde edilmiştir. Non-lineer optik özellikler, birçok alandaki gelişmekte olan teknolojiler için önemlidir. Elektron korelasyonunun değerini değiştirebildiği hiperpolarizabilite, baz setlere ve kullanılan teorik yaklaşım seviyesine karşı oldukça hassastır [230,231]. $3 \times 3 \times 3$ matris ile tanımlanabilen hiperpolarizebilitenin üçüncü derece tensörü Kleinmann simetrisi nedeniyle 10 bileşene indirgenebilir [232]. Moleküler sistemlerin enerjisi, dış elektrik alanının varlığı ile işlev görür. β bileşenleri, dış elektrik alandaki enerjinin Taylor

serisinin genişletilmesinde katsayı kullanılarak tanımlanmıştır. Dış elektrik alan, pertürbe edilmemiş moleküllerin enerjisine, dipol momentine, polarizebilitesine ve moleküllerin birinci dereceden hiperpolarizebilitesine bağlı olarak sonlu yaklaşım alanı ile hesaplanır. Bir seri içindeki alana bağlı enerji $E(F)$ nin genişletilmesi;

$$E(F) = E(0) - \sum_i \mu_i F_i - \frac{1}{2} \sum_{i,j} \alpha_{ij} F_i F_j - \frac{1}{6} \sum_{i,j,k} \beta_{ijk} F_i F_j F_k - \frac{1}{24} \sum_{i,j,k,l} \gamma_{ijkl} F_i F_j F_k F_l - \dots \quad (4.1)$$

şeklinde ifade edilir [233,234].

$E(0)$, elektrik alanın olmadığı durumda moleküler sistemin toplam enerji ifadesi olup, μ_i , α_i , β_{ijk} , γ_{ijkl} , sırasıyla, statik dipol moment, polarizebilite, ilk hiperpolarizebilite ve ikinci hiperpolarizebilite tensörlerinin bileşenleridir. μ , α , $\Delta\alpha$ (polarizebilitenin anizotropisi), β aşağıdaki şekilde belirlenir;

$$\mu = (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2)^{1/2} \quad (4.2)$$

$$\langle \alpha \rangle = \frac{\alpha_{xx}}{3} + \frac{\alpha_{yy}}{3} + \frac{\alpha_{zz}}{3} \quad (4.3)$$

$$\Delta\alpha = 2^{-1/2} [(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 + 6\alpha_{xx}^2]^{1/2} \quad (4.4)$$

$$\beta_0 = (\beta_x^2 + \beta_y^2 + \beta_z^2)^{1/2} \quad (4.5)$$

$$\beta_x = \beta_{xxx} + \beta_{xyy} + \beta_{xzz} \quad (4.6)$$

$$\beta_y = \beta_{yyy} + \beta_{xxy} + \beta_{yyz} \quad (4.7)$$

$$\beta_z = \beta_{zzz} + \beta_{xzz} + \beta_{yyz} \quad (4.8)$$

Gaussian 09 programı ile elde edilen polarizebilite ve hiperpolarizebilite değerleri atomik birimde (a.u.) elde edildikten sonra elektronik birime (esu) çevrilirler. Polarizebilite için $\alpha = 1$ a.u. = 0.1482×10^{-24} esu ve hiperpolarizebilite $\beta = 1$ a.u. = 8.639×10^{-33} esu kabul edilerek gerekli dönüşümler yapılmıştır. Polarizebilite, teorisyenler tarafından cm^3 yerine Bohr yarıçapı a_0 ile ifade edilir. cm^3 cinsinden polarizebilite (α) ifadesi, Bohr yarıçapı cinsinden $0.148184 \times 10^{-24} \cdot \alpha (a_0^3)$ değerine eşittir.

Gaussian 09 programında DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen dipol moment, polarizebilite ve hiperpolarizebilite değerleri Tablo

4.13’de verilmiştir. Elde edilen dipol moment değeri 1.6968023 D ve hiperpolarizebilite değeri $2.6114151629 \times 10^{-30}$ esu’dur.

Tablo 4.13: YKT tripeptidinin hesaplanan dipol moment, polarizibilite ve hiperpolarizibilite değerleri.

Parametreler			
μ_x	-0.7736091	β_{xxx}	-45.1187173
μ_y	1.1058228	β_{xxy}	3.9859085
μ_z	-1.0285052	β_{xyy}	-107.2066633
μ	1.6968023	β_{yyy}	205.1883547
α_{xx}	301.183032	β_{xxz}	-29.7750615
α_{xy}	4.5501607	β_{xyz}	3.3650559
α_{yy}	280.3586188	β_{yyz}	56.0279763
α_{xz}	-13.5298548	β_{xzz}	-15.1125743
α_{yz}	18.6290357	β_{yzz}	40.1568576
α_{zz}	254.1346634	β_{zzz}	7.9961513
$\langle\alpha_o\rangle$	278.5587714	β_o	302.2821117
$\langle\alpha_{top(esu)}\rangle$	41.28241×10^{-24}	$\beta_{o(esu)}$	$2611,4151629 \times 10^{-33}$
		$\beta_{o(esu)}$	$2.6114151629 \times 10^{-30}$

4.1.7. Naturel (Doğal) Bağ Orbital (NBO) Analizi

Doğal bağ orbitali, en yüksek elektron yoğunluğu ile hesaplanmış bağ orbitalidir. Hesapsal çalışmalarda elektron yoğunluğunun atomlardaki ve atomlar arasındaki bağlardaki dağılımını hesaplamak için lokalize olmuş (doğal) yörüngeler kullanılır [235]. Doğal bağ orbital analizi yardımıyla atomik yük, bağ tipi ve bağlar arası etkileşim, hibridizasyon ve yük transferi gibi moleküler çalışmalarda önem arz eden bilgiler elde edilebilmektedir [236,237].

NBO analizi, donör (doldurulmuş) Lewis tipi doğal bağ orbitalleri ile akseptör (boş) non-Lewis tipi doğal bağ orbitalleri arasındaki tüm olası etkileşimleri inceleyerek ve ikinci derece pertürbasyon teorisi ile enerjik önemlerini tahmin ederek gerçekleştirilir. Her donör doğal bağ orbitali (i) ve akseptör doğal bağ orbitali (j) için, $i \rightarrow j$ delokalizasyonu ile bağlantılı stabilizasyon enerjisi $E(2)$ aşağıdaki şekilde tahmin edilir.

$$E(2) = \Delta E_{ij} = q_i \frac{F(i,j)^2}{\varepsilon_j - \varepsilon_i} \quad (4.9)$$

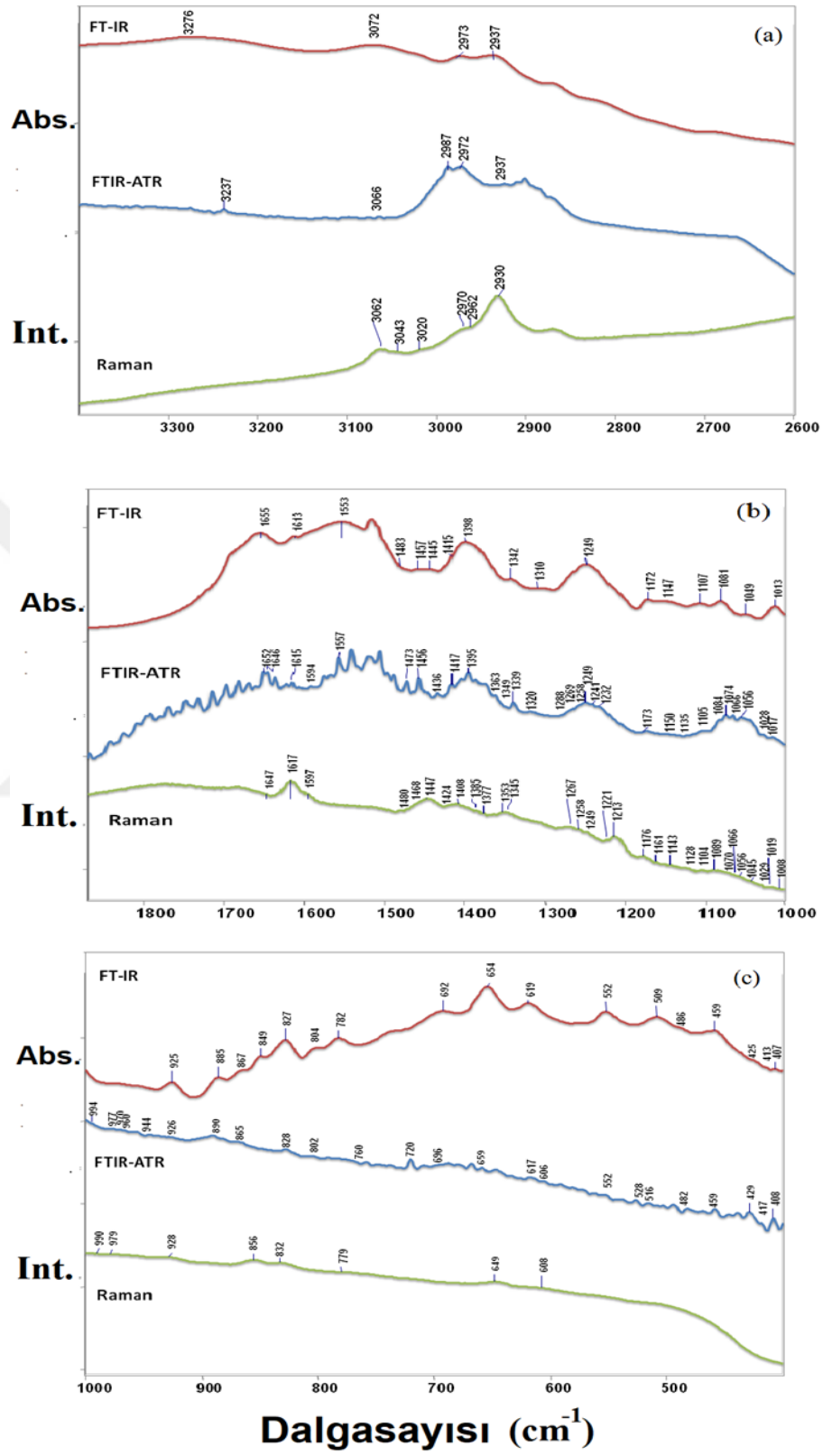
Burada q_i donör orbital doluluğu, ε_i ve ε_j diyagonal elemanlar (orbital enerjileri) ve $F(i,j)$ diyagonal olmayan NBO Fock matris elemanıdır [238].

YKT tripeptidi için doğal bağ orbital analizi Gaussian09 paket programında DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda YKT tripeptidine ait elektron geçişlerinden en büyük stabilizasyon enerjisine sahip olan geçiş 266,36 kcal/mol ile tirozin halkası içindeki $\pi^*(C_{12}-C_{14})$ antibağ orbitalinden $\pi^*(C_9-C_{10})$ antibağ orbitaline olan geçiştir. Elde edilen bu yüksek enerji antibağ orbitalleri arasındaki elektron yoğunluğu geçişini ifade etmektedir. Yine bu geçişi 66,45 kcal/mol stabilizasyon enerjisi ile treonin amino asidi ile lizin amino asidi arasındaki peptid bağındaki $n_1(N_{44})$ yalnız elektron çiftinden $\pi^*(C_{42}-O_{43})$ anti bağ orbitaline ve tirozin amino asidinin karboksil grubu ile lizin amino asidinin amino grubu arasında oluşan bir diğer peptid bağını oluşturan 68,3 kcal/mol stabilizasyon enerjisi ile $n_1(N_{23})$ yalnız elektron çiftinden $\pi^*(C_{21}-O_{22})$ antibağ orbitaline doğru olan elektron yoğunluğu geçişleri izlemektedir. Bir diğer önemli elektron geçiş bölgesi olan karboksil grubuna yakından baktığımızda $n_1(O_{58})$ yalnız elektron çiftinden $\pi^*(C_{56}-O_{57})$ anti bağ orbitaline ve $n_2(O_{57})$ yalnız elektron çiftinden $\sigma^*(C_{56}-O_{58})$ anti bağ orbitaline sırasıyla 43,57 kcal/mol ve 33,62 kcal/mol stabilizasyon enerjileri ile bir elektron yoğunluğu geçişi olduğu yapılan çalışma sonucunda gözlenmiştir. Diğer bir önemli geçiş, tirozin amino asidinin yan zincirine aittir. Bu geçiş elektron çifti $n_2(O_{19})$ 'dan $\pi^*(C_{12}-O_{14})$ anti-bağ orbitaline gerçekleşti ve 26.9 kcal / mol enerjiye sahipti. (Bknz. Ek 2)

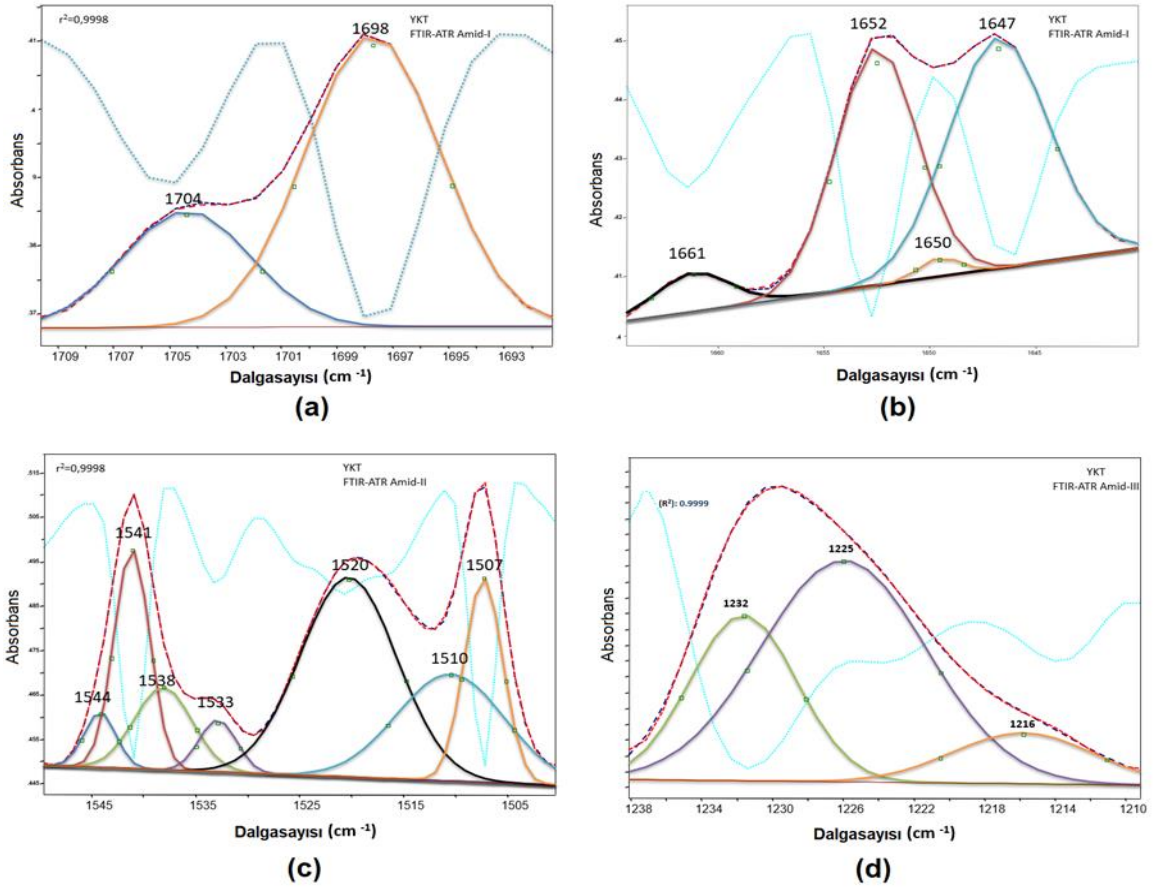
4.1.8. YKT Tripeptidine Ait Spektrumlar

YKT tripeptidinin deneysel olarak moleküler yapısının belirlenmesi ve teorik sonuçlarla karşılaştırılması için Raman, FTIR, FTIR-ATR teknikleri kullanılmış ve spektrumlar karşılaştırmalı olarak Şekil 4.8 ve EK3'de verilmiştir. Ayrıca peptidin amid gruplarına ait pikler bant komponent analizi ile ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Bant komponent analizleri GRAMS/AI paket programı kullanılarak yapılmış ve Şekil 4.9'da verilmiştir.

IR spektrumları için Jasco 6300 FT-IR spektrometresi kullanılmış, 2 cm^{-1} çözünürlükte 4000-400 cm^{-1} aralığında ölçüm alınmıştır. FT-IR spektrumunun elde edilmesi aşamasında YKT tripeptidi KBr pellet tekniği ile ölçüme hazırlanmıştır. ATR spektrumlarının elde edilmesi aşamasında herhangi bir örnek hazırlama prosesi olmamakla birlikte, spektrometre içinde FTIR dan farklı olarak sadece ATR ölçüm başlığı kullanılmıştır. Raman spektrumları da örnek hazırlama prosesi olmadan NRS 3100 Dispersif Mikro Raman spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 4.8: YKT tripeptidine ait FT-IR, FTIR-ATR ve Raman spektrumları.



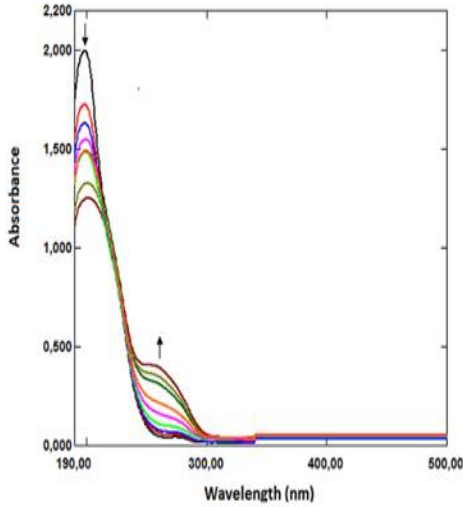
Şekil 4.9: YKT tripeptidine ait amid I (a,b), amid II (c) ve amid III (d)'ün bant komponent analizi sonuçları.

4.1.9. DNA Bağlanma Analizi

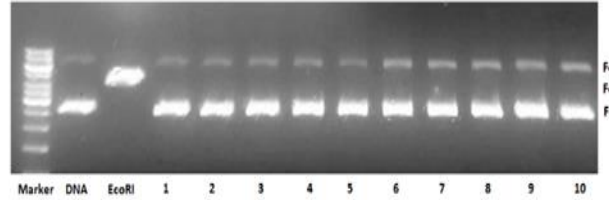
DNA, kanser tedavisinde ilaç molekülleri için önemli hedeflerden biri olup, ilaç moleküllerinin DNA'ya farklı yollarla bağlanabildiği bilinmektedir. YKT tripeptidinin DNA'ya bağlanma şeklinin belirlenmesinde UV-Vis spektroskopisi kullanılmıştır [239-243]. Peptidin DNA'ya bağlanması, elde edilen absorpsiyonlardaki artış ve azalış (hiperkromatik/hipokromatik) ile dalgaboylarındaki kayma (kırmızı/mavi) ile belirlenir. Şekil 4.10a'da, CT-DNA yokluğunda ve CT-DNA varlığında YKT tripeptidinin absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Bu çalışmada, YKT tripeptidinin spektrumunda CT-DNA konsantrasyonundaki artışla birlikte, 199 nm'de %37 hipokromizm ve 2 nm kırmızıya kayma (batokromik kayma), 268 nm'de %90 hiperkromizm ve 16 nm mavi kayma (hipsokromik kayma) gözlenmiştir. YKT tripeptidi için hesaplanan K_b değerleri, hipokromik etki için $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve hiperkromik etki için $1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 'dir.

4.1.10. DNA Kesme Analizi

Agaroz jel elektroforez yöntemi ile UV-Vis spektrometresi kullanılarak yapılan bu çalışmada, YKT peptidinin DNA'yı kesme potansiyeli olup olmadığı incelenmiştir. YKT peptidinin DNA'yı kesme potansiyeli, TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponunda (pH 8.0) süper sarmal yapıya sahip pBR322 DNA kullanılarak incelenmiştir. YKT tripeptidinin pBR322 DNA kullanılarak DNA kesme potansiyeli, H₂O₂ oksitleyicisinin hem varlığında (oksidatif) hem de yokluğunda (hidrolitik) incelenmiştir. Jelde plazmid pBR322 DNA'nın farklı yapıları farklı bantlar olarak gözlenmektedir. Bozulmamış süper sarmal yapı olarak bilinen (Form I) plazmit DNA, jel üstünde daha hızlı ilerleyebilmektedir. Eğer plazmit DNA'nın bir zincirinde kesilme olursa, süper sarmal hali gevşeyerek Form II denilen dairesel yapıya dönüşür. Eğer iki zincirde de kesilme olursa, doğrusal bir yapı olan Form III meydana gelir [244,245]. Şekil 4.10b'de görüldüğü üzere, kontrol ile kıyaslandığında, YKT tripeptidi, oksidatif olarak, bir kısım süper sarmal DNA'yı Form II'ye dönüştürmüştür.



(a)



(b)

Şekil 4.10: (a) Tris-HCl / NaCl tamponunda (pH 7.2) artan miktarda CT-DNA varlığında ve yokluğunda (siyah tepe) YKT tripeptidinin absorpsiyon spektrumları. (Koşullar: [YKT] = 30 μ M, [DNA] = 0-120 μ M. Oklar ($\uparrow$ $\downarrow$), artan DNA konsantrasyonu üzerine absorbans değişikliklerini gösterir.) (b) YKT tarafından pBR322 DNA'nın hidrolitik bölünmesi (1: 400 μ M YKT+DNA, 2: 200 μ M YKT+DNA, 3: 200 μ M YKT+DNA, 4: 50 μ M YKT+DNA and 5: 25 μ M YKT+DNA) ve oksidatif bölünmesi (6: 400 μ M YKT+DNA+H₂O₂, 7: 200 μ M YKT+DNA+H₂O₂, 8: 100 μ M YKT+DNA+H₂O₂, 9: 50 μ M YKT+DNA+H₂O₂ ve 10: 25 μ M YKT+DNA+H₂O₂).

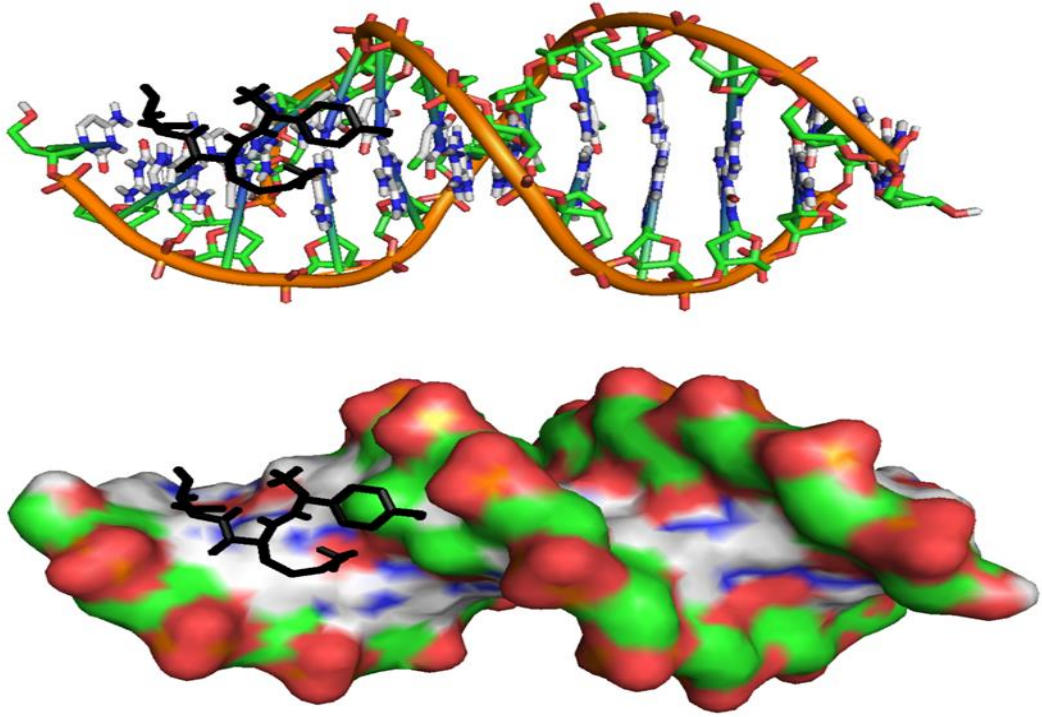
4.1.11. Moleküler Doking (Kenetlenme) Analizi

YKT'nin, moleküler doking (kenetlenme) çalışmalarında Schrödinger programının Maestro 11.4 Glide modülü [193,194] ve AutoDock Vina 1.1.2 [195] kullanılmıştır.

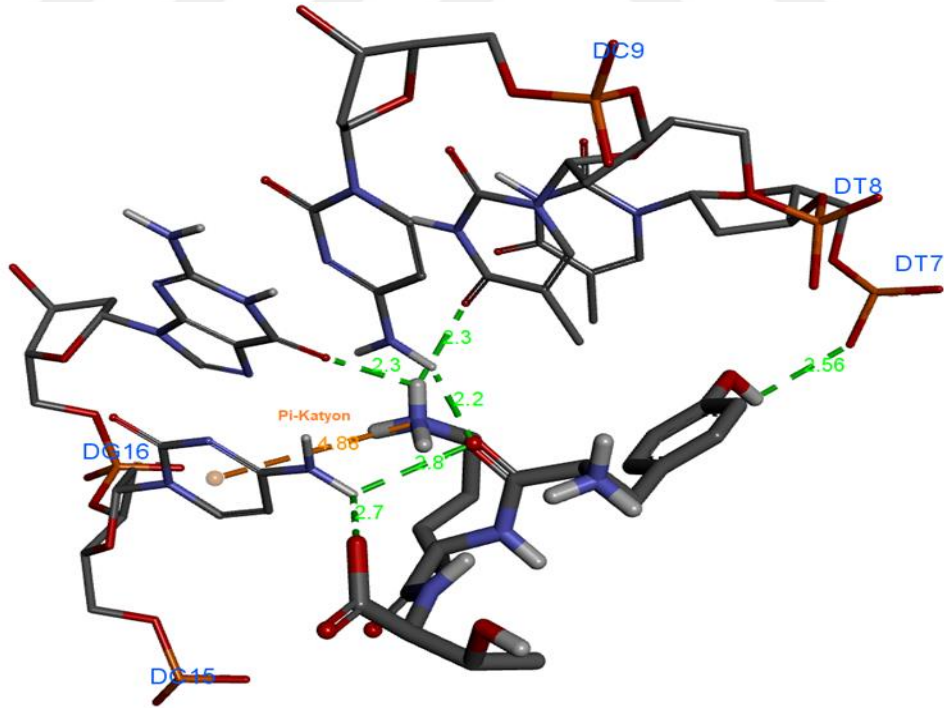
4.1.11.1. 1BNA (B-DNA DODECAMER)

YKT tripeptidinin, moleküler kenetlenme analizi yapılmadan önce AutoDockTools 1.5.6 programı aracılığıyla hazırlanmıştır. Reseptör olarak 1.9 Å çözünürlüğe sahip bir B-DNA Dodecamer (PDB Kodu: 1BNA) yapısı seçilmiş ve Protein DataBank'tan indirilmiştir. Pdb dosyasındaki tüm su molekülleri çıkarılmıştır. Kenetlenme çalışması için reseptör, AutoDockTools 1.5.6 programı ile hazırlanmıştır. Grid box 0.375 Å grid aralığı ile 30x30x30 Å³ olarak ayarlanmıştır. Moleküler yerleştirme çalışması AutoDock Vina 1.1.2 ile gerçekleştirilip, bağlanma afiniteleri ve RMSD (Kök-ortalama-kare sapma) değerleri elde edilmiştir. RMSD, ligand konformasyonunun gerçekteki konformasyonu ile bir docking çalışması sonucunda tahmin edilen arasındaki farkın bir ölçüsüdür. YKT tripeptidinin ADME analizi için, Swissadme [246] kullanılmıştır.

YKT tripeptidinin DNA ile kenetlenme çalışması sonucunda elde edilen bağlanma afiniteleri ve RMSD değerleri Tablo 4.14'da verilmiştir. Tablo 4.14'e göre en iyi bağlanma afinitesinin -4.5 kcal/mol enerji değerine ve RMSD'ye sahip olduğu görülmüştür. RMSD değerleri genellikle 2 Å'nın altındadır.



Şekil 4.11: (a) Moleküler yerleştirme pozu ve (b) YKT tripeptid ve B-DNA Dodecamer yüzey haritası.



Şekil 4.12: YKT tripeptidinin B-DNA ile yapmış olduğu yakın etkileşimler.

YKT, yerleştirme çalışması sonucunda B-DNA Dodecamer ile 12 hidrojen bağı yapmıştır. YKT tripeptid, DNA ile tirozin kalıntısından 3 hidrojen bağı, lizin kalıntısından 4 hidrojen bağı ve

treonin kalıntısından 5 hidrojen bağı yapmıştır. Ek olarak, YKT ile DNA arasında Yük-Yük etkileşimi (pi-kasyon) gözlemlendi. Deneysel çalışmada, hiperkromik etki elektrostatik etkileşim varlığını kanıtlarken bu katkıların YKT'nin amino gruplarından ve DNA çevresindeki fosfat omurgasından gelebileceği literatür göz önünde bulundurularak belirtilmiştir [247-249]. Oluşan hidrojen bağları incelendiğinde, YKT tripeptidinde tirozin halkasının ucundaki oksijene bağlı hidrojen, A zincirindeki DT7'nin OP2'si ile 2.6 Å'a sahip hidrojen bağı, YKT tripeptidinde lizinin yan zincirinde azota bağlı hidrojenler, DNA'nın B zincirindeki DG16'nın O6'sı ve A zincirindeki DT8'in O4'ü ile 2.3 Å, 2.6 Å ve 3.0 Å'a sahip hidrojen bağları yapmıştır. Yine tirozin tarafına baktığımızda, peptid grubu içindeki oksijen atomunun, DNA'nın A zincirindeki DC9'un H42 si ile ve B zincirindeki DC15'in H42'si ile sırasıyla 2.2 Å ve 2.8 Å'a sahip hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. YKT tripeptidindeki Treonin tarafının peptid grubu içinde kalan azotu, DNA'da B zincirindeki DC15'in H42'si ile 2.8 Å'a sahip bir hidrojen bağı yapmıştır. Ayrıca yine treonin kısmının karboksil kısmındaki oksijen atomu DNA'nın B zincirindeki DC15'in H42'si ve H41'i ile sırasıyla 2.7 Å ve 3.0 Å'a sahip hidrojen bağları yapmıştır. Yine karboksil grubu, B zincirindeki DG14'ün H7'si ile 2.3 Å ve 2.5 Å'a sahip hidrojen bağları yapmıştır. Ek olarak, YKT tripeptidinde lizinin yan zincirindeki azot ve B zincirindeki DC15 halkası, Şekil 4.12'de gösterilen 4.88 Å'ya sahip bir mesafe ile pi-kasyon etkileşimi oluşturmuştur. Tüm bu sonuçlara göre YKT tripeptidinin esas olarak DNA'nın Guaninler ve Sitozinleri ile hidrojen bağları yaptığı görülmüştür. Literatürde de belirtildiği gibi özellikle guanin ve sitozinlerin etkileşimlerinin çok olduğu yerlerde batokromik ve hipokromik kaymaların olduğu bilinmektedir [250,251]. Deneysel çalışmalarda da bu kaymaların varlığı görülmektedir. Gerçekleştirilen teorik ve deneysel çalışmaların birbirini desteklediği yapılan çalışmaların örtüşmesi ile görülmektedir.

Tablo 4.14: YKT tripeptidinin bağlanma afiniteleri ve RMSD değerleri.

Mod	Afinite (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.
1	-4.5	0.000	0.000
2	-4.2	2.430	3.915
3	-4.2	1.412	1.958
4	-4.2	1.763	3.427
5	-4.0	2.297	3.689
6	-4.0	1.652	2.136
7	-3.9	1.738	2.416
8	-3.9	2.583	3.537
9	-3.9	1.971	3.157

ADME hesaplama çalışmalarında SwissADME online sistemi kullanılmış [252], YKT tripeptidinin 411.47 g/mol moleküler ağırlığa sahip olduğu ve bu değer Lipinski kuralı ile uyumlu olduğu hesaplanmıştır. Oktanol / su katsayısının 5'i geçmediği ve tüm log Po/w hesaplamalarının genel kabulünün -2.62 olduğu belirlenmiştir. Lipinski kuralındaki koşullar göz önüne alındığında, Swissadme'de yapılan çalışmada YKT'nin lipinski kuralına uyabileceği belirtildi. Polar yüzey alanı değeri SwissADME sunucu sisteminde 163.68 Å² olarak belirlenmiştir ve bu değer BBB (Kan-Beyin Bariyeri) penetrasyonu [253-255] ile ilişkisi sebebiyle yüksektir. İlaç keşif çalışmalarında CYP2D6 inhibisyon deneyleri gereklidir, çünkü bir ilaç tarafından CYP2D6'nın inhibisyonu ciddi ilaç-ilac etkileşimlerine neden olabilir [256,257]. Bu çalışmada, YKT'nin CYP2D6 inhibisyonu değerlendirilmiş ve YKT inhibitör olmayan olarak sınıflandırılmıştır. Elde edilen tüm ADME tahminleri Tablo 4.15'de gösterilmiştir.

Tablo 4.15: Swissadme tarafından ilaç benzerliğini gösteren sentezlenmiş bileşiğin sanal taraması.

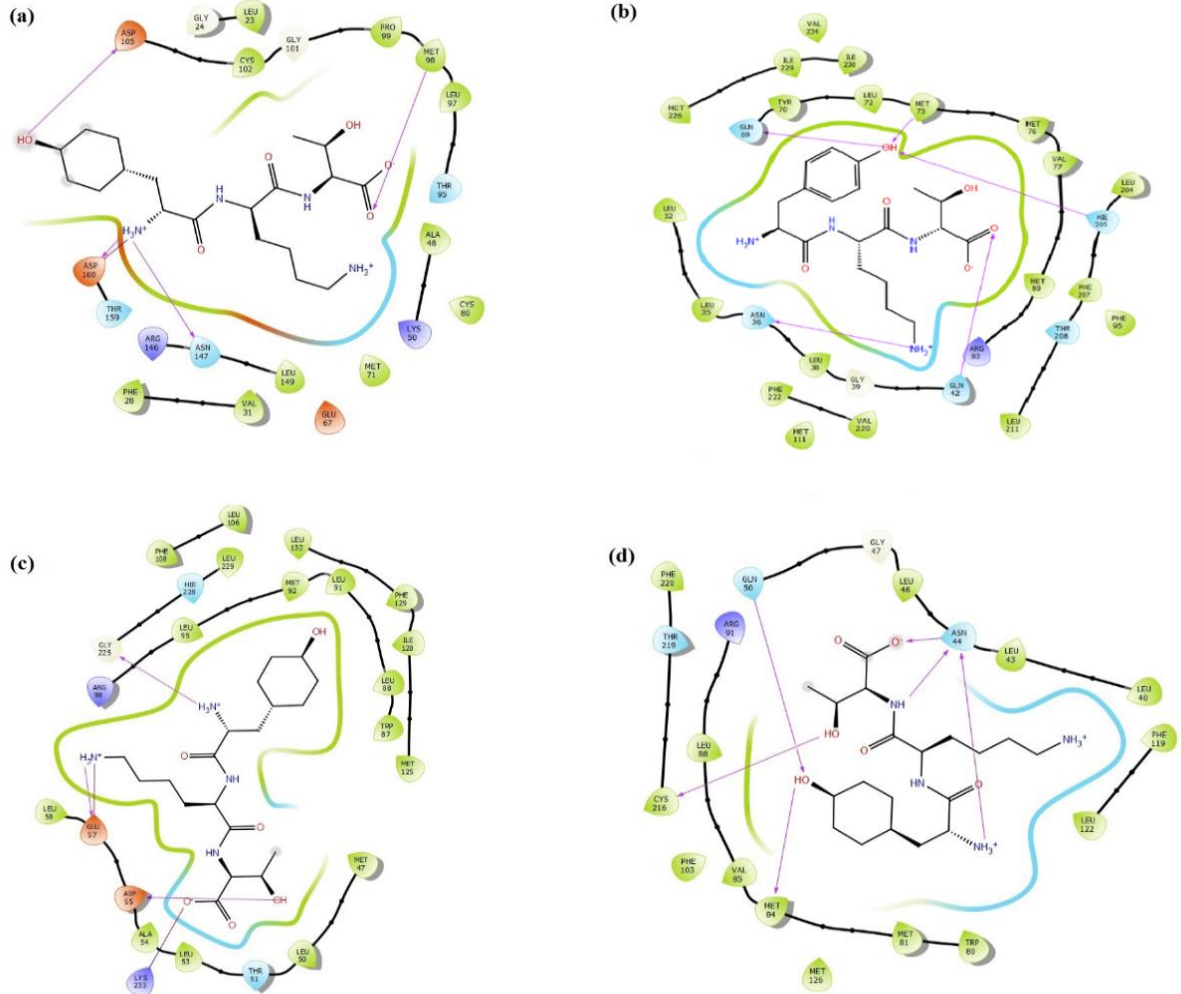
<i>Swissadme özellikleri</i>			
Fizikokimyasal Özellikler		Lipofiliklik	
Formül	C ₁₉ H ₃₁ N ₄ O ₆	LogP _{O/w} (iLOGP)	-5.07
Polar yüzey alanı	163.68 Å ²	LogP _{O/w} (XLOGP3)	-2.24
H-bağ akseptör sayısı	6	LogP _{O/w} (WLOGP)	-1.07
H-bağ donör sayısı	6	LogP _{O/w} (MLOGP)	-4.75
Dönebilen bağ sayısı	13	LogP _{O/w} (SILICOS-IT)	0.04
Ağır atom sayısı	29	Ortak LogP _{O/w}	-2.62
Aromatik ağır atom sayısı	6	Su çözünürlüğü	
MW	411.47 g/mol	Log S (ESOL)	-0.28
Farmakokinetik		Log S (Ali)	-0.66
GI absorpsiyon	Düşük	Log S (SILICOS-IT)	-3.31
BBB geçirgenlik	Hayır	İlaç benzerliği	
CYP1A2/ CYP2D6/ CYP3A4 inhibitörleri	Hayır	Lipinski	Evet, 1 ihlal
P-gp substrat	Evet	Ghose	Hayır, 1 ihlal
Log K _p (cilt geçirgenliği)	-10.40 cm/s	Biyoyararlanım Puanı	0.55

4.1.11.2. 2J6M (epidermal büyüme faktör reseptörü), 4OJB (androjen reseptör), 1A52 (östrojen reseptörü) ve 4OAR (progesteron reseptörü)

Prostat kanserinde kullanılan hormon baskılayıcı ilaçların hedefi androjen sentezi ve androjen reseptörüdür [258]. Androjen reseptörlerinin üremeden bağışıklık sistemine kadar farklı vücut sistemlerinde önemli olduğu bilinmektedir. Ayrıca, androjen reseptör sinyali tümörlerin gelişiminde kilit rol oynamaktadır [259]. Prostat kanserinde androjen öne çıkmasına rağmen, östrojen reseptörlerinin de (ÖR) prostat gelişimine ek olarak kanserin başlama ve ilerleme süreçlerinde de etkin olabileceği bildirilmiştir [260,261]. Hormon reseptörleri olan ÖR ve progesteron reseptörü (PR) meme kanseri vakalarında öne çıkmaktadır. Tümörler, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve epidermal büyüme faktörü reseptör ekspresyonlarına göre alt tiplere ayrılabilir [262,263]. Epidermal büyüme faktör reseptörü (EBFR) prostat kanseri gibi farklı tip kanser türlerinin gelişiminde önemli roller oynamaktadır [264]. EBFR’de meydana gelen aşırı ekspresyon veya mutasyon gibi bozukluklar, prostat, servikal, göğüs, yumurtalık gibi çeşitli kanserlerle ilişkilendirilebilmektedir. Küçük moleküllü EGFR inhibitörleri, çok daha düşük yan etki riski ile antikanser ilaçlar olarak önerilmektedir [264].

Docking çalışmaları, epidermal büyüme faktör reseptörü (PDB Kodu: 2J6M) [265], androjen reseptörü (AR) (PDB Kodu: 4OJB) [266], östrojen reseptörü (PDB Kodu: 1A52) [267] ve progesteron reseptörü (PDB Kodu: 4OAR) [268] ile gerçekleştirilmiştir.

Schrödinger Glide modülü içindeki “LigPrep” aracı ile OPLS kuvvet alanı [269] kullanılarak YKT tripeptidinin nötral pH da 32 farklı konformeri oluşturulmuştur (Tablo 25). Reseptör yapısı SWISS MODEL server’ından alınarak, Glide modülü içindeki “protein hazırlama sihribazında” yardımı ile yapı içindeki reseptör molekülü haricinde su ve iyon gibi diğer yapılar kaldırılmış ve polar hidrojen atomları reseptöre eklenmiştir. Bağ düzenleri tayin edilip, yükler nötral pH da belirlenmiştir. Seçilen reseptör PROPKA yardımıyla optimize edilip, 0.3 Å RMSD değeri tercih edilerek ve OPLS3 kuvvet alanı kullanılarak reseptör içindeki ağır atomlar yaklaştırılmıştır. Grid kutusu, “Glide Grid Üretim” aracını kullanarak mevcut ortak kristalize edilmiş ligandı merkezleyerek reseptöre tanımlanmıştır. Grid oluşumunun amacı, ligand-reseptör kenetlenmesi için olası ligand-reseptör bağlanma alanlarını belirlemektir. Ligand, reseptör ve grid hazırlandıktan sonra, YKT, SP (standart hassasiyet) algoritması kullanılarak reseptöre yerleştirildi.



Şekil 4.13: 2J6M (a), 4OJB (b), 1A52 (c) ve 4OAR (d) reseptörlerinin aktif bölgesinde YKT tripeptidinin 2D ligand etkileşimi.

Yapılan kenetlenme çalışmalarına göre (Şekil 4.13), seçilen dört reseptör olan EBFR, AR, ÖR ve PR ile YKT'nin etkileşimi sonucunda sırasıyla -7.558 kcal/mol, -9.325 kcal/mol, -9.115 kcal/mol ve -9.176 kcal/mol kenetlenme skorları elde edilmiştir. YKT ile seçilen dört reseptöre ait doking skorları ve etkileşim bilgileri Tablo 4.16'te verilmiştir.

Tablo 4.16: Doking Skor enerjileri ve YKT tripeptidi ile tüm tercih edilen reseptörlerin olası etkileşimleri.

<i>Reseptörler</i>	<i>EBFR PdbID: 2J6M</i>	<i>AR PdbID: 4OJB [270]</i>	<i>ÖR PdbID: 1A52</i>	<i>PR PdbID: 4OAR</i>
<i>Docking Skoru (Kcal/mol)</i>	-7.558	-9.325	-9.115	-9.176
<i>H-Bağ Etkileşimi (Å)</i>	1-MET98(2.05) 2-ASP105(1.72) 3-ASN147(1.88) 4-ASP160(1.55)	1-ASN36(1.75/2.34) 2-GLN42(2.56) 3-GLN69(2.22) 4-MET73(2.65) 5-HIE205(1.94)	1-ASP55(2.27) 2-GLU57(1.64) 3-GLY225(2.42) 4-LYS233(1.69)	1-ASN44(1.71) 2-ASN44(1.90) 3-ASN44(2.47) 4-GLN50(2.18) 5-MET84(2.76) 6-CYS216(1.81)
<i>Tuz Köprüsü</i>	1-ASP160(2.51)	1-ARG83(3.13)	1-GLU57(4.45) 2-LYS233(2.61)	-
<i>Hidrofobik Kalıntılar</i>	LEU23, PHE28, VAL31, ALA48, MET71, CYS80, LEU97, MET98, PRO99, CYS102, LEU149	LEU22, LEU32, LEU35, LEU38, TYR70, LEU72, MET73, MET76, VAL77, MET80, PHE95, MET111, LEU204, PHE207, VAL220, PHE222, MET226, ILE229, ILE230, VAL234	MET47, LEU50, LEU53, ALA54, LEU58, TRP87, LEU88, LEU91, MET92, LEU95, LEU106, PHE108, MET125, ILE128, PHE129, LEU132	LEU40, LEU43, LEU46, TRP80, MET81, MET84, VAL85, LEU88, PHE103, PHE119, LEU122, MET126, CYS216, PHE220
<i>Polar Kalıntılar</i>	THR95, ASN147, THR159	ASN36, GLN42, GLN69, HIE205, THR208	THR51, HIE228	ASN44, GLN50, THR219
<i>Pozitif Yüklü Kalıntılar</i>	LYS50, ARG146	ARG83	ARG98, LYS233	ARG91
<i>Negatif Yüklü Kalıntılar</i>	GLU67, ASP105, ASP160	-	ASP55, GLU57	-
<i>Glisin</i>	GLY24, GLY101	GLY39	GLY225	GLY47

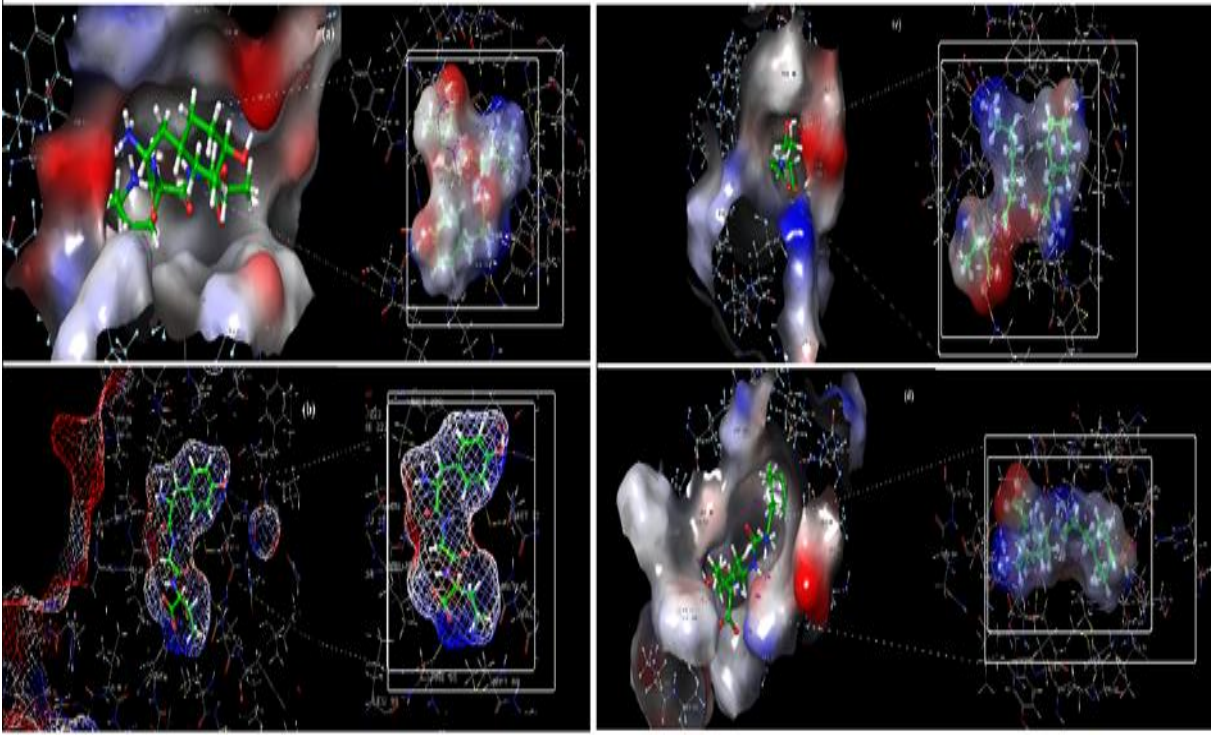
ASP160 (1.55 Å) ve ASP105 (1.72 Å) gibi negatif yüklü EBFR kalıntıları, sırasıyla YKT tripeptidinin N-terminal amino grubu ve tirozin amino asidinin OH grubu ile hidrojen bağı etkileşimini gösterirken, hidrofobik MET98 (2.05 Å) ve polar ASN147 (1.88 Å) kalıntıları, sırasıyla karboksil grubu ve NH₃⁺ grubu ile bu etkileşimi gerçekleştirmiştir. Hidrojen bağı

etkileşimlerinin yanı sıra, ASP160 kalıntısı ile NH_3^+ grubu arasında bir tuz köprüsü olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13a).

Androjen reseptörü ile YKT tripeptidi arasında hidrojen bağı ile bağlanma bölgeleri MET-73, GLN69, HIE205, ASN36 ve GLN42 olarak belirlenmiş ve Şekil 4.13b’de verilmiştir. Hidrojen bağlarına yakından bakıldığında YKT tripeptidindeki tirozin amino asidinin OH grubu, MET73 (2.65 Å) ve HIE205 (1.94 Å) ile hidrojen bağı etkileşimi göstermiştir. Ayrıca, YKT tripeptidindeki tirozin amino asidinin OH grubu, GLN69 (2.22 Å) ile hidrojen bağı etkileşimi göstermiştir. YKT tripeptidindeki NH_3^+ ve N-terminal amino grubu, ASN36 ile 1.75 Å ve 2.34 Å bağı uzunluklarına sahip hidrojen bağı etkileşimleri göstermiştir. YKT tripeptidinin karboksil grubu ile GLN42 (2.56 Å) de hidrojen bağı etkileşimi göstermiştir. Buna ek olarak, YKT tripeptidi, androjen reseptörünün ARG83 kalıntısı ile tuz köprüsü etkileşimi de yapmıştır.

Östrojen reseptörü ile YKT arasındaki hidrojen bağı etkileşim bölgeleri ASP55, GLU57, LYS233 ve GLY225’tir. Hidrojen bağı etkileşimlerinin yanı sıra YKT’nin NH_3^+ ve karboksil grupları GLU57 (4.45 Å) ve LYS233 (2.61 Å) ile tuz köprüleri oluşturmuştur. Progesteron reseptörü ile gerçekleştirilen doking çalışmasında ise ASN44, GLN50, CYS216 ve MET84 öne çıkan kalıntılardır.

Moleküler kenetleme çalışması sonucunda ligand ve reseptöre ait elde edilen elektrostatik potansiyel enerji haritalarında, kırmızı bölgelerin en düşük elektrostatik potansiyel enerji değerine, mavi bölgelerin ise en yüksek elektrostatik potansiyel enerji değerine karşılık gelmektedir (Şekil 4.14). Bu yük dağılım haritalarının amacı, moleküllerin birbirleriyle nasıl etkileşime girdiğini anlamaktır.



Şekil 4.14: YKT tripeptidi ve EBFR (a), AR (b), ÖR (c), PR (d) elektrostatik potansiyel harita yüzeyleri.

ADME analizi için Schrödinger Qikprop aracı kullanılmıştır. Qikprop aracı, Profesör William L. Jorgensen tarafından tasarlanan kullanımı kolay bir ADME tahmin programıdır [271]. ADME analizi sonucunda (bkz. Tablo 4.17), ilaç adayı moleküle ait ilaç benzeri özelliklerin tahmini yapılmaktadır [272,273]. Buna göre, ilk olarak Lipinski kuralları içinde bulunan değerlere baktığımızda, hesaplanan moleküler ağırlığı, hidrojen bağı donörleri, hidrojen bağı alıcıları ve oktanol-su partisyon katsayısı log P değerleri için Lipinski kurallarına kesin bir uyumun olmadığı görülmektedir. Ancak bir ihlalle de olsa uygun bir ilaç adayı olabileceği söylenebilir.

İlaç adayı moleküller için en önemli özelliklerden biri kan-beyin bariyerinin geçilebilmesidir. Bir ilacın vücuda dağılımı konusunda önem arz eden bir özellik olan Kan-Beyin bariyerinin geçiş tahmininde sulu ortam için oktanol-su partisyon katsayısı (log P) önemli bir tanımlayıcı olup [274], yapılan çalışmalarda program içerisinde verilen referans aralığı içinde olan QP log BB değerleri EBFR, AR, ER, PR için sırasıyla -2.032, -2.547, -2.902 ve -2.837 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, ilacın kan-beyin bariyerini geçebileceği tahmin edilmektedir. İnsan serum albümini (HSA) birçok hastalığa (örneğin; diyabet, kanser vb.) karşı terapötik ajanlar için çok yönlü bir taşıyıcı olarak ortaya çıkmıştır [275]. İlacın suda çözünür

olması da ilacın vücut tarafından emilimini kolaylaştıran bir özelliktir. İnsan serum albumin (HSA)-plazma protein bağlanması, ilaçların plazmadan hedef dokuya dağılımını etkileyen faktörlerden olup [276], bu çalışmalarda QP log K hsa Serum Protein Bağlanma değerleri EBFR, AR, ER, PR için sırasıyla -1.332, -1.293, -1.337, -1.291 olarak belirlenen referans aralığında elde edilmiştir. Yine, cildimiz ilaç emiliminde önemli bir engel oluşturmaktadır. Cilt geçirgenliği katsayısı (Kp), moleküle ait ağırlık, hacim ve octanol/su oranı ile ilişkili olarak elde edilir [277]. Buna göre, cildin geçirgenliği ile ilgili sonuçlarda QP log Kp -8.867, -9.162, -10.088, -9.727 (Kp in cm/hr) elde edilmiştir. Ek olarak, Polar Yüzey Alanı (PSA), ilaç keşfi için fizikokimya çalışmalarında önemli bir parametredir çünkü PSA, oktanol-su bölme katsayısı gibi ilaç moleküllerinin taşıma işlemini karakterize etmek için kullanılır ve PSA, ilaç emiliminin çeşitli nedenlerine bağlanabilir. Bu çalışmada YKT'nin polar yüzey alanları hesaplandığında $193.891 \text{ \AA}^2$, $198.114 \text{ \AA}^2$, $200.316 \text{ \AA}^2$ ve $200.327 \text{ \AA}^2$ (7 ila 200 arasında önerilir) olarak elde edilmiştir. Caco-2 hücreleri kan-bağırsak bariyerinin bir modelidir. Analiz sonucunda bu değerin de sıfır olduğu görülmektedir. ADME analizinin sonuçları, tripeptidin hesaplanan hidrofobik, hidrofilik karakter, moleküler hacim, polar yüzey alanı, polarize edilebilirlik ve solvent erişilebilirlik yüzey alanı gibi birçok özelliğinin reseptörlerin özelliklerine bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.17: YKT tripeptidinin farklı reseptörler ile kenetlenmesi sonucunda sahip oldukları doking skor enerjileri ve hesaplanan ADME özellikleri.

<i>Reseptörler</i>	<i>EBFR PdbID: 2J6M</i>	<i>AR PdbID: 4OJB</i>	<i>ER PdbID: 1A52</i>	<i>PR PdbID: 4OAR</i>	
<i>Doking Skoru (Kcal/mol)</i>	-7.558	-9.325	-9.115	-9.176	
Temel Tanımlayıcılar					(İlaçların %95'inin Aralığı)
Polar Yüzey Bölgesi (PSA)((Angstroms^2)	193.891	198.114	200.316	200.327	(7.0 / 200.0)
Donör-Hidrojen bağları	6.500	6.500	6.500	6.500	(0.0 / 6.0)
Akseptör-Hidrojen bağları	9.900	8.950	9.900	9.900	(2.0 / 20.0)
Özelliklerin tahminleri					
QP Polarizebilite (Angstroms^3)	35.770M	36.480M	36.833M	38.257M	(13.0 / 70.0)
hexadecane/gaz için QP log P	13.605M	14.768M	14.363M	14.610M	(4.0 / 18.0)
octanol/gaz için QP log P	27.062M	26.910M	28.188M	28.028M	(8.0 / 35.0)
Su/gaz için QP log P	20.728M	21.972M	21.883M	20.915M	(4.0 / 45.0)
Octanol/su için QP log P	-2.784	-2.729	-3.152	-2.844	(-2.0 / 6.5)
Sulu çözünürlük için QP log S	0.115	0.269	-0.120	-0.933	(-6.5 / 0.5)
QP log K hsa Serum Protein Bağlanma	-1.332	-1.293	-1.337	-1.291	(-1.5 / 1.5)
Kan/Beyin için QP log BB	-2.032	-2.547	-2.902	-2.837	(-3.0 / 1.2)
Öngörülen CNS Activitesi (-- to ++)	--	--	--	--	
HERG K+ Kanal Blokajı: log IC50	-0.986	-1.916	-1.505	-1.780	(concern below -5)
Görünür Caco-2 Geçirgenliği (nm/sec)	0	0	0	0	(<25 poor, >500 great)
Görünür MDCK Geçirgenliği (nm/sec)	0	0	0	0	(<25 poor, >500 great)
Cilt geçirgenliği için QP log Kp	-8.867	-9.162	-10.088	-9.727	(Kp in cm/hr)
Maksimum transdermal taşıma oranı	0.001	0.001	0.000	0.000	(micrograms/cm^2-hr)
Lipinski Kuralı	1	1	1	1	(maximum is 4)
% İnsan Oral Emilimi (+- 20%)	0	0	0	0	(<25% is poor)

4.1.12. YKT Tripeptidinin Kansere Hücresel Etkisi

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hücre kültür besiyerinde hazırlanan HeLa ve MCF-7 hücreleri, 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde, RPMI hücre kültür besiyerinde yetiştirilen MAT-LyLu hücreleri ise 0.5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde mikrotiplere eklenmiştir. 24 saat boyunca 37°C ve %5 lik CO_2 lik ortamda hücrelerin çoğalması ve yüzeyi kaplaması için bırakılmıştır.

Literatür verilerine dayanarak [135-139,278-282], YKT tripeptidi 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL konsantrasyonlarda hücrelere eklenmiş, 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra

hücrelerin sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi için kolorimetrik bir test olan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolumbromide) uygulanmıştır.

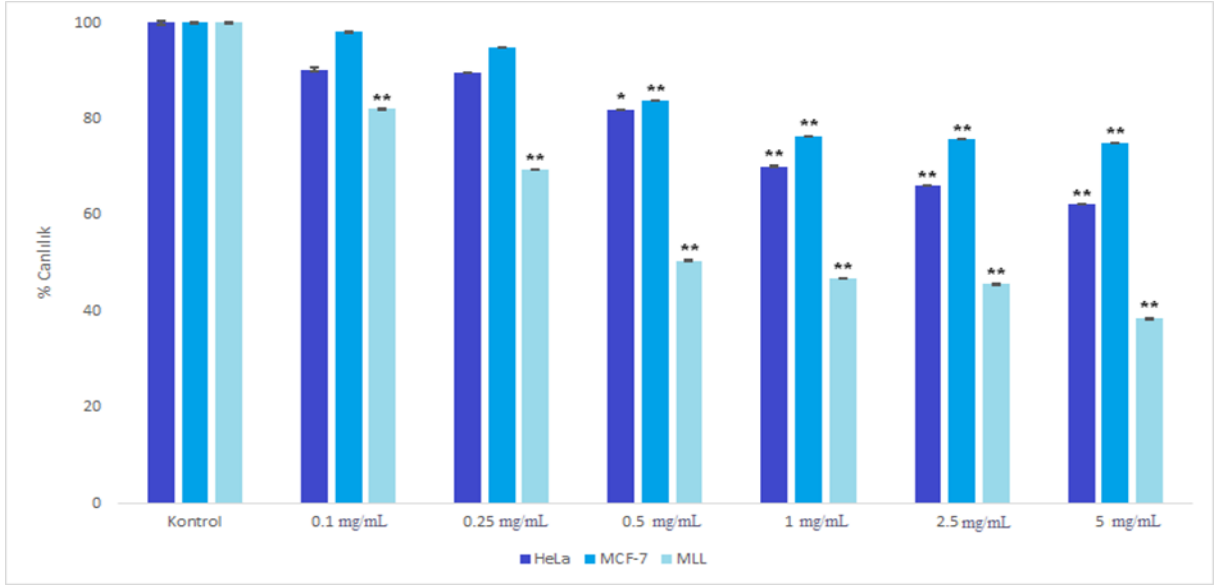
Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen absorbans değerleri % canlılık formülünde yerine koyularak belirlenen canlılık yüzdeleri elde edilmiştir.

4.1.12.1. YKT Tripeptidi Sitotoksikite Çalışması

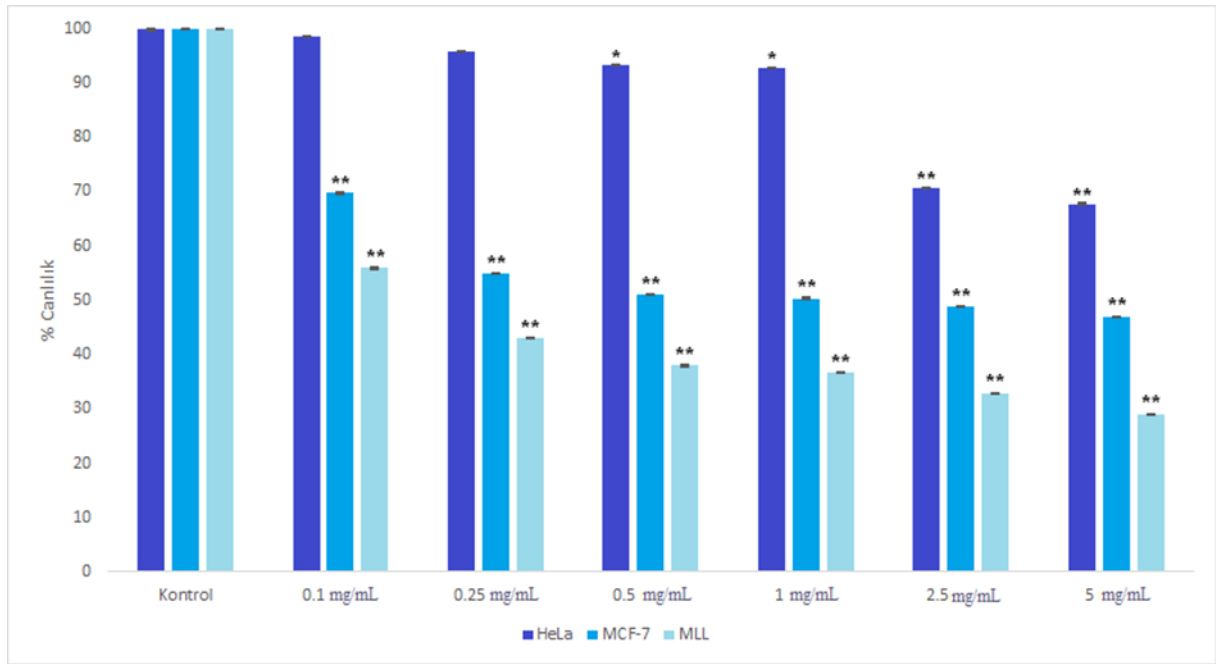
HeLa (Rahim ağzı Kanseri hücre hattı), MCF-7 (Meme kanseri hücre hattı) ve MAT-LyLu (MLL)(Sıçan prostat kanser hücre hattı) hücrelerine YKT (Tyr-Lys-Thr) uygulanmış, bu maddenin 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonucunda prostat, meme ve rahim ağzı hücrelerinde meydana getirdikleri sitotoksik etkiler, MTT yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Kontrol ve deney gruplarının absorbans değerleri ölçülmüş, konsantrasyonlara göre (0.1 mg/ml, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1mg/ml, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL) % canlılık grafikleri Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da, konsantrasyonlara göre % canlılık değerleri de Tablo 4.18 ve Tablo 4.19'de verilmiştir. İstatistiksel analiz yardımıyla deney gruplarının kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak anlamlılıkları ile ilgili bilgiler elde edilmiştir.

MTT analizine göre, YKT peptidinin 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL konsantrasyonlarda HeLa, MCF-7 ve MAT-LyLu hücre hatları üstünde 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda sitotoksik aktivitesi ile ilgili veriler elde edilmiştir. Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da görüldüğü gibi 24 ve 48 saatlik deney grupları kontrol gruplarına (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$) göre sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Deney grupları arasında YKT peptidinin en sitotoksik aktivitesi MAT-LyLu hücreleri üzerinde olduğu belirlenmiştir. MTT analizine göre ortalama IC_{50} değerleri, 24 saatte MAT-LyLu hücre hattı için 0.5 mg/mL ve 48 saatte MCF-7 hücre hattı için 1 mg/mL olarak belirlenmiştir. YKT tripeptidi uygulanan HeLa, MCF-7 ve MAT-LyLu hücrelerinin 24 saat sonunda absorbans değerlerinin konsantrasyonla ilişkili olarak azaldığı saptanmıştır. 24 saat sonundaki istatistiksel analizler ile MAT-LyLu hücre hatları üstünde uygulanan tüm konsantrasyonlar kontrole göre anlamlı olduğu ($p < 0,01$), MCF-7 hücre hatları üstünde uygulanan 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarının kontrole göre anlamlı olduğu ($p < 0,01$) ve HeLa hücreleri üstünde iste kontrole göre, uygulanan 0.5 mg/mL ($p < 0,05$), 1 mg/mL, 2.5 mg/mL ve 5 mg/mL ($p < 0,01$) konsantrasyonlarının anlamlı olduğu belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlara göre, MAT-LyLu hücreleri kontrole göre tüm konsantrasyonlara göre anlamlı olmasına rağmen MCF-7 ve

HeLa hücre hatları düşük konsantrasyonlarda (0.1 mg/mL ve 0.25 mg/mL) kontrolle arasındaki farkların anlamlı olmadığı görülmüştür. 48 saat sonundaki çalışmalarda ise MAT-LyLu hücre hattının yanı sıra ve MCF-7 hücre hatlarını üstüne uygulanan tüm konsantrasyonların kontrol ile anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,01$). HeLa hücresinde ise yine düşük konsantrasyonların kontrol ile arasındaki farkların anlamlı olmadığı, daha yüksek konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.15: 24 saat boyunca HeLa, MCF-7 ve MLL hücrelerine uygulanan YKT tripeptidinin farklı konsantrasyonlarında yüzde canlılık grafiği ($p<0,05$: * (kontrole göre anlamlılık); $p<0,01$: ** (kontrole göre anlamlılık)).



Şekil 4.16: 48 saat boyunca HeLa, MCF-7 ve MLL hücrelerine uygulanan YKT tripeptidinin farklı konsantrasyonlarında yüzde canlılık grafiği ($p < 0,05$: * (kontrole göre anlamlılık); $p < 0,01$: ** (kontrole göre anlamlılık)).

Tablo 4.18: YKT tripeptidi için HeLa, MCF-7 ve MAT-Lyly hücrelerine ait 24 saat inkübasyon sonunda yüzde canlılık değerleri.

Örnek Konsantrasyonu	HeLa	MCF-7	MAT-Lyly
Kontrol	100	100	100
0.1 mg/mL	90,31	98,08	82,01**
0.25 mg/mL	89,7	94,88	69,48**
0.5 mg/mL	81,94*	93,84**	50,48**
1 mg/mL	70,16**	76,48**	46,8**
2.5 mg/mL	66,23**	75,84**	45,59**
5 mg/mL	62,3**	75,04**	38,41**

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

Tablo 4.19: YKT tripeptidi için HeLa, MCF-7 ve MAT-LyLu hücrelerine ait 48 saat inkübasyon sonunda yüzde canlılık değerleri.

Örnek Konsantrasyonu	HeLa	MCF-7	MAT-LyLu
Kontrol	100	100	100
0.1 mg/mL	98,5	69,72**	55,91**
0.25 mg/mL	95,75	54,93**	43,07**
0.5 mg/mL	93,25*	51,05**	38,01**
1 mg/mL	92,75*	50,34**	36,76**
2.5 mg/mL	70,75**	48,77**	32,86**
5 mg/mL	67,75**	47**	28,97**

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

Yapılan çalışmalar sonucunda YKT tripeptidinin uygulandığı 3 hücre hattında da sitotoksik etki gösterdiği sonucuna varılmış, en büyük etkinin sıçan prostat kanser hücre hatlarında (MAT-LyLu) olduğu belirlenmiştir.

4.2. YKT YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİNİN KARAKTERİZASYONU

4.2.1. Ortalama Partikül Boyutu, Polidispersite ve Zeta Potansiyel Analizi

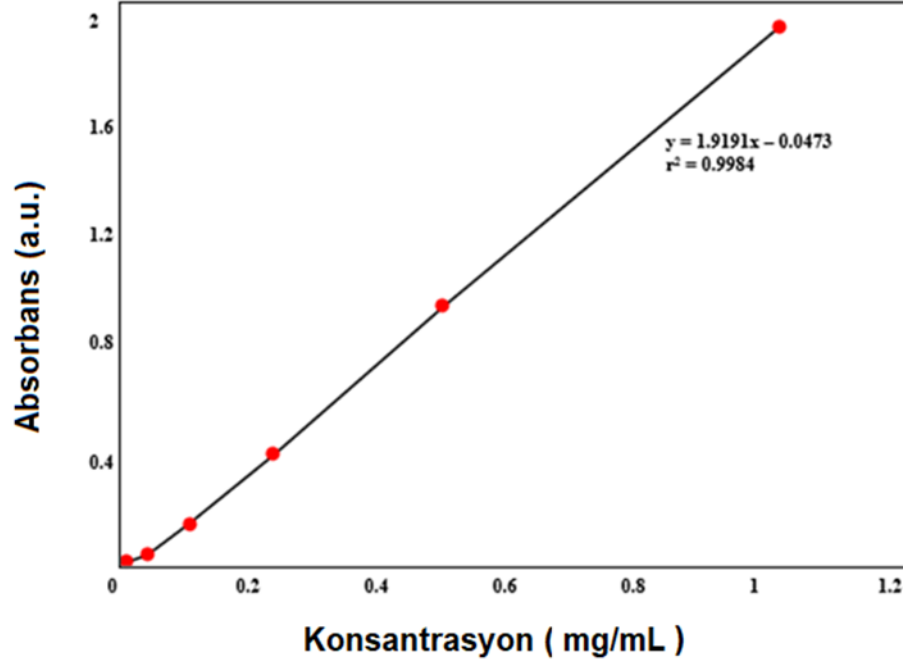
Boş kitosan ve YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyeli ve ortalama partikül boyutu ölçümleri 25 °C'de 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) içeren Malvern Zetasizer Nano ZS ile gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Tablo 1 'de verilmiştir.

Tablo 4.20: Boş ve YKT tripeptidi yüklü kitosan nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyeli ve PDI değerleri.

Örnek	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Zeta Potansiyel (mV)	PdI
Boş kitosan nanopartikülü	54.80	13.2	0.125
YKT yüklü kitosan nanopartikülü	57.11	12.4	0.221

4.2.2. Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi Sonuçları

UV-Vis spektrometresi kullanılarak, YKT tripeptidinin farklı konsantrasyonları analiz edilmiş ve absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerlerine göre (standart YKT eğrisi hazırlanmıştır (Bknz Şekil 4.17).



Şekil 4.17: YKT tripeptidinin UV-Visible spektrometresi ile elde edilen standart eğrisi.

UV-Vis spektrometresinde, boş nanopartikül ile blank alındıktan sonra, YKT yüklü nanopartikülün absorbans değeri okunmuş ve gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra, enkapsülasyon ve yükleme verimleri aşağıda sırası ile verilen denklemler ile hesaplanmıştır;

$$\text{Enkapsülasyon Verimi} = \frac{\text{Toplam YKT miktarı} - \text{Serbest YKT miktarı}}{\text{Toplam YKT miktarı}} \times 100 \quad (4.10)$$

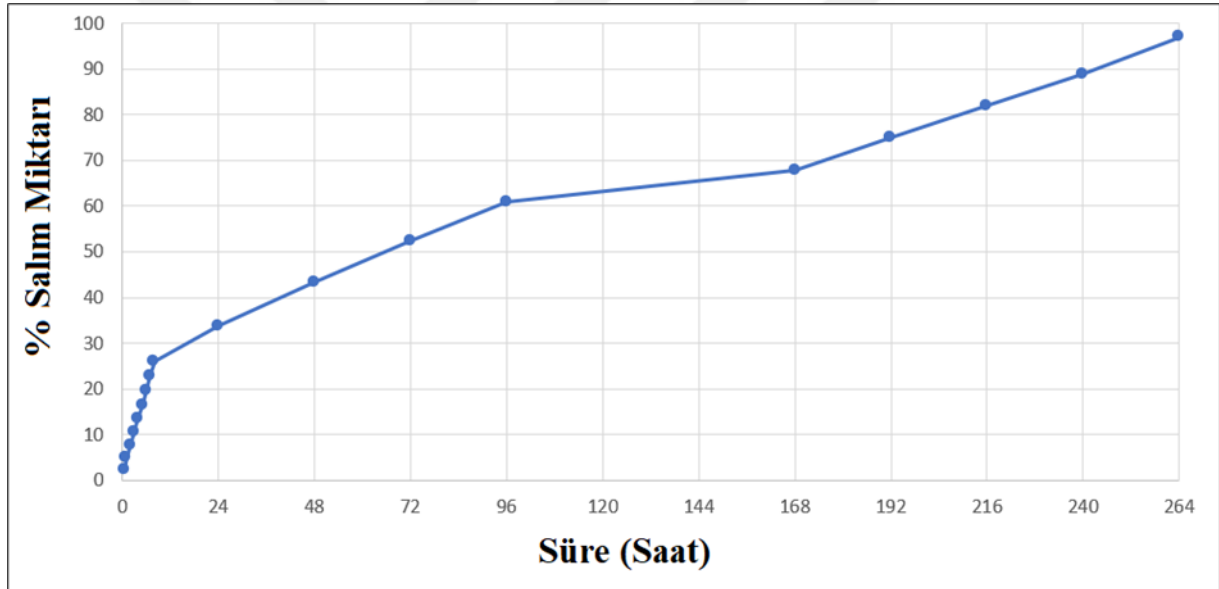
$$\text{Yükleme Kapasitesi} = \frac{\text{Enkapsüle olan YKT miktarı}}{\text{Toplam nanopartikül ağırlığı}} \times 100 \quad (4.11)$$

YKT yüklü kitosan için, YKT'nin enkapsülasyon verimliliğinin %100 olduğu bulunmuştur. Yükleme kapasitesinin ise %34.97 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinin başarıyla elde edildiğini göstermektedir.

4.2.3. *In vitro* Salım Testi Sonuçları

Kontrollü salım sistemlerinde aktif maddelerin belirli oranlarda ve zamanda salım yapması amaçlanmaktadır. Burada temel amaç, kan plazma konsantrasyonundaki madde miktarını kontrol altında tutup, yan ve toksik etkilerden kaçınmaktır [283].

YKT yüklü kitosan nanopartikülleri formülasyonu diyaliz membranı içine alınarak 30 mL PBS tamponu dolu beherler içerisinde (pH=7,4), 37 °C’de yatay çalkalayıcıda 150 rpm’de çalkalanmaya bırakılmıştır. Belirlenen zaman aralıkları ile (30.dk, 1.sa., 2.sa., 3.sa., 4.sa., 5.sa., 6.sa., 7.sa., 8.sa., 24.sa., 48.sa...264.sa.) örnekler alınarak UV-Vis spektrofotometrede absorbans değerleri okunarak standart eğrinin denklemi yardımı ile salınan YKT konsantrasyonları hesaplanmıştır.



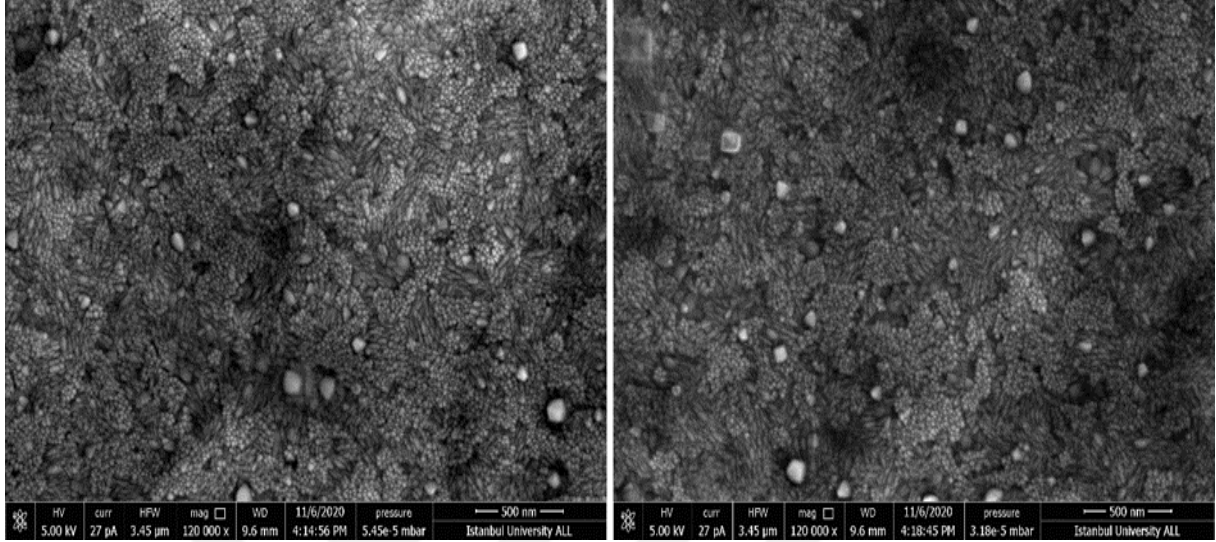
Şekil 4.18: YKT tripeptidi yüklü kitosan nanopartiküllerinin salım grafiği.

Şekil 4.18’de YKT yüklü Kitosan nanopartiküllerinin, 264.saatin sonunda %96,77 oranında YKT saldığı görülmüştür.

4.2.4. SEM Analizi

YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinin morfolojik çalışmaları Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (FEI Versa 3D) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SEM aracılığıyla elde edilen görüntüler incelenmiş ve YKT yüklü nanopartiküllerinin düzenli bir dağılıma ve yoğun bir yapıya sahip

küresel parçacıklar olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.19’da YKT yüklü kitosan nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri verilmiştir.



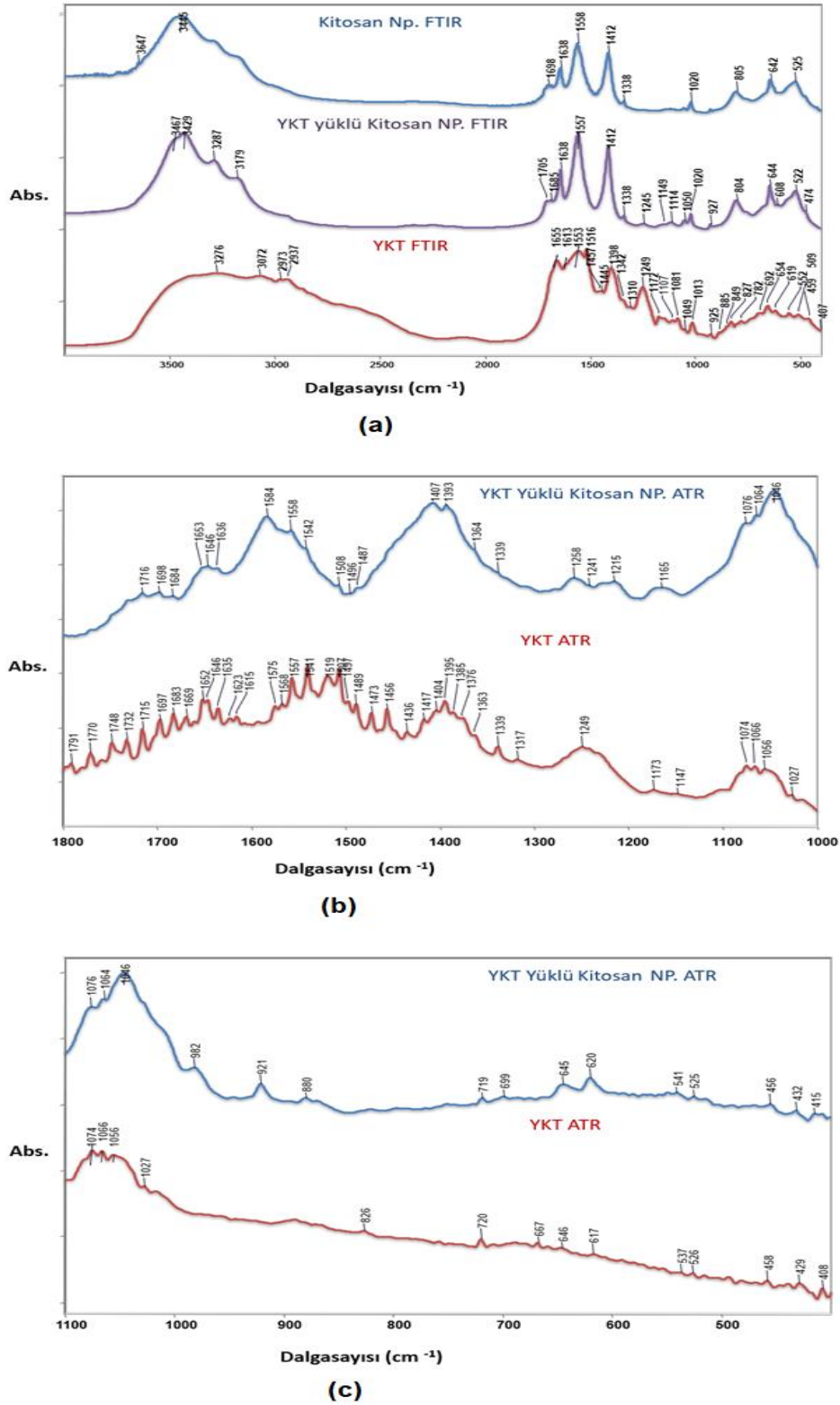
Şekil 4.19: 5mg YKT yüklü kitosan nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.

4.2.5.Kitosan nanopartiküllerine ait spektrumlar

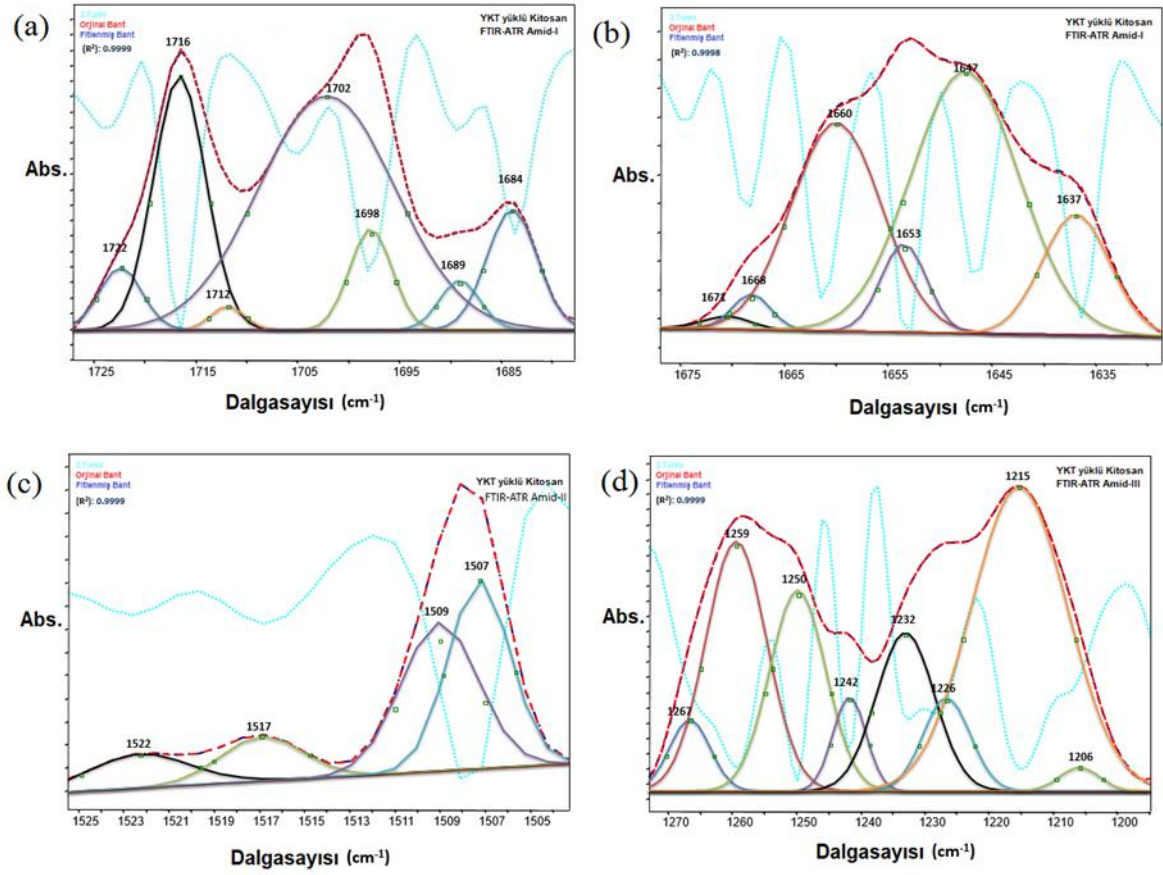
Çalışmanın spektroskopik kısmında sentezlenen kitosan nanopartikülleri, YKT tripeptidi ve YKT yüklü kitosan nanopartiküllerine ait spektrumlar, FTIR ve FTIR-ATR yöntemleri ile incelenmiştir. Ayrıntılı analizlerin gerçekleştirilebilmesi için YKT tripeptidinin, YKT yüklü kitosan nanopartikül ve boş kitosan nanopartikülleri için oda sıcaklığında ve katı halde kayıt edilen FTIR spektrumları, $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dalgasayısı bölgesinde karşılaştırmalı olarak Şekil 4.20a’da verilmektedir. Ayrıca, örnek hazırlamaya gerek duyulmadan ATR spektrumları da YKT tripeptidi ve YKT yüklü nanopartikül spektrumları $1800-1000\text{ cm}^{-1}$ ve $1100-400\text{ cm}^{-1}$ bölgelerinde karşılaştırmalı olarak Şekil 4.20b ve Şekil 4.20c’de gösterilmiştir. Bunların yanı sıra, YKT tripeptidinin peptid grubuna ait olan ve amid I, II, III karakteristik pikleri YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinin FTIR-ATR spektrumlarından, bant komponent analizi yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21). YKT yüklü NP’lerin ATR spektrumu için $1725-1685\text{ cm}^{-1}$ ve $1675-1635\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki YKT tripeptidine ait amid I karakteristik pikleri, bant komponent analizi yöntemi ile detaylı olarak incelenmiştir (Şekil 21a,b). Bunlara ek olarak YKT amid grubuna ait olan amid II ve amid III karakteristikleri de $1525-1505\text{ cm}^{-1}$ ve $1270-1200\text{ cm}^{-1}$ bölge aralıklarında YKT yüklü kitosan nanopartikülüne ait olan ATR spektrumunun bant komponent analizi ile incelenmesiyle belirlenmiştir. Bant komponent analiz yönteminde, gerekli piklerin doğru analizini elde etmek için, baseline düzeltmeleri uygulanmış ancak pikleri

kaybetmemek için smoothing uygulanmamıştır. Bant komponent analizinin uygulandığı YKT yüklü nanopartikül spektrumları, 2. türev spektrumları, 2 derece 9 nokta ve Savitzky Golay yöntemleri tercih edilerek analiz edilmiştir. Ayrıca tüm spektroskopik sonuçlar tablollaştırılarak, kitosan polimeri ile kaplanmış YKT tripeptidinin, kitosan ile etkileşimi sonucunda piklerinde meydana gelen kayma miktarları tespit edilmiştir. (Tablo 21)





Şekil 4.20: Kitosan nanopartikülleri, YKT yüklü kitosan nanopartikülleri ve YKT tripeptidine ait FTIR spektrumları (a), YKT yüklü kitosan nanopartikülleri ve YKT tripeptidine ait 1800-1000 cm⁻¹ bölgesi ATR spektrumları (b) ve 1100-400 cm⁻¹ bölgesi ATR spektrumları (c).



Şekil 4.21: YKT yüklü kitosan nanopartiküllerine ait ATR spektrumu kullanılarak bant komponent analizi yöntemi ile elde edilen amid pikleri.

Tablo 4.21: YKT yüklü kitosan NP'lerin gözlenen FT-IR ve ATR pikleri ve atamaları.

Kitosan				YKT				YKT yüklü kitosan NP			
Referanslar		Bu çalışma		Atamalar		IR		ATR		IR	
Atamalar	IR	R	IR*	ATR**							ATR
O-H gerilme	3750-3000 [284,285]		3445		N-H gerilme					3429	
N-H gerilme	3367 [286] 3290 [287]	3311 [298]	3287		N-H gerilme	3276				3287	
CH gerilme	2927 [287] 2867 [288]	2932 2885 [299]	2933 2851		CH gerilme	2937; 2868		2937; 2871		2937	-
					CO gerilme (karboksil)	-		1715		1705	1716
NH ₂ bükülme	1637 [284] 1636 [289]		1638	1636	C-O gerilme (amid-I); NH ₂ bükülme	- 1655		1698(bk); 1652(bk); 1635		1698 -; 1638	1698(bk) 1653(bk); 1636
C-C (aromatik)	1585 (Chitosan) [290] 1542 (Chitosan NP) [291]		1558	1584 1542	CNH(peptit)bükülme amid-II	- 1516;		1520(bk); 1507(bk)		-; 1507	1522(bk) 1507(bk)
NCH bükülme			1412		HCH bükülme	1483		1497;1489;		-	1496;1487
C-N gerilme	1317 [292]		1338		NCH bükülme	1398		1404;1395		-	1407;1393
					C-C gerilme	1310		1317		1338	-
					C-N(peptit) gerilme						
C-O gerilme; O-C-H bükülme	1261 [287]			1258	C-O gerilme (tyr)	1249		1249		1245	1241
COC antism. gerilme	1154 [286] 1152 [287] 1148 [287]	1146 [299]	1154		vCN(peptit)						1226 (bk)
TPP çapraz bağlayıcı (P=O)	1170 [292] 1148 [293] 1126 [294]		1171	1169	CCH+CNH(tyr) gerilme	1172; 1147		1173 1147		- 1149	1165 -
					C-N gerilme	1107		-		1114	-
C-O-C / C-O-H /CH ₂ CO (CO gerilme)	1081 [286] 1092 [295]	1093 [299]		1079	C-N/C-C gerilme	1081; -		1074; 1066; 1056		- - 1050	1076; 1064 1046
C-O gerilme	1031 [296]		1020		CCH(halka) CCH(lys)	925; 885		926; 890		927 -	921; 880
Sakkarit yapısı	897 [286] 892 [287] 890 [297]	896 [299]	-	895	CCOH	-		720			719
P-O-P antism. gerilme	912 [284,293] 875 [294]		805	871	CCOH	619		617		608	620
					CCCO	552		537		-	541

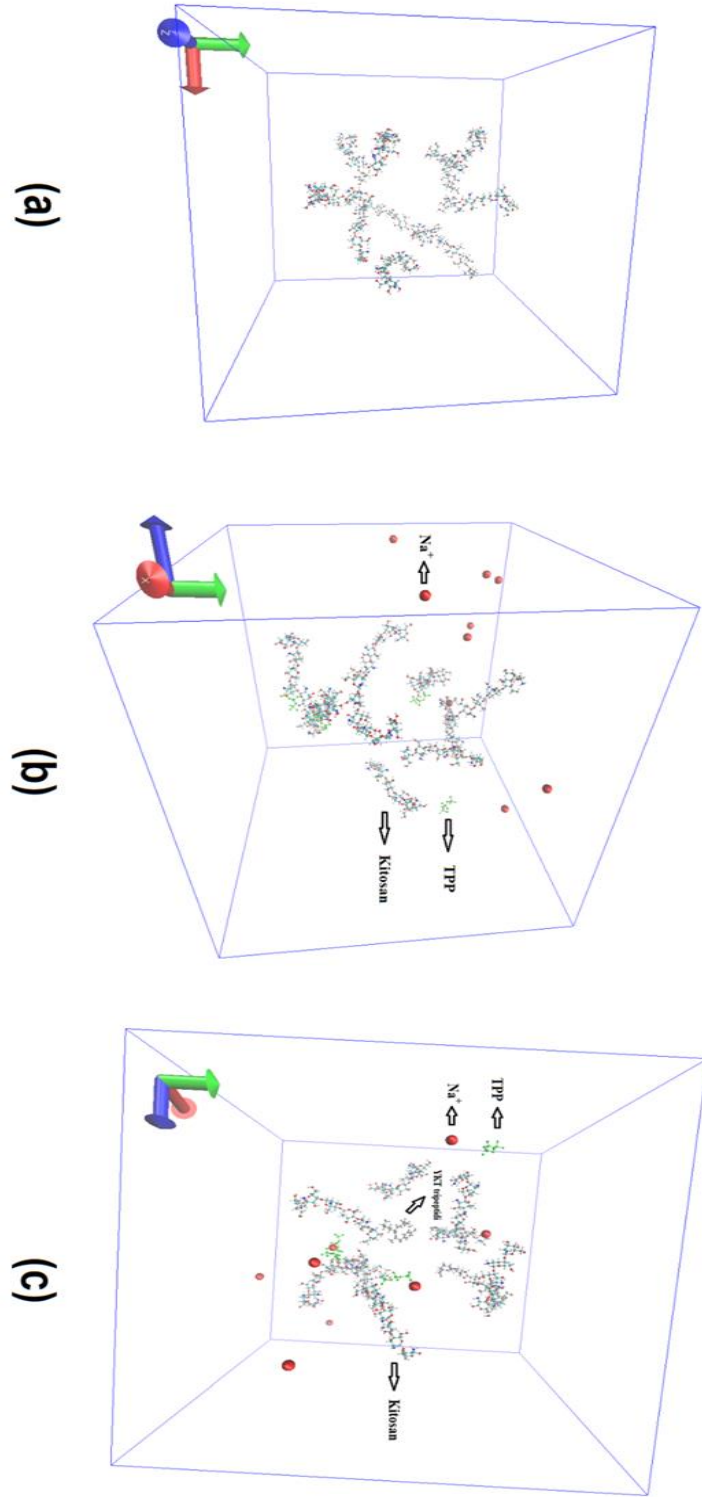
Not: *. Boş kitosan NP FTIR spektrumu, **: YKT yüklü kitosan NP ATR spektrumu, bk: bant komponent

4.2.6. Kitosan-YKT Sistemi MD Çalışması

YKT tripeptidinin, kitosan nanopartikülü sentez sürecinde kullanılan kitosan polimeri ve TPP (tripolifosfat)'nin ilk yapıları Gaussian paket programı [300,301] kullanılarak elde edilmiştir. Moleküler dinamik çalışmalar için, GROMACS 2019.1 programında AMBER-99SB-ILDN kuvvet alanı [302] ve TIP4P su tipi [303] kullanılmıştır.

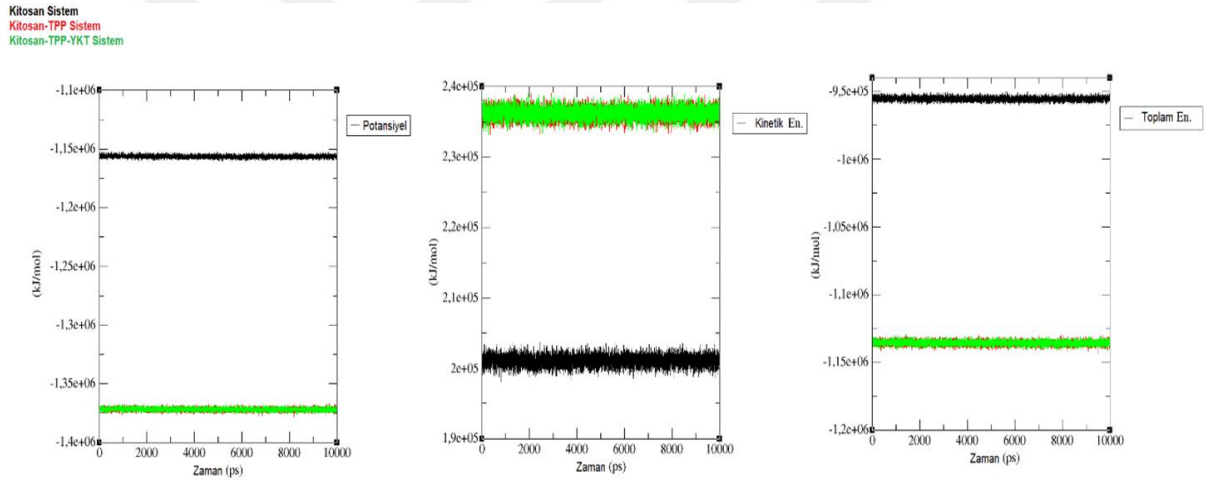
Bu çalışmalarda, minimizasyon için maksimum adım sayısı Steepest Descent metodu kullanılarak 50000 adım olarak belirlenmiştir. Yapının minimize olduğu sistem için, sıcaklık ve basıncın moleküler dinamik çalışmasından önce dengelenmesi gerekir. İlk olarak, sistemi 310 ° K 'lik bir hedef sıcaklığa getirmek için 100 ps 'de NVT simülasyonu yapılmıştır. İkinci olarak, 1 bar 'da doğru yoğunluğu ve basıncı bulmak için 100 ps 'lik NPT simülasyonu yapılmıştır. Basınç, izotropik Parrinello-Rahman barostat [304] kullanılarak dengelenmiştir. Sıcaklık ise bir V-rescale termostadı [305] kullanılarak sabitlenmiştir. Dengeleme işleminden sonra, tüm simülasyonlar için 10 ns (10000 ps) MD simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm moleküler dinamik hesaplarının grafikleri ve şekilleri, XMGRACE [306] ve VMD [307] programları kullanılarak elde edilmiştir.

İlk çalışmada kitosan moleküllerinin deiyonize su içindeki moleküler dinamik çalışması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.22a). İkinci çalışmada, boş nanopartikül içerisinde bulunan kitosan molekülleri ve kitosan çapraz bağlayıcısı TPP 'nin olduğu sistem incelenmiştir (Şekil 4.22b). Üçüncü çalışmada kitosan, TPP ve bu moleküllerin yanına YKT tripeptidi eklenerek oluşturulan sistem incelenmiştir (Şekil 4.22c).



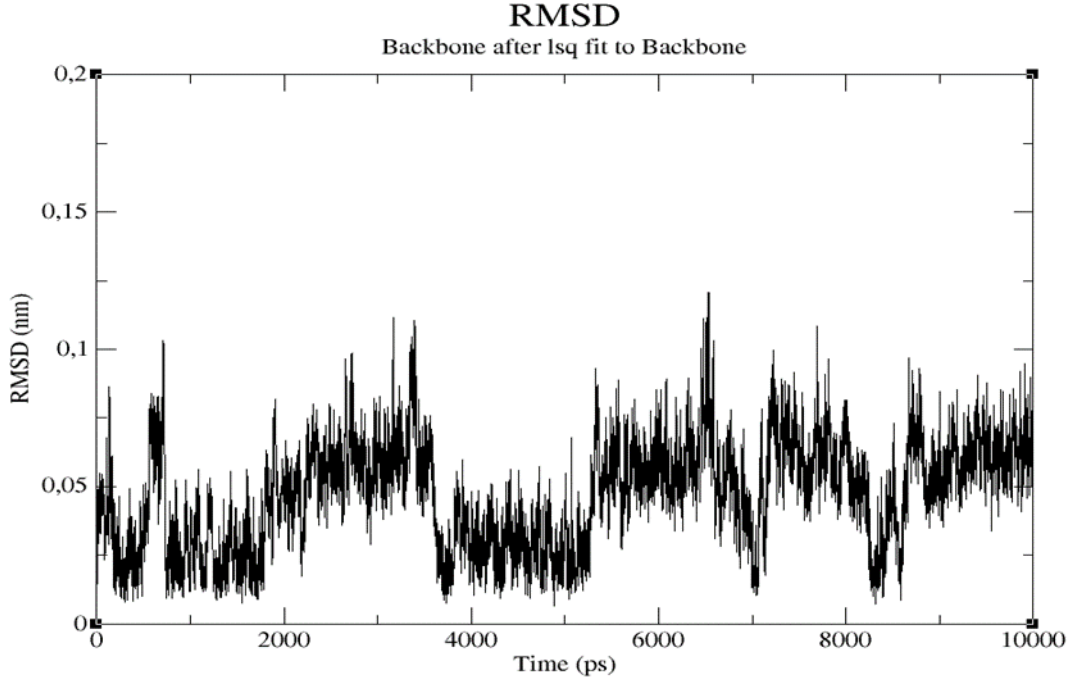
Şekil 4.22: Kutu içerisindeki kitosan molekülleri (a), Kutu içerisindeki boş nanopartikül sentezinde kullanılan moleküller (b), Kutu içerisindeki dolu nanopartikül sentezinde kullanılan moleküller (c).

10 ns boyunca 310⁰ K ve 1 bar basınçta AMBER-99SB-ILDN kuvvet alanı kullanılarak yapılan MD çalışmaları sonucunda, kitosan moleküllerinin deiyonize su içindeki ortalama potansiyel, kinetik ve toplam enerjileri -1.15630×10^6 , 2.01059×10^5 ve -9.55238×10^5 kJ/mol olarak elde edilmiştir. İkinci çalışmada boş nanopartikül yapısı içinde bulunan kitosan ve TPP deiyonize su içerisinde incelenerek MD çalışması gerçekleştirilmiştir. MD çalışmaları sonucunda, bu sistemin deiyonize su içindeki ortalama potansiyel, kinetik ve toplam enerjileri -1.37193×10^6 , 2.36159×10^5 ve -1.13577×10^6 kJ/mol olarak elde edilmiştir. Peptid yüklü nanopartikül çalışmasında kitosan ve TPP ye ek olarak YKT tripeptidi ile oluşturulan sistem incelenmiştir. MD çalışmaları sonucunda, bu sistemin deiyonize su içindeki ortalama potansiyel, kinetik ve toplam enerjileri -1.37183×10^6 , 2.36238×10^5 ve -1.13559×10^6 kJ/mol olarak elde edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Moleküler Dinamik çalışması sonucu elde edilen potansiyel, kinetik ve toplam enerji grafikleri.

YKT tripeptidinin yüklenmesi, sistemin kinetik enerjisinde 0.00079 kJ/mol, potansiyel ve toplam enerjide 0.0001 kJ/mol lük bir artışa sebep olduğu belirlenmiştir. YKT tripeptidinin sistem içerisindeki RMSD değerinin 0.12 nm değerini aşmadığını (Şekil 4.24) yani ilk yapıdan çok fazla sapmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç, MD çalışması sırasında, peptidin stabil yapısını koruduğu anlamına gelmektedir. Böylece, kitosan ve diğer sentez molekülleri peptidin ilk yapısını saptıracak kadar büyük değişimlere sebep olmadığı sonucu çıkmaktadır. Nanopartikülün amacı da zaten var olan ilaç molekülünü hedef bölgeye taşımaktır. Hedef bölgeye taşınacak molekülün stabil yapısını koruması ilaç etkisi açısından büyük önem taşımaktadır.



Şekil 4.24: Sistem içindeki YKT molekülüne ait RMSD değerleri.

4.2.7.YKT yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Kanser Hücre Hatları Üstündeki Etkisi

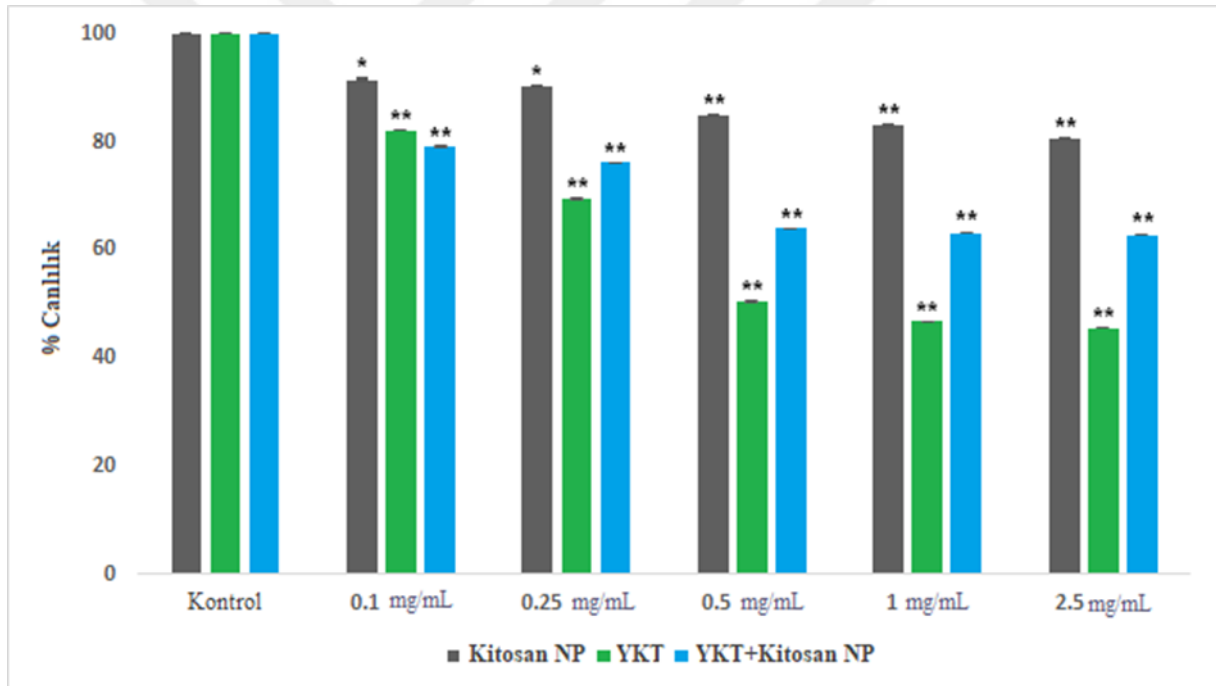
YKT yüklü nanopartiküller 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 mg/mL konsantrasyonlarda hücrelere eklenmiş ve 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra MTT testi uygulanmıştır. MTT çözeltisi 5 mg/mL olacak şekilde PBS (Gibco) içerisinde çözdürülerek, 0.22 µm'lik filtre ile steril edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen absorbans değerleri formülünde yerine koyularak belirlenen % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

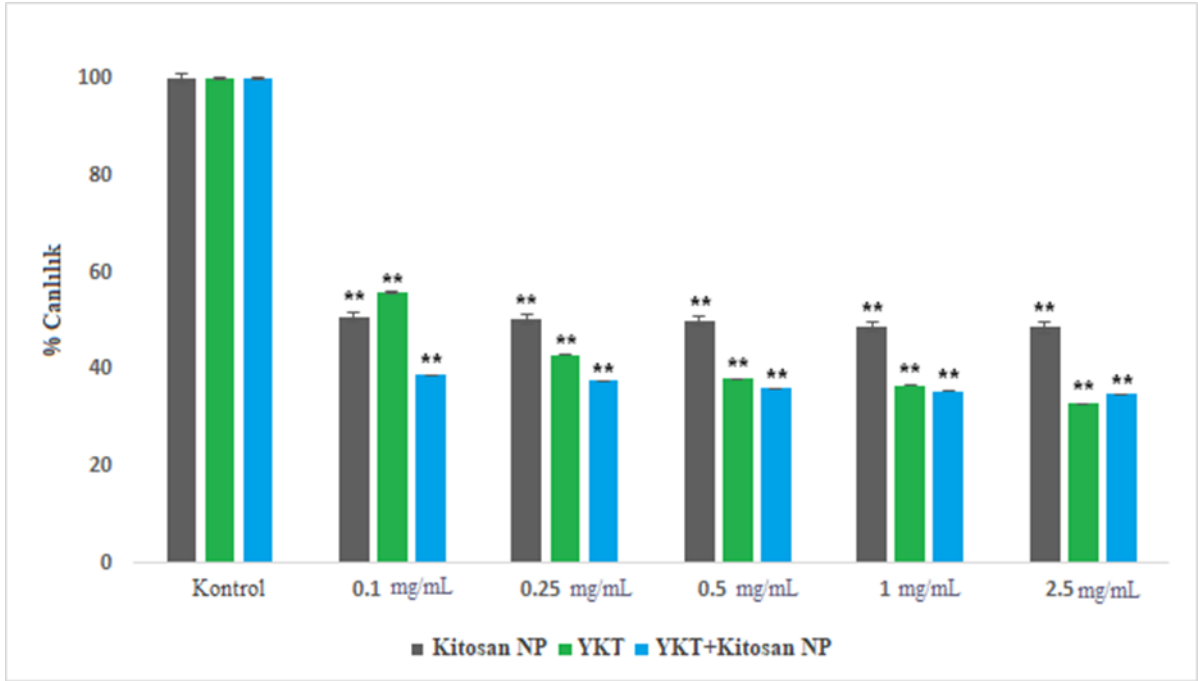
4.2.7.1. YKT ve YKT Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksikite Çalışmaları

MLL hücrelerine YKT, Kitosan nanopartikülleri ve YKT yüklü Kitosan Nanopartikülleri teker teker uygulanmış, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonucunda sıçan prostat kanseri hücrelerinde meydana getirdikleri sitotoksik etki MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol ve deney gruplarının absorbans değerleri ölçülmüş, farklı konsantrasyonlardaki (0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1mg/mL, 2.5 mg/mL) % canlılık grafikleri Şekil 25 ve Şekil 26'da, % canlılık değerleri de Tablo 22 ve Tablo 23'de verilmiştir. İstatistiksel analizler yardımıyla deney grupları kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak anlamlılıkları ile ilgili bilgiler elde edilmiştir.

MTT analizine göre, belirli konsantrasyonlarda (0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL) MAT-LyLu hücre hatları üstünde 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda sitotoksitesi ile ilgili veriler elde edilmiştir. Şekil 25 ve 26 görüldüğü gibi 24 ve 48 saatlik deney grupları kontrol gruplarına (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$) göre YKT tripeptidi sitotoksik etki göstermiştir. YKT, Kitosan ve YKT yüklü Kitosan nanopartikülleri uygulanan MAT-LyLu hücrelerinin 24 saat sonunda absorbans değerlerinin konsantrasyonla ilişkili olarak azaldığı saptanmıştır. 24 saat sonundaki istatistiksel analizler ile MAT-LyLu hücre hatları üstünde uygulanan YKT tripeptidinin tüm konsantrasyonları kontrole göre anlamlı olduğu ($p < 0.01$; $p < 0.05$), belirlenmiştir. 48 saat sonundaki çalışmalarda da MAT-LyLu hücre hatlarının üstüne uygulanan maddelerin tüm konsantrasyonlarının kontrol ile anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$).



Şekil 4.25: 24 saat boyunca MLL hücrelerine uygulanan YKT, Kitosan ve YKT yüklü Kitosan Nanopartikül konsantrasyonlarında yüzde canlılık grafiği ($p < 0.05$: * (kontrole göre anlamlılık); $p < 0.01$: ** (kontrole göre anlamlılık)).



Şekil 4.26: 48 saat boyunca MLL hücrelerine uygulanan YKT, Kitosan ve YKT yüklü Kitosan Nanopartikül konsantrasyonlarında canlılık yüzde grafiği ($p < 0,05$: * (kontrolle göre anlamlılık); $p < 0,01$: ** (kontrolle göre anlamlılık))

Tablo 4.22: Örneklerin MAT-Lyly hücreleri üzerindeki 24 saatlik yüzde canlılık değerleri.

Örnek Konsantrasyonu	Yüzde Canlılık		
	Kitosan	YKT	YKT@Kitosan
Kontrol	100	100	100
0.1 mg/mL	91,43	82,1	79,07
0.25 mg/mL	90,23	69,48	76,18
0.5 mg/mL	84,86	50,48	63,93
1 mg/mL	82,87	46,8	63,08
2.5mg/mL	80,45	45,59	62,72

Tablo 4.23: MAT-Lyly hücreleri üzerindeki 48 saatlik yüzde canlılık değerleri.

Örnek Konsantrasyonu	Yüzde Canlılık		
	Kitosan	YKT	YKT@Kitosan
Kontrol	100	100	100
0.1 mg/mL	50,77	55,91	38,86
0.25 mg/mL	50,31	43,07	37,69
0.5 mg/mL	49,92	38,01	36,06
1 mg/mL	48,68	36,76	35,59
2.5 mg/mL	48,6	32,86	34,89

4.3. YKT YÜKLÜ PCL NANOPARTİKÜLLERİNİN KARAKTERİZASYONU

4.3.1. Ortalama Partikül Boyutu, Polidispersite ve Zeta Potansiyel Analizi

Boş kitosan ve YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyel ve partikül boyutu ölçümleri için 25 °C'da çalışan ve 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) içeren Malvern Zetasizer Nano ZS kullanılmıştır ve sonuçlar Tablo 4.24'te verilmiştir.

Tablo 4.24: Boş ve YKT tripeptidi yüklü PCL nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyeli ve Pdl değerleri.

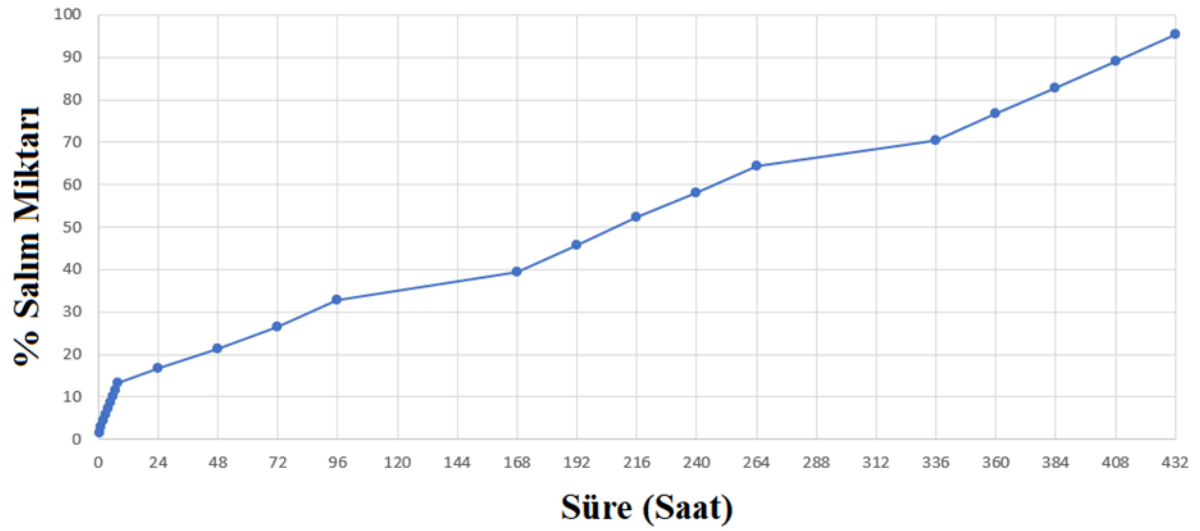
Örnek	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Zeta Potansiyel (mV)	PdI
Boş PCL nanopartikülü	334.1	-3.15	0.086
YKT yüklü PCL nanopartikülü	263.3	-2.72	0.127

4.3.2. Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi Sonuçları

YKT yüklü PCL için, YKT'nin enkapsülasyon verimliliği 4.11 numaralı denklem ile hesaplanmış ve %83 olarak bulunmuştur. Yükleme kapasitesi ise 4.12 numaralı denklem kullanılarak %20.75 olarak hesaplanmıştır.

4.3.3. *In vitro* Salım Testi Sonuçları

YKT yüklü PCL nanopartikülleri diyaliz membran içine alınarak 30 mL PBS tamponu dolu beherlerin içerisine yerleştirilip (pH=7,4), 37 °C'de yatay çalkalayıcıda 150 rpm'de çalkalanmaya bırakılmıştır. Çalışma üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Belirlenen zaman aralıkları ile (30.dk, 1.sa., 2.sa., 3.sa., 4.sa., 5.sa., 6.sa., 7.sa., 8.sa., 24.sa., 48.sa...432.sa.) örnekler alınarak UV-Vis spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülerek YKT standart eğrisinin denklemi kullanılarak salınan YKT konsantrasyonları hesaplanmıştır.

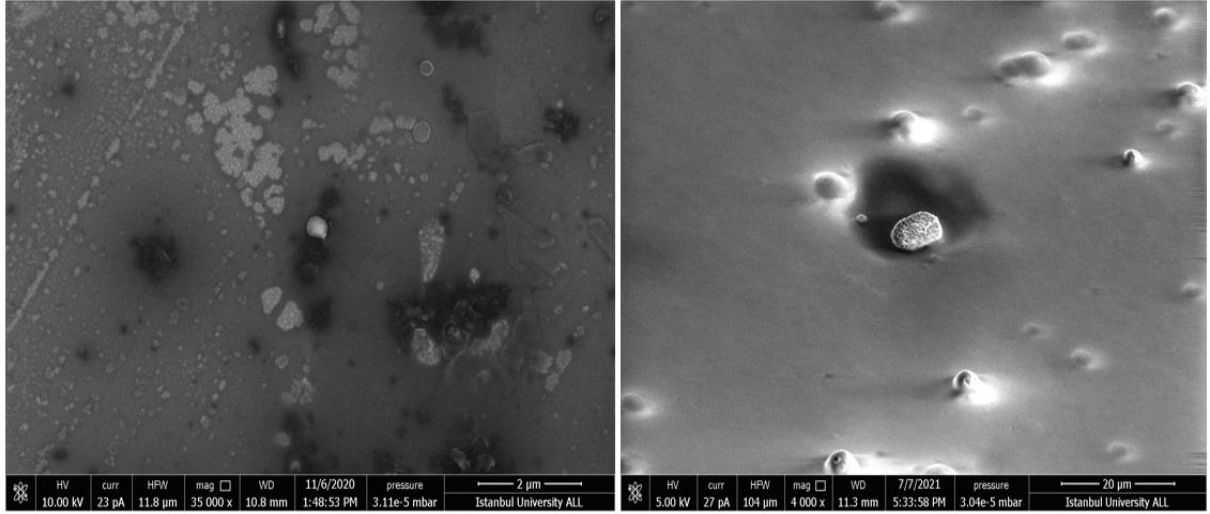


Şekil 4.27: YKT tripeptidi yüklü PCL nanopartiküllerinin salım grafiği.

Şekil 4.27’de YKT yüklü PCL nanopartiküllerinin, 432. Saatin sonunda %95,26 oranında YKT saldıgı görülmüştür.

4.3.4. SEM Analizi

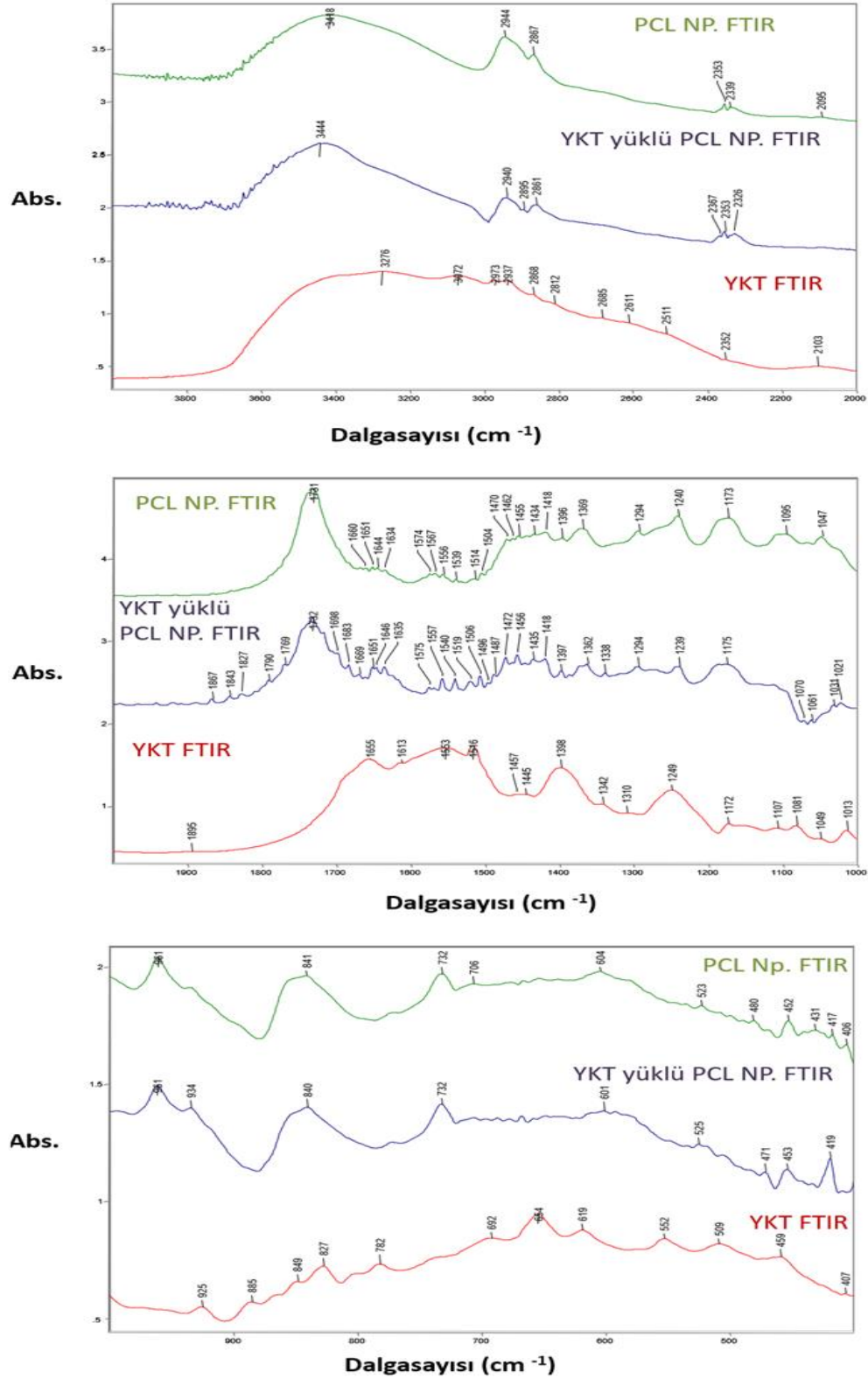
YKT yüklü PCL nanopartiküllerinin morfolojik çalışmaları SEM (FEI Versa 3D) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SEM aracılığıyla elde edilen görüntüler incelenmiş ve YKT yüklü nanopartiküllerin yoğun bir yapıya sahip küresel parçacıklar olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.28’de YKT yüklü PCL nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri verilmiştir.



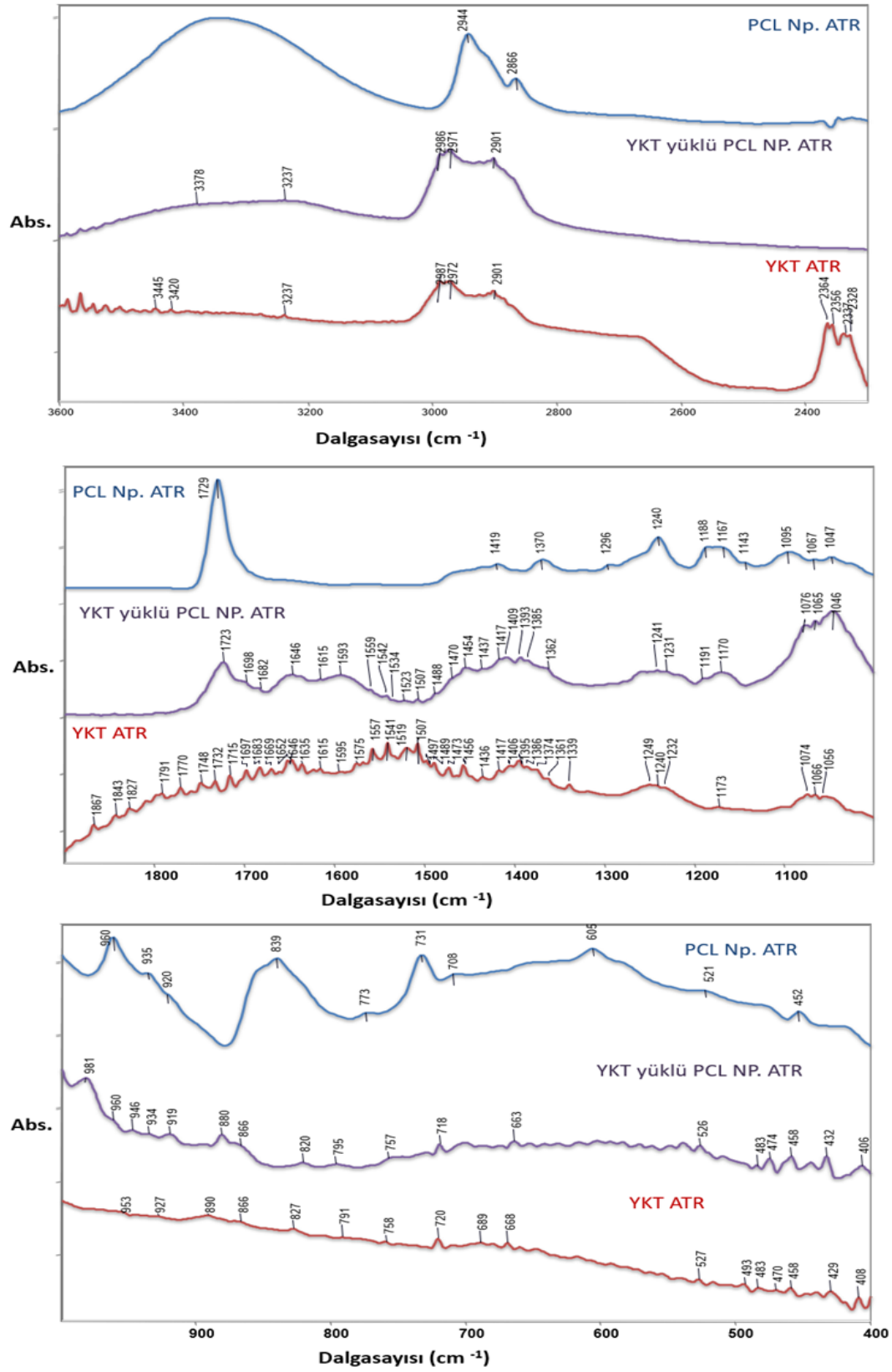
Şekil 4.28: 5mg YKT yüklü PCL nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.

4.3.5.PCL nanopartiküllerine ait spektrumlar

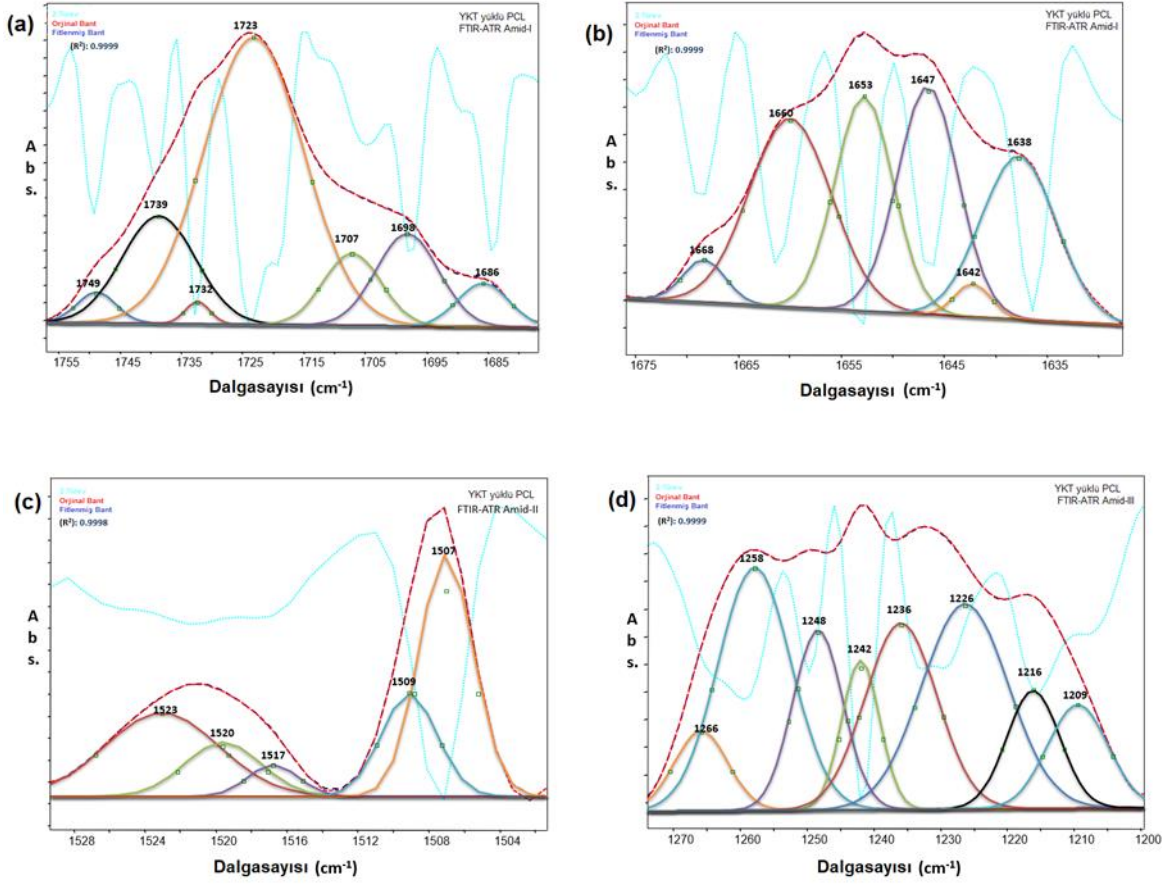
Çalışmanın spektroskopik kısmında sentezlenen PCL nanopartikülleri, YKT tripeptidi ve YKT yüklü PCL nanopartiküllerine ait spektrumlar karşılaştırmalı olarak, FTIR ve FTIR-ATR yöntemleri ile incelenmiştir (bknz. Şekil 4.29 ve 4.30). Bunların yanı sıra, YKT tripeptidinin peptid grubuna ait olan amid I, amid II ve amid III karakteristik pikleri YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinin FTIR-ATR spektrumundan, bant komponent analizi yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.31). YKT yüklü nanopartikülün ATR spektrumu; $1755\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ ve $1675\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı bölgeslerinde bant komponent analiz yöntemiyle derinlemesine incelenmiştir. Bu aralıklardaki YKT tripeptidine ait olan amid I pikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.31a,b). YKT amid grubuna ait olan amid II karakteristiği de $1530\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ bölge aralığında YKT yüklü kitosan nanopartikülüne ait olan ATR spektrumunun bant komponent analizi ile incelenmesiyle belirlenmiştir (Şekil 4.31c). Amid III karakteristiği ise, $1275\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ bölge aralığında tespit edilmiştir (Şekil 4.31d). Ayrıca tüm spektroskopik sonuçlar tablolastırılarak, PCL polimeri ile kaplanmış YKT tripeptidinin, PCL ile etkileşimi sonucunda piklerinde meydana gelen kayma miktarları tespit edilmiştir. (Tablo 4.25)



Şekil 4.29: PCL nanopartikülleri, YKT yüklü PCL nanopartikülleri ve YKT tripeptidine ait FTIR spektrumları.



Şekil 4.30: PCL nanopartikülleri, YKT yüklü PCL nanopartikülleri ve YKT tripeptidine ait ATR spektrumları.



Şekil 4.31: YKT yüklü PCL nanopartiküllerine ait ATR spektrumu kullanılarak bant komponent analizi yöntemi ile elde edilen amid pikleri.

Tablo 4.25: YKT yüklü PCL NP'lerin gözlenen FT-IR ve ATR pikleri ve atamaları.

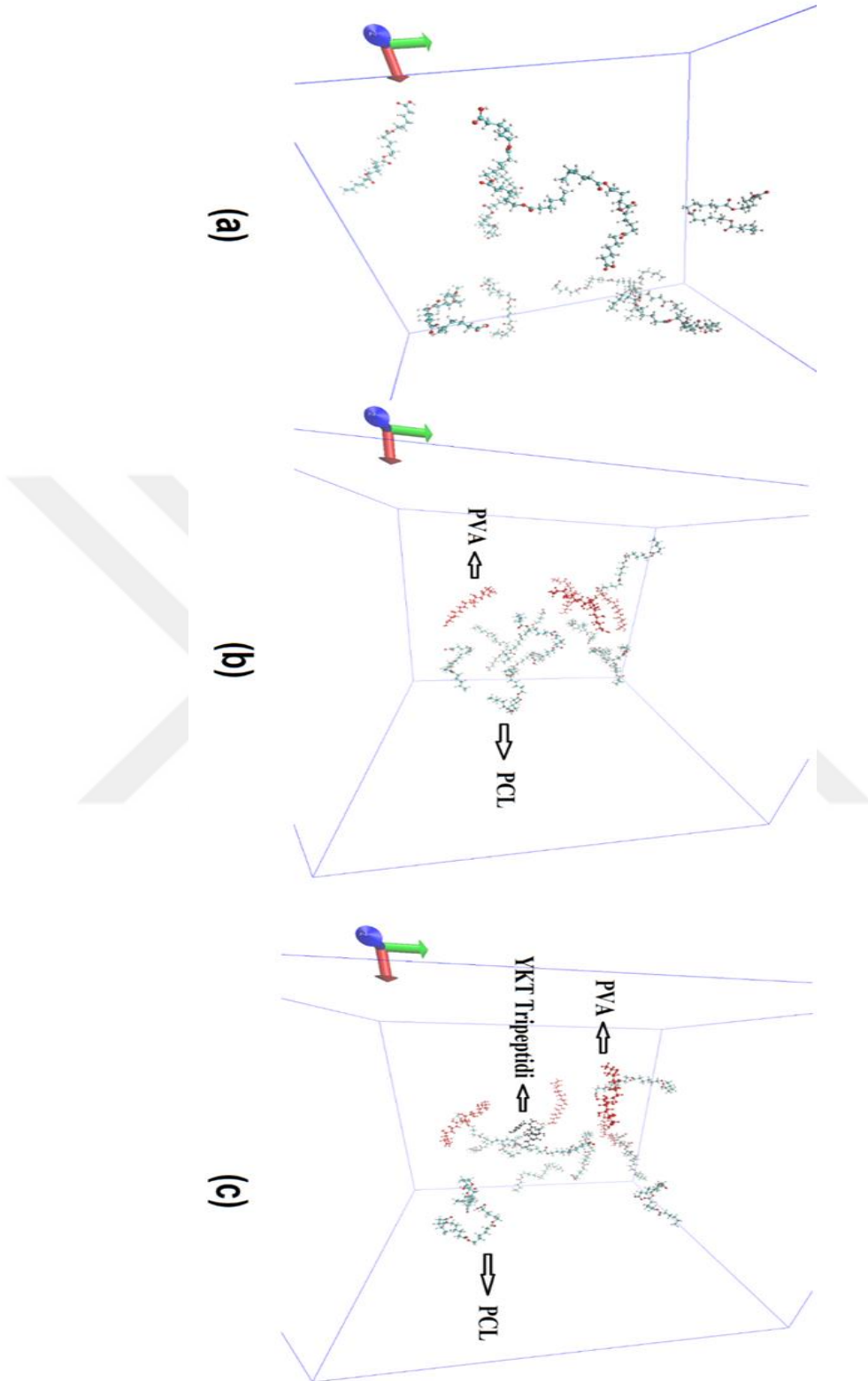
	PCL			Bu çalışma			Atama	YKT		YKT yüklü PCL np.	
	IR	R	IR	ATR				IR	ATR	IR	ATR
Atama											
CH ger.asim.	2949 [308]		2944	2944			vCH(thr)	2937	2937	2940	2943
CH ger.sim.	2865 [308]		2867	2866							
-C=O	1727 [308]- 1725 [309]		1731	1729			vCO(amid-I)	- 1655	1697 1652	1698 1651	1698(bk) 1653(bk);
δ CH ₂		1470-1415 [310]	1470; 1418;	1471; 1419;			δ HNH(lys)makas	-	1635	1635	-
ω CH ₂		1303-1281 [310]	1294	1296			vCC (tyr-halka)	1613	1615	1616	1615
Asimetrik COC gerilmesi	1240 [308]		1240	1240			δ CNH(peptid)amid-II	1516	1519 1507	1519 1506	1523(bk) 1507(bk)
OC-O gerilmesi	1190 [308]		-	1188			δ HCH(lys)makas	-	1489	1487	1488
Simetrik COC gerilmesi	1170 [308]		1173	1167			δ HCH(tyr)makas	1445	1448	1448	-
İskelet gerilmeleri		1107-1033	1095; 1047	1095; 1047			δ NCH(tyr)	1398	1395	1397	1393
C-COO gerilmesi		912	934	935			δ CCH(lys)wag+twist.	-	1363	1362	1362
							vCN(peptide)	-	-		1226 (bk)
PCL karakteristik pikleri	1723,1468- 1244,1192,1108,1047,963,733 [311]		1731,1470 ,1240, 1173, 1095, 1047,961, 732	1729, 1240, 1188, 1095 1047,960 731			δ CCH(tyr)+ δ CNH(tyr)	1172	1173	1175	1170

4.3.6.PCL-YKT Sistemi MD Çalışması

YKT (Tyr-Lys-Thr) tripeptidinin, PCL nanopartikül yapımında kullanılan PCL (poli-ε-kaprolakton) polimeri ve PVA (polivinilalkol)'nın ilk yapıları Gaussian paket programı [64,65] kullanılarak elde edilmiştir. Moleküler dinamik çalışmalar için, GROMACS 2019.1 programında AMBER-99SB-ILDN kuvvet alanı ve TIP4P su tipi kullanılmıştır.

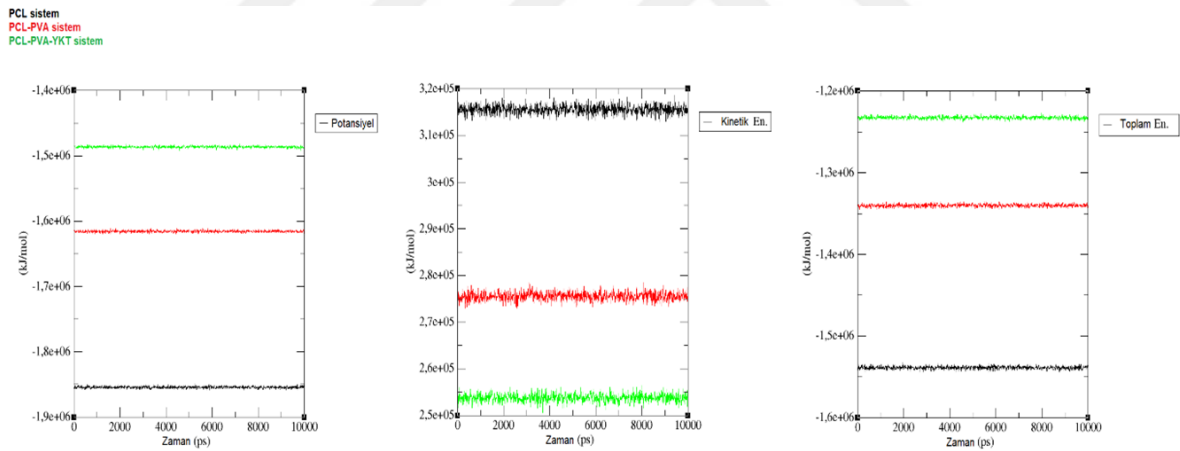
Bu çalışmalarda, minimizasyon için maksimum adım sayısı Steepest Descent metodu kullanılarak 50000 adım olarak belirlenmiştir. Yapının minimize olduğu sistem için, sıcaklık ve basıncın moleküler dinamik çalışmasından önce dengelenmesi gerekir. İlk olarak, sistemi 310 K 'lık bir hedef sıcaklığa getirmek için 100 ps 'de NVT simülasyonu yapılmıştır. İkinci olarak, 1 bar 'da doğru yoğunluğu ve basıncı bulmak için 100 ps 'lik NPT simülasyonu yapılmıştır. Basınç, izotropik Parrinello-Rahman barostat kullanılarak dengelenmiştir. Sıcaklık ise bir V-rescale termostadı kullanılarak sabitlenmiştir. Dengeleme işleminden sonra, tüm simülasyonlar için 10 ns (10000 ps) MD simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm moleküler dinamik hesaplarının grafikleri ve şekilleri, XMGRACE ve VMD programları kullanılarak elde edilmiştir.

Bu çalışmada, ilk olarak PCL polimerlerinin deiyonize su içindeki moleküler dinamik çalışması gerçekleştirildi (Şekil 4.32a). İkinci sistemde boş nanopartikül sentezinde kullanılan PCL polimerleri ile PVA moleküllerinin sulu ortamda nasıl davrandığı ve enerji değişimleri incelenmiştir (Şekil 4.32b). Üçüncü sistemde ise dolu nanopartikül sentezinde kullanılan tüm moleküller; PCL polimeri ve stabilizasyon ajanı olarak kullanılan PVA molekülüne ek olarak YKT tripeptidi de kutu içerisine yerleştirilerek tüm sistemdeki moleküllerin deiyonize su içerisindeki davranışları ve enerji değişimleri incelenmiştir (Şekil 4.32c).



Şekil 4.32: Kutu içerisindeki PCL molekülleri (a), Kutu içerisindeki boş nanopartikül sentezinde kullanılan moleküller (b), Kutu içerisindeki dolu nanopartikül sentezinde kullanılan moleküller (c).

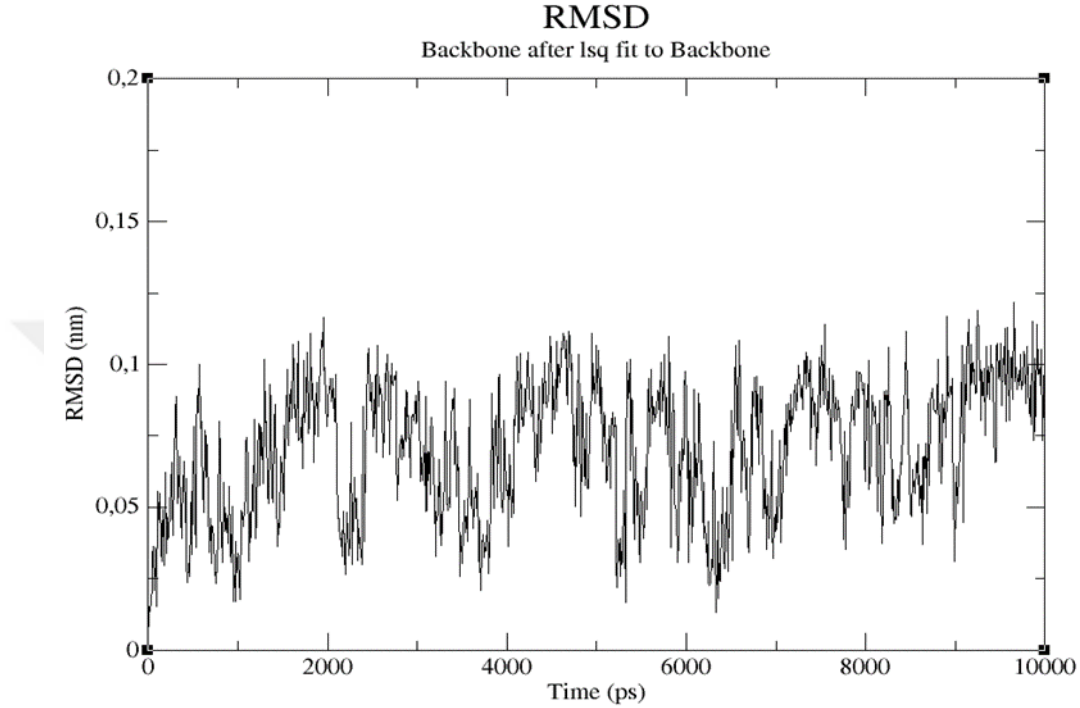
10 ns boyunca 310 K ve 1 bar basınçta AMBER-99SB-ILDN kuvvet alanı kullanılarak yapılan MD çalışmaları sonucunda, PCL moleküllerinin deiyonize su içindeki ortalama potansiyel, kinetik ve toplam enerjileri -1.85434×10^6 , 3.155556×10^5 ve -1.53879×10^6 kJ/mol olarak elde edilmiştir (Şekil 4.33). Boş nanopartikül sentezinde DCM sistemden uzaklaştırıldıktan sonra (DCM uçucu bir maddedir), sistemde yalnızca PCL, PVA ve su kalmaktadır. Bu çalışmada da PCL ve PVA moleküllerinin sulu ortamda birlikte nasıl davrandıkları ve enerji değişimleri elde edilmiştir. PCL ve su ile dolu ortama PVA moleküllerinin koyulması ile PCL nin yalnız olduğu ortamla karşılaştırıldığında bu sistemin enerjisinin yükseldiği gözlenmiştir. Ortalama potansiyel, kinetik ve toplam enerjileri sırasıyla, -1.61559×10^6 , 2.75575×10^5 , -1.34001×10^6 kJ/mol olarak elde edilmiştir (Şekil 4.33). En son sistemde ise PCL polimeri, stabilizasyon ajanı olan PVA molekülüne ek olarak YKT tripeptidi de sisteme eklenmiştir. Sistemin enerjisinde çok küçük bir değişim gözlenmiştir. Ortalama potansiyel, kinetik ve toplam enerjileri sırasıyla, -1.48628×10^6 , 2.53745×10^5 , -1.23254×10^6 kJ/mol olarak elde edilmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: Moleküler Dinamik çalışması sonucu elde edilen potansiyel, kinetik ve toplam enerji grafikleri.

YKT tripeptidinin yüklenmesi, sistemin ortalama kinetik enerjisinde 0.2183 kJ/mol lük bir değişim meydana getirmiş, ortalama potansiyel ve toplam enerjide sırasıyla 0.12931 kJ/mol ve 0.10747 kJ/mol lük bir artışa sebep olduğu belirlenmiştir. YKT tripeptidinin sistem içerisindeki RMSD değerinin 0.12 nm değerini aşmadığını yani ilk yapıdan çok fazla sapmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.34). Bu sonuç, MD çalışması sırasında, peptidin stabil yapısını koruduğu anlamına gelmektedir. Böylece, PCL, PVA ve sulu ortamın peptidin ilk yapısını saptıracak

kadar büyük değişimlere sebep olmadığı sonucu çıkmaktadır. Nanopartikülün amacı da zaten var olan ilaç molekülünü hedef bölgeye taşımaktır. Hedef bölgeye taşınacak molekülün stabil yapısını koruması ilaç etkisi açısından büyük önem taşımaktadır.



Şekil 4.34: Sistem içindeki YKT molekülüne ait RMSD değerleri.

4.3.7.YKT Yüklü PCL Nanopartiküllerinin Kanser Hücre Hatları Üstündeki Etkisi

YKT yüklü nanopartiküller de 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 mg/mL konsantrasyonlarda hücrelere eklenmiş, 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra MTT testi ile değerlendirilmiştir. MTT çözeltisi 5 mg/mL olacak şekilde PBS (Gibco) içerisinde çözündürülerek, 0.22 µm'lik filtre ile steril edilmiştir.

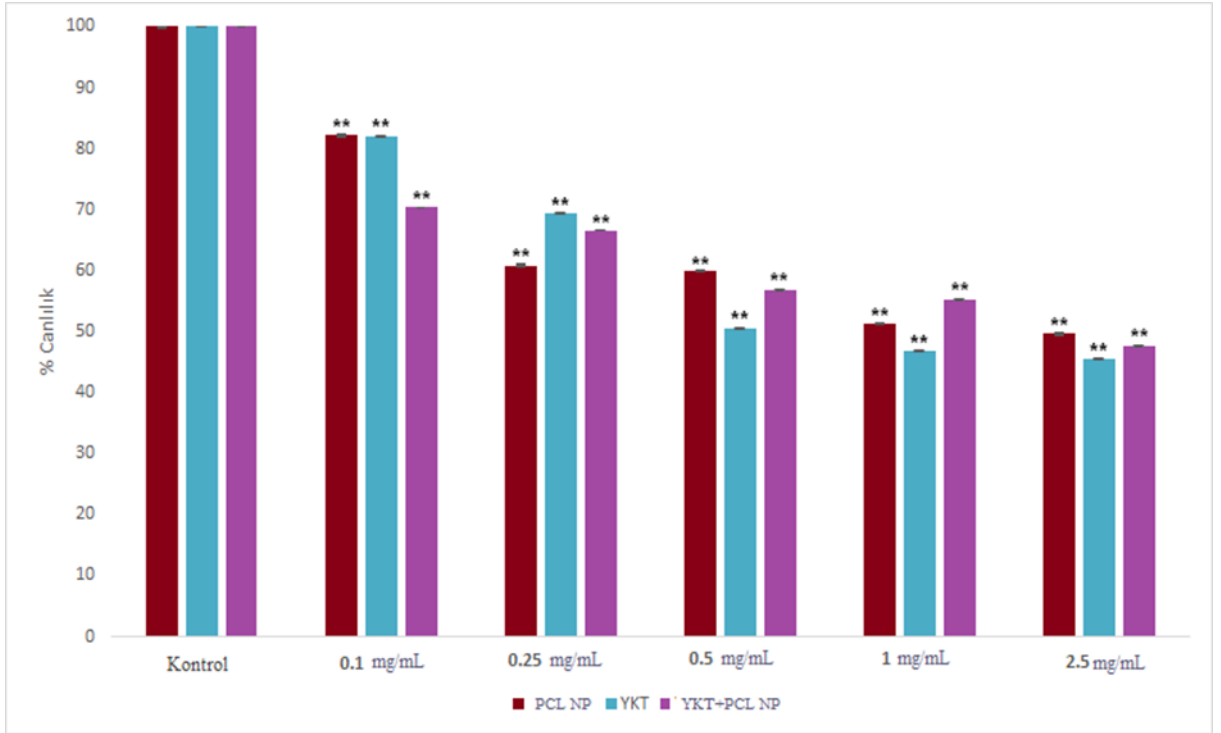
Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen absorbans değerleri % canlılık formülünde yerine koyularak belirlenen yüzde canlılık değerleri elde edilmiştir.

4.3.7.1. YKT ve YKT Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksikite Çalışmaları

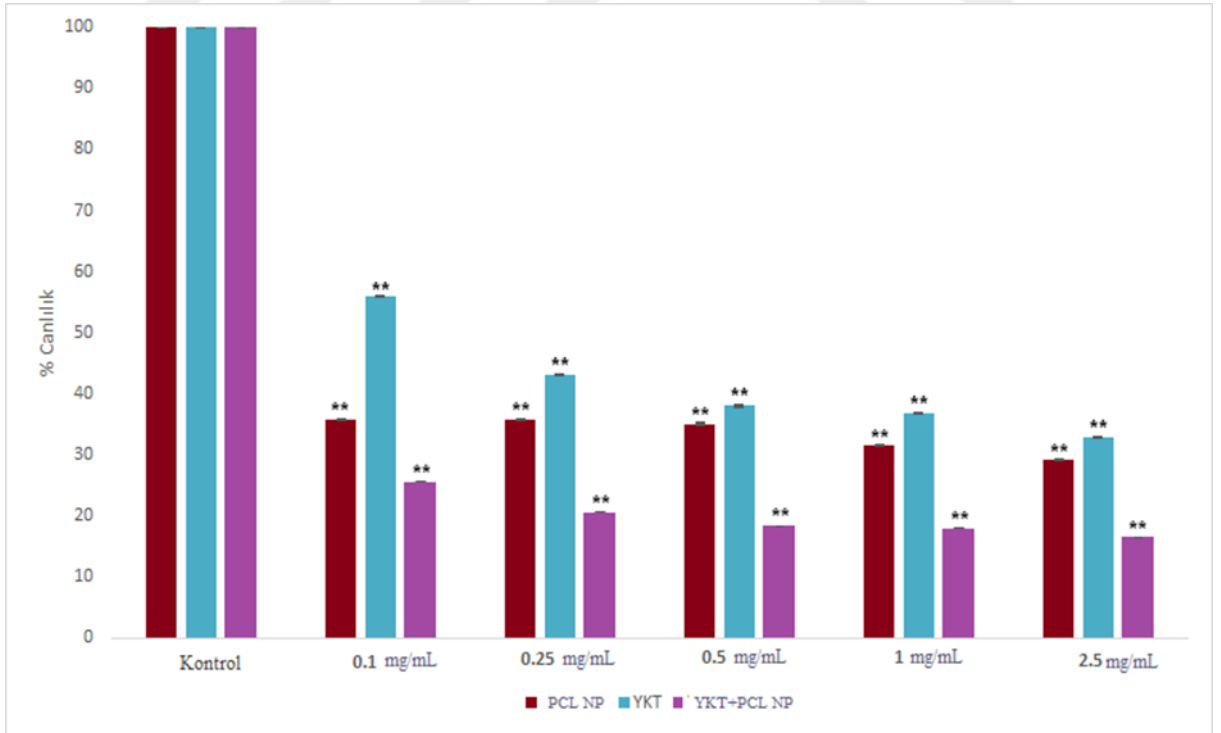
MLL hücrelerine YKT, PCL nanopartikülleri ve YKT yüklü PCL nanopartikülleri teker teker uygulanmış, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonucunda sıçan prostat kanseri hücrelerinde meydana getirdikleri sitotoksik etkiler, MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol ve

deney gruplarının absorbans değerleri ölçölmüş, farklı konsantrasyonlardaki (0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1mg/mL, 2.5 mg/mL) % canlılık grafikleri Şekil 4.35 ve Şekil 4.36’da, % canlılık değerleri de Tablo 4.26 ve Tablo 4.27’de verilmiştir. İstatistiksel analizler yardımıyla deney grupları kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak anlamlılıkları ile ilgili bilgiler elde edilmiştir.

MTT analizine göre, belirli konsantrasyonlarda (0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL) MAT-LyLu hücre hatları üstünde 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda sitotoksik aktivitesi ile ilgili veriler elde edilmiştir. Şekil 4.35 ve 4.36’da göröldüğü gibi 24 ve 48 saatlik deney grupları kontrol gruplarına (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$) göre sitotoksik etki göstermiştir. MTT analizine göre ortalama IC50 değerleri, 24 saatte MAT-LyLu hücre hattı için PCL ve YKT yüklü PCL nanopartikülleri için 1 mg/mL olarak belirlenmiştir. YKT, PCL ve YKT yüklü PCL nanopartikülleri uygulanan MAT-LyLu hücrelerinin 24 saat sonunda absorbans değerlerinin konsantrasyonla ile ilişkili olarak azaldığı saptanmıştır. 24 saat sonundaki istatistiksel analizler ile MAT-LyLu hücre hatları üstünde uygulanan tüm maddelerin tüm konsantrasyonları kontrole göre anlamlı olduğı ($p < 0,01$; $p < 0,05$), belirlenmiştir. 48 saat sonundaki çalışmalarda da MAT-LyLu hücre hatlarının üstüne uygulanan maddelerin tüm konsantrasyonlarının kontrol ile anlamlı olduğı saptanmıştır ($p < 0,01$). Sentezlenen nanopartiküller arasında YKT yüklü PCL nanopartiküllerinin YKT yüklü kitosan nanopartiküllerine göre sitotoksik etkisinin daha fazla olduğı sıçan prostat kanser hücre hatlarında yapılan *in vitro* çalışmalarında belirlenmiştir. Özellikle 48 saat sonunda elde edilen % canlılık sonuçlarında en iyi etkiyi YKT yüklü PCL nanopartiküllerinin verdiğı Tablo 4.27’de gösterilmiştir.



Şekil 4.35: 24 saat boyunca MLL hücrelerine uygulanan YKT, PCL, YKT yüklü PCL Nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarda yüzde canlılık grafiği ($p < 0,05$: * (kontrolle göre anlamlılık); $p < 0,01$: ** (kontrolle göre anlamlılık)).



Şekil 4.36: 48 saat boyunca MLL hücrelerine uygulanan YKT, PCL, YKT yüklü PCL Nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarda yüzde canlılık grafiği ($p < 0,05$: * (kontrolle göre anlamlılık); $p < 0,01$: ** (kontrolle göre anlamlılık)).

Tablo 4.26: MAT-Lylü hücrelerine ait 24 saatlik yüzde canlılık değerleri.

Örnek Konsantrasyonu	Yüzde Canlılık		
	PCL	YKT	YKT@PCL
Kontrol	100	100	100
0.1 mg/mL	82,14	82,1	70,32
0.25 mg/mL	60,79	69,48	66,58
0.5 mg/mL	59,95	50,48	56,87
1 mg/mL	51,38	46,8	55,24
2.5mg/mL	49,63	45,59	47,71

Tablo 4.27: MAT-Lylü hücrelerine ait 48 saatlik yüzde canlılık değerleri.

Örnek Konsantrasyonu	Yüzde Canlılık		
	PCL	YKT	YKT@PCL
Kontrol	100	100	100
0.1 mg/mL	35,83	55,91	25,62
0.25 mg/mL	35,74	43,07	20,63
0.5 mg/mL	35,12	38,01	18,38
1 mg/mL	31,54	36,76	18,06
2.5 mg/mL	29,28	32,86	16,51

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması; diziliminde antikanser, antiviral, antibakteriyel ve analjezik etkiye sahip amino asitler bulunduran YKT tripeptidinin kullanıldığı teorik ve deneysel çalışmalarını içermektedir. Tez kapsamında YKT tripeptidinin moleküler yapısını ve etkinliğini ortaya çıkarmak için moleküler yapı ve aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının ilk aşamasına moleküler yapının oluşturulması ile başlanmış, sonrasında moleküle ait konformasyonlar, optimize edilmiş yapı ve titreşim kipleri belirlenmiştir. YKT'nin elektrostatik özelliklerinin belirlenmesi için HOMO-LUMO, MEP, Hiperpolarizabilite ve NBO analizleri de tez çalışması içerisinde gerçekleştirilmiştir. Moleküler kenetlenme (docking) analizi kullanılarak YKT tripeptidinin epidermal büyüme faktör reseptörü, androjen reseptörü, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve DNA ile etkileşim mekanizmaları ve ADME çalışmaları ile molekülün farmakokinetik özellikleri belirlenerek molekülün aktivitesine ve ilaç adayı olarak kullanılabilme potansiyeline dair bilgiler değerlendirilmiştir. Tez çalışmasının ikinci aşaması yani deneysel kısmında ise, YKT tripeptidi ile iki farklı yüzey yüküne sahip polimer kullanılarak nanopartikül sentezleri yapılmış ve karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. *In vitro* salım çalışmaları ile enkapsüle edilmiş peptid molekülünün salım profilleri belirlenmiş, daha sonrasında farklı hücre hatları üstündeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Spektroskopik çalışmalar ile hem peptid molekülüne ait hem de sentezlenen peptid yüklü iki farklı polimerik nanopartiküle ait çalışmalar karşılaştırmalı gerçekleştirilmiş ve üretilen YKT peptidi yüklü nanopartiküllerin kontrollü salım özelliğine sahip nano boyutlu ilaç formülasyonu olarak kullanılabilme potansiyeli değerlendirilmiştir.

Tezin teorik çalışmasına Fortran programı ile Teorik konformasyon analizi yapılarak başlanmıştır. Bu analiz ile tripeptide ait kararlı konformasyonlar belirlenmeye çalışılmıştır. Teorik konformasyon analizinde, giriş dosyasına peptidi oluşturan atomlar, bağ uzunlukları, dönü açıları, açı değerleri ve yük bilgisi girilerek ve peptidi oluşturan amino asitlerin Ramachandran tarafından oluşturulan konformasyon bölgeleri yardımıyla konformasyon bölgelerine ait dihedral dönü açı değerleri girilerek mümkün olan konformasyonlar ve bu konformasyonlara ait enerji değerleri elde edilmiştir. YKT tripeptidine ait 105462 tane konformasyon incelenmiş ve en düşük enerjiye sahip konformasyonun BBB ($B_1B_3B_1$) bölgesinde ve 6.37 kcal/mol enerji değerine sahip olduğu görülmüştür. Bu enerji değerine en büyük katkıyı -11.34 kcal/mol değeri ile Van der Waals enerjisi sağlarken, toplam enerjiye

katkıda bulunan elektrostatik ve torsiyon enerji değerleri sırasıyla 15.63 kcal/mol ve 2.08 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Teorik Konformasyon Analizi ile elde edilen 6.37 kcal/mol enerjiye sahip en kararlı konformasyon Gaussian09 programına tanıtılmış, optimizasyon ve temel titreşim dalgasayılarının belirlenme çalışması DFT-B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nötral YKT tripeptidi 59 atomlu olup $3N-6 = 171$ tane temel titreşim dalga sayısına sahiptir. Tripeptidin 171 tane temel titreşim dalga sayısı hesaplanmış ve titreşimsel kiplerinin analizi için Gar2PED programı ile elde edilen potansiyel enerji dağılımından (%PED) faydalanılmıştır.

Elektrostatik ve kimyasal kararlılık gibi özelliklerin belirlenmesi için HOMO-LUMO, MEP, Hiperpolarizabilite ve NBO analizleri gerçekleştirilmiştir. HOMO-LUMO analizi ile moleküle ait elektriksel özellikler, kimyasal kararlılık ve molekül içinde yer alan yük transferi ile ilgili, elektrostatik potansiyel haritaları (MEP) ile elektrofilik ve nükleofilik bölgelerle ilgili, hiperpolarizabilite hesaplaması ile moleküle ait dipol moment, polarizabilite ve hiperpolarizabilite ile ilgili ve NBO analizi ile de bağ tipi ve bağlar arası etkileşim, yük transferi gibi, moleküler yapıyı tanımlayan önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Deneysel olarak elde edilen absorpsiyon dalga boyu λ (nm), uyarma enerjileri E (eV) ve farklı ortamlarda çözünen YKT tripeptidin absorbans değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir. Literatürde belirtildiği gibi, peptidin deneysel UV spektrumunda 200-230 nm aralığında ve tirozin amino asit nedeniyle 240-300 nm aralığında iki pik gözlenmiştir. Literatürde 275 nm'de gözlenen tirozin piki bu çalışmada su ortamında 274.5 nm'de gözlenmiş ve literatürle tam uyumlu olduğu belirlenmiştir [115,312]. Teorik olarak elde edilen absorpsiyon dalga boyu λ (nm), uyarma enerjileri E (eV) ve osilatör güçleri (f), YKT tripeptidinin ana katkı değerleri ile birlikte Tablo 4.12'de verilmiştir. Teorik ve deneysel UV spektrumları da Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'te verilmiştir. Tablo 4.11 ve Tablo 4.12'de verilen deneysel ve teorik UV çalışmaları karşılaştırıldığında su, etanol ve metanol için teorik ve deneysel UV dalgaboyu farkları belirlenmiştir. Su için deneysel (274,5 nm) ve teorik (253,8630 nm) sonuçlar arasındaki fark ~20 nm, etanol için deneysel (279 nm) ve teorik (253,9983 nm) sonuçlar arasındaki fark ~25 nm, metanol için deneysel (277,5 nm) ve teorik (253,9098 nm) sonuçlar arasındaki fark ~23 nm dir. Deneysel ve teorik enerji farkları da su, etanol ve metanol için sırasıyla 0.37, 0.44, 0.42 olarak belirlenmiştir. Eşme ve Sağdıncı tarafından yapılan etanol ortamındaki deneysel ve teorik

çalışmalar arasındaki farkında ~ 21 nm [313], Rajai ve Mirsattari tarafından yapılan çalışmalarda ise farkın yaklaşık 20 ila 28 nm arasında değiştiği görülmüştür [314]. Bu dalgaboyu farklarına göre hesaplamalarla elde ettiğimiz değerlerin de, literatürle uyumlu olduğu değerlendirilmiştir. Tablo 4.12'deki GaussSUM programı [315] kullanılarak elde edilen dalgaboyu, enerji, osilatör gücü ve ana katkı değerleri verilerine dayanarak, en büyük katkıların; metanol, etanol ve su ortamları için %85 ile HOMO-LUMO geçişlere, vakum ortamında ise %59 katkı ile HOMO-1'den LUMO geçişlerine karşılık geldiği belirlenmiştir. Şekil 4.4'de ve Tablo 4.9'da verilen HOMO, LUMO bölgeleri ve ΔE enerji aralıklarına bakıldığında, en yüksek enerji aralığına 5.62324 eV değeri ile su ortamının sahip olduğunu görmek mümkündür. Özellikle sıvı ortamlarda ΔE enerji aralıkları vakum ortamına göre daha büyüktür. Enerji aralığı değerinin büyük olması molekülün kararlı durumdan uyarılmış duruma geçirilebilmesi için yüksek enerjilere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Vakum ortamında HOMO LUMO analizine göre, HOMO lizin amino asidi üzerinde yoğunlaşırken, LUMO, YKT tripeptidindeki tirozin ve treonin amino asitleri üzerinde yoğunlaşmıştır ve ΔE değeri 5.54051 eV olarak hesaplanmıştır. HOMO-LUMO geçişi, moleküldeki yük transferinin YKT'deki lizin amino asitinden tirozin ve treonin amino asitlerine doğru gerçekleştiğini göstermektedir. Su, metanol ve etanol ortamlarında ise HOMO LUMO geçişlerinin özellikle tirozin amino asidi üzerinde gerçekleştiği Şekil 4.4'de görülmektedir ve ΔE değerleri 5.62324 eV (su), 5.62133 eV (metanol), 5.62079 eV (etanol) olarak belirlenmiştir ve vakuma göre daha yüksektir. Ayrıca YKT tripeptidinin sahip olabileceği iyonizasyon potansiyeli, elektron afinitesi, elektronegatiflik, kimyasal sertlik değerleri gibi hesaplanan değerleri de Tablo 4.10'da verilmiştir.

Gerçekleştirilen MEP analizi sonucunda, elektronlarca zengin bölgelerin özellikle tirozine ait amino grubu (-0.0445616 a.u.(vakum ortamında), -0.0488883 a.u.(su ortamında), -0.0486767 a.u.(etanol ortamında) ve -0.0487489 a.u.(metanol ortamında)), peptid grubu içindeki CO grubu (-0.0402084 a.u. (vakum ortamında) -0.0463164 a.u. (su ortamında), -0.0459354 a.u. (etanol ortamında) ve -0.0460688 a.u. (metanol ortamında)) ve lizinin yan zincirinin ucunda bulunan NH₂ grubunda (-0.0564202 a.u.(vakum ortamında), -0.0488212 a.u.(su ortamında), -0.0614755 a.u.(etanol ortamında) ve -0.0623705 a.u.(metanol ortamında)) yoğunlaştığı, elektronlarca fakir bölgelerin ise tirozine ait yan zincirindeki halkaya bağlı OH grubu (0.0593732 a.u. (vakum ortamında) , 0.065919 a.u. (su ortamında), 0.0656348 a.u. (etanol ortamında) ve 0.0657316 au. (metanol ortamında)) ve treoninin yan zincirindeki (0.0566714 a.u. (vakum ortamında),

0.0636846 a.u.(su ortamında), 0.0633921 a.u. (etanol ortamında) ve 0.0634926 a.u. (metanol ortamında)) ve karboksil grubundaki (0.0613608 a.u. (vakum ortamında), 0.0674761 a.u.(su ortamında), 0.0672397 a.u. (etanol ortamında) ve 0.0673217 a.u. (metanol ortamında)) OH larda yoğunlaştığı enerji değerlerine bakıldığında görülmektedir. Moleküler kenetlenme (doking) çalışmalarında da, reseptör ve ligandın birbirlerini moleküler yüzeylerinden tanımlarından dolayı, moleküllerin elektrostatik potansiyel değerleri önem kazanmaktadır [316]. Yapılan tüm docking çalışmaları, MEP analizi sonuçları ile karşılaştırıldığında etkileşim yerlerinin MEP analizinde belirlenen elektronlarca en zengin ve en fakir bölgeler olduğu görülmektedir.

Hiperpolarizebilite analizi, molekülün non-lineer optik özellikleri ile ilgili bilgiler sağlamaktadır. Üre, bileşiklerin non-lineer özelliklerinin araştırmasında sıkça kullanılan büyük ikinci dereceden mikroskopik polarize edilebilirliğe sahip bir molekül olup, çalışmalarda eşik değeri olarak kabul edilmektedir [317,318]. Literatürdeki üre değerleri μ , α ve β ları 1.373D, 3.8312×10^{-24} esu ve 0.37289×10^{-30} esu olarak B3LYP/6-31G(d) metodu ile elde edilmiştir [319]. YKT tripeptidine ait değerler ile literatür verileri karşılaştırıldığında tripeptidin dipol moment, polarizebilite ve hiperpolarizebilite değerleri sırasıyla üreninkinin 1.2358, 10.775 ve 7.0031 katı olarak elde edilmiştir.

NBO analizinde stabilizasyon enerjisi E(2) değerinin yüksek olması ile elektron verici ve alıcılarının arasındaki etkileşim yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki vardır [313,320]. Aromatik halka gruplarında σ orbitalleri ve π orbitallerinin kendi içlerindeki orbital örtüşmesinin etkisi ile bazı güçlü molekül-içi etkileşimler ortaya çıkardığı bilinmektedir [313]. Molekülümüzde de 266,36 kcal/mol ile en yüksek stabilizasyon enerjisine sahip olan yine halka grubu içindeki $\pi^*(C_{12}-C_{14})-\pi^*(C_9-C_{10})$ geçişine aittir. Buna en yakın değerler peptid bağ bölgelerindeki n_1 'den π^* 'a olan geçişlere ($n_1(N_{44})-\pi^*(C_{42}-O_{43})$ (66,45 kcal/mol) ve $n_1(N_{23})-\pi^*(C_{21}-O_{22})$ (68,3 kcal/mol)) aittir. Bu geçişlere ait enerji değerlerini karboksil grubundaki 43,57 kcal/mol ile $n_1(O_{58})$ 'den $\pi^*(C_{56}-O_{57})$ 'a geçiş ve 33,62 kcal/mol ile $n_2(O_{57})$ 'den $\sigma^*(C_{56}-O_{58})$ 'a geçiş izlemektedir. Diğer önemli geçiş ise, 26.9 kcal / mol ile $n_2(O_{19})$ 'dan $\pi^*(C_{12}-O_{14})$ 'e olan geçiştir. Ayrıca 200-230 nm ile 274 nm arasındaki YKT tripeptidinin UV spektrumunda gözlenen piklerin yapıdaki $n-\pi^*$ ve $\pi-\pi^*$ geçişlerinden kaynaklandığı da bilinmektedir [113].

Tirozin amino asidinde bulunan benzen halkasına ait olan halka CH bağ gerilmeleri, 3072 cm^{-1} (FTIR), 3066 cm^{-1} , 2987 cm^{-1} (FTIR-ATR), $3062,3043$ ve 3020 cm^{-1} (Raman) spektrumlarında

kaydedilmiş ve karşılık gelen literatür değerleri 3071, 3047, 3019 cm^{-1} (FTIR) ve 3060, 3036, 3026 cm^{-1} (Raman) ile uyumlu oldukları görülmüştür [321] (bkz EK 3). Halka içi C-C bağ gerilme titreşimleri sırasıyla 1615 cm^{-1} (FTIR-ATR), 1613 cm^{-1} (FTIR), 1617 ve 1597 cm^{-1} (Raman)'da kaydedilmiş ve dalga sayısı değerlerinin literatürdeki 1623, 1594 cm^{-1} (FTIR) ve 1612, 1594 cm^{-1} (Raman) değerleri ile uyum içinde olduğu görülmüştür. HCH makas hareketi için 1450 cm^{-1} olarak hesaplanan dalga sayısı değeri, spektrumlar üzerinde sırasıyla 1445 cm^{-1} (FTIR), 1448 cm^{-1} (FTIR-ATR) ve 1447 cm^{-1} (Raman)'da gözlenmiştir. Ayrıca halka içi C-C bağ gerilmesi 1417, 1326, 839 cm^{-1} (FTIR-ATR), 1424 cm^{-1} (Raman) ve uygun olan literatür değerlerine karşılık geldikleri görülmüştür [321]. 1390 cm^{-1} de hesaplanan ve 1398 cm^{-1} (FTIR), 1395 cm^{-1} (FTIR-ATR) ve 1408 cm^{-1} (Raman)'da gözlenen açılı bükülme hareketi, NCH açılı bükülmesi olarak atanmıştır. CCH wagging hareketi olarak atanan ve 1288 cm^{-1} 'de ATR'de gözlemlenen pik, yine 1288 cm^{-1} 'de hesaplanmıştır. Tirozine ait C-O bağ gerilmesi 1250 cm^{-1} de hesaplanmış ve 1249 cm^{-1} de her üç spektrumda da (FTIR, ATR ve Raman) kayıt edilmiştir. C-N bağ gerilme hareketi olarak atanan dalga sayıları FTIR, ATR ve Raman spektrumlarında sırasıyla 1107 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} ve 1104 cm^{-1} 'de görülmüştür ve literatürde 1093 cm^{-1} 'de ki değer ile uyum içerisindedir [321]. CCCH halka torsiyon hareketi ise 925, 827, 804 cm^{-1} (FTIR), 926, 828, 802 cm^{-1} (FTIR-ATR) ve 928, 832 cm^{-1} (Raman)'da kayıt edilmiş ve atama yapılmıştır. Literatürde 767 cm^{-1} ve 763 cm^{-1} tanımlanan C-C-C halka açılı bükülmesi [321], deneysel olarak sırasıyla 760, 646 cm^{-1} de FTIR-ATR ve 649 cm^{-1} de Raman spektrumlarında gözlenmiş ve 767, 640 cm^{-1} de hesaplanmıştır. Yine CCCC torsiyon hareketi ise 706 ve 506 cm^{-1} olarak hesaplanmış, 692, 509 cm^{-1} (FTIR) ve 708, 494 cm^{-1} (FTIR-ATR) olarak literatürle uyumlu olarak spektrumlarda gözlenmiştir [321].

Lizin amino asidine ait asimetric C-H bağ gerilmesi spektrumlar üzerinde 2930-2871 cm^{-1} aralığında gözlenmiş ve literatürde yer alan uygun değerlere karşılık gelecek şekilde yerleştirilmişlerdir. Simetric C-H bağ gerilme titreşimi ise ATR ve Raman spektrumlarında sırasıyla 2923; 2901 cm^{-1} ve 2930 cm^{-1} 'de atamaları yapılmıştır. HNH makas hareketi olarak tanımlanan açılı bükülme titreşimi, 1638 cm^{-1} 'da ki literatür değerleriyle uyumlu olarak 1635 cm^{-1} 'de FTIR-ATR spektrumunda tanımlanmışlardır [322, 323]. HCH makas hareketi ise 1457 cm^{-1} (FTIR), 1489, 1456, 1451 cm^{-1} (FTIR-ATR) ve 1468 cm^{-1} (Raman) da kaydedilmiş ve literatüre uygun olarak ataması yapılmıştır. Literatürde 1368; 1345 cm^{-1} (FTIR) ve 1366; 1344 cm^{-1} (Raman)'da gözlenip [322] CCH wagging hareketi olarak atama yapılan açılı bükülme titreşimi 1342 cm^{-1} (FTIR), 1373, 1349 cm^{-1} (FTIR-ATR) ve 1345 cm^{-1} (Raman)

spektrumlarında gözlenmiştir. Literatürde 1321 (FTIR) ve 1320 (Raman) cm^{-1} 'de gözlenen pik ve ATR spektrumunda 1320 cm^{-1} gözlenmiş ve CCH twisting hareketi olarak ataması yapılmıştır. NCH açılı bükülme titreşimi ise 1297 cm^{-1} olarak hesaplanmış ve ATR spektrumunda 1296 cm^{-1} 'de literatüre uygun olarak gözlenmiştir. C-C bağ gerilme katkılı C-N titreşimi, 1066 cm^{-1} de hem ATR hem de Raman spektrumlarında gözlenmiş, 1065 cm^{-1} 'de hesaplanmıştır. C-C bağ gerilmesi ise 1049 cm^{-1} (FTIR), 1056 cm^{-1} (FTIR-ATR ve Raman) da gözlenmiş ve literatürdeki 1052 cm^{-1} (FTIR) ve 1055 cm^{-1} (Raman) dalga sayılarıyla uyum içinde olduğu görülmüştür. C-C ve C-N titreşimlerinin baskın olduğu pikler ise literatür değerleriyle aynı olarak 1028 cm^{-1} (FTIR-ATR) ve 1029 cm^{-1} (Raman) da gözlenmiştir. C-C-H açılı bükülme titreşimi FTIR'da 885 cm^{-1} 'de ve ATR'de 890 cm^{-1} gözlenerek, hesaplanan 889 cm^{-1} değeri ile uyumlu olarak atamaları yapılmıştır. Lizine ait C-C-N açılı bükülmesi titreşimi 425 ve 429 cm^{-1} 'de sırasıyla FTIR ve ATR de gözlenmiş ve 429 cm^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Treonin amino asidi yapısında metil ve hidroksil grupları barındıran bir amino asittir. Treonin C-H bağ gerilme titreşimi Raman spektrumunda 2970 cm^{-1} 'de, FTIR ve ATR spektrumlarında ise sırasıyla 2973 ve 2972; 2893 cm^{-1} 'de kaydedilmiş ve 2977 cm^{-1} 'de de teorik olarak hesaplanmıştır. CCH açılı bükülme titreşim hareketi ise 1375 cm^{-1} (FTIR-ATR) ve 1377 cm^{-1} (Raman)'da gözlenmiş ve 1375 cm^{-1} 'de teorik olarak hesaplanmıştır. NCH açılı bükülmesi, literatürde 1342;1346 cm^{-1} 'de FTIR ve 1345 cm^{-1} 'de ATR spektrumlarında [324,325], bu çalışmada ise ATR spektrumunda 1339 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Ayrıca 1266 cm^{-1} 'de hesaplanan ve 1269 cm^{-1} ve 1267 cm^{-1} 'de ATR ve Raman spektrumlarında gözlenen pike CCH açılı bükülme titreşimi olarak atama yapılmıştır. Treonine ait C-N bağ gerilmesi ise 1161 cm^{-1} 'de hem ATR hem de Raman spektrumlarında gözlenmiştir. C-C bağ gerilmesi 1074 cm^{-1} ATR'de ve 1070 cm^{-1} de Ramanda gözlenmiş, 1068 cm^{-1} 'de teorik olarak hesaplanmıştır. CO bağ gerilmesi teorik olarak hesaplanan 855 cm^{-1} dalgasayısı ile uyumlu olarak 856 cm^{-1} 'de ATR ve Raman spektrumlarında gözlenmiştir. CCOH torsiyon hareketleri FTIR'da 619 cm^{-1} , ATR de 720 ve 617 cm^{-1} 'de gözlenmiş, 719 ve 625 cm^{-1} olarak hesaplanmıştır. CCO açılı bükülmesi ise 633 cm^{-1} 'de ATR spektrumunda gözlenmiştir. Literatürde 570 cm^{-1} 'de Raman spektrumunda gözlenen CNCH torsiyon hareketi, bu çalışmada 562 cm^{-1} 'de ATR spektrumunda gözlenmiştir. Teorik olarak 526 cm^{-1} olarak hesaplanan ve ATR spektrumunda 528 cm^{-1} 'de gözlenen pik treoninin CCOH ve CNCH torsiyon hareketleri olarak atanmıştır.

Proteinlere ait amid 1, amid 2, amid 3 titreşim modları 1700 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} ve 1200 cm^{-1} civarında gözlenmektedir [326,327]. YKT tripeptidi için yapılan teorik ve spektroskopik analizler sonucunda, teorik olarak 1694 cm^{-1} 'de hesaplanan ve PED analizinde de yüzde 72'lik baskın bir C=O gerilme hareketi ile temsil edilen amid I modu, bant komponent analizi sonucunda 1698 cm^{-1} (FTIR) spektrumunda tespit edilmiştir. PED analizinde yüzde 66 'lık katkı ile belirlenen, 1679 cm^{-1} değerinde hesap edilen ve deneysel olarak da 1655 cm^{-1} ve 1652 cm^{-1} de sırasıyla FTIR ve ATR spektrumlarında gözlenen ikinci amid I modu da, Şekil 4.9b'de belirtilmiştir. FTIR ve ATR spektrumlarında sırasıyla 1516 cm^{-1} ve $1519;1507\text{ cm}^{-1}$ dalgasayılarında kaydedilen ve PED analizinde peptid grubuna ait CNH bağ gerilme titreşimiyle tanımlanan amid II modu, bant komponent analizi sonucunda 1520 ve 1507 cm^{-1} olarak Şekil 4.9c'de gösterildiği gibi tespit edilmiştir.

Peptid grubundaki C-N bağ gerilme titreşimiyle beraber C-N-H açı bükülme katkısıyla da tanımlanan sırasıyla 1222 cm^{-1} ve 1184 cm^{-1} olarak hesaplanan, 1214 cm^{-1} (FTIR), 1181 cm^{-1} (ATR) ve 1221 cm^{-1} (Raman) spektrumlarında gözlenen amid III modları, bant komponent analizinde, 1225 cm^{-1} de ortaya çıkartılmıştır (Şekil 4.9d).

UV-Vis spektroskopisi ile gerçekleştirilen DNA bağlanma çalışmalarına bakıldığında, kırmızı veya maviye kayma ile hiperkromik veya hipokromik etki YKT peptidinin DNA ile etkileşime girdiğini gösterir [248]. İnterkalasyon ajanlarının DNA sekans seçiciliği olmasa da, literatür çalışmaları guanin ve sitozin açısından zengin bölgelere daha fazla bağlandıklarını göstermiştir [250]. Hipokromik etki ve batokromik kayma nedeniyle YKT peptidinin DNA oluşuna bağlandığı veya DNA sarmalına girdiği (interkalatif) söylenebilir. Ayrıca moleküler yerleştirme çalışmasında, YKT tripeptidinin DNA'nın guanin ve sitozin bazlarına bağlandığını ve bağlanma tipinin interkalatif olabileceği gösterilmiştir. Dahası, DNA bağlanma modundaki hiperkromik etki, elektrostatik bir etkileşim olabileceğini göstermektedir [328-330]. DNA-çift sarmal, küçük ve büyük oluklarda erişilebilen birçok hidrojen bağlama alanına sahiptir. YKT tripeptidinin amin grubu, hiperkromizme katkıda bulunarak DNA ile hidrojen bağları oluşturabilmektedir [247,248]. Ek olarak, hiperkromik etki, CT-DNA çevresindeki negatif yüklü fosfat omurgası arasındaki elektrostatik etkileşime bağlı olabilmektedir [249]. Moleküler yerleştirme çalışmasına göre, teorik olarak YKT tripeptidinin DNA'nın fosfat grupları ile elektrostatik olarak etkileşime girdiği belirlenmiştir. Elde edilen K_b sonuçlarından, YKT tripeptidinin CT-DNA'ya bağlanma afinitesi üzerinde daha büyük bir hiperkromik etkiye sahip

olduğu anlaşılmıştır. Klasik interkalatör (Ethidium bromide $K_b = 7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) [331] ile karşılaştırıldığında hesaplanan $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (hipokromik için) ve $1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (hiperkromik için) K_b değerleri düşük olmasına rağmen, literatürdeki çalışmalarda da $1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1.731 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $4.117 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ gibi benzer sonuçlar bildirilmiştir [244,332-335].

DNA kesme aktivitesinde asıl hedefler, DNA'nın ana bileşenleri olan fosfodiester bağı, deoksiriboz şekeri ve nükleobazlardır. Hidrolitik veya oksidatif olarak hedef bölgelerin kesilmesi gerçekleşir. Hidrolitik kesme aktivitesinde, DNA'nın fosfodiester bağlarının hidrolizi ile zincir kırılırken, oksidatif kesme aktivitesinde, deoksiriboz şekerin veya nükleobazların oksidasyonu meydana gelir [336]. YKT peptidinin kesme etkinliği, H_2O (hidrolitik yarımla) ve H_2O_2 (oksidatif yarımla) varlığında değerlendirilmiştir. Sadece DNA ve H_2O_2 kullanılarak yapılan kontrol deneylerinde DNA kesmenin gözlenmediği gösterilmiştir [337]. YKT peptidi ile yapılan çalışmalarda, kontrole kıyasla sadece H_2O_2 varlığında kesme aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.10b). Oksidatif bölünme ile, süper sarmal DNA'nın bir kısmını açık dairesel forma (Form II) indirgendiği anlaşılmaktadır. DNA kesme aktivitesi sonuçlarına dayanarak ise, YKT peptidinin, H_2O_2 varlığında deoksiriboz şekerden veya nükleobazlardan DNA'yı kestiği sonucuna varılabilir.

Moleküler kenetlenme çalışmalarında özellikle prostat kanseri başta olmak üzere farklı tip kanserler ile YKT'nin ilişkisi göz önünde bulundurularak, epidermal büyüme faktör reseptörü, androjen reseptörü, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve DNA ile olan etkileşimlerine bakılmış ve ADME profilleri her bir doking çalışması sonucunda hesaplanmıştır. DNA ile yapılan kenetlenme sonuçlarına göre YKT tripeptidinin esas olarak DNA'nın Guaninleri ve Sitozinleri ile hidrojen bağları yaptığı görülmüştür. Deneysel çalışmalarda da DNA ve YKT'nin etkileştiği dalgaboyundaki kayma (hipsokromik ve batokromik) ve şiddetteki değişimlerden (hiperkromik ve hipokromik) anlaşılmaktadır. Böylece, teorik ve deneysel çalışmaların birbirini desteklediği görülmüştür.

Diğer çalışmalara bakıldığında ise, literatürde önemli androjen reseptörü inhibisyon aktivitesine sahip olan fitokimyasallar ve prostat kanseri ilaç moleküllerinin androjen reseptörü ile yapılan doking çalışmalarında ligandların bağlanma enerjilerinin -8.10 kcal/mol (enzalutamide), -8.69 kcal/mol (flutamide), -10.32 kcal/mol (abiraterone), -13.73 kcal/mol (isobavachin) olarak belirlendiği [338] ve bu değerlerin YKT ile androjen reseptörü bağlanma enerjisi olan -9.325 kcal/mol ile yakın değerler verdiği görülmüştür. Gln ve Asn'ler ile

etkileşimlerin öne çıktığı literatür ve tez çalışmasında görülmektedir. EBFR ile antikanser ajanlar olan etalazin türevleri ile yapılan doking çalışması sonucunda elde edilen -5.466 kcal/mol doking skorunun tez çalışmasında bulunan -7.558 kcal/mol değerine göre daha yüksek bir değerde kaldığı görülmektedir [339]. Bu tez çalışmasında kullanılan YKT molekülünün doking skorunun daha düşük olması daha kararlı bir bağlanmanın olduğunun da bir göstergesidir. EBFR'ye ait aspartik asit(Asp)'in hidrojen bağ etkileşimlerinde öne çıktığı da literatürle uyumlu olarak gözlenmiştir. Östrojen reseptörü ile yapılan doking çalışması içeren bir çalışmada quercetin, kaempferol, isocorilagin gibi meme kanserine karşı ilaçların doking skorlarının sırasıyla -7.572, -7.665, -7.901 kcal/mol olarak hesaplandığı ve bu değerlerin YKT ile östrojen reseptörünün docking skoru olan -9.115 kcal/mol'den daha yüksek değerlerde olduğu görülmüştür. Ayrıca hidrojen bağ bölgelerinde Glutamik asit (Glu)'in öne çıktığı literatür ve tez çalışmasında görülmektedir [340]. Progesteron reseptörü ile yapılan bir başka çalışmada ligandların doking skorlarının -9.59 kcal/mol, -8.95 kcal/mol, -8.83 kcal/mol, -9.02 kcal/mol gibi değerler aldığı [341] ve YKT- progesteron reseptör doking skoru olan -9.176 kcal/mol ile yakın değerlerde olduğu görülmüştür. Ayrıca progesteron reseptörünün özellikle Gln amino asidi ile etkileşim olduğu hem literatürde hem de tez çalışmasının doking çalışmasında görülmektedir.

Literatürde en başarılı ilaçların 500 dalton'un altında moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir [198,342]. Örneğin, yapılan bir çalışmada, hedefleme kabiliyeti ve yüksek güvenlik derecesi nedeniyle böbrek hedefli bir peptid bazlı aktif ilacın moleküler ağırlığı, etkinliği arttırmada ve toksisiteyi azaltmada önemli rol oynadığı bildirilmiştir [199]. Lipinski tarafından oral ilaç alımı için belirlenen fizikokimyasal parametrelere bakıldığında molekül ağırlığının 500 daltondan düşük, bağ akseptör sayısının 10, donör sayısının ve oktanol-su partisyon katsayısının 5 değerinden fazla olmamasının uygun olduğu belirlenmiştir. YKT tripeptidinin de 500 dalton'dan çok daha az bir moleküler ağırlığa sahip olduğu bilinmektedir. Lipinski kuralları içerisinde bulunan akseptör ve donör sayısına bakıldığında donör sayısının 6.5 değeri ile biraz üst sınırdaki olduğu ancak akseptör değerinin lipinskiye göre 10 değerinden düşük olduğu görülmüştür. Yine Lipinski kuralları içinde bulunan ve 5 değerini geçmemesi gereken oktanol-su partisyon katsayısı (log P), gerçekleştirilen tüm doking çalışmalarında hesaplanmış ve -2.62 (DNA doking) -2.784 (EBFR doking), -2.729 (AR doking), -3.152 (ÖR doking), -2.844 (PR doking) olarak elde edilmiştir. Molekülümüzün bir ihlal ile de olsa Lipinski kurallarına uyan ilaç moleküllerine benzer özelliklerde olduğu hesaplamalar sonucunda

görülmektedir. EBFR, AR, ER ve PR ile yapılan ADME çalışmalarına bakıldığında peptidin kan/beyin için QP log BB değerlerinin -2.032 (EBFR), -2.547 (AR), -2.902 (ÖR), -2.837 (PR) olarak hesaplamaların gerçekleştirildiği programın -3.0/+1.2 referans aralığı içinde kaldığı görülmektedir. İlaçların plazmadan hedef dokuya penetrasyonunu etkileyen faktörlerden biri plazma protein bağlanmasıdır. Yapılan çalışmalarda HSA bağlanma katsayısı log K, -1.332 (EBFR), -1.293 (AR), -1.337 (ÖR), -1.291 (PR) olarak hesaplanmış ve bir ilaç adayı için uygun referans aralığı olan -1.5/+1.5 aralığı içerisinde hesaplanmıştır. YKT'nin CYP2D6 inhibisyonuna neden olmaması da, ilaç etkileşimi gibi ciddi bir sorunun ortaya çıkma ihtimalini de düşürmektedir.

Biyolojik olarak aktif olan peptidler, birçok kanser hücre hattında sitotoksik etki göstermektedir [343]. Farklı mekanizmalarla doğrudan sitotoksik ajanlar olarak da kullanılabilme ya da spesifik hedefleme ile sitotoksik ajanlar ve radyoizotopların taşınmasında rol oynamaktadır [344]. Ayrıca karsinogenez ile ilgili bir veya birden çok spesifik moleküler yolu etkileyebilirler [345]. Antikanser özelliğe sahip peptidlerin pozitif net yükü, kanser hücrelerinin hedeflenmesinde ve öldürülmesinde önemlidir. YKT, pozitif yüklü lizin amino asidine sahip bir tripeptiddir [33,346,347]. Bu çalışmada yürütülen sitotoksikite deneylerinde ilk olarak YKT tripeptidinin üç farklı kanser hücre hattı (HeLa, MCF-7 ve MAT-LyLu) üzerindeki sitotoksik etkilerine farklı konsantrasyonlar (0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL) kullanılarak bakılmıştır. % canlılık ile ilgili bilgilere Tablo 4.18-4.19 ve Şekil 4.15-4.16'dan bakıldığında, konsantrasyonun artırılması ile her üç hücre hattı için canlılık yüzdesinin düştüğü gözlenmiştir. 24 saat sonundaki istatistiksel analizler ile MAT-LyLu hücre hatları üstünde uygulanan tüm konsantrasyonlar kontrole göre anlamlı olmasına rağmen MCF-7 ve HeLa hücre hatları düşük konsantrasyonlarda (0.1 mg/mL ve 0.25 mg/mL) kontrolle arasındaki farkların anlamlı olmadığı görülmüştür. 48 saat sonundaki çalışmalarda ise MAT-LyLu hücre hattının yanı sıra ve MCF-7 hücre hattı üstündeki sitotoksik etkinin tüm konsantrasyonlarda kontrol göre anlamlı olduğu saptanmıştır. Yüksek dirence sahip HeLa hücre hattı ile yapılan çalışmalarda ise hem 24 saat hem de 48 saat sonunda öne çıkan konsantrasyonların 0.25 mg/mL'den yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan tüm sitotoksikite çalışmaları sonucunda, YKT'nin özellikle MAT-LyLu hücre hattı üstünde önemli bir sitotoksik etkisi olduğu -belirlenmiştir.

Boş kitosan nanopartiküllerinin DLS analizi sonucuna göre 54.80 nm ortalama partikül boyutuna ve 13.2 mV zeta potansiyeline sahipken, YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinde ise ortalama partikül boyutunun 57.11 nm olduğu, zeta potansiyel değerinin ise 12.4 mV olduğu belirlenmiştir. Kitosan nanopartiküllerinin boş ve dolu nanopartikül yapısı için PDI değerleri ise sırasıyla 0.125 ve 0.221 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlara bakıldığında, zeta potansiyelinin çok düşük olmaması nedeniyle elde edilen nanopartiküllerin aglomerasyona (yığılma) direnç gösterebileceği, boyutlarının da küçük olması sebebiyle kan dolaşımını kolayca terk edebileceği kanaatine varılmıştır. Literatürdeki peptid yüklü kitosan nanopartiküller üzerine yapılan bir çalışmada [348], kitosan nanopartiküllerinin 124 nm büyüklüğünde olduğu belirtilmiştir. Kitosan nanopartiküllerimizin literatüre göre yaklaşık 2.3 kat daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Yüklü nanopartiküller ile karşılaştırıldığında, elde ettiğimiz peptid yüklü nanopartikülün boyutu, literatürdeki 185 nm olan partikül boyutuna göre yaklaşık 3.2 kat daha küçük ve zeta potansiyeli de literatürde hesaplanan +8.8 mV'a göre yaklaşık 1.4 kat daha büyüktür. Başka bir çalışmada, boş kitosan nanopartiküllerin 183.3 nm boyutunun tez çalışmasında elde edilen kitosan nanopartiküllerinin boyutundan yaklaşık 3.3 kat daha büyük olduğu ve literatürdeki 33.7 mV değerindeki zeta potansiyelinin 2.5 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir [349]. Egil ve ark. yaptıkları çalışmada yüklü kitosan nanopartiküllerinde zeta potansiyel değeri azalırken partikül boyutu ve PDI değerinin arttığını belirtmiştir [129]. Sonuçlarımız literatür ile kıyaslandığında benzer sonuçlar elde edilmiş olduğu görülmüştür. Nanopartiküllerin süpernatantındaki serbest YKT konsantrasyonu, enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesini hesaplamak için analiz edilmiştir. YKT yüklü kitosan nanopartiküller için kapsülleme verimi %100 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, sentez sırasında kullanılan tüm peptidin kitosan nanopartiküller içinde kapsüllendiğini belirtmektedir. Yapılan bir çalışmada düşük molekül ağırlığının enkapsülasyon verimini olumlu etkilediği bildirilmiştir [284]. Molekülümüzün sahip olduğu küçük moleküler ağırlık ile, yüksek bir enkapsülasyon yüzdesi sağlandığı düşünülmektedir. Liyofilizasyon işleminden sonra nanopartiküller tartılmış ve yükleme kapasitesi yaklaşık %35 olarak hesaplanmıştır. Yani %35'lik yükleme kapasitesi demek, yüklü nanopartikül ağırlığının %35'inin YKT'den oluştuğu anlamına gelmektedir. Bir başka deyişle, her 1 mg kitosan nanopartiküllerinin kabaca 0.35 mg YKT peptidi içerdiği anlamına gelmektedir. İlacın enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi, kontrollü salıma dayalı ilaç adayı geliştirilmesinde çok önemli parametrelerdir. Enkapsülasyon veriminde elde edilen yüzdelik değer, ilaç ve polimer arasındaki etkileşimle ilgilidir [350]. Literatür

çalışmalarına bakıldığında, bir çalışmada peptit yüklü kitosan nanopartiküllerinin %99 enkapsülasyon verimine sahip olduğu hesaplanmıştır. Yükleme kapasitesi de %10 olarak belirlenmiştir [284]. Peptid yüklü kitosan nanopartikülleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada, konsantrasyona göre en yüksek enkapsülasyon yüzdesi %71 iken en yüksek yükleme kapasitesi %42.87 olarak hesaplanmıştır [351]. Başka bir çalışmada, enkapsülasyon yüzdesinin %40 civarında, yükleme kapasitesinin ise %7-20 arasında değiştiği belirtilmiştir [352]. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, literatürle karşılaştırıldığında YKT yüklü kitosan nanopartiküllerin daha verimli sentezlendiği söylenebilmektedir. Enkapsüle edilen YKT tripeptidinin zamanla kontrollü olarak salındığı Şekil 4.18'de görülmektedir. Tez çalışmasına benzer literatür çalışmalarına bakıldığında, AVP (4-5)-NH₂ yüklü kitosan nanopartiküllerin 24 saatte % 17.23 ve 240 saat sonunda % 61.13 salım oranına sahiptir [284]. Matriks, geometrik yapı, hazırlama yöntemi ve çözünme ortamı gibi farklı faktörlerin ilaç salınımını etkilediği bilinmektedir [353]. Başka bir çalışmada, kateşin yüklü kitosan nanopartiküllerinin 24 saat içinde %32 salınım oranına sahip olduğu bildirilmiştir [354]. Sonuçların tez çalışmasında 24 saat sonunda elde edilen %33.77 değerine oldukça yakın olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, YKT'nin *in vitro* salımı, iki farklı salınım modeli göstermiştir. Şekil 4.18'de görüldüğü gibi, birinci modelde, ilk 8 saatte YKT'nin %26'sı salınmış ve bu, kitosan nanoparçacıklarından YKT patlama (burst) salım profiline karşılık gelmiştir. İkinci salınım modelinde ise YKT'nin yavaş salındığı ve 11. günün sonunda (264 saat) YKT'nin %97'sinin salındığı görülmüştür. Hem 24. saat hem de 11 gün sonraki değerler literatür değerleri ile karşılaştırıldığında nanopartiküllerimizin daha hızlı salım hızına sahip olduğu görülmüştür.

YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinin morfoloji çalışmalarının incelenmesi SEM ile görüntüleme yapılarak tamamlanmıştır. YKT yüklü kitosan nanopartiküllerin SEM görüntüleri Şekil 4.19'te gösterilmiştir. SEM ölçümleri sonucunda partikül boyut ölçümlerinde kitosan nanopartiküllerinin yaklaşık 20 nm civarında olduğu belirlenmiştir. YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinin düzenli bir dağılıma ve yoğun bir yapıya sahip küresel parçacıklar olduğu gözlenmiştir. Zeta sizer cihazı ile elde edilen partikül boyutlarına göre daha küçük boyutlarda nanopartiküllere sahip olduğumuz görülmüştür.

SEM analizi tipik olarak asıl parçacıkların boyutunu yansıtır. Oysa DLS tekniğinin duyarlılığı, küçük miktarlardaki büyük parçacıklara veya daha küçük parçacık kümelerinin varlığına dayanır. İki teknik arasındaki parçacık boyutu farklılıklarının nedeni budur.

Bu çalışmada öncelikle kitosan NP için FTIR ve ATR spektrumları çekilmiş ve kitosana ait olan karakteristik pikler belirlenmiştir. Kitosanda bulunan O-H, N-H ve C-H gerilmelerini karakterize eden pikler literatürde genellikle 3750, 3367-3290 ile 2937-2867 cm^{-1} (FTIR) dalgasayısı bölgelerinde tespit edilmişlerdir. Bu çalışmada, boş kitosan NP için FTIR spektrumunda 3445 cm^{-1} , 3287 cm^{-1} ve 2933 cm^{-1} pikleri, sırasıyla uygun gelen O-H, N-H ve C-H gerilme titreşimleri için atanmıştır. FTIR spektrumunda 1700-1600 cm^{-1} gözlenen pikler literatür sonuçlarına bağlı kalarak, NH_2 bükülme titreşim hareketini karakterize etmektedir. Çekilen spektrumda 1638 cm^{-1} de gözlenen pikin, literatüre uyduğu gözlenmiştir. Literatür atamaları göz önünde bulundurularak, FTIR spektrumunda 1558 cm^{-1} ve YKT yüklü nanopartiküle ait ATR spektrumunda 1584 ve 1542 cm^{-1} 'de gözlenen piklerin, aromatik halkaya ait olan C-C gerilmesine ataması yapılmıştır. Literatürde 1317 cm^{-1} 'de gözlenen C-N gerilmesi de çekilen FTIR spektrumunda 1338 cm^{-1} 'de gözlenmiştir [292]. Ayrıca, ATR de 1259 cm^{-1} 'de gözlenen pik, kitosan için literatürde 1261 cm^{-1} 'de gözlenen [287] ve C-O gerilme ve O-C-H bükülme titreşimine ait olan piktir. 1152 ve 1154 cm^{-1} civarlarında gözlenen asimetrik C-O-C gerilmesi, FTIR spektrumunda 1154 cm^{-1} 'de bulunmuştur. Ayrıca, literatürde FTIR spektrumunda 1081 ve 1092 cm^{-1} 'de gözlenen [286,295] C-O-C/C-O-H pikleri ATR spektrumunda 1079 cm^{-1} 'de tespit edilmiştir. Sakkarit yapısına ait olan pikler ise literatür değerlerine uyumlu olarak 895 cm^{-1} 'de ATR spektrumunda gözlenmiştir [286,287,297]. TPP çapraz bağlayıcıyı karakterize eden pikler ise FTIR da 1171 cm^{-1} 'de, ATR spektrumunda ise 1169 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Ayrıca P-O-P antisimetrik gerilme titreşimini ifade eden ve literatürde 912 ve 875 cm^{-1} 'de gözlenen pikler ATR spektrumunda 871 cm^{-1} gözlenmiştir [284,293,294].

YKT yüklü NP 'a ait olan spektrumlar YKT spektrumları ile karşılaştırmalı olarak çizilerek, dolu NP ait spektrumlardan YKT ye ait olan pikler belirlenmiş, NP 'ün YKT tripeptidi ile yüklenme karakterizasyonu, spektroskopik sonuçlara dayalı olarak ortaya konmuştur. YKT, YKT yüklü kitosan NP, boş kitosan NP karşılaştırmalı FTIR spektrumları incelendiğinde özellikle 1300 cm^{-1} -900 cm^{-1} bölgesinde YKT ye ait olan pikler spektrum üzerinde belirgin bir biçimde gözlenebilmektedir. Bu bölge dışındaki pikler, kitosan polimerinin pikleri altında gizlenmiştir. YKT tripeptine ait FTIR ve ATR spektrumlarında 1249 cm^{-1} 'de gözlenen pik, YKT yüklü NP'lere ait FTIR spektrumunda 1245 cm^{-1} 'de küçük şiddette de olsa gözlenmiştir. YKT yüklü NP'lere ait ATR spektrumunda ise bu pik 1241 cm^{-1} 'de tespit edilmiştir. YKT FTIR spektrumunda 1249 cm^{-1} 'de gözlemlenen bu pik, Ek 3'deki PED analizinin %51 C-O bağ

gerilme katkısı sonucuna göre tripeptiddeki tirozinin C-O gerilmesini ifade eder. Karşılaştırmalı FTIR spektrum analizinde kayda değer bir diğer pik, YKT'ye ait 1107 cm^{-1} 'deki pik noktasıdır. YKT FTIR spektrumunda 1107 cm^{-1} 'de gözlenen bu pik, YKT yüklü NP spektrumunda 1114 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Bu pik, YKT'de ağırlıklı olarak tirozine ait olan ve Tablo 4.21'de verilen CN gerilmesine karşılık gelir. Yine YKT'ye ait FTIR spektrumunda 1049 cm^{-1} 'de gözlenen ve YKT'deki lizinin CC bağ gerilmesi olarak atanan pik, YKT yüklü kitosan NP spektrumunda 1050 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. YKT'nin FTIR spektrumunda 925 cm^{-1} ve 619 cm^{-1} 'de gözlenen ve CCCH (halka) ve karboksil grubu CCOH bükülmesi olarak atanan pikler, YKT yüklü kitosan NP'ünün FTIR spektrumunda 927 cm^{-1} ve 608 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. NP spektrumlarında YKT'ye ait pikler hem FTIR hem de ATR spektrumları ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiş (bkz. Şekil 4.20) ve Tablo 4.21'de uygun yerlere yazılmıştır. YKT'nin yüklü NP'lerde varlığını gösteren en önemli kanıt, YKT yüklü NP'lerin spektrumlarında YKT'ye ait piklerin belirli kaymalarla da olsa var olmasıdır.

Peptid yapıları, CONH grubu ile birbirine bağlandığından, bu grupların da kendilerine ait bazı spesifik hareketleri vardır. YKT'nin $1709\text{--}1693\text{ cm}^{-1}$ ve $1670\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ ATR spektrumundaki bölgeler bant komponent analizi ile incelenmiş ve peptid grubuna ait C=O bağ gerilmesi ile tanımlanan amid I piki, 1698 cm^{-1} ve 1652 cm^{-1} 'de bulunmuştur. YKT yüklü kitosan NP'ünün ATR spektrumunda $1725\text{--}1685\text{ cm}^{-1}$ ve $1675\text{--}1635\text{ cm}^{-1}$ bölgelerine bant komponent analizi uygulanmıştır ve YKT yüklü NP'lerin ATR spektrumundaki 1698 cm^{-1} ve 1653 cm^{-1} pikleri, YKT'nin amid I titreşimine karşılık gelen pikler olarak belirlenmiştir (bkz. Şekil 4.21 ve Tablo 4.21).

Peptid grubuna ait C-N-H bükülme hareketini temsil eden Amid II titreşimi, FTIR'de 1516 cm^{-1} 'de ve ATR spektrumunda 1519 ve 1507 cm^{-1} 'de gözlemlendi. Karşılaştırmalı FTIR spektrumları incelendiğinde maalesef YKT yüklü kitosan nanopartiküllerin FTIR ve ATR spektrumlarında bu pikler gözlenmemiştir çünkü bu pikler kitosan spektrumunun altında kalmıştır. Bu nedenle Şekil 4.21c'de YKT yüklü NP'ye ait spektrumun $1525\text{--}1505\text{ cm}^{-1}$ bölgesi bant komponent analizi ile detaylı olarak taranmıştır. Ayrıntılı analiz sonuçlarına göre, 1522 cm^{-1} ve 1507 cm^{-1} piklerin amid II titreşimlerine karşılık gelebileceği belirlenmiştir. Ayrıca YKT yüklü kitosan spektrumundaki $1270\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ bölgesi de bant komponent analizi ile incelenmiş ve 1226 cm^{-1} 'de gözlemlenen piki amid III titreşimine uyduğu gözlenmiştir (bkz. Şekil 4.21d).

Bant komponent analizi sonucunda; YKT yüklü kitosan NP'lerin normal spektrumunda gözlenemeyen, kitosan polimeri altında bulunan ve peptid yapı özelliğini oluşturan YKT tripeptidinin ait amid titreşimleri de belirlenmiştir.

Moleküler dinamik çalışmalarında ise sulu ortamda, sentezlenen nanopartiküllerin içerisinde bulunan moleküller (kitosan polimeri ve TPP) ve bu moleküller ile birlikte YKT tripeptidinin olduğu sistem incelenmiştir. Sistemlere ait kinetik, potansiyel ve toplam enerjiler elde edilmiş, ayrıca YKT'nin sistem içinde ilk yapısından çok fazla sapmadığı yani stabil yapısını koruduğu yapılan RMSD çalışmaları sonuçlarında gözlenmiştir. RMSD, molekülün sistemdeki ilk geometrik yapısının simülasyon boyunca ne kadar değiştiğine dair bir fikir sunar ve bu değerin 0,2 nm geçmemesi beklenir, bu da molekülün simülasyon boyunca ilk formundan fazla sapmaya uğramadığını gösterir. Çalışma sonucunda kitosan sisteminde bulunan YKT tripeptidinin 10 ns'lik simülasyon boyunca 0,12 nm RMSD değerini geçmediği ve stabil yapısının sentez molekülleri ve solvent etkisi ile bozulmadığı öngörülmüştür. Nanopartiküllerin amacı ilaç moleküllerinin stabil yapısını bozmadan hedef bölgeye taşımaktır. Hedef bölgeye taşınacak molekülün nanopartikülü oluşturan diğer moleküller ile etkileşimlerinde stabil yapısını koruması ilaç etkisi açısından büyük önem taşımaktadır.

Kitosan nanopartiküllerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin doza ve zamana bağlı olduğu bilinmektedir [355]. Bir çalışmada, kitosan nanopartiküllerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak antikanser aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca kitosan nanopartiküllerinin doza bağımlı tümör baskılanmasının, tümör anjiyogenezinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu da kaydedilmiştir [356]. Bu tez çalışmasında, MAT-Lyly hücre hatlarında 24 ve 48 saat boyunca YKT, boş kitosan nanopartiküller, ve YKT yüklü kitosan nanopartikülleri 0.1, 0.25, 0.5, 1 ve 2.5 mg/mL konsantrasyonlarında sitotoksik aktivitesi MTT testi ile değerlendirilmiştir. YKT ve YKT yüklü kitosan nanopartikülleri, hem 24 saatlik hem de 48 saatlik deney gruplarında boş kitosan nanopartiküllerine kıyasla daha yüksek toksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. 24 saatlik deney gruplarında YKT, YKT yüklü kitosan nanopartiküllerine kıyasla 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL ve 2.5 mg/mL konsantrasyonlarında daha yüksek sitotoksikite gösterdi. 48 saatlik deney gruplarında, YKT yüklü kitosan nanopartikülleri, YKT'ye kıyasla 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında daha yüksek sitotoksikite gösterdiği görülmüştür. Ek olarak, MAT-Lyly hücrelerinin her üç deney grubunda da hücre canlılığında konsantrasyona bağlı bir azalma gösterdiği bulunmuştur. Boş kitosan nanopartiküllerinin ve

YKT'nin IC₅₀ değerleri yaptığımız 48 saatlik çalışma ile belirlenmiştir. Literatürde HepG2 hücre kültürü çalışmasında 48. saatte hücre canlılığı incelenmiş ve IC₅₀ değeri 239 µg/mL olarak saptanmıştır [357]. Mat-LyLu hücre kültürü çalışmamızda 48 saatteki hücre canlılık yüzdesine baktığımızda IC₅₀ değerimizin 0.1 mg/mL olarak bu değere yakın olduğu görülmektedir. Ayrıca salım profili dikkate alındığında YKT, 24 saatte %34 ve 48 saatte %43 salım yapmaktadır.

PCL nanopartikül çalışmasında da, boş PCL nanopartiküllerinin 334.1 nm boyuta ve -3.15 mV zeta potansiyeline sahip olduğu, YKT'nin yüklenmesi ile boyutun 263.3 nm'ye kadar düştüğü ve -2.72 mV'luk potansiyele yükseldiği gözlenmiştir. PDI değerleri ise boş ve dolu nanopartiküller için sırasıyla 0.086 ve 0.127'dir. Literatürde PCL nanopartiküllerini içeren çalışmalarda genellikle ortalama partikül boyutunun 200 ila 450 nm arasında olduğu [358], zeta potansiyel değerinin ise -2 ile -35 mV arasındaki değerlerde ölçüldüğü görülmektedir [359]. Örneğin, Girgis ve ark. tarafından yapılan farklı konsantrasyonlardaki PCL nanopartikül çalışmalarında 294-408 nm aralığındaki ortalama partikül boyutlarında nanopartiküller üretilmiştir [360]. Tinca ve ark. tarafından sentezlenen PCL nanopartiküllerinin de -6 mV ve -33 mV aralığında zeta potansiyel değerine sahip olduğu belirtilmiştir [361]. PDI değerleri 0.1 ve 0.25 arasında ise monodispersif bir dağılım, 0.5 üstü ise geniş bir partikül boyut dağılımı olduğu söylenebilir [362]. Bu tez çalışmasında sentezlenen nanopartiküllerin PDI değerlerine baktığımızda hem boş (0.086) hem de dolu PCL nanopartikülleri (0.127) için monodispersif nanopartiküller olduğu söylenebilir.

Enkapsülasyon verimine baktığımızda %83, yükleme kapasitesinin ise %20.75 olduğu hesaplanmıştır. Literatürde enkapsülasyon verimi %98'lerden %33 e kadar farklı değerlerde elde edilmiş olup [358,359], 2018 yılında gerçekleştirilen çalışmada papain yüklü PCL nanopartikülleri için enkapsülasyon veriminin, yakın bir değer %80.4 olduğu gözlenmiştir [363]. Yükleme kapasitesi %27.2, bir başka çalışmada ise yükleme kapasitesi %27.95 olarak hesaplanmıştır [364]. Bu tez çalışmasındaki nanopartikül için elde edilen yükleme kapasitesi değerinin ise %20.75 ile literatürde elde edilen değerlerle örtüştüğü görülmektedir. *In vitro* salım çalışmasında ise YKT yüklü PCL nanopartiküllerinin kümülatif salım miktarları incelenmiştir. Enkapsüle edilen YKT tripeptidinin zamanla kontrollü olarak salındığı Şekil 4.27'de görülmektedir. PCL nanopartiküllerine yüklenen YKT peptidinin sırasıyla %17'inin ve %21'inin sırasıyla 24 ve 48 saat sonunda salındığı belirlenmiştir. 432 saat sonunda ise PCL

nanopartiküllerine yüklenen YKT peptidinin %95'inin salındığı tespit edilmiştir. *In vitro* salım çalışmasından elde edilen bilgiler, ilaç molekülünün kontrollü bir şekilde dağıtımının kontrolü, doz ayarlama, tedavinin sürekliliği açısından önemli bilgiler sunar [365]. YKT gibi kanda tek başına çabuk degrade olabilecek bir peptid molekülünün PCL nanopartikülleri ile nanoformülasyonu sayesinde uzun süre kontrollü bir şekilde salınması, bu peptid molekülünün ilaç adayı olarak kullanılması durumunda kanda belirli bir oranda kalmasına imkan sağlayabilecektir. Kontrollü salım ile birlikte tedavi sürecinde meydana gelebilecek toksisite durumunun önlenmesi beklenmektedir.

YKT yüklü PCL nanopartiküllerinin morfoloji çalışmalarının incelenmesi SEM ile görüntüleme yapılarak tamamlanmıştır. YKT yüklü PCL nanopartiküllerin SEM görüntüleri Şekil 4.28'de verilmiştir.

Bu çalışmada boş PCL nanopartikül spektrumları, YKT yüklü PCL nanopartikül ve YKT tripeptid spektrumları ile birlikte, FTIR ve ATR-FTIR 'da 4000-2000, 2000-1000 ve 1000-400 cm^{-1} bölge aralıklarında, karşılaştırmalı olarak çizilerek gösterilmiştir. 4000-2000 cm^{-1} bölgesinde genellikle PCL polimerinin C-H antisimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerine rastlanmaktadır [308]. ATR spektrumunda 2944 cm^{-1} ve 2866 cm^{-1} de ve FTIR spektrumunda 2944 ve 2867 cm^{-1} 'de gözlenen pikler sırasıyla, CH antisimetrik ve simetrik bağ gerilmesine ait olan piklerdir. Bu pikler literatürde de sırasıyla 2949 ve 2865 cm^{-1} 'de gözlenmiştir [308]. 2000-1000 cm^{-1} bölgesi ise genellikle C=O gerilme, CH₂ bükülme, COC antisimetrik ve simetrik gerilme titreşimleri ile iskelet titreşimlerini içermektedir [308-310]. ATR spektrumunda 1729 cm^{-1} 'de ve FTIR da 1731 cm^{-1} 'de çok şiddetli gözlenen pikler, literatürde de 1727 ve 1725 de kaydedilmiş [308,310] ve C=O gerilmesini karakterize eden pik olarak atanmıştır. 1470-1415 cm^{-1} ve 1303-1281 cm^{-1} bölgeleri sırasıyla δCH_2 ve ωCH_2 bükülmelerini içermektedir [309]. FTIR spektrumunda 1470;1418 ve 1294 cm^{-1} 'de ve ATR spektrumunda da 1471;1419 ve 1296 cm^{-1} 'de gözlenen pikler CH₂ grubuna ait olan bükülmeleri tanımlamaktadır. FTIR ve ATR spektrumlarında 1240 cm^{-1} belirgin bir şekilde gözlenen pik, asimetrik COC gerilmesini tanımlarken, ATR spektrumunda 1188 cm^{-1} de gözlenen pik ise OC-O gerilmesini ifade etmektedir. ATR spektrumunda 1167 cm^{-1} 'de gözlenen çok küçük şiddetteki pik FTIR spektrumunda 1173 cm^{-1} 'de kaydedilmiş ve bu pik literatüre dayanarak [308], simetrik COC gerilmesi olarak atanmıştır. İskelet hareketleri ise spektrumlarda 1100-1030 cm^{-1} bölgeleri arasında gözlenmektedir. Buna uygun olan pikler FTIR ve ATR spektrumlarında 1095 cm^{-1} ve

1047 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. FTIR ve ATR spektrumlarında sırasıyla 934 ve 935 cm^{-1} 'de gözlenmiş olan pikler ise, C-COO gerilmesini tanımlamaktadır. 1723,1468-1244,1192,1108,1047,963,733 cm^{-1} 'de gözlenen pikler, PCL ye ait olan karakteristik pikler olarak literatürde yer almaktadır [311]. Bu piklere karşılık gelen pikler, FTIR spektrumunda 1731, 1470, 1240, 1173, 1095, 1047, 961 ve 732 cm^{-1} olarak kaydedilmişken, ATR spektrumunda 1729, 1240, 1188, 1095, 1047, 960 ve 731 cm^{-1} 'de tespit edilmiştir.

YKT ve YKT yüklü nanopartiküller için hem FTIR hem de ATR spektrumları 3 ayrı bölge için kayıt edilmiş, birbirleriyle karşılaştırmalı olarak kayıt edilen spektrumlar sunulmuştur. Ayrıca bu karşılaştırmaların daha ayrıntılı analiz edilebilmesi için tablo hazırlanmıştır. Tablo 4.25'de görüleceği üzere, YKT tripeptidinin FTIR ve ATR spektrumunda gözlenen dalgasayıları ile dalgasayılarının atamaları ve YKT yüklü nanopartikülün kayıt edilen FTIR ve ATR spektrumlarında işaretlenen belirgin pikler ve kayma miktarları verilmektedir. FTIR ve ATR spektrumlarında 2937 cm^{-1} 'de gözlenen pik YKT yüklü nanopartikülün FTIR ve ATR spektrumlarında, sırasıyla, 2940 ve 2943 cm^{-1} 'de gözlenmiş ve YKT içerisindeki treonin amino asidinin C-H bağ gerilmesi olarak ataması yapılmıştır. YKT'nin ATR spektrumunda 1635 cm^{-1} 'de gözlemlenen HNH açılı bükülmesi (makas hareketi), YKT yüklü PCL nanopartikülüne ait FTIR spektrumunda da 1635 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. YKT içerisindeki tirozin amino asidindeki halkaya ait CC bağ gerilmeleri, YKT'nin FTIR spektrumunda 1613 cm^{-1} 'de, ATR spektrumunda 1615 cm^{-1} 'de gözlenirken, YKT yüklü nanopartikül için FTIR ve ATR spektrumlarında sırasıyla 1616 ve 1615 cm^{-1} 'deki piklerde gözlenmiştir. YKT'nin HCH açılı bükülmesi (makas hareketi) FTIR ve ATR spektrumlarında sırasıyla 1445 cm^{-1} ve 1489;1448 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 1398 cm^{-1} (FTIR) ve 1395 cm^{-1} 'de (ATR) gözlenen ve tirozin amino asidinin NCH açılı bükülmesi olarak atanan pik, YKT yüklü PCL nanopartikülün FTIR ve ATR spektrumlarında, sırasıyla, 1397 ve 1393 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Lizin amino asidinin CCH bükülme hareketini tanımlayan, YKT'nin ATR spektrumunda 1363 cm^{-1} 'de gözlenen pik, YKT yüklü nanopartikülün FTIR ve ATR spektrumlarında 1362 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. YKT'nin FTIR ve ATR spektrumlarında 1172 ve 1173 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik, YKT yüklü PCL nanopartikülüne ait FTIR ve ATR spektrumlarında 1175 ve 1170 cm^{-1} 'de gözlemlenmiş ve tirozine ait CCH+CNH açılı bükülmesi olarak atanmıştır. Karşılaştırmalı FTIR ve ATR spektrumları incelendiğinde, YKT yüklü nanopartikül spektrumunda özellikle YKT ye ait olan birçok pikin 1700-1000 cm^{-1} bölgelerinde var olduğu görülmektedir. YKT yüklü PCL

nanopartikül spektrumunda, PCL ye ait karakteristik piklerin yanı sıra, YKT ye ait piklerin de görülmesi, nanopartikül içerisinde YKT nin var olduğunu göstermektedir.

YKT yüklü nanopartikülün ATR spektrumunda 1755cm^{-1} - 1680cm^{-1} ve 1675cm^{-1} - 1630cm^{-1} spektrum bölgeleri, bant komponent analiz yöntemiyle incelenmiştir. Polimer altında kalmış ve YKT peptidine ait olan, amid I olarak adlandırılan ve baskın olarak peptid grubundaki C=O bağ gerilmesi titreşim hareketiyle tanımlanan pikler, YKT yüklü PCL nanopartikül FTIR spektrumunda $1698;1651\text{ cm}^{-1}$ 'de, ATR spektrumunda ise bant komponent analizi yöntemiyle pik bileşenlerine ayrılarak, $1698;1653\text{ cm}^{-1}$ 'de tespit edilmiştir. YKT tripeptidinde amid II olarak adlandırılan ve ağırlıklı olarak amid grubundaki CNH bükülmesinden kaynaklanan karakteristik hareketi temsil eden pikleri araştırmak için, YKT yüklü nanopartikül FTIR-ATR spektrumunda $1530\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ bölgesi bant komponent analiz yöntemiyle bileşen bantlarına ayrılmış ve 1523 cm^{-1} ve 1507 cm^{-1} deki pikler amid II için belirlenmiştir. Aynı şekilde YKT peptidine ait olan peptid gruplarındaki C-N bağ gerilmesiyle birlikte CNH açılı bükülmesinin tanımladığı amid III olarak adlandırılan pikleri ortaya çıkarabilmek için, YKT yüklenmiş PCL spektrumunda $1275\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ bölgesi ayrıntılı bir biçimde incelenmiş ve 1226 cm^{-1} piki amid III için belirlenmiştir. Böylece PCL polimer matriksi altında kalan ve YKT peptid grubuna ait olan amid-I, amid-II ve amid-III pikleri, bant komponent analiz yöntemiyle tespit edilmiş ve peptide ait olan bu pikler ortaya çıkartılmıştır. Böylece nanopartikülün peptid ile yüklendiği yapılan bu ayrıntılı çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Moleküler dinamik çalışmalarında, sentez molekülleri (PCL polimeri ve PVA) ve bu moleküller ile birlikte YKT tripeptidinin olduğu sistem incelenmiştir. 10 ns boyunca kinetik, potansiyel ve toplam enerjilerdeki değişimler elde edilmiş, ayrıca YKT'nin sistem içinde 10 ns boyunca RMSD değerleri kaydedilmiştir. Çalışma sonucunda PCL sisteminde bulunan YKT tripeptidinin 0,12 nm RMSD değerini geçmediği, yani stabil yapısının sentez molekülleri ve solvent etkisi ile bozulmadığı belirlenmiştir.

Docetaxel ve docetaxel yüklü PCL nanopartikülleri ile yapılan çalışmada docetaxel kadar docetaxel yüklü PCL nanopartiküllerinin de meme kanseri hücre hattı BT-474 üstünde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir [366]. Bir başka çalışmada, PC3 prostat kanser hücre hattı üstünde docetaxel ve docetaxel yüklü PLGA-PCL nanopartiküllerinin sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan 24 ve 48 saat çalışmalarında docetaxel yüklü nanopartiküllerin docetaxele göre daha sitotoksik olduğu görülmüştür [367]. Tez çalışmasında

da, Mat-LyLu hücre hattı üstünde yapmış olduğumuz sitotoksikite çalışmalarında da YKT kadar ve YKT yüklü PCL nanopartiküllerinin de sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 24 saat sonunda YKT varlığında %45,59, YKT yüklü PCL nanopartikülleri varlığında %47,71 olan canlılık yüzdeleri 48 saat sonunda sırasıyla %32,86 ve %16,51 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar da YKT yüklü PCL nanopartiküllerinin daha etkin olabileceğini göstermektedir.

Sonuçlara bakıldığında, kitosan ve PCL nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerleri ile aglomerasyona (yığılma) direnç gösterebileceği ve PDI değerleri ile monodispersif nanopartiküller olduğu söylenebilir. Partikül boyutlarının küçük olması da kan dolaşımından kolaylıkla ayrılmanın mümkün olduğunu göstermektedir. Enkapsülasyon çalışmalarına dayanarak, YKT yüklü kitosan nanopartiküllerinin PCL nanopartiküllerine göre enkapsülasyon ve yükleme verimi yüzdelerinin daha iyi olduğu görülmüştür. Salım çalışmalarında, YKT yüklü nanopartiküllerden kitosan nanopartiküllerinin PCL nanopartiküllerine göre daha hızlı salım profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Spektroskopi çalışmalarında da, enkapsülasyon çalışmalarından dolayı dalgasayılarında kaymalar gözlenmiştir. YKT yüklü nanopartikül spektrumlarında gözlenmesi zor olan YKT'ye ait amid pikleri bant komponent analizi yardımıyla belirlenmiştir. Buna göre, YKT tripeptidinin taşıyıcı sisteme yüklendiği boyut, zeta potansiyeli gibi analizlerin yanı sıra spektroskopik analizlerle de belirlenmiştir. MD çalışmalarında, YKT tripeptidinin kitosan, PCL ve sentez molekülleri ve solvent etkisi ile stabil yapısından önemli bir değişime uğramadığı 10 ns boyunca izlenen RMSD sonuçları ile belirlenmiştir. Sitotoksikite çalışmalarında ise YKT yüklü PCL nanopartiküllerinin hem YKT hem de YKT yüklü kitosan nanopartiküllerine göre Mat-LyLu prostat kanser hücre hattı üstünde daha sitotoksik bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında, YKT tripeptidinin moleküler modelleme çalışmaları, kanser tedavisinde terapötik ajan olarak kullanım potansiyeli olan YKT tripeptidinin iki farklı yüzey yüküne sahip polimerik nano formülasyonlarının geliştirilmesi çalışmaları, YKT'nin DNA bağlanma-kesme aktivite çalışmaları ve çeşitli kanser hücre hatları üstünde etkinlik çalışmalarına ait sonuçlar elde edilmiştir. Hem teorik hem de deneysel çalışmaları içeren ve multidisipliner nitelikte olan bu tez çalışması peptide dayalı nano-ilaç tasarımı vizyonu ve zengin içeriği ile literatüre önemli katkı sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1]. Agyei, D., Ahmed, I., Akram, Z., MN Iqbal, H., & K Danquah, M., 2017, Protein and peptide biopharmaceuticals: an overview, *Protein and peptide letters*, 24(2), 94-101.
- [2]. Agyei, D., & Danquah, M. K., 2011, Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides, *Biotechnology advances*, 29(3), 272-277.
- [3]. Fosgerau, K., & Hoffmann, T., 2015, Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug discovery today*, 20(1), 122-128.
- [4]. Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nature biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
- [5]. Usmani, S. S., Bedi, G., Samuel, J. S., Singh, S., Kalra, S., Kumar, P., ... & Raghava, G. P., 2017, THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics, *PloS one*, 12(7), e0181748.
- [6]. Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S., & Price, D., 2013, The future of peptide- based drugs, *Chemical biology & drug design*, 81(1), 136-147.
- [7]. Cao, S. J., Xu, S., Wang, H. M., Ling, Y., Dong, J., Xia, R. D., & Sun, X. H., 2019, Nanoparticles: oral delivery for protein and peptide drugs, *AAPS PharmSciTech*, 20(5), 1-11.
- [8]. Bouttefeux, O., Belouqui, A., & Preat, V., 2016, Delivery of peptides via the oral route: diabetes treatment by peptide-loaded nanoparticles, *Current pharmaceutical design*, 22(9), 1161-1176.
- [9]. Lieberman, H. R., Corkin, S., Spring, B. J., Wurtman, R. J., & Growdon, J. H., 1985, The effects of dietary neurotransmitter precursors on human behavior, *The American journal of clinical nutrition*, 42(2), 366-370.
- [10]. Rasmussen, D. D., Ishizuka, B., Quigley, M. E., & Yen, S. S. C., 1983, Effects of tyrosine and tryptophan ingestion on plasma catecholamine and 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 57(4), 760-763.
- [11]. Gülçin, I., 2007, Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa, *Amino acids*, 32(3), 431.
- [12]. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K., 1996, Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein, *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(9), 2619-2623.
- [13]. Tankersley, R. W., 1964, Amino acid requirements of herpes simplex virus in human cells, *Journal of bacteriology*, 87(3), 609-613.
- [14]. Li, P., Yin, Y. L., Li, D., Kim, S. W., & Wu, G., 2007, Amino acids and immune function, *British Journal of Nutrition*, 98(2), 237-252.

- [15]. Simic, P., Sahm, H., & Eggeling, L., 2001, L-Threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*, *Journal of bacteriology*, 183(18), 5317-5324.
- [16]. Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., Mckechnie, S., & Donkor, O. N., 2015, Identification of anticancer peptides from bovine milk proteins and their potential roles in management of cancer: a critical review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2), 123-138.
- [17]. Otani, H., & Suzuki, H., 2003, Isolation and characterization of cytotoxic small peptides, α - caseidins, from bovine α s1- casein digested with bovine trypsin, *Animal Science Journal*, 74(5), 427-435.
- [18]. Chen, P., Bodor, N., Wu, W. M., & Prokai, L., 1998, Strategies to target kyotorphin analogues to the brain, *Journal of medicinal chemistry*, 41(20), 3773-3781.
- [19]. Uthuppan, J., & Soni, K., 2013, Conformational analysis: a review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(1), 34.
- [20]. Wiklund, F., 2013, *Metabolomics and Prostate Cancer*. <https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA583738>, [Ziyaret tarihi: 4 Kasım 2018].
- [21]. Friedman A.E., Chamborn J.C., Sauvage J.P., Turro N.J., Barton J.K., 1992, Novel Dipyridophenazine Complexes of Ruthenium(II): Exploring Luminescent Reporters of DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 114, 5919-5925.
- [22]. Abdi K., Hadadzadeh H., Weil M., Salimi M., 2012, Mononuclear Copper(II) Complex with Terpyridine and an Extended Phenanthroline Base, [Cu(Tpy)(Dppz)]²⁺: Synthesis, Crystal Structure, DNA Binding and Cytotoxicity Activity, *Polyhedron*, 31 (1), 638-648.
- [23]. Gok, B., 2017, *Anilin Benziliden Türevlerinin Biyolojik Aktivite ve Antimutajenik Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans, Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [24]. <https://www.britannica.com/science/amino-acid>, [Ziyaret tarihi: 4 Ağustos 2019].
- [25]. Barrett, G.C., and Elmore D.T., 1998, *Amino acids and peptides*, Cambridge University Press, Cambridge, London, ISBN: 978-1-1391-6382-8.
- [26]. Sewald, N. and Jakubke H.D., 2015, *Peptides: Chemistry and Biology*, 2nd ed., Wiley, Weinheim, Germany, ISBN: 978-3-527-80265-4.
- [27]. Agyei, D., Tan, K. X., Pan, S., Udenigwe, C. C., & Danquah, M. K., 2018, *Peptides for biopharmaceutical applications*, In *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, In: Koutsopoulos, S. (ed), Chapter 9, Woodhead Publishing, United Kingdom, ISBN: 978-0-08-100736-5, 231-251.
- [28]. Banga, A. K., 2015, *Therapeutic peptides and proteins: formulation, processing, and delivery systems*, 3rd ed., CRC press, Newyork, USA, ISBN: 978-1-4665-6607-1.

- [29]. Tekman, Ş., and Öner, N., 1998, *Genel biyokimya*, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Türkiye.
- [30]. Sun, L., 2013, Peptide-based drug development, *Mod Chem Appl*, 1(1), 1-2.
- [31]. Danquah, M. K., and Agyei, D., 2012, Pharmaceutical applications of bioactive peptides, *OA biotechnology*, 1(2), 1-7.
- [32]. Antosova, Z., Mackova, M., Kral, V., & Macek, T., 2009, Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever?, *Trends in biotechnology*, 27(11), 628-635.
- [33]. El- Sersy, N. A., Abdelwahab, A. E., Abouelkhiir, S. S., Abou- Zeid, D. M., & Sabry, S. A., 2012, Antibacterial and Anticancer activity of ϵ - poly- L- lysine (ϵ - PL) produced by a marine *Bacillus subtilis* sp, *Journal of basic microbiology*, 52(5), 513-522.
- [34]. Bertolo, R. F., Chen, C. Z., Law, G., Pencharz, P. B., & Ball, R. O., 1998, Threonine requirement of neonatal piglets receiving total parenteral nutrition is considerably lower than that of piglets receiving an identical diet intragastrically, *The Journal of nutrition*, 128(10), 1752-1759.
- [35]. Wang, W. W., Qiao, S. Y., & Li, D. F., 2009, Amino acids and gut function, *Amino acids*, 37(1), 105-110.
- [36]. Bala, K. A., Dogan, M., Mutluer, T., Kaba, S., Aslan, O., Balahoroglu, R., ... & Kocaman, S., 2016, Plasma amino acid profile in autism spectrum disorder (ASD), *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(5), 923-929.
- [37]. Priya, V. S. V., Roy, H. K., Jyothi, N., & Prasanthi, N. L., 2016, Polymers in drug delivery technology, types of polymers and applications, *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 5(7), 305-308.
- [38]. <https://byjus.com/jee/polymers/#Structure-of-Polymers> [Ziyaret Tarihi: 25 Mart 2020].
- [39]. <https://tr.strephonsays.com/difference-between-addition-polymerisation-and-condensation-polymerisation> [Ziyaret Tarihi: 25 Mart 2020].
- [40]. Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A., 2010, Polymers for drug delivery systems, *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 1, 149-173.
- [41]. Srivastava, A., Yadav, T., Sharma, S., Nayak, A., Kumari, A. A., & Mishra, N., 2015, Polymers in drug delivery, *Journal of Biosciences and Medicines*, 4(1), 69-84.
- [42]. Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Jacquot, M., & Desobry, S., 2010, Poly-Lactic Acid: production, applications, nanocomposites, and release studies, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(5), 552-571.
- [43]. Lakshmana Prabu, S., & Suriyaprakash, T. N. K., 2017, Role of Natural Polymers in Drug Delivery Systems as Challenging Ailments, *Novel Approaches in Drug Designing & Development*, 3(1), 19-23.

- [44]. Mohammed, M. A., Syeda, J., Wasan, K. M., & Wasan, E. K., 2017, An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery, *Pharmaceutics*, 9(4), 53.
- [45]. Divya, K., and Jisha, M. S., 2018, Chitosan nanoparticles preparation and applications, *Environmental chemistry letters*, 16(1), 101-112.
- [46]. Cheba, B. A., 2011, Chitin and chitosan: marine biopolymers with unique properties and versatile applications, *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 6(3), 149-153.
- [47]. Xie, W., Xu, P., & Liu, Q., 2001, Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(13), 1699-1701.
- [48]. Yıldırım, Z., Öncül, N., & Yıldırım, M., 2015, Kitosan ve antimikrobiyal özellikleri. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(1), 19-36.
- [49]. No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., & Meyers, S. P., 2002, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *International journal of food microbiology*, 74(1-2), 65-72.
- [50]. Illum, L., 1998, Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharmaceutical research*, 15(9), 1326-1331.
- [51]. Illum, L., and Davis, S., 2005, Chitosan as a delivery system for the transmucosal administration of drugs, *Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility*, 643-660.
- [52]. Kotzé, A. F., Hamman, J. H., Snyman, D., Jonker, C., & Stander, M., 2002, Mucoadhesive and absorption enhancing properties of N-trimethyl chitosan chloride, *Chitosan in pharmacy and chemistry*, 31-40.
- [53]. Rinaudo, M., 2006, Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.
- [54]. Dehaghi, S. M., Rahmanifar, B., Moradi, A. M., & Azar, P. A., 2014, Removal of permethrin pesticide from water by chitosan–zinc oxide nanoparticles composite as an adsorbent, *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(4), 348-355.
- [55]. Zhao, L. M., Shi, L. E., Zhang, Z. L., Chen, J. M., Shi, D. D., Yang, J., & Tang, Z. X., 2011, Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(3), 353-362.
- [56]. Woodruff, M. A., and Hutmacher, D. W., 2010, The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century, *Progress in polymer science*, 35(10), 1217-1256.
- [57]. Guarino, V., Gentile, G., Sorrentino, L., and Ambrosio, L., 2002, Polycaprolactone: Synthesis, properties, and applications, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 1-36.

- [58]. Soletti, L., Nieponice, A., Hong, Y., Ye, S. H., Stankus, J. J., Wagner, W. R., & Vorp, D. A., 2011, In vivo performance of a phospholipid- coated bioerodable elastomeric graft for small- diameter vascular applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96(2), 436-448.
- [59]. Bilensoy, E., Sarisozen, C., Esendağlı, G., Doğan, A. L., Aktaş, Y., Şen, M., & Mungan, N. A., 2009, Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors, *International journal of pharmaceutics*, 371(1-2), 170-176.
- [60]. Chawla, J. S., & Amiji, M. M., 2002, Biodegradable poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen, *International journal of pharmaceutics*, 249(1-2), 127-138.
- [61]. Bernabeu, E., Helguera, G., Legaspi, M. J., Gonzalez, L., Hocht, C., Taira, C., & Chiappetta, D. A., 2014, Paclitaxel-loaded PCL–TPGS nanoparticles: in vitro and in vivo performance compared with Abraxane®, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 43-50.
- [62]. Nasr, F.H., Khoei, S., Dehghan, M.M., Chaleshtori, S.S., & Shafiee, A., 2016, Preparation and evaluation of contact lenses embedded with polycaprolactone-based nanoparticles for ocular drug delivery, *Biomacromolecules*, 17(2), 485-495.
- [63]. Leroueil-Le Verger, M., Fluckiger, L., Kim, Y.I., Hoffman, M., & Maincent, P., 1998, Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46(2), 137-143.
- [64]. Lee, B.K., Yun, Y.H., and Park, K., 2015, Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities, *Chemical engineering science*, 125, 158-164.
- [65]. Singh, R., and Lillard Jr, J.W., 2009, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215-223.
- [66]. Shi, J., Kantoff, P.W., Wooster, R., & Farokhzad, O.C., 2017, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 20.
- [67]. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 [Ziyaret Tarihi: 27 Mart 2020]
- [68]. Yu, X., Trase, I., Ren, M., Duval, K., Guo, X., & Chen, Z., 2016, Design of nanoparticle-based carriers for targeted drug delivery, *Journal of nanomaterials*, 2016.
- [69]. Wang, X., Yang, L., Chen, Z., and Shin, D.M., 2008, Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging, *CA: a cancer journal for clinicians*, 58(2), 97-110.
- [70]. Liyanage, P.Y., Hettiarachchi, S.D., Zhou, Y., Ouhtit, A., Seven, E.S., Oztan, C.Y., ... & Leblanc, R.M., 2019, Nanoparticle-mediated targeted drug delivery for breast cancer treatment, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1871(2), 419-433.
- [71]. Kavaz, D., 2011, Nanopartiküller, *Nanobülten*, 13, 12-19.

- [72]. Tüylek, Z., 2019, İlaç Taşıyıcı Nanosistemler, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 28(3), 184-192.
- [73]. Mi, Y., Zhao, J., & Feng, S.S., 2012, Vitamin E TPGS prodrug micelles for hydrophilic drug delivery with neuroprotective effects, *International journal of pharmaceutics*, 438(1-2), 98-106.
- [74]. Kecel-Gunduz, S., Bicak, B., and Ozel, A. E., 2020, *Drug delivery nanosystems for neural regenerative medicine*, In Neural Regenerative Nanomedicine, In: Razavi, M. (ed.), Chapter 4, Academic Press, United Kingdom, ISBN: 978-0-12-820223-4, 89-122.
- [75]. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., ... & Nejati-Koshki, K., 2013, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale research letters*, 8(1), 1-9.
- [76]. Sayiner, Ö., and Çomoğlu, T., 2016, Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 40(3), 62-79.
- [77]. Kahraman, E., and Özsoy, Y., 2011, Polimerik Miseller ve Nazal Yol ile Uygulanmaları Polymeric Micelles and Its Nasal Applications, *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 41, 121-139.
- [78]. Escobar-Chávez, J. J., Rodríguez-Cruz, I.M., Domínguez-Delgado, C.L., Díaz-Torres, R., Revilla-Vázquez, A.L., and Aléncaster, N.C., 2012, *Nanocarrier systems for transdermal drug delivery*. Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems, In: Sezer, A.D. (ed.), InTech, Chapter 8, Rijeka, Croatia, ISBN: 978-953-51-0810-8, 201-239.
- [79]. Chan, J. M., Valencia, P.M., Zhang, L., Langer, R., & Farokhzad, O.C., 2010, *Polymeric nanoparticles for drug delivery*, Cancer Nanotechnology, In: Grobmyer, A.R., Moudgil, B.M. (ed.), Humana Press, Chapter 11, United States, ISBN: 978-149-39-6120-7, 163-175.
- [80]. Calzoni, E., Cesaretti, A., Polchi, A., Di Michele, A., Tancini, B., & Emiliani, C., 2019, Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies, *Journal of functional biomaterials*, 10(1), 4.
- [81]. Şengel-Türk, C.T., Haşıçek, C., and Gönül, N., 2007, Beyne ilaç hedeflendirilmesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, *Journal of Neurological Sciences*, 24(3), 254-263.
- [82]. Derman, S., Kızılbey, K., and Akdeste, Z. M., 2013, Polymeric nanoparticles, *Sigma*, 31, 107-120.
- [83]. Selvamani, V., 2019, *Stability studies on nanomaterials used in drugs*. In Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery, In: Mohapatra, S., Ranjan, S., Thomas, S. (ed.), Chapter 15, Elsevier, United Kingdom, ISBN: 978-0-12-814031-4, 425-444.
- [84]. Dalgakıran, E., 2006, *Poliakrilik asidin bovine serum albumin ile etkileşiminin dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleri ile araştırılması*, Yüksek Lisans, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [85]. <https://merlab.metu.edu.tr/tr/zeta-potansiyel-ve-mobilite-olcum-cihazı> [Ziyaret Tarihi: 3 Ağustos 2019].
- [86]. <https://merlab.metu.edu.tr/tr/system/files/Belgeler/TanitimBrosurleri/PZL.pdf> [Ziyaret Tarihi: 3 Ağustos 2019].
- [87]. <https://atomikateknik.com/uploads/belgeler/polidispers-sistemlerin-zetasizer-karakterizasyonu-34477.pdf> [Ziyaret Tarihi: 19 Haziran 2021].
- [88]. Kumar, D., 2012, *Co-Functionalised Gold Nanoparticles for Drug Delivery Applications*, PhD Thesis, University of Ulster, Faculty of Computing & Engineering.
- [89]. https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html [Ziyaret Tarihi: 12 Ocak 2021].
- [90]. <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/> [Ziyaret Tarihi: 12 Ocak 2021].
- [91]. Kuruoğlu, F., 2018, *Nano yapılu uçucu olmayan bellek aygıtlarının üretimi ve karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [92]. Smith, B. C., 2011, *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*, CRC press, 2nd ed., Newyork, USA, ISBN: 978-1-4200-6930-3.
- [93]. <https://www.coursehero.com/file/6170728/IRtheory/> [Ziyaret Tarihi: 29 Temmuz 2019].
- [94]. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R., 2017, *Principles of instrumental analysis*, Cengage learning, 7nd ed., Boston, USA, ISBN:978-1-305-57721-3.
- [95]. https://serc.carleton.edu/NAGTWorkshops/mineralogy/mineral_physics/raman_ir.html#Inst [Ziyaret Tarihi: 29 Temmuz 2019].
- [96]. Stuart, B., 2000, *Infrared spectroscopy*, Kirk- Othmer encyclopedia of chemical technology, In: Seidel, A., 5th ed., Wiley, Hoboken, ISBN: 9780471238966, 1–18.
- [97]. Serdyuk, I. N., Zaccai, N. R., & Zaccai, J., 2007, *Methods in molecular biophysics: structure, dynamics, function*, Cambridge University Press, 2nd ed., United Kingdom, ISBN: 978-1-1070-5637-4.
- [98]. <http://mtweb.mtsu.edu/nchong/Spectroscopy-CHEM6230.pdf> [Ziyaret Tarihi: 10 Ağustos 2019].
- [99]. Wartewig, S., 2006, *IR and Raman spectroscopy: fundamental processing*, John Wiley & Sons, Weinheim, Germany, ISBN: 3-527-30245-X.
- [100]. <https://web.ist.utl.pt/berberan/PQF/JCE%20Perkins%201986.pdf> [Ziyaret Tarihi: 21 Şubat 2021].
- [101]. <https://www.jasco.co.uk/ftir.html#tab1> [Ziyaret Tarihi: 21 Şubat 2021].
- [102]. https://en.wikipedia.org/wiki/Frequency_modulation [Ziyaret Tarihi: 21 Şubat 2021].

- [103]. Haykin, S., 2001, *Communication Systems*, 4th ed., John Wiley & Sons Inc., USA, ISBN: 0-471-17869-1.
- [104]. https://en.wikipedia.org/wiki/Frequency_modulation [Ziyaret Tarihi: 21 Şubat 2021].
- [105]. https://en.wikipedia.org/wiki/Fourier_analysis [Ziyaret Tarihi: 21 Şubat 2021].
- [106]. Rabiner, L. R. Gold, B., 1975, *Theory and Application of Digital Signal Processing*, Englewood Cliffs, NJ.
- [107]. Subramanian, A., and Rodriguez-Saona, L., 2009, *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*, Infrared spectroscopy for food quality analysis and control, Academic Press Oxford, 145-178.
- [108]. https://en.wikipedia.org/wiki/Independent_component_analysis [Ziyaret Tarihi: 21 Kasım 2020].
- [109]. https://en.wikipedia.org/wiki/Savitzky%E2%80%93Golay_filter [Ziyaret Tarihi: 21 Kasım 2020].
- [110]. http://instructor.physics.lsa.umich.edu/adv-labs/Raman_Spectroscopy/Raman_spect.pdf [Ziyaret Tarihi: 21 Kasım 2020].
- [111]. Long, D. A., 2005, Introductory raman spectroscopy. john r. ferraro, kazuo nakamoto and chris w. brown. academic press, amsterdam, 2003. xiii+ 434, *Journal of Raman Spectroscopy*, 36(10), 1012-1012.
- [112]. <https://www.sas.upenn.edu/~crulli/TheRamanSpectrophotometer.html> [Ziyaret Tarihi: 21 Kasım 2020].
- [113]. Erdik, E., 2008, *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler* 5. Baskı. Gazi Kitabevi, Ankara.
- [114]. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51384/mod_resource/content/0/UV%20Spektroskopisi.pdf [Ziyaret Tarihi: 21 Kasım 2020].
- [115]. Schmid, F. X., 2001, *Biological macromolecules: UV- visible spectrophotometry*. e LS.
- [116]. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/7906/mod_resource/content/0/5.%20hafta.pdf [Ziyaret Tarihi: 21 Temmuz 2020].
- [117]. <https://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/hkutuk/120963/UV.pdf> [Ziyaret Tarihi: 22 Temmuz 2020].
- [118]. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51384/mod_resource/content/0/UV%20Spektroskopisi.pdf [Ziyaret Tarihi: 21 Temmuz 2020].
- [119]. http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/blog-page_918.html [Ziyaret Tarihi: 22 Temmuz 2020].

- [120]. Deshmukh, R., Wagh, P., & Naik, J., 2016, Solvent evaporation and spray drying technique for micro-and nanospheres/particles preparation: A review, *Drying technology*, 34(15), 1758-1772.
- [121]. Lee, S. J., & McClements, D. J., 2010, Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach, *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 560-569.
- [122]. O'Donnell, P. B., & McGinity, J. W., 1997, Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Advanced drug delivery reviews*, 28(1), 25-42.
- [123]. Shinde, N. C., Keskar, N. J., & Argade, P. D., 2012, Nanoparticles: Advances in drug delivery systems, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, 3, 922-929.
- [124]. Özer, S., 2018, *Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve İn Vitro Salım Çalışmaları*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [125]. Mohanraj, V. J., & Chen, Y., 2006, Nanoparticles-a review, *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573.
- [126]. Kumar, B., Jalodia, K., Kumar, P., & Gautam, H. K., 2017, Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 41, 260-268.
- [127]. Shaikh, S. A., & Jayaram, B., 2004, DNA drug interaction, *Supercomputing Facility for Bioinformatics and Computational Biology*, 1-8.
- [128]. Uşa, T.Y., 2020, *Rosmarinus Officinalis L. (Biberiye) Ekstraktı Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Et Ürünleri Korunmasında Kullanımı İçin Sentezi Ve Karakterizasyonu*, Lisans Bitirme Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya ve Metalurji Fakültesi.
- [129]. Egil, A. C., 2018, *Encapsulation Of Epilobium Parviflorum Extract With Chitosan Nanoparticles*, Lisans Bitirme Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya ve Metalurji Fakültesi.
- [130]. Fox, K. R., 1997, Drug-DNA interaction protocols, Humana Press, NJ, ISBN: 978-1-59259-574-7.
- [131]. Strekowski, L., & Wilson, B., 2007, Noncovalent interactions with DNA: an overview, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623(1-2), 3-13.
- [132]. Kecel-Gunduz, S., Budama-Kilinc, Y., Gok, B., Bicak, B., Akman, G., Arvas, B., ... & Yolacan, C., 2021, Computer-aided anticancer drug design: In vitro and in silico studies of new iminocoumarin derivative, *Journal of Molecular Structure*, 1239, 130539.
- [133]. Marmur, J., 1961, A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of molecular biology*, 3(2), 208-IN1.

- [134]. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20TR/bolum5.pdf> [Ziyaret Tarihi: 14 Ekim 2020].
- [135]. Cortes-Dericks, L., Carboni, G. L., Schmid, R. A., & Karoubi, G., 2010, Putative cancer stem cells in malignant pleural mesothelioma show resistance to cisplatin and pemetrexed, *International journal of oncology*, 37(2), 437-444.
- [136]. Prabhakaran, P., Hassiotou, F., Blancafort, P., Filgueira, L., 2013, Cisplatin induces differentiation of breast cancer cells, *Front Oncol.*, 3, 134.
- [137]. Rathinam, R., Ghosh, S., Neumann, W.L., Jamesdaniel, S., 2015, Cisplatin-induced apoptosis in auditory, renal, and neuronal cells is associated with nitration and downregulation of LMO4, *Cell Death Discov.*, 1, 15052.
- [138]. Tundo, G.R., Sbardella, D., Ciaccio, C., De Pascali, S., Campanella, V., Cozza, P., Tarantino, U., Coletta, M., Fanizzi, F.P., Marini, S., 2015, Effect of cisplatin on proteasome activity, *J Inorg Biochem*, 153, 253-258.
- [139]. Horibe, S., Matsuda, A., Tanahashi, T., Inoue, J., Kawauchi, S., Mizuno, S., Ueno, M., Takahashi, K., Maeda, Y., Maegouchi, T., Murakami, Y., Yumoto, R., Nagai, J., Takano, M., 2015, Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins, *Life Sci.*, 124, 31-40.
- [140]. Özcan, F.G., Dağdeviren, Ö., Akman, G., Khalilia, W., Tezel, B. , Karagöz, A., Melikoğlu, G., Anıl, S., Kültür, Ş., Sütülpınar, N., 2016, Screening for antitumour activity of various plant extracts on HeLa and C 4-I cell lines, *Journal Of BUON*, 21, 13-24.
- [141]. Vlachakis, D., 2007, *An Introduction to Molecular Modelling, from theory to application*. University of Cardiff, Wales, UK, ISBN: 978-0-6151-7606-2.
- [142]. Ramachandran, K. I., Deepa, G., & Namboori, K., 2008, *Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications*, Springer Science & Business Media, Berlin, Germany, ISBN: 978-3-540-77302-3.
- [143]. Lipkowitz, K. B., & Boyd, D. B., 1995, *Reviews in Computational Chemistry*, Wiley, ISBN: 978-0-4703-8839-6.
- [144]. Udenfriend, S., Meienhofer, J., & Hruby, V. J., 2014, *Conformation in Biology and Drug Design: The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology (Vol. 7)*, Elsevier, ISBN: 0-12-304207-0.
- [145]. Ramachandran, G.N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V., 1963, Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. mol. Biol*, 7, 95-99.
- [146]. Ramachandran, G. T., & Sasisekharan, V., 1968, Conformation of polypeptides and proteins, *Advances in protein chemistry*, 23, 283-437.
- [147]. Kecel, S., 2009, *Pro-Tyr, Glu-Asn Ve Ala-Gln Dipeptidlerinin Konformasyon Analizi ve Ab-Initio DFT Yöntemleri ile Titreşim Frekans ve Kiplerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [148]. Bıçak, B., 2014, Met-Ser Dipeptidinin Titreşim Frekans ve Kiplerinin Konformasyon Analizi Ve Ab-Initio DFT Yöntemleri ile İncelenmesi, Yüksel Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [149]. <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/161Ahydrogenbond.html> [Ziyaret Tarihi: 12 Ocak 2020].
- [150]. https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/structure/molecular_interactions/mol_int.html#E [Ziyaret Tarihi: 12 Ocak 2020].
- [151]. Brant, D. A., Miller, W. G., & Flory, P. J., 1967, Conformational energy estimates for statistically coiling polypeptide chains, *Journal of Molecular Biology*, 23(1), 47-65.
- [152]. Gocayev N., Akyuz S., Akverdiyeva G.A, 1997, A Molecular Mechanics Conformational Study of Peptid T, *J.Mol.Struc*, 403, 95-110.
- [153]. <http://www.ncbr.muni.cz/~martinp/C3210/StructBioinf7.pdf> [Ziyaret Tarihi: 12 Ocak 2020].
- [154]. http://glycam.org/legacy_courses/2013/MolecularModeling2013/lectureNotes/CH332_L2_ForceFields.pdf [Ziyaret Tarihi: 12 Temmuz 2019].
- [155]. http://www.chm.bris.ac.uk/pt/ajm/mmhtm/MM_L2p1.htm [Ziyaret Tarihi: 12 Temmuz 2019].
- [156]. <http://faculty.uml.edu/vbarsegov/teaching/bioinformatics/lectures/MDEnsemblesModified.pdf> [Ziyaret Tarihi: 13 Temmuz 2019].
- [157]. Braun, E., Gilmer, J., Mayes, H. B., Mobley, D. L., Monroe, J. I., Prasad, S., & Zuckerman, D. M., 2018, Best Practices for Foundations in Molecular Simulations, *Living Journal of Computational Molecular Science*, 1(1), 5957.
- [158]. Allen, M. P., 2004, Introduction to molecular dynamics simulation, *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins*, 23, 1-28.
- [159]. https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/tutorial/NCSA2002/pdf/01_intro_to_md.pdf [Ziyaret Tarihi: 14 Temmuz 2019].
- [160]. Kotelyanskii, M., & Theodorou, D. N., 2004, Simulation methods for polymers, CRC Press, NewYork, USA, ISBN: 0-8247-0247-6.
- [161]. Halitoglu, S., 2008, *Poliimid Gaz Ayırma Membranlarının Moleküler Simulasyonu*, Master Thesis, ITU.
- [162]. http://www.nus.edu.sg/comcen/svu/publications/hpc_nus/jun_2006/mdsoftware.pdf [Ziyaret Tarihi: 18 Temmuz 2019].
- [163]. http://www.gromacs.org/About_Gromacs [Ziyaret Tarihi: 18 Temmuz 2019].

- [164]. Holtje, H. D., Folkers, G., Mannhold, R., Kubinyi, H., & Timmerman, H., 1997, *Molecular modeling: basic principles and applications*, John Wiley & Sons, Inc., ISBN: 3-527-29384-1.
- [165]. Sholl, D., & Steckel, J. A., 2011, *Density functional theory: a practical introduction*, John Wiley & Sons, Canada, ISBN: 978-0-470-37317-0.
- [166]. Lewars, E., 2003, Computational chemistry, *Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*, 318.
- [167]. Hehre, W. J., Lathan, W. A., Ditchfield, R., Newton, M. D., & Pople, J. A., 1970, Gaussian 70. *Quantum Chemistry Program Exchange*, 236.
- [168]. Khan T, Lawrence AJ, Azad I, Raza S, Khan AR, 2018, Molecular Docking Simulation with Special Reference to Flexible Docking Approach, *JSM Chem*, 6(1), 1053.
- [169]. Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M., 2011, Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery, *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.
- [170]. McConkey, B. J., Sobolev, V., & Edelman, M., 2002, The performance of current methods in ligand-protein docking, *Current Science*, 83, 845-856.
- [171]. Ece, A., 2016, Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımına Giriş ve Moleküller Arası Etkileşimler, 2. *Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı Kursu (Uygulamalı)*, 16-17 Mayıs 2016, Biruni Üniversitesi, İstanbul, 1.
- [172]. Huang, S. Y., & Zou, X., 2010, Advances and challenges in protein-ligand docking. *International journal of molecular sciences*, 11(8), 3016-3034.
- [173]. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., ... & Shenkin, P. S., 2004, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring, 1. Method and assessment of docking accuracy, *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1739-1749.
- [174]. Ewing, T. J., Makino, S., Skillman, A. G., & Kuntz, I. D., 2001, DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases, *Journal of computer-aided molecular design*, 15(5), 411-428.
- [175]. shodhganga.inflibnet.ac.in/jspui/.../2/chapter%201.pdf [Ziyaret Tarihi: 19 Temmuz 2020]
- [176]. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., & Olson, A. J., 1996, Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4, *Journal of computer-aided molecular design*, 10(4), 293-304.
- [177]. Sochacka, J., 2014, Docking of thiopurine derivatives to human serum albumin and binding site analysis with Molegro Virtual Docker, *Acta Pol. Pharm*, 71, 343-349.

- [178]. Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E., 2014, Receptor–ligand molecular docking, *Biophysical reviews*, 6(1), 75-87.
- [179]. Dastmalchi, S., 2016, *Methods and Algorithms for Molecular Docking-based Drug Design and Discovery*, IGI Global, USA, ISBN: 9781522501169.
- [180]. Jain, A. N., 2006, Scoring functions for protein-ligand docking, *Current Protein and Peptide Science*, 7(5), 407-420.
- [181]. Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G., & Andricopulo, A., 2015, Molecular docking and structure-based drug design strategies, *Molecules*, 20(7), 13384-13421.
- [182]. Jain, A. N., 1996, Scoring noncovalent protein-ligand interactions: a continuous differentiable function tuned to compute binding affinities, *Journal of computer-aided molecular design*, 10(5), 427-440.
- [183]. Head, R. D., Smythe, M. L., Oprea, T. I., Waller, C. L., Green, S. M., & Marshall, G. R., 1996, VALIDATE: A new method for the receptor-based prediction of binding affinities of novel ligands, *Journal of the American Chemical society*, 118(16), 3959-3969.
- [184]. Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V., & Mee, R. P., 1997, Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes, *Journal of computer-aided molecular design*, 11(5), 425-445.
- [185]. Böhm, H. J., 1994, The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure, *Journal of computer-aided molecular design*, 8(3), 243-256.
- [186]. Wang, R., Liu, L., Lai, L., & Tang, Y., 1998, SCORE: A new empirical method for estimating the binding affinity of a protein-ligand complex, *Molecular modeling annual*, 4(12), 379-394.
- [187]. Böhm, H. J., 1998, Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs, *Journal of computer-aided molecular design*, 12(4), 309-309.
- [188]. Krammer, A., Kirchhoff, P. D., Jiang, X., Venkatachalam, C. M., & Waldman, M., 2005, LigScore: a novel scoring function for predicting binding affinities, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23(5), 395-407.
- [189]. Gehlhaar, D. K., Verkhivker, G. M., Rejto, P. A., Sherman, C. J., Fogel, D. R., Fogel, L. J., & Freer, S. T., 1995, Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming, *Chemistry & biology*, 2(5), 317-324.
- [190]. Gehlhaar, D. K., Bouzida, D., & Rejto, P. A., 1999, *Rational drug design: novel methodology and practical applications*. In ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington DC, USA, 719, 292-311.

- [191]. Wang, R., Lai, L., & Wang, S., 2002, Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction, *Journal of computer-aided molecular design*, 16(1), 11-26.
- [192]. Morris, G. M., & Lim-Wilby, M., 2008, *Molecular docking*, In Molecular modeling of proteins, Humana Press, NJ, ISBN: 978-1-59745-177-2, 365-382.
- [193]. Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L., 2004, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening, *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1750-1759.
- [194]. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., ... & Mainz, D. T., 2006, Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes, *Journal of medicinal chemistry*, 49(21), 6177-6196.
- [195]. Trott, O., & Olson, A. J., 2010, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- [196]. Lipinski, C. A., 2004, Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337-341.
- [197]. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J., 1997, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.
- [198]. Brown, N., 2015, *In Silico Medicinal Chemistry: Computational Methods to Support Drug Design*, Royal Society of Chemistry, UK, ISBN: 978-1-78262-260-4.
- [199]. Xu, P., Zhang, H., Dang, R., & Jiang, P., 2018, Peptide and Low Molecular Weight Proteins Based Kidney Targeted Drug Delivery Systems, *Protein and peptide letters*, 25(6), 522-527.
- [200]. Hefti, F. F., 2008, Requirements for a lead compound to become a clinical candidate, *BMC neuroscience*, 9(3), S7.
- [201]. Tihanyi, K., & Vastag, M., 2011, *Solubility, delivery and ADME problems of drugs and drug-candidates*, Bentham Science Publishers, ISBN: 978-1-60805-120-5.
- [202]. Mannhold, R., Kubinyi, H., & Folkers, G., 2008, *Molecular drug properties: measurement and prediction*, Wiley-VCH, 37th edition, Darmstadt, ISBN: 978-527-31755-4.
- [203]. Pajouhesh, H., & Lenz, G. R., 2005, Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs, *NeuroRx*, 2(4), 541-553.
- [204]. Hitchcock, S. A., and Pennington, L. D., 2006, Structure– brain exposure relationships, *Journal of medicinal chemistry*, 49(26), 7559-7583.

- [205]. van de Waterbeemd, H., & Kansy, M., 1992, Hydrogen-bonding capacity and brain penetration, *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 46(7-8), 299-303.
- [206]. van De Waterbeemd, H., Camenisch, G., Folkers, G., & Raevsky, O. A., 1996, Estimation of Caco- 2 cell permeability using calculated molecular descriptors, *Quantitative Structure- Activity Relationships*, 15(6), 480-490.
- [207]. Ertl, P., Rohde, B., & Selzer, P., 2000, Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, *Journal of medicinal chemistry*, 43(20), 3714-3717.
- [208]. Castillo- Garit, J. A., Marrero- Ponce, Y., Torrens, F., & García- Domenech, R., 2008, Estimation of ADME properties in drug discovery: Predicting Caco- 2 cell permeability using atom- based stochastic and non- stochastic linear indices, *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(5), 1946-1976.
- [209]. Yee, S., 1997, In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth, *Pharmaceutical research*, 14(6), 763-766.
- [210]. Chaturvedi, P. R., Decker, C. J., & Odinecs, A., 2001, Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(4), 452-463.
- [211]. O'Brien, L. E., Zegers, M. M., & Mostov, K. E., 2002, Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models, *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(7), 531.
- [212]. Irvine, J. D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J. W., Selick, H. E., & Grove, J. R., 1999, MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening, *Journal of pharmaceutical sciences*, 88(1), 28-33.
- [213]. Ranade, V. V., and Cannon, J. B., 2011, *Drug delivery systems*, 3th edition, CRC press, NW, ISBN: 978-1-4398-0618-0.
- [214]. Carpenter, T. S., Kirshner, D. A., Lau, E. Y., Wong, S. E., Nilmeier, J. P., & Lightstone, F. C., 2014, A method to predict blood-brain barrier permeability of drug-like compounds using molecular dynamics simulations, *Biophysical journal*, 107(3), 630-641.
- [215]. Lexa, K. W., Dolgih, E., & Jacobson, M. P., 2014, A structure-based model for predicting serum albumin binding, *PLoS One*, 9(4), e93323.
- [216]. Simard, J. R., Zunszain, P. A., Hamilton, J. A., & Curry, S., 2006, Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis, *Journal of molecular biology*, 361(2), 336-351.
- [217]. He, X. M., & Carter, D. C., 1992, Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature*, 358(6383), 209.

- [218]. <https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/ADME/distribution.html> [Ziyaret Tarihi: 17 Mart 2021].
- [219]. Howard, M. L., Hill, J. J., Galluppi, G. R., & McLean, M. A., 2010, Plasma protein binding in drug discovery and development. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 13(2), 170-187.
- [220]. Kratz, F., & Elsadek, B., 2012, Clinical impact of serum proteins on drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 161(2), 429-445.
- [221]. Benet, L. Z., Kroetz, D., Sheiner, L., Hardman, J., & Limbird, L., 1996, Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, metabolism, and elimination, *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 3-27.
- [222]. Saraç, K., 2017, 4-Klorometil-6-etoksikumarin bileşiğinin deneysel ve kuantum kimyasal hesaplamaları, *Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi-B Teorik Bilimler*, 5(2), 120-128.
- [223]. Tanış, E., 2017, 2-metil-1h-benzimidazol-5-karboksilik asit molekülünün yapısal ve titreşimsel spektrumlarının teorik ve deneysel olarak incelenmesi, *Sakarya University Journal of Science*, 21(3), 545-563.
- [224]. Zhang, G., & Musgrave, C. B., 2007, Comparison of DFT methods for molecular orbital eigenvalue calculations, *The journal of physical chemistry A*, 111(8), 1554-1561.
- [225]. Raja, M., Muhamed, R. R., Muthu, S., & Suresh, M., 2017, Synthesis, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, NMR, UV-Visible), NLO, NBO, HOMO-LUMO, Fukui function and molecular docking study of (E)-1-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene) semicarbazide, *Journal of Molecular Structure*, 1141, 284-298.
- [226]. Govindarajan, M., Periandy, S., & Carthigayen, K., 2012, FT-IR and FT-Raman spectra, thermo dynamical behavior, HOMO and LUMO, UV, NLO properties, computed frequency estimation analysis and electronic structure calculations on α -bromotoluene, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 97, 411-422.
- [227]. Kuruvilla, T. K., Prasana, J. C., Muthu, S., George, J., & Mathew, S. A., 2018, Quantum mechanical and spectroscopic (FT-IR, FT-Raman) study, NBO analysis, HOMO-LUMO, first order hyperpolarizability and molecular docking study of methyl [(3R)-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropyl]. amine by density functional method, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 188, 382-393.
- [228]. Saranya, M., Ayyappan, S., Nithya, R., Sangeetha, R. K., & Gokila, A., 2018, Molecular Structure, NBO and HOMO-LUMO Analysis of Quercetin On Single Layer Graphene By Density Functional Theory, *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 13(1).
- [229]. <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/211elecpotential.html> [Ziyaret Tarihi: 31 Ekim 2019].

- [230]. Velraj, G., Soundharam, S., & Sridevi, C., 2014, Structure, vibrational, electronic, NBO and NMR analyses of 3-methyl-2, 6-diphenylpiperidin-4-one (MDPO) by experimental and theoretical approach, *Journal of molecular structure*, 1060, 156-165.
- [231]. Karabacak, M., Sinha, L., Prasad, O., Cinar, Z., & Cinar, M., 2012, The spectroscopic (FT-Raman, FT-IR, UV and NMR), molecular electrostatic potential, polarizability and hyperpolarizability, NBO and HOMO–LUMO analysis of monomeric and dimeric structures of 4-chloro-3, 5-dinitrobenzoic acid, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 93, 33-46.
- [232]. Sajan, D., Joe, H., Jayakumar, V. S., & Zaleski, J., 2006, Structural and electronic contributions to hyperpolarizability in methyl p-hydroxy benzoate, *Journal of Molecular Structure*, 785(1-3), 43-53.
- [233]. Calaminici, P., Jug, K., & Köster, A. M., 1998, Density functional calculations of molecular polarizabilities and hyperpolarizabilities, *The Journal of chemical physics*, 109(18), 7756-7763.
- [234]. Muthu, S., & Paulraj, E. I., 2012, Molecular structure, vibrational spectra, first order hyper polarizability, NBO and HOMO–LUMO analysis of 4-amino-3 (4-chlorophenyl) butanoic acid, *Solid state sciences*, 14(4), 476-487.
- [235]. Weinhold, F., & Landis, C. R., 2005, *Valency and bonding: a natural bond orbital donor-acceptor perspective*, Cambridge University Press, UK, ISBN: 0-521-83128-8.
- [236]. Chaitanya, K., 2012, Molecular structure, vibrational spectroscopic (FT-IR, FT-Raman), UV–vis spectra, first order hyperpolarizability, NBO analysis, HOMO and LUMO analysis, thermodynamic properties of benzophenone 2, 4-dicarboxylic acid by ab initio HF and density functional method, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 86, 159-173.
- [237]. Glendening, E. D., Landis, C. R., & Weinhold, F., 2012, Natural bond orbital methods, *Wiley interdisciplinary reviews: computational molecular science*, 2(1), 1-42.
- [238]. <https://nbo6.chem.wisc.edu/tutorial.html> [Ziyaret Tarihi: 8 Kasım 2019].
- [239]. Gaur, R., & Mishra, L., 2013, Bi-nuclear Ru (II) complexes of bis-chalcone and bis-flavonol: synthesis, characterization, photo cleavage of DNA and Topoisomerase I inhibition, *RSC advances*, 3(30), 12210-12219.
- [240]. Houk, K. N., Menzer, S., Newton, S. P., Raymo, F. M., Stoddart, J. F., & Williams, D. J., 1999, [C– H⊙⊙⊙ O] Interactions as a Control Element in Supramolecular Complexes: Experimental and Theoretical Evaluation of Receptor Affinities for the Binding of Bipyridinium-Based Guests by Catenated Hosts1, *Journal of the American Chemical Society*, 121(7), 1479-1487.
- [241]. Chen, Z. F., Mao, L., Liu, L. M., Liu, Y. C., Peng, Y., Hong, X., ... & Liang, H., 2011, Potential new inorganic antitumour agents from combining the anticancer traditional Chinese medicine (TCM) matrine with Ga (III), Au (III), Sn (IV) ions, and DNA binding studies, *Journal of inorganic biochemistry*, 105(2), 171-180.

- [242]. Novoa, J. J., & Mota, F., 2000, The C–H... π bonds: strength, identification, and hydrogen-bonded nature: a theoretical study, *Chemical Physics Letters*, 318(4-5), 345-354.
- [243]. Shah, A., Qureshi, R., Janjua, N. K., Haque, S., & Ahmad, S., 2008, Electrochemical and spectroscopic investigations of protonated ferrocene-DNA intercalation, *Analytical Sciences*, 24(11), 1437-1441.
- [244]. Alpaslan, G., Boyacioglu, B., Demir, N., Tümer, Y., Yapar, G., Yıldırım, N., ... & Ünver, H., 2019, Synthesis, characterization, biological activity and theoretical studies of a 2-amino-6-methoxybenzothiazole-based fluorescent Schiff base, *Journal of Molecular Structure*, 1180, 170-178.
- [245]. Barton, J. K., & Raphael, A. L., 1984, Photoactivated stereospecific cleavage of double-helical DNA by cobalt (III) complexes, *Journal of the American Chemical Society*, 106(8), 2466-2468.
- [246]. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V., 2017, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Scientific reports*, 7, 42717.
- [247]. Liu, C., Zhou, J., Li, Q., Wang, L., Liao, Z., & Xu, H., 1999, DNA damage by copper (II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities, *Journal of inorganic biochemistry*, 75(3), 233-240.
- [248]. Shahabadi, N., Mohammadi, S., & Alizadeh, R., 2011, DNA interaction studies of a new platinum (II) complex containing different aromatic dinitrogen ligands, *Bioinorganic chemistry and applications*, 2011.
- [249]. Xiao, Y. N., & Zhan, C. X., 2002, Studies on the interaction of DNA and water- soluble polymeric Schiff base–nickel complexes, *Journal of applied polymer science*, 84(5), 887-893.
- [250]. Geierstanger, B. H., and Wemmer, D. E., 1995, Complexes of the minor groove of DNA. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 24(1), 463-493.
- [251]. Arif, R., Rana, M., Yasmeen, S., Khan, M. S., Abid, M., & Khan, M. S., 2020, Facile synthesis of chalcone derivatives as antibacterial agents: Synthesis, DNA binding, molecular docking, DFT and antioxidant studies, *Journal of Molecular Structure*, 1208, 127905.
- [252]. Li, A. P., 2001, Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery, *Drug discovery today*, 6(7), 357-366.
- [253]. Weaver, D. F., 2009, Book Review of Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction, *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 2, 579.
- [254]. Gupta, M., Bogdanowicz, T., Reed, M. A., Barden, C. J., & Weaver, D. F., 2019, The brain exposure efficiency (BEE) score, *ACS chemical neuroscience*, 11(2), 205-224.

- [255]. Lloyd, E. J., & Andrews, P. R., 1986, A common structural model for central nervous system drugs and their receptors, *Journal of medicinal chemistry*, 29(4), 453-462.
- [256]. de la Nuez, A., and Rodríguez, R., 2008, Current methodology for the assessment of ADME-Tox properties on drug candidate molecules, *Biotecnología Aplicada*, 25(2), 97-110.
- [257]. Szumilak, M., Lewgowd, W. I. E. S. Ł. A. W. A., & Stanczak, A., 2016, In silico ADME studies of polyamine conjugates as potential anticancer drugs, *Acta Pol. Pharm*, 73, 717-723.
- [258]. Brennen, W. N., & Isaacs, J. T., 2017, Cellular origin of androgen receptor pathway-independent prostate cancer and implications for therapy, *Cancer Cell*, 32(4), 399-401.
- [259]. Davey, R. A., and Grossmann, M., 2016, Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside, *The Clinical Biochemist Reviews*, 37(1), 3.
- [260]. Yeh, C. R., Da, J., Song, W., Fazili, A., & Yeh, S., 2014, Estrogen receptors in prostate development and cancer, *American journal of clinical and experimental urology*, 2(2), 161.
- [261]. Fujimura, T., Takayama, K., Takahashi, S., & Inoue, S., 2019, Estrogen and androgen blockade for advanced prostate cancer in the era of precision medicine, *The Road from Nanomedicine to Precision Medicine*, 901-929.
- [262]. Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Botstein, D., 2000, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, 406(6797), 747-752.
- [263]. Reis-Filho, J. S., & Pusztai, L., 2011, Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction, *The Lancet*, 378(9805), 1812-1823.
- [264]. Erzurumlu, Y., 2021, Prostat Kanseri: Androjen Reseptörü Sinyal Mekanizması. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 28(1), 187-198.
- [265]. Yun, C. H., Boggon, T. J., Li, Y., Woo, M. S., Greulich, H., Meyerson, M., & Eck, M. J., 2007, Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity, *Cancer cell*, 11(3), 217-227.
- [266]. Hsu, C. L., Liu, J. S., Wu, P. L., Guan, H. H., Chen, Y. L., Lin, A. C., ... & Chang, C., 2014, Identification of a new androgen receptor (AR) co-regulator BUD31 and related peptides to suppress wild-type and mutated AR-mediated prostate cancer growth via peptide screening and X-ray structure analysis, *Molecular oncology*, 8(8), 1575-1587.
- [267]. Tanenbaum, D. M., Wang, Y., Williams, S. P., & Sigler, P. B., 1998, Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 5998-6003.

- [268]. Petit-Topin, I., Fay, M., Resche-Rigon, M., Ulmann, A., Gainer, E., Rafestin-Oblin, M. E., & Fagart, J., 2014, Molecular determinants of the recognition of ulipristal acetate by oxo-steroid receptors, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 144, 427-435.
- [269]. Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J. Y., ... & Friesner, R. A., 2016, OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins, *Journal of chemical theory and computation*, 12(1), 281-296.
- [270]. Bicak, B., Budama-Kilinc, Y., Kecel-Gunduz, S., Zorlu, T., & Akman, G., 2021, Peptide based nano-drug candidate for cancer treatment: Preparation, characterization, in vitro and in silico evaluation, *Journal of Molecular Structure*, 1240, 130573.
- [271]. Release, S., 2017, 2: QikProp. Schrödinger, LLC: New York, NY, USA.
- [272]. Kokcu, Y., Kecel-Gunduz, S., Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Bicak, B., Zorlu, T., ... & Akyuz, S., 2020, Structural analysis, molecular dynamics and docking calculations of skin protective tripeptide and design, characterization, cytotoxicity studies of its PLGA nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*, 1200, 127046.
- [273]. Bıçak, B., Gündüz, S. K., Kökcü, Y., & Akyüz, S., 2019, Molecular docking and molecular dynamics studies of L-glycyl-L-glutamic acid dipeptide, *Bilge International Journal of Science and Technology Research*, 3(1), 1-9.
- [274]. Feher, M., Sourial, E., & Schmidt, J. M., 2000, A simple model for the prediction of blood–brain partitioning, *International journal of pharmaceutics*, 201(2), 239-247.
- [275]. Ishima, Y., & Maruyama, T., 2016, Human serum albumin as carrier in drug delivery systems, *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 136(1), 39-47.
- [276]. <https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/ADME/distribution.html> [Ziyaret Tarihi: 16 Mart 2021].
- [277]. Potts, R. O., and Guy, R. H., 1992, Predicting skin permeability, *Pharmaceutical research*, 9(5), 663-669.
- [278]. Jang, A., Jo, C., Kang, K. S., & Lee, M., 2008, Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides, *Food Chemistry*, 107(1), 327-336.
- [279]. Akman, G., 2019, *Kimyasal Ajanların Hücre Siklusuna Etkisi ve Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü.
- [280]. Özcan, G., Akman, G., & Khalilia, W. M. Induction of Apoptosis by Hypoxia in C-4 I Human Cervical Cancer Cells, *apoptosis*, 4, 29.

- [281]. Arican, G. O., Khalilia, W., Serbes, U., Akman, G., Cetin, I., & Arican, E., 2014, Effects of hypobaric conditions on apoptosis signalling pathways in HeLa cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(12), 5043-5047.
- [282]. Ozcan, G., Ozsoylemez, O. D., Akman, G., Khalilia, W., Tezel, B., Yetiz, A. K., ... & Sutlupinar, N., 2016, Screening for antitumor activity of various plant extracts on HeLa and C 4-I cell lines, *J BUON*, 21(6), 1552-60.
- [283]. <https://www.slideshare.net/EczaciLaleHn/kontroll-ila-salnm> [Ziyaret Tarihi: 04.02.2021].
- [284]. Kecel-Gunduz, S., Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Zorlu, T., Bicak, B., Kokcu, Y., ... & Akyuz, S., 2020, In Silico design of AVP (4–5) peptide and synthesis, characterization and in vitro activity of chitosan nanoparticles, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-19.
- [285]. Silva, S. M., Braga, C. R., Fook, M. V., Raposo, C. M., Carvalho, L. H., & Canedo, E. L., 2012, *Application of infrared spectroscopy to analysis of chitosan/clay nanocomposites*, Infrared Spectroscopy—Materials Science, Engineering and Technology, Theohile, T. (Ed.), Chapter 2, InTech, Croatia, ISBN: 978-953-51-0537-4, 43-62.
- [286]. Anicuta, S. G., Dobre, L., Stroescu, M., & Jipa, I., 2010, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for characterization of antimicrobial films containing chitosan. *Analele Universitatii din Oradea fascicula: Ecotoxicologie, Zootehniesitehнологii de Industrie Alimentara*, 1234-1240.
- [287]. Negrea, P., Caunii, A., Sarac, I., & Butnariu, M., 2015, The study of infrared spectrum of chitin and chitosan extract as potential sources of biomass, *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 10(4).
- [288]. Liu, C. G., Desai, K. G. H., Chen, X. G., & Park, H. J., 2005, Preparation and characterization of nanoparticles containing trypsin based on hydrophobically modified chitosan, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1728-1733.
- [289]. Hou, W., Liu, L., & Shen, H., 2018, Selective conversion of chitosan to levulinic acid catalysed by acidic ionic liquid: intriguing NH₂ effect in comparison with cellulose, *Carbohydrate polymers*, 195, 267-274.
- [290]. de Pinho Neves, A. L., Milioli, C. C., Müller, L., Riella, H. G., Kuhnen, N. C., & Stulzer, H. K., 2014, Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445, 34-39.
- [291]. Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., & Zhong, F., 2015, Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study, *Food Hydrocolloids*, 44, 309-319.
- [292]. Mohammadpour Dounighi, N., Eskandari, R., Avadi, M. R., Zolfagharian, H., Mir Mohammad Sadeghi, A., & Rezayat, M., 2012, Preparation and in vitro characterization

- of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system, *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 18(1), 44-52.
- [293]. Mazancová, P., Némethová, V., Treľová, D., Kleščíková, L., Lacík, I., & Rázga, F., 2018, Dissociation of chitosan/tripolyphosphate complexes into separate components upon pH elevation, *Carbohydrate polymers*, 192, 104-110.
- [294]. Sullivan, D. J., Cruz-Romero, M., Collins, T., Cummins, E., Kerry, J. P., & Morris, M. A., 2018, Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles, *Food hydrocolloids*, 83, 355-364.
- [295]. Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J., & Fu, S., 2005, Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate, *International journal of pharmaceutics*, 295(1-2), 235-245.
- [296]. De Vasconcelos, C. L., Bezerril, D. P., Dos Santos, D. E. S., Dantas, D. T., Pereira, M. R., & Fonseca, J. L. C., 2006, Effect of molecular weight and ionic strength on the formation of polyelectrolyte complexes based on poly (methacrylic acid) and chitosan, *Biomacromolecules*, 7(4), 1245-1252.
- [297]. Darder, M., Colilla, M., & Ruiz-Hitzky, E., 2003, Biopolymer– clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite, *Chemistry of Materials*, 15(20), 3774-3780.
- [298]. Zhang, K., Helm, J., Peschel, D., Gruner, M., Groth, T., & Fischer, S., 2010, NMR and FT Raman characterisation of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfate groups and the degree of substitution, *Polymer*, 51(21), 4698-4705.
- [299]. Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M., & Dymińska, L., 2015, Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114-120.
- [300]. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., ... & Fox, D. J., 2009, Gaussian, Inc., Wallingford CT. Gaussian 09.
- [301]. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., ... & Li, X., 2016, Gaussian 16. Revision A, 3.
- [302]. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C., 2006, Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(3), 712-725.
- [303]. Vega, C., Abascal, J. L. F., & Nezbeda, I., 2006, Vapor-liquid equilibria from the triple point up to the critical point for the new generation of TIP4P-like models: TIP4P/Ew, TIP4P/2005, and TIP4P/ice, *The Journal of chemical physics*, 125(3), 034503.
- [304]. Parrinello, M., & Rahman, A., 1981, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, *Journal of Applied physics*, 52(12), 7182-7190.

- [305]. Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M., 2007, Canonical sampling through velocity rescaling, *The Journal of chemical physics*, 126(1).
- [306]. Turner, P. J., 2005, XMGRACE. Version, 5, 19.
- [307]. Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K., 1996, VMD: visual molecular Dynamics, *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.
- [308]. Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S., & Dumas, P., 2004, FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *Journal of colloid and interface science*, 273(2), 381-387.
- [309]. Wu, C. S., 2004, In situ polymerization of titanium isopropoxide in polycaprolactone: properties and characterization of the hybrid nanocomposites, *Journal of applied polymer science*, 92(3), 1749-1757.
- [310]. Gupta, K. K., Kundan, A., Mishra, P. K., Srivastava, P., Mohanty, S., Singh, N. K., ... & Maiti, P., 2012, Polycaprolactone composites with TiO₂ for potential nanobiomaterials: tunable properties using different phases, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(37), 12844-12853.
- [311]. Ji, L., Wang, W., Jin, D., Zhou, S., & Song, X., 2015, In vitro bioactivity and mechanical properties of bioactive glass nanoparticles/polycaprolactone composites, *Materials Science and Engineering: C*, 46, 1-9.
- [312]. Souza, J. M., Choi, I., Chen, Q., Weisse, M., Daikhin, E., Yudkoff, M., ... & Ischiropoulos, H., 2000, Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins, *Archives of biochemistry and biophysics*, 380(2), 360-366.
- [313]. Eşme, A. S. L. I., & Sağdıç, S. G., 2017, Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV-Vis) analysis, conformational, HOMO-LUMO, NBO and NLO calculations on monomeric and dimeric structures of 4-pyridazinecarboxylic acid by HF and DFT methods, *Journal of Molecular Structure*, 1147, 322-334.
- [314]. Rajaei, I., & Mirsattari, S. N., 2018, Spectroscopic characteristic (FT-IR, ¹H, ¹³C NMR and UV-Vis) and theoretical calculations (MEP, DOS, HOMO-LUMO, PES, NBO analysis and keto-enol tautomerism) of new tetradentate N, N'-bis (4-hydroxysalicylidene)-1, 4-phenylenediamine ligand as chelating agent for the synthesis of dinuclear Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) complexes, *Journal of Molecular Structure*, 1163, 236-251.
- [315]. O'boyle, N. M., Tenderholt, A. L., & Langner, K. M., 2008, CcLib: a library for package-independent computational chemistry algorithms, *Journal of computational chemistry*, 29(5), 839-845.
- [316]. Mary, Y. S., Panicker, C. Y., Sapnakumari, M., Narayana, B., Sarojini, B. K., Al-Saadi, A. A., ... & War, J. A., 2015, FT-IR, NBO, HOMO-LUMO, MEP analysis and molecular docking study of 1-[3-(4-Fluorophenyl)-5-phenyl-4, 5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]. ethanone, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 483-493.

- [317]. Kecel-Gunduz, S., Celik, S., Ozel, A. E., & Akyuz, S., 2015, Structural and vibrational spectroscopic elucidation of sulphiride in solid state. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33(2), 322-343.
- [318]. Kecel-Gunduz, S., Bicak, B., Celik, S., Akyuz, S., & Ozel, A. E., 2017, Structural and spectroscopic investigation on antioxidant dipeptide, l-Methionyl-l-Serine: A combined experimental and DFT study, *Journal of Molecular Structure*, 1137, 756-770.
- [319]. Sun, Y. X., Hao, Q. L., Wei, W. X., Yu, Z. X., Lu, L. D., Wang, X., & Wang, Y. S., 2009, Experimental and density functional studies on 4-(3, 4-dihydroxybenzylideneamino) antipyrine, and 4-(2, 3, 4-trihydroxybenzylideneamino) antipyrine, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 904(1-3), 74-82.
- [320]. Sebastian, S., and Sundaraganesan, N., 2010, The spectroscopic (FT-IR, FT-IR gas phase, FT-Raman and UV) and NBO analysis of 4-Hydroxypiperidine by density functional method, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(3), 941-952.
- [321]. Kecel, S., Ozel, A. E., Akyuz, S., Celik, S., & Agaeva, G., 2011, Conformational analysis and vibrational spectroscopic investigation of l-proline-tyrosine (l-Pro-Tyr) dipeptide, *Journal of Molecular Structure*, 993(1-3), 349-356.
- [322]. Paiva, F. M., Batista, J. C., Rego, F. S. C., Lima Jr, J. A., Freire, P. T. C., Melo, F. E. A., ... & Nogueira, C. E. S., 2017, Infrared and Raman spectroscopy and DFT calculations of DL amino acids: Valine and lysine hydrochloride, *Journal of Molecular Structure*, 1127, 419-426.
- [323]. Marchewka, M. K., Debrus, S., & Ratajczak, H., 2003, Vibrational spectra and second harmonic generation in molecular complexes of L-lysine with L-tartaric, D, L-malic, acetic, arsenous, and fumaric acids, *Crystal growth & design*, 3(4), 587-592.
- [324]. Kumar, G. R., Raj, S. G., Mohan, R., & Jayavel, R., 2005, Growth, structural and spectral analyses of nonlinear optical L-threonine single crystals, *Journal of crystal growth*, 275(1-2), e1947-e1951.
- [325]. Kumar, M. S., Ravindra, H. J., Jayarama, A., & Dharmaprakash, S. M., 2006, Structural characteristics and second harmonic generation in L-threonine crystals, *Journal of crystal Growth*, 286(2), 451-456.
- [326]. Hayashi, T., and Mukamel, S., 2008, Two-dimensional vibrational lineshapes of amide III, II, I and A bands in a helical peptide. *Journal of molecular liquids*, 141(3), 149-154.
- [327]. Zhao, J., & Wang, J., 2015, Understanding the amide-II vibrations in β -peptides, *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(47), 14831-14839.
- [328]. He, D., Wang, L., Wang, L., Li, X., & Xu, Y., 2017, Spectroscopic studies on the interactions between novel bisnaphthalimide derivatives and calf thymus DNA, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166, 333-340.

- [329]. Qiao, X., Ma, Z. Y., Xie, C. Z., Xue, F., Zhang, Y. W., Xu, J. Y., ... & Yan, S. P., 2011, Study on potential antitumor mechanism of a novel Schiff Base copper (II) complex: synthesis, crystal structure, DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity, *Journal of inorganic biochemistry*, 105(5), 728-737.
- [330]. Shi, J. H., Lou, Y. Y., Zhou, K. L., & Pan, D. Q., 2018, Probing the behavior of calf thymus DNA upon binding to a carboxamide fungicide boscalid: Insights from spectroscopic and molecular docking approaches, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(10), 2738-2745.
- [331]. Waring, M. J., 1965, Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, *Journal of molecular biology*, 13(1), 269-282.
- [332]. Abu-Dief, A. M., Abdel-Rahman, L. H., Abdelhamid, A. A., Marzouk, A. A., Shehata, M. R., Bakheet, M. A., ... & Nafady, A., 2020, Synthesis and characterization of new Cr (III), Fe (III) and Cu (II) complexes incorporating multi-substituted aryl imidazole ligand: Structural, DFT, DNA binding, and biological implications. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 228, 117700.
- [333]. Coban, B., Tekin, I. O., Sengul, A., Yildiz, U., Kocak, I., & Sevinc, N. (2016). DNA studies of newly synthesized heteroleptic platinum (II) complexes [Pt (bpy)(iip)]²⁺ and [Pt (bpy)(miip)]²⁺, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21(2), 163-175.
- [334]. Cusumano, M., Di Pietro, M. L., & Giannetto, A. (2006). DNA interaction of platinum (II) complexes with 1, 10-phenanthroline and extended phenanthrolines, *Inorganic chemistry*, 45(1), 230-235.
- [335]. Iqbal, M., Karim, A., Ali, S., Tahir, M. N., & Sohail, M., 2020, Synthesis, characterization, structural elucidation, electrochemistry, DNA binding study, micellization behaviour and antioxidant activity of the Cu (II) carboxylate complexes, *Polyhedron*, 178, 114310.
- [336]. Breen, A. P., & Murphy, J. A., 1995, Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free radical biology and medicine*, 18(6), 1033-1077.
- [337]. Aboafia, S. A., Elsayed, S. A., El-Sayed, A. K., & El-Hendawy, A. M., 2018, New transition metal complexes of 2, 4-dihydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone Schiff base (H2dhbh): synthesis, spectroscopic characterization, DNA binding/cleavage and antioxidant activity, *Journal of Molecular Structure*, 1158, 39-50.
- [338]. Singh, A. N., Baruah, M. M., & Sharma, N., 2017, Structure Based docking studies towards exploring potential anti-androgen activity of selected phytochemicals against Prostate Cancer, *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- [339]. Shinde, M. G., Modi, S. J., & Kulkarni, V. M., 2017, QSAR and molecular docking of phthalazine derivatives as epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(04), 181-191.
- [340]. Afrin, S., Uddin, N., Mehjabin, K. Z., Niketa, T. K., Nesa, F., Akther, S., ... & Akther, N., 2018, In Silico Molecular Docking Approach of Some Selected Isolated

- Phytochemicals from *Phyllanthus Emblic* Against Breast Cancer, *Biomedical Journal*, 1, 5.
- [341]. Sheikh, I. A., Abu-Elmagd, M., Turki, R. F., Damanhour, G. A., Beg, M. A., & Al-Qahtani, M., 2016, Endocrine disruption: In silico perspectives of interactions of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its five major metabolites with progesterone receptor, *BMC structural biology*, 16(1), 1-10.
- [342]. Moore, D. E., 2002, Drug-induced cutaneous photosensitivity, *Drug safety*, 25(5), 345-372.
- [343]. Cicero, A. F., Fogacci, F., & Colletti, A., 2017, Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review, *British journal of pharmacology*, 174(11), 1378-1394.
- [344]. Thundimadathil, J., 2012, Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects, *Journal of amino acids*, 2012.
- [345]. Blanco- Míguez, A., Gutiérrez- Jácome, A., Pérez- Pérez, M., Pérez- Rodríguez, G., Catalán- García, S., Fdez- Riverola, F., ... & Sánchez, B., 2016, From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides, *Protein Science*, 25(6), 1084-1095.
- [346]. Pokrovsky, V. S., Treshalina, H. M., Lukasheva, E. V., Sedakova, L. A., Medentzev, A. G., Arinbasarova, A. Y., & Berezov, T. T., 2013, Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D, *Anti-cancer drugs*, 24(8), 846-851.
- [347]. Harris, F., Dennison, S. R., Singh, J., & Phoenix, D. A., 2013, On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells, *Medicinal research reviews*, 33(1), 190-234.
- [348]. Piras, A. M., Maisetta, G., Sandreschi, S., Gazzarri, M., Bartoli, C., Grassi, L., ... & Batoni, G., 2015, Chitosan nanoparticles loaded with the antimicrobial peptide temporin B exert a long-term antibacterial activity in vitro against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*, *Frontiers in microbiology*, 6, 372.
- [349]. Ribeiro, M. C., Corrêa, V. L. R., da Silva, F. K. L., de Oliveira Neto, J. R., Casas, A. A., de Menezes, L. B., & Amaral, A. C., 2018, Improving peptide quantification in chitosan nanoparticles, *International journal of biological macromolecules*, 119, 32-36.
- [350]. Çalış, S., Atar, K. Ö., Arslan, F. B., Eroğlu, H., & Çapan, Y., 2019, *Nanopharmaceuticals as Drug-Delivery Systems: For, Against, and Current Applications*, In *Nanocarriers for Drug Delivery*, In: Mohapatra, S., Ranjan, S., Thomas, S. (ed.), Chapter 4, Elsevier, United Kingdom, ISBN: 978-0-12-814031-4, 133-154.
- [351]. Sun, L., Chen, Y., Zhou, Y., Guo, D., Fan, Y., Guo, F., ... & Chen, W., 2017, Preparation of 5-fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles and study of the sustained release in vitro and in vivo, *asian journal of pharmaceutical sciences*, 12(5), 418-423.

- [352]. Hosseini, S. F., Soleimani, M. R., & Nikkhah, M., 2018, Chitosan/sodium tripolyphosphate nanoparticles as efficient vehicles for antioxidant peptidic fraction from common kilka, *International journal of biological macromolecules*, 111, 730-737.
- [353]. Arisoy, S., & Comoglu, T., 2020, Kinetic evaluation of L-Dopa loaded WGA-grafted nanoparticles, *Medicine*, 9(2), 385-8.
- [354]. Dudhani, A. R., & Kosaraju, S. L., 2010, Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization, *Carbohydrate polymers*, 81(2), 243-251.
- [355]. Ma, Z., & Lim, L. Y., 2003, Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles, *Pharmaceutical research*, 20(11), 1812-1819.
- [356]. Kumar, S. P., Birundha, K., Kaveri, K., & Devi, K. R., 2015, Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells, *International journal of biological macromolecules*, 78, 87-95.
- [357]. Loutfy, S. A., El-Din, H. M. A., Elberry, M. H., Allam, N. G., Hasanin, M. T. M., & Abdellah, A. M., 2016, Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 035008.
- [358]. Zili, Z., Sfar, S., & Fessi, H., 2005, Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin, *International journal of pharmaceutics*, 294(1-2), 261-267.
- [359]. Ribeiro, A. F., de Oliveira Rezende, R. L., Cabral, L. M., & de Sousa, V. P., 2013, Poly ϵ -caprolactone nanoparticles loaded with Uncaria tomentosa extract: preparation, characterization, and optimization using the Box–Behnken design. *International journal of nanomedicine*, 8, 431.
- [360]. Girgis, S., Faheem, A., & Elkordy, A., 2019, Preparation of poly ϵ : caprolactone nanoparticles containing bovine serum albumin by emulsification, *The Pharma Innovation Journal*, 8(5), 238-24.
- [361]. Tinca, A. L., Iurian, S., Rus, L. M., Porfire, A., & Tefas, L. R., 2020, Development and characterization of curcumin-loaded polycaprolactone nanoparticles by Design of Experiments, *Ro J Pharm Pract*, 13(3), 127-138.
- [362]. Özkahraman, B., Işıl, A. C. A. R., Gök, M. K., & Güçlü, G., 2014, Poli (N-Vinilkaprolaktam) Mikrojellerinin Sentez Şartlarının Optimizasyonu, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 14(1), 13-21.
- [363]. Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Kecel-Gunduz, S., Zorlu, T., Kokcu, Y., Bicak, B., ... & Ozel, A. E., 2018, Papain loaded poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles: In-silico and in-vitro studies, *Journal of fluorescence*, 28(5), 1127-1142.

- [364]. Alex, A. T., Joseph, A., Shavi, G., Rao, J. V., & Udupa, N., 2016, Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery, *Drug delivery*, 23(7), 2144-2153.
- [365]. Gürsoy, A., İlaçta yeni arayışlar: Kontrollü Salım Sistemleri , http://e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/tebhaberler/ocak_subat99/8.pdf (19.06.2021)
- [366]. Kolluru, L. P., Chandran, T., Shastri, P. N., Rizvi, S. A., & D'Souza, M. J., 2020, Development and evaluation of polycaprolactone based docetaxel nanoparticle formulation for targeted breast cancer therapy, *Journal of Nanoparticle Research*, 22(12), 1-14.
- [367]. Sanna, V., Roggio, A. M., Posadino, A. M., Cossu, A., Marceddu, S., Mariani, A., ... & Sechi, M., 2011, Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on poly (lactide-co-caprolactone) and poly (lactide-co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment: formulation, characterization, and cytotoxicity studies, *Nanoscale research letters*, 6(1), 1-9.
- [368]. Koleva, B. B., Kolev, T. M., & Spiteller, M., 2007, Spectroscopic and structural elucidation of l-tyrosine-containing dipeptides valyl-tyrosine and tyrosyl-alanine: Solid-state IR-LD spectroscopy, quantum chemical calculations and vibrational analysis, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 68(5), 1187-1196.
- [369]. Balci, K., & Akyuz, S., 2008, A vibrational spectroscopic investigation on benzocaine molecule, *Vibrational Spectroscopy*, 48(2), 215-228.
- [370]. Merrick, J. P., Moran, D., & Radom, L., 2007, An evaluation of harmonic vibrational frequency scale factors, *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(45), 11683-11700.

EKLER

EK 1. Tyr-Lys-Thr tripeptidinin optimize olmuş bağ uzunlukları (Å), aç ve dihedral değerleri.

BAĞ	6-311++G(d,p)	AÇI	6-311++G(d,p)	DİHEDRAL	6-311++G(d,p)
H1-N2	1,0134	H1-N2-H3	109,0402	H1-N2-C4-H5	-83,5707
N2-H3	1,016	H1-N2-C4	111,5289	H1-N2-C4-C6	36,4338
N2-C4	1,4579	H3-N2-C4	109,6419	H1-N2-C4-C21	159,3202
C4-H5	1,096	N2-C4-H5	108,7168	H3-N2-C4-H5	155,5545
C4-C6	1,5642	N2-C4-C6	114,1771	H3-N2-C4-C6	-84,4409
C4-C21	1,5373	N2-C4-C21	106,7859	H3-N2-C4-C21	38,4455
C6-H7	1,0953	H5-C4-C6	107,497	N2-C4-C6-H7	-43,5887
C6-H8	1,0944	H5-C4-C21	108,6947	N2-C4-C6-H8	70,8911
C6-C9	1,5121	C6-C4-C21	110,8524	N2-C4-C6-C9	-164,151
C9-C10	1,3973	C4-C6-H7	106,2763	H5-C4-C6-H7	77,0972
C9-C17	1,4026	C4-C6-H8	108,6473	H5-C4-C6-H8	-168,423
C10-H11	1,0838	C4-C6-C9	114,9046	H5-C4-C6-C9	-43,4652
C10-C12	1,3928	H7-C6-H8	106,6946	C21-C4-C6-H7	-164,2365
C12-H13	1,0856	H7-C6-C9	108,9465	C21-C4-C6-H8	-49,7566
C12-C14	1,394	H8-C6-C9	110,963	C21-C4-C6-C9	75,2012
C14-C15	1,396	C6-C9-C10	121,8126	N2-C4-C21-O22	-34,3865
C14-O19	1,3697	C6-C9-C17	120,5854	N2-C4-C21-N23	145,6829
C15-H16	1,0834	C10-C9-C17	117,5767	H5-C4-C21-O22	-151,5101
C15-C17	1,3902	C9-C10-H11	119,9932	H5-C4-C21-N23	28,5593
C17-H18	1,086	C9-C10-C12	121,5093	C6-C4-C21-O22	90,5503
O19-H20	0,963	H11-C10-C12	118,4907	C6-C4-C21-N23	-89,3803
C21-O22	1,2282	C10-C12-H13	119,7226	C4-C6-C9-C10	-94,5552
C21-N23	1,3555	C10-C12-C14	119,8385	C4-C6-C9-C17	83,5711
N23-H24	1,0097	H13-C12-C14	120,4301	H7-C6-C9-C10	146,3614
N23-C25	1,4659	C12-C14-C15	119,7762	H7-C6-C9-C17	-35,5124
C25-H26	1,0932	C12-C14-O19	122,7269	H8-C6-C9-C10	29,1822
C25-C27	1,5377	C15-C14-O19	117,4969	H8-C6-C9-C17	-152,6915
C25-C42	1,5472	C14-C15-H16	119,1497	C6-C9-C10-H11	-1,274
C27-H28	1,0951	C14-C15-C17	119,6097	C6-C9-C10-C12	177,7612
C27-H29	1,0951	H16-C15-C17	121,2404	C17-C9-C10-H11	-179,4542
C27-C30	1,5376	C9-C17-C15	121,688	C17-C9-C10-C12	-0,419
C30-H31	1,098	C9-C17-H18	119,5106	C6-C9-C17-C15	-178,0405
C30-H32	1,0966	C15-C17-H18	118,799	C6-C9-C17-H18	2,5285
C30-C33	1,533	C14-O19-H20	109,6253	C10-C9-C17-C15	0,1632
C33-H34	1,0973	C4-C21-O22	121,1574	C10-C9-C17-H18	-179,2679
C33-H35	1,0932	C4-C21-N23	116,4264	C9-C10-C12-H13	-178,6091
C33-C36	1,5364	O22-C21-N23	122,4161	C9-C10-C12-C14	0,3171
C36-H37	1,0961	C21-N23-H24	118,9176	H11-C10-C12-H13	0,4401
C36-H38	1,0962	C21-N23-C25	122,6811	H11-C10-C12-C14	179,3663
C36-N39	1,4661	H24-N23-C25	118,0877	C10-C12-C14-C15	0,0522
N39-H40	1,0156	N23-C25-H26	106,467	C10-C12-C14-O19	-179,9301
N39-H41	1,0165	N23-C25-C27	109,2816	H13-C12-C14-C15	178,9707
C42-O43	1,2236	N23-C25-C42	109,4584	H13-C12-C14-O19	-1,0116
C42-N44	1,3584	H26-C25-C27	109,7535	C12-C14-C15-H16	179,5174
N44-H45	1,0105	H26-C25-C42	109,3118	C12-C14-C15-C17	-0,3013
N44-C46	1,4426	C27-C25-C42	112,3924	O19-C14-C15-H16	-0,4994
C46-H47	1,0934	C25-C27-H28	106,7791	O19-C14-C15-C17	179,6819
C46-C48	1,5421	C25-C27-H29	108,5171	C12-C14-O19-H20	1,2508

EK 2. YKT Tirpeptidinin fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

<i>Donör (i)</i>	<i>Akseptör (j)</i>	<i>E(2)^a</i> (kcal/mol)	<i>E(j) - E(i)^b</i> (a.u.)	<i>F(i, j)</i> (a.u.)
$\sigma(\text{H}_1 - \text{N}_2)$	$\sigma^*(\text{C}_4 - \text{C}_{21})$	1,98	0,98	0,040
$\sigma(\text{N}_2 - \text{H}_3)$	$\sigma^*(\text{C}_4 - \text{H}_5)$	2,09	1,00	0,041
$\sigma(\text{N}_2 - \text{H}_3)$	$\sigma^*(\text{C}_4 - \text{C}_{21})$	0,76	0,97	0,025
$\sigma(\text{N}_2 - \text{C}_4)$	$\sigma^*(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	1,30	1,15	0,035
$\sigma(\text{N}_2 - \text{C}_4)$	$\pi^*(\text{C}_{21} - \text{O}_{22})$	0,60	0,74	0,020
$\sigma(\text{N}_2 - \text{C}_4)$	$\sigma^*(\text{C}_{21} - \text{N}_{23})$	2,11	1,21	0,046
$\sigma(\text{C}_4 - \text{H}_5)$	$\sigma^*(\text{N}_2 - \text{H}_3)$	2,53	0,95	0,044
$\sigma(\text{C}_4 - \text{H}_5)$	$\sigma^*(\text{C}_6 - \text{H}_8)$	2,44	0,90	0,042
$\sigma(\text{C}_4 - \text{H}_5)$	$\sigma^*(\text{C}_{21} - \text{O}_{22})$	3,92	1,08	0,058
$\sigma(\text{C}_4 - \text{H}_5)$	$\pi^*(\text{C}_{21} - \text{O}_{22})$	1,47	0,51	0,026
$\sigma(\text{C}_4 - \text{C}_6)$	$\sigma^*(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	1,03	1,02	0,029
$\sigma(\text{C}_4 - \text{C}_6)$	$\sigma^*(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	0,70	1,18	0,026
$\sigma(\text{C}_4 - \text{C}_6)$	$\pi^*(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	2,35	0,63	0,038
$\sigma(\text{C}_4 - \text{C}_6)$	$\sigma^*(\text{C}_{21} - \text{O}_{22})$	0,54	1,17	0,023
$\sigma(\text{C}_4 - \text{C}_6)$	$\pi^*(\text{C}_{21} - \text{O}_{22})$	3,32	0,60	0,043
$\sigma(\text{C}_4 - \text{C}_{21})$	$\sigma^*(\text{H}_1 - \text{N}_2)$	2,38	1,06	0,045
$\sigma(\text{C}_4 - \text{C}_{21})$	$\sigma^*(\text{C}_6 - \text{H}_7)$	1,37	1,02	0,034
$\sigma(\text{C}_4 - \text{C}_{21})$	$\sigma^*(\text{C}_{21} - \text{O}_{22})$	1,02	1,21	0,032
$\sigma(\text{C}_4 - \text{C}_{21})$	$\sigma^*(\text{N}_{23} - \text{C}_{25})$	4,27	0,96	0,057
$\sigma(\text{C}_6 - \text{H}_7)$	$\sigma^*(\text{N}_2 - \text{C}_4)$	0,60	0,86	0,020
$\sigma(\text{C}_6 - \text{H}_7)$	$\sigma^*(\text{C}_4 - \text{C}_{21})$	2,58	0,86	0,042
$\sigma(\text{C}_6 - \text{H}_7)$	$\sigma^*(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	3,63	1,08	0,056
$\sigma(\text{C}_6 - \text{H}_7)$	$\pi^*(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	1,34	0,53	0,026
$\sigma(\text{C}_6 - \text{H}_8)$	$\sigma^*(\text{C}_4 - \text{H}_5)$	2,25	0,89	0,040
$\sigma(\text{C}_6 - \text{H}_8)$	$\pi^*(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	0,66	0,54	0,018
$\sigma(\text{C}_6 - \text{H}_8)$	$\sigma^*(\text{C}_9 - \text{C}_{17})$	3,77	1,07	0,057
$\sigma(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	$\sigma^*(\text{N}_2 - \text{C}_4)$	1,91	0,99	0,039
$\sigma(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	$\sigma^*(\text{C}_4 - \text{C}_6)$	0,66	0,97	0,023
$\sigma(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	$\sigma^*(\text{C}_6 - \text{H}_7)$	0,59	1,02	0,022
$\sigma(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	$\sigma^*(\text{C}_6 - \text{H}_8)$	0,55	1,03	0,021
$\sigma(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	$\sigma^*(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	2,23	1,21	0,046
$\sigma(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	$\sigma^*(\text{C}_9 - \text{C}_{17})$	2,09	1,20	0,045
$\sigma(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	$\sigma^*(\text{C}_{10} - \text{C}_{12})$	2,39	1,21	0,048
$\sigma(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	$\sigma^*(\text{C}_{15} - \text{C}_{17})$	2,34	1,21	0,048
$\sigma(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	$\sigma^*(\text{C}_6 - \text{H}_7)$	0,61	1,09	0,023
$\sigma(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	$\sigma^*(\text{C}_6 - \text{C}_9)$	1,98	1,12	0,042
$\sigma(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	$\sigma^*(\text{C}_9 - \text{C}_{17})$	3,42	1,27	0,059
$\sigma(\text{C}_9 - \text{C}_{10})$	$\sigma^*(\text{C}_{10} - \text{H}_{11})$	1,05	1,14	0,031

EK 2.(Devam) YKT Tirpeptidinin fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(C_9 - C_{10})$	$\sigma^*(C_{10} - C_{12})$	3,10	1,27	0,056
$\sigma(C_9 - C_{10})$	$\sigma^*(C_{12} - H_{13})$	2,22	1,12	0,045
$\sigma(C_9 - C_{10})$	$\sigma^*(C_{17} - H_{18})$	2,63	1,13	0,049
$\pi(C_9 - C_{10})$	$\sigma^*(C_4 - C_6)$	3,83	0,60	0,046
$\pi(C_9 - C_{10})$	$\sigma^*(C_6 - H_7)$	1,37	0,65	0,029
$\pi(C_9 - C_{10})$	$\sigma^*(C_6 - H_8)$	0,51	0,65	0,018
$\pi(C_9 - C_{10})$	$\pi^*(C_{12} - C_{14})$	18,09	0,28	0,064
$\pi(C_9 - C_{10})$	$\pi^*(C_{15} - C_{17})$	22,10	0,28	0,070
$\sigma(C_9 - C_{17})$	$\sigma^*(C_6 - H_8)$	0,77	1,09	0,026
$\sigma(C_9 - C_{17})$	$\sigma^*(C_6 - C_9)$	1,93	1,12	0,041
$\sigma(C_9 - C_{17})$	$\sigma^*(C_9 - C_{10})$	3,41	1,27	0,059
$\sigma(C_9 - C_{17})$	$\sigma^*(C_{10} - H_{11})$	2,75	1,14	0,050
$\sigma(C_9 - C_{17})$	$\sigma^*(C_{15} - H_{16})$	2,23	1,13	0,045
$\sigma(C_9 - C_{17})$	$\sigma^*(C_{15} - C_{17})$	3,10	1,28	0,056
$\sigma(C_9 - C_{17})$	$\sigma^*(C_{17} - H_{18})$	0,96	1,13	0,030
$\sigma(C_{10} - H_{11})$	$\sigma^*(C_9 - C_{10})$	0,91	1,10	0,028
$\sigma(C_{10} - H_{11})$	$\sigma^*(C_9 - C_{17})$	4,58	1,09	0,063
$\sigma(C_{10} - H_{11})$	$\sigma^*(C_{10} - C_{12})$	0,66	1,10	0,024
$\sigma(C_{10} - H_{11})$	$\sigma^*(C_{12} - C_{14})$	3,38	1,08	0,054
$\sigma(C_{10} - C_{12})$	$\sigma^*(C_6 - C_9)$	3,70	1,12	0,058
$\sigma(C_{10} - C_{12})$	$\sigma^*(C_9 - C_{10})$	3,39	1,28	0,059
$\sigma(C_{10} - C_{12})$	$\sigma^*(C_{10} - H_{11})$	0,89	1,14	0,029
$\sigma(C_{10} - C_{12})$	$\sigma^*(C_{12} - H_{13})$	1,29	1,13	0,034
$\sigma(C_{10} - C_{12})$	$\sigma^*(C_{12} - C_{14})$	2,93	1,26	0,054
$\sigma(C_{10} - C_{12})$	$\sigma^*(C_{14} - O_{19})$	4,41	1,04	0,061
$\sigma(C_{12} - H_{13})$	$\sigma^*(C_9 - C_{10})$	3,72	1,1	0,057
$\sigma(C_{12} - H_{13})$	$\sigma^*(C_{10} - C_{12})$	0,95	1,1	0,029
$\sigma(C_{12} - H_{13})$	$\sigma^*(C_{12} - C_{14})$	0,53	1,09	0,021
$\sigma(C_{12} - H_{13})$	$\sigma^*(C_{14} - C_{15})$	3,98	1,08	0,059
$\sigma(C_{12} - H_{13})$	$\sigma^*(C_{14} - O_{19})$	0,85	0,87	0,024
$\sigma(C_{12} - C_{14})$	$\sigma^*(C_{10} - H_{11})$	2,22	1,16	0,045
$\sigma(C_{12} - C_{14})$	$\sigma^*(C_{10} - C_{12})$	2,99	1,29	0,056
$\sigma(C_{12} - C_{14})$	$\sigma^*(C_{12} - H_{13})$	0,91	1,14	0,029
$\sigma(C_{12} - C_{14})$	$\sigma^*(C_{14} - C_{15})$	4,19	1,27	0,065
$\sigma(C_{12} - C_{14})$	$\sigma^*(C_{15} - H_{16})$	2,06	1,15	0,044
$\pi(C_{12} - C_{14})$	$\pi^*(C_9 - C_{10})$	22,23	0,3	0,073
$\pi(C_{12} - C_{14})$	$\pi^*(C_{12} - C_{14})$	0,52	0,29	0,011
$\pi(C_{12} - C_{14})$	$\pi^*(C_{15} - C_{17})$	17,36	0,29	0,064
$\sigma(C_{14} - C_{15})$	$\sigma^*(C_{12} - H_{13})$	2,3	1,13	0,046
$\sigma(C_{14} - C_{15})$	$\sigma^*(C_{12} - C_{14})$	3,96	1,27	0,063
$\sigma(C_{14} - C_{15})$	$\sigma^*(C_{15} - H_{16})$	0,92	1,14	0,029
$\sigma(C_{14} - C_{15})$	$\sigma^*(C_{15} - C_{17})$	2,68	1,29	0,053
$\sigma(C_{14} - C_{15})$	$\sigma^*(C_{17} - H_{18})$	2,35	1,14	0,046

EK 2.(Devam) YKT Tirpeptidinin fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(C_{14} - C_{15})$	$\sigma^*(O_{19} - H_{20})$	1,61	1,1	0,038
$\sigma(C_{14} - O_{19})$	$\sigma^*(C_{10} - C_{12})$	1,13	1,5	0,037
$\sigma(C_{14} - O_{19})$	$\sigma^*(C_{12} - C_{14})$	0,8	1,48	0,031
$\sigma(C_{14} - O_{19})$	$\sigma^*(C_{14} - C_{15})$	0,61	1,48	0,027
$\sigma(C_{14} - O_{19})$	$\sigma^*(C_{15} - C_{17})$	1,33	1,5	0,04
$\sigma(C_{15} - H_{16})$	$\sigma^*(C_9 - C_{17})$	3,74	1,09	0,057
$\sigma(C_{15} - H_{16})$	$\sigma^*(C_{12} - C_{14})$	4,01	1,08	0,059
$\sigma(C_{15} - H_{16})$	$\sigma^*(C_{14} - C_{15})$	0,61	1,08	0,023
$\sigma(C_{15} - H_{16})$	$\sigma^*(C_{14} - O_{19})$	0,99	0,86	0,026
$\sigma(C_{15} - H_{16})$	$\sigma^*(C_{15} - C_{17})$	0,9	1,1	0,028
$\sigma(C_{15} - C_{17})$	$\sigma^*(C_6 - C_9)$	3,59	1,13	0,057
$\sigma(C_{15} - C_{17})$	$\sigma^*(C_9 - C_{17})$	3,41	1,27	0,059
$\sigma(C_{15} - C_{17})$	$\sigma^*(C_{14} - C_{15})$	2,65	1,26	0,052
$\sigma(C_{15} - C_{17})$	$\sigma^*(C_{14} - O_{19})$	3,77	1,05	0,056
$\sigma(C_{15} - C_{17})$	$\sigma^*(C_{15} - H_{16})$	1,28	1,14	0,034
$\sigma(C_{15} - C_{17})$	$\sigma^*(C_{17} - H_{18})$	0,88	1,14	0,028
$\pi(C_{15} - C_{17})$	$\pi^*(C_9 - C_{10})$	17,64	0,29	0,065
$\pi(C_{15} - C_{17})$	$\pi^*(C_{12} - C_{14})$	21,55	0,28	0,071
$\sigma(C_{17} - H_{18})$	$\sigma^*(C_9 - C_{10})$	4,51	1,1	0,063
$\sigma(C_{17} - H_{18})$	$\sigma^*(C_9 - C_{17})$	0,79	1,09	0,026
$\sigma(C_{17} - H_{18})$	$\sigma^*(C_{14} - C_{15})$	3,35	1,08	0,054
$\sigma(C_{17} - H_{18})$	$\sigma^*(C_{15} - C_{17})$	0,63	1,1	0,024
$\sigma(O_{19} - H_{20})$	$\sigma^*(C_{14} - C_{15})$	4,31	1,31	0,067
$\sigma(C_{21} - O_{22})$	$\sigma^*(C_4 - C_{21})$	1,13	1,42	0,036
$\sigma(C_{21} - O_{22})$	$\sigma^*(C_{21} - N_{23})$	1,05	1,53	0,036
$\sigma(C_{21} - O_{22})$	$\sigma^*(N_{23} - H_{24})$	1,66	1,45	0,044
$\pi(C_{21} - O_{22})$	$\sigma^*(C_4 - H_5)$	0,56	0,76	0,018
$\pi(C_{21} - O_{22})$	$\sigma^*(C_4 - C_6)$	1,06	0,72	0,025
$\pi(C_{21} - O_{22})$	$\pi^*(C_{21} - O_{22})$	1,05	0,38	0,019
$\pi(C_{21} - O_{22})$	$\sigma^*(C_{50} - H_{53})$	0,52	0,79	0,018
$\sigma(C_{21} - N_{23})$	$\sigma^*(N_2 - C_4)$	0,5	1,21	0,022
$\sigma(C_{21} - N_{23})$	$\sigma^*(C_{21} - O_{22})$	1	1,43	0,034
$\sigma(C_{21} - N_{23})$	$\sigma^*(N_{23} - H_{24})$	0,53	1,24	0,023
$\sigma(C_{21} - N_{23})$	$\sigma^*(N_{23} - C_{25})$	1,16	1,18	0,033
$\sigma(C_{21} - N_{23})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{27})$	0,7	1,22	0,026
$\sigma(N_{23} - H_{24})$	$\sigma^*(C_{21} - O_{22})$	4,85	1,25	0,07
$\sigma(N_{23} - H_{24})$	$\sigma^*(C_{25} - H_{26})$	0,97	1,06	0,029
$\sigma(N_{23} - C_{25})$	$\sigma^*(C_4 - C_{21})$	2,21	1,11	0,045
$\sigma(N_{23} - C_{25})$	$\sigma^*(C_{21} - N_{23})$	1,16	1,23	0,034
$\sigma(N_{23} - C_{25})$	$\sigma^*(C_{27} - C_{30})$	1,37	1,14	0,035
$\sigma(N_{23} - C_{25})$	$\pi^*(C_{42} - O_{43})$	1,68	0,77	0,035
$\sigma(C_{25} - H_{26})$	$\sigma^*(N_{23} - H_{24})$	3,22	0,91	0,048
$\sigma(C_{25} - H_{26})$	$\sigma^*(C_{27} - H_{29})$	2,38	0,92	0,042

EK 2.(Devam) YKT Tirpeptidinin fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(C_{25} - H_{26})$	$\sigma^*(C_{42} - O_{43})$	4,36	1,1	0,062
$\sigma(C_{25} - C_{27})$	$\sigma^*(C_{21} - N_{23})$	2,52	1,09	0,047
$\sigma(C_{25} - C_{27})$	$\sigma^*(C_{25} - H_{26})$	0,62	1,01	0,022
$\sigma(C_{25} - C_{27})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{42})$	0,74	0,96	0,024
$\sigma(C_{25} - C_{27})$	$\sigma^*(C_{27} - C_{30})$	0,63	1,01	0,023
$\sigma(C_{25} - C_{27})$	$\sigma^*(C_{30} - H_{32})$	1,08	1,02	0,03
$\sigma(C_{25} - C_{27})$	$\pi^*(C_{42} - O_{43})$	1,28	0,63	0,027
$\sigma(C_{25} - C_{27})$	$\sigma^*(C_{42} - N_{44})$	1,69	1,09	0,039
$\sigma(C_{25} - C_{42})$	$\sigma^*(N_{23} - H_{24})$	0,55	1,02	0,021
$\sigma(C_{25} - C_{42})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{27})$	0,64	1	0,023
$\sigma(C_{25} - C_{42})$	$\sigma^*(C_{27} - H_{28})$	1,32	1,03	0,033
$\sigma(C_{25} - C_{42})$	$\sigma^*(C_{42} - O_{43})$	0,82	1,21	0,028
$\sigma(C_{25} - C_{42})$	$\sigma^*(N_{44} - C_{46})$	4,52	0,98	0,059
$\sigma(C_{27} - H_{28})$	$\sigma^*(N_{23} - C_{25})$	1,06	0,82	0,026
$\sigma(C_{27} - H_{28})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{42})$	2,9	0,84	0,045
$\sigma(C_{27} - H_{28})$	$\sigma^*(C_{30} - C_{33})$	3,12	0,9	0,047
$\sigma(C_{27} - H_{29})$	$\sigma^*(C_{25} - H_{26})$	2,8	0,89	0,044
$\sigma(C_{27} - H_{29})$	$\sigma^*(C_{30} - H_{31})$	2,65	0,9	0,044
$\sigma(C_{27} - C_{30})$	$\sigma^*(N_{23} - C_{25})$	1,98	0,93	0,038
$\sigma(C_{27} - C_{30})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{27})$	0,75	0,97	0,024
$\sigma(C_{27} - C_{30})$	$\sigma^*(C_{27} - H_{28})$	0,52	1	0,02
$\sigma(C_{27} - C_{30})$	$\sigma^*(C_{27} - H_{29})$	0,58	1,01	0,022
$\sigma(C_{27} - C_{30})$	$\sigma^*(C_{30} - C_{33})$	0,77	1,01	0,025
$\sigma(C_{27} - C_{30})$	$\sigma^*(C_{33} - C_{36})$	1,62	1,01	0,036
$\sigma(C_{30} - H_{31})$	$\sigma^*(C_{27} - H_{29})$	2,92	0,89	0,046
$\sigma(C_{30} - H_{31})$	$\sigma^*(C_{33} - H_{34})$	2,83	0,9	0,045
$\sigma(C_{30} - H_{32})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{27})$	3,5	0,85	0,049
$\sigma(C_{30} - H_{32})$	$\sigma^*(C_{33} - H_{35})$	2,88	0,92	0,046
$\sigma(C_{30} - C_{33})$	$\sigma^*(C_{27} - H_{28})$	1,2	0,99	0,031
$\sigma(C_{30} - C_{33})$	$\sigma^*(C_{27} - C_{30})$	0,65	0,98	0,023
$\sigma(C_{30} - C_{33})$	$\sigma^*(C_{33} - C_{36})$	0,55	1	0,021
$\sigma(C_{30} - C_{33})$	$\sigma^*(C_{36} - N_{39})$	2,35	0,97	0,043
$\sigma(C_{33} - H_{34})$	$\sigma^*(C_{30} - H_{31})$	3,01	0,88	0,046
$\sigma(C_{33} - H_{34})$	$\sigma^*(C_{36} - H_{37})$	2,62	0,88	0,043
$\sigma(C_{33} - H_{35})$	$\sigma^*(C_{30} - H_{32})$	2,73	0,88	0,044
$\sigma(C_{33} - H_{35})$	$\sigma^*(C_{36} - H_{38})$	2,73	0,88	0,044
$\sigma(C_{33} - H_{35})$	$\pi^*(C_{42} - O_{43})$	0,59	0,49	0,016
$\sigma(C_{33} - C_{36})$	$\sigma^*(C_{27} - C_{30})$	2,18	0,98	0,041
$\sigma(C_{33} - C_{36})$	$\sigma^*(C_{30} - C_{33})$	0,85	0,99	0,026
$\sigma(C_{36} - H_{37})$	$\sigma^*(C_{33} - H_{34})$	2,85	0,89	0,045
$\sigma(C_{36} - H_{37})$	$\sigma^*(N_{39} - H_{40})$	3,18	0,92	0,048
$\sigma(C_{36} - H_{38})$	$\sigma^*(C_{33} - H_{35})$	2,51	0,91	0,043
$\sigma(C_{36} - H_{38})$	$\sigma^*(N_{39} - H_{41})$	3,02	0,94	0,048

EK 2.(Devam) YKT Tirpeptidinin fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(C_{36} - N_{39})$	$\sigma^*(C_{30} - C_{33})$	1,43	1,11	0,036
$\sigma(N_{39} - H_{40})$	$\sigma^*(C_{36} - H_{37})$	2,23	1	0,042
$\sigma(N_{39} - H_{41})$	$\sigma^*(C_{36} - H_{38})$	2,28	1	0,043
$\sigma(C_{42} - O_{43})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{42})$	1,12	1,41	0,036
$\sigma(C_{42} - O_{43})$	$\sigma^*(C_{42} - N_{44})$	1	1,53	0,036
$\sigma(C_{42} - O_{43})$	$\sigma^*(N_{44} - H_{45})$	1,55	1,46	0,043
$\pi(C_{42} - O_{43})$	$\sigma^*(N_{23} - C_{25})$	1,66	0,71	0,031
$\pi(C_{42} - O_{43})$	$\pi^*(C_{42} - N_{44})$	1,08	0,4	0,02
$\sigma(C_{42} - N_{44})$	$\sigma^*(C_{42} - O_{43})$	0,91	1,43	0,032
$\sigma(C_{42} - N_{44})$	$\sigma^*(N_{44} - H_{45})$	0,58	1,25	0,024
$\sigma(C_{42} - N_{44})$	$\sigma^*(N_{44} - C_{46})$	1,4	1,2	0,037
$\sigma(C_{42} - N_{44})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{48})$	0,62	1,18	0,024
$\sigma(N_{44} - H_{45})$	$\sigma^*(C_{42} - O_{43})$	5,04	1,25	0,071
$\sigma(N_{44} - H_{45})$	$\sigma^*(C_{46} - H_{47})$	1,34	1,05	0,033
$\sigma(N_{44} - C_{46})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{42})$	2,15	1,12	0,045
$\sigma(N_{44} - C_{46})$	$\sigma^*(C_{42} - N_{44})$	1,35	1,25	0,037
$\sigma(N_{44} - C_{46})$	$\sigma^*(C_{48} - H_{49})$	0,83	1,16	0,028
$\sigma(N_{44} - C_{46})$	$\sigma^*(C_{56} - O_{58})$	1,6	1,1	0,038
$\sigma(C_{46} - H_{47})$	$\sigma^*(N_{44} - H_{45})$	3,62	0,93	0,052
$\sigma(C_{46} - H_{47})$	$\sigma^*(C_{48} - O_{54})$	3,53	0,79	0,047
$\sigma(C_{46} - H_{47})$	$\sigma^*(C_{56} - O_{57})$	2,05	1,14	0,043
$\sigma(C_{46} - H_{47})$	$\pi^*(C_{56} - O_{57})$	4,47	0,52	0,045
$\sigma(C_{46} - C_{48})$	$\sigma^*(C_{42} - N_{44})$	2	1,11	0,042
$\sigma(C_{46} - C_{48})$	$\sigma^*(C_{46} - H_{47})$	0,64	1,02	0,023
$\sigma(C_{46} - C_{48})$	$\sigma^*(C_{48} - C_{50})$	0,62	1	0,022
$\sigma(C_{46} - C_{48})$	$\sigma^*(C_{50} - H_{51})$	1,29	1,02	0,033
$\sigma(C_{46} - C_{48})$	$\sigma^*(O_{54} - H_{55})$	2,03	1,05	0,042
$\sigma(C_{46} - C_{48})$	$\sigma^*(C_{56} - O_{57})$	1,62	1,24	0,04
$\sigma(C_{46} - C_{48})$	$\pi^*(C_{56} - O_{57})$	2,15	0,63	0,034
$\sigma(C_{46} - C_{56})$	$\sigma^*(C_{42} - N_{44})$	0,84	1,13	0,028
$\sigma(C_{46} - C_{56})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{48})$	0,54	1	0,021
$\sigma(C_{46} - C_{56})$	$\sigma^*(C_{48} - C_{50})$	1,95	1,03	0,04
$\sigma(C_{46} - C_{56})$	$\sigma^*(C_{56} - O_{57})$	1,21	1,27	0,035
$\sigma(C_{46} - C_{56})$	$\sigma^*(O_{58} - H_{59})$	2,22	1,03	0,043
$\sigma(C_{48} - H_{49})$	$\sigma^*(N_{44} - C_{46})$	3,88	0,87	0,052
$\sigma(C_{48} - H_{49})$	$\sigma^*(C_{50} - H_{53})$	2,61	0,93	0,044
$\sigma(C_{48} - C_{50})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{48})$	0,92	0,98	0,027
$\sigma(C_{48} - C_{50})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{56})$	1,72	0,97	0,037
$\sigma(C_{48} - O_{54})$	$\sigma^*(C_{46} - H_{47})$	1,26	1,22	0,035
$\sigma(C_{50} - O_{54})$	$\sigma^*(C_{50} - H_{52})$	0,94	1,23	0,03
$\sigma(C_{50} - H_{51})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{48})$	3,18	0,86	0,047
$\sigma(C_{50} - H_{52})$	$\sigma^*(C_{48} - O_{54})$	4,89	0,77	0,055
$\sigma(C_{50} - H_{53})$	$\sigma^*(C_{48} - H_{49})$	2,54	0,89	0,043

EK 2.(Devam) YKT Tirpeptidinin fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(O_{54} - H_{55})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{48})$	1,93	1,08	0,041
$\sigma(C_{56} - O_{57})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{56})$	1,41	1,46	0,041
$\pi(C_{56} - O_{57})$	$\sigma^*(C_{46} - H_{47})$	1,19	0,8	0,028
$\pi(C_{56} - O_{57})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{48})$	1,16	0,75	0,026
$\pi(C_{56} - O_{57})$	$\pi^*(C_{56} - O_{57})$	0,67	0,4	0,015
$\sigma(C_{56} - O_{58})$	$\sigma^*(N_{44} - C_{46})$	1,2	1,3	0,035
$\sigma(O_{58} - H_{59})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{56})$	3,49	1,11	0,057
$\sigma(O_{58} - H_{59})$	$\sigma^*(C_{56} - O_{57})$	0,87	1,38	0,031
$n_1(N_2)$	$\sigma^*(C_4 - H_5)$	3,99	0,69	0,047
$n_1(N_2)$	$\sigma^*(C_4 - C_6)$	7,69	0,65	0,063
$n_1(N_2)$	$\sigma^*(C_6 - C_9)$	0,63	0,72	0,019
$n_1(O_{19})$	$\sigma^*(C_{12} - C_{14})$	5,9	1,17	0,074
$n_2(O_{19})$	$\pi^*(C_{12} - C_{14})$	26,9	0,35	0,093
$n_1(O_{22})$	$\sigma^*(C_4 - C_{21})$	1,79	1,06	0,039
$n_1(O_{22})$	$\sigma^*(C_{21} - N_{23})$	1,42	1,17	0,037
$n_2(O_{22})$	$\sigma^*(N_2 - H_3)$	0,87	0,71	0,023
$n_2(O_{22})$	$\sigma^*(C_4 - C_{21})$	18,79	0,63	0,098
$n_2(O_{22})$	$\sigma^*(C_{21} - N_{23})$	22,81	0,74	0,118
$n_1(N_{23})$	$\pi^*(C_{21} - O_{22})$	68,3	0,28	0,123
$n_1(N_{23})$	$\sigma^*(C_{25} - H_{26})$	2,47	0,66	0,039
$n_1(N_{23})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{27})$	0,8	0,64	0,022
$n_1(N_{23})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{42})$	7,19	0,62	0,063
$n_1(N_{23})$	$\pi^*(C_{42} - O_{43})$	2,09	0,29	0,022
$n_1(N_{39})$	$\sigma^*(C_{30} - C_{33})$	0,83	0,69	0,022
$n_1(N_{39})$	$\sigma^*(C_{33} - C_{36})$	7,19	0,7	0,063
$n_1(N_{39})$	$\sigma^*(C_{33} - H_{37})$	1,7	0,7	0,031
$n_1(N_{39})$	$\sigma^*(C_{36} - H_{38})$	1,19	0,7	0,026
$n_1(O_{43})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{42})$	2,02	1,04	0,041
$n_1(O_{43})$	$\sigma^*(C_{42} - N_{44})$	1,71	1,16	0,04
$n_2(O_{43})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{42})$	20,33	0,61	0,1
$n_2(O_{43})$	$\sigma^*(C_{42} - N_{44})$	23,98	0,73	0,12
$n_1(N_{44})$	$\pi^*(C_{42} - O_{43})$	66,45	0,28	0,123
$n_1(N_{44})$	$\sigma^*(C_{46} - H_{47})$	0,96	0,65	0,024
$n_1(N_{44})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{48})$	2,83	0,6	0,04
$n_1(N_{44})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{56})$	8,52	0,6	0,068
$n_1(N_{44})$	$\sigma^*(C_{56} - O_{58})$	0,95	0,59	0,022
$n_1(O_{54})$	$\sigma^*(C_{46} - H_{47})$	0,57	1,02	0,021
$n_1(O_{54})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{48})$	1,15	0,97	0,03
$n_1(O_{54})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{50})$	1,83	1	0,038
$n_2(O_{54})$	$\sigma^*(C_{48} - H_{49})$	7,63	0,7	0,066
$n_2(O_{54})$	$\sigma^*(C_{48} - C_{50})$	3,84	0,69	0,046
$n_2(O_{54})$	$\sigma^*(C_{50} - H_{52})$	0,54	0,71	0,018
$n_1(O_{57})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{56})$	2,36	1,06	0,045

EK 2.(Devam) YKT Tirpeptidinin fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$n_1(O_{57})$	$\sigma^*(C_{56} - O_{58})$	1,47	1,04	0,036
$n_2(O_{57})$	$\sigma^*(C_{33} - H_{35})$	0,52	0,72	0,018
$n_2(O_{57})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{56})$	19,48	0,62	0,1
$n_2(O_{57})$	$\sigma^*(C_{56} - O_{58})$	33,62	0,61	0,13
$n_1(O_{58})$	$\sigma^*(C_{56} - O_{57})$	7,06	1,25	0,084
$n_1(O_{58})$	$\pi^*(C_{56} - O_{57})$	43,57	0,35	0,111
$\pi^*(C_9 - C_{10})$	$\sigma^*(C_4 - C_6)$	1,97	0,31	0,049
$\pi^*(C_9 - C_{10})$	$\sigma^*(C_6 - H_8)$	0,52	0,36	0,028
$\pi^*(C_{12} - C_{14})$	$\pi^*(C_9 - C_{10})$	266,36	0,01	0,081
$\pi^*(C_{21} - O_{22})$	$\sigma^*(N_2 - C_4)$	0,6	0,35	0,033
$\pi^*(C_{21} - O_{22})$	$\sigma^*(C_4 - C_6)$	1,76	0,34	0,053
$\pi^*(C_{42} - O_{43})$	$\sigma^*(N_{23} - C_{25})$	2,53	0,31	0,062
$\pi^*(C_{42} - O_{43})$	$\sigma^*(C_{25} - C_{27})$	0,73	0,35	0,036
$\pi^*(C_{42} - O_{43})$	$\sigma^*(C_{42} - O_{43})$	1	0,57	0,054
$\pi^*(C_{56} - O_{57})$	$\sigma^*(C_{46} - H_{47})$	0,72	0,39	0,046
$\pi^*(C_{56} - O_{57})$	$\sigma^*(C_{46} - C_{48})$	0,87	0,34	0,046

EK 3. YKT tripeptidine ait deneysel IR, Raman, ATR, hesaplanan dalga sayıları ve potansiyel enerji dağılımları.

	Alama	YKT FTIR	ATR	RAMAN	TYR [321,368] IR	LYS [322,323] IR	THR [324,325] IR	FT- Raman	GW frek	Dual Scaling [369]	IR Int.	Rmn Akt.	GAR2PED PED%
1	VoH(dn)								3843	3670	42	116	VoH(dn)(100)
2	VoH(yn)								3833	3661	65	105	VoH(yn)(100)
3	VoH(carboxyl)								3761	3592	82	174	VoH(carboxyl)(100)
4	VNH(peptide)								3614	3451	36	50	VNH(peptide)(99)
5	VNH(peptide)								3610	3447	48	40	VNH(peptide)(99)
6	VNH(ysasym)								3587	3426	11	49	VNH(ysasym)(100)
7	VNH(ysasym)								3561	3401	5	43	VNH(ysasym)(100)
8	VNH(ysasym)								3499	3342	12	139	VNH(ysasym)(100)
9	VNH(ysasym)								3486	3329	2	99	VNH(ysasym)(100)
10	VCH(ys+ring)	3072	3066	3062	3071 ³²¹ 3060 ³²¹				3192	3048	4	204	VCH(ys+ring)(93)
11	VCH(ys+ring)			3043	3047 ³²¹ 3036 ³²¹				3185	3042	9	83	VCH(ys+ring)(97)
12	VCH(ys+ring)			3020	3019 ³²¹ 3026 ³²¹				3161	3019	10	69	VCH(ys+ring)(99)
13	VCH(ys+ring)		2987						3153	3011	13	57	VCH(ys+ring)(94)
14	VCH(dn)	2973	2972	2970					3117	2977	4	38	VCH(dn)(94)
15	VCH(ysasym)					2950 ³²²	2946 ³²²		3083	2944	38	27	VCH(ysasym)(84)
16	VCH(dn)								3083	2944	15	68	VCH(dn)(97)
17	VCH(dn)	2937	2937					2944 ^{324,325}	3076	2938	19	38	VCH(dn)(90)
18	VCH(ysasym)			2930		2938 ³²²	2937 ³²²		3071	2933	19	27	VCH(ysasym)(95)
19	VCH(ysasym)								3069	2931	19	40	VCH(ysasym)(97)
20	VCH(ysasym)		2923			2922 ³²³	2920 ³²²		3056	2918	10	45	VCH(ysasym)(98)
21	VCH(ysasym)		2901			2909 ³²²	2909 ³²²		3041	2904	28	96	VCH(ysasym)(98)
22	VCH(ysasym+sym)								3035	2898	30	219	VCH(ysasym+sym)(96)
23	VCH(dn)		2893						3034	2897	33	122	VCH(dn)(91)

EK 3. (Devam) YKT tripeptidine ait deneysel IR, Raman, ATR, hesaplanan dalga sayıları ve potansiyel enerji dağılımları.

24	VCH(tyrysym.																		3024	2888	2930	50	132	VCH(tyrysym.(98)
25	VCH(thiarysym.																		2880 ^{32,4,2879,32,5}	2887	2929	10	120	VCH(thiarysym.(93)
26	VCH(tyrysym.+sym.																		2882 ^{32,2}	2885	2927	23	70	VCH(tyrysym.+sym.(89)
27	VCH(tyrysym.																			2880	2922	12	63	VCH(tyrysym.(97)
28	VCH(tyrysym.																			2879	2921	70	71	VCH(tyrysym.(92)
29	VCH(tyrysym.																		2867 ^{32,2}	2872	2913	6	149	VCH(tyrysym.(93)
30	VCH(tyrysym.																		2998	2863	2904	11	106	VCH(tyrysym.(95)
31	VCO(carboxyl)																		1822	1740	1765	341	15	VCO(carboxyl(81))+δCHH(carboxyl(6)
32	VCO(tyry-peptide)amide-I																		1734	1694	1680	272	5	VCO(tyry-peptide(72))+ VCN(peptide(7))+ δCCN(7)
33	VCO(amide-I)																		1719	1679	1665	126	10	VCO(tyry-peptide(66))+ δHNH(tyrysis(7))+ δCCN(7)+ VCN(peptide(6)
34	δHNH(tyrysis.																		1672	1634	1620	22	2	δHNH(tyrysis(95)
35	VCC(tyry-riag)																		1654	1616	1602	60	44	VCC(tyry-riag(61))+ δCCH(tyry-riag(12))+ δCC(tyry-riag(6)
36	δHNH(tyrysis.																		1631	1593	1580	145	2	δHNH(tyrysis(72))+ VCO(tyry-peptide(7)
37	VCC(tyry-riag)																		1629	1592	1578	7	7	VCC(tyry-riag(57))+ δHNH(tyrysis(11)
38	δCC(tyry-riag)																		1543	1508	1495	121	2	δCC(tyry-riag(48))+ VCC(tyry-riag(35))+ VCN(tyry(8)
39	δCNH(peptide)amide-II																		1542	1507	1494	264	1	δCNH(peptide(48))+ VCN(peptide(25))+ VCN(thiary(8))+ δCNH(thiary(5)
40	δCNH(peptide)amide-II																		1538	1503	1490	205	2	δCNH(peptide(45))+ VCN(peptide(27)
41	δHCH(tyrysis.																		1510	1475	1463	4	1	δHCH(tyrysis(99)
42	δHCH(thiary)																		1508	1473	1461	5	4	δHCH(thiary(87))+ δCCH(thiary(8)
43	δHCH(thiary)																		1457 ^{32,4}	1462	1449	3	6	δHCH(thiary(84))+ δCCH(thiary(10)
44	δHCH(tyrysis.																		1491	1457	1444	0	1	δHCH(tyrysis(94)
45	δHCH(tyrysis.																		1489	1455	1443	5	6	δHCH(tyrysis(95)
46	δHCH(tyrysis.																		1486	1452	1440	5	16	δHCH(tyrysis(95)
47	δHCH(tyrysis.																		1484	1450	1438	2	7	δHCH(tyrysis(91)
48	VCC(tyry-riag)																		1467	1433	1421	21	0	VCC(tyry-riag(39))+ δCCH(tyry-riag(29))+ δCC(tyry(8)
49	δHCH(tyry)																		1423	1390	1379	2	1	δHCH(tyry(44))+ VCN(tyry(10))+ δCCH(tyry(14))+ δCNH(peptide(5))+ δCN(tyry(5)
50	δHCH(thiaryamb.																		1422	1389	1378	10	0	δHCH(thiaryamb.(80))+ VCN(thiary(10))+ δCC(thiary(5)
51	δCCH(tyryriag.																		1411	1379	1367	12	1	δCCH(tyryriag(61))+ δHCH(tyry(8))+ VCC(tyry(6)

EK 3. (Devam) YKT tripeptidine ait deneysel IR, Raman, ATR, hesaplanan dalga sayıları ve potansiyel enerji dağılımları.

52	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1375	1377						1407	1375	1363	3	3	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(26)+\delta_{\text{CON}}(\text{in})(17)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(8)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(5)$
53	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1373				1368 ³²²	1366 ³²²		1404	1372	1360	13	2	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(40)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(9)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(8)$
54	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1363							1393	1361	1350	2	2	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(49)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(40)$
55	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$			1353						1386	1354	1343	13	1	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(75)$
56	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$	1342	1349	1345			1345 ³²²	1344 ³²²		1383	1351	1340	3	4	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(61)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(14)$
57	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$									1381	1349	1338	47	4	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(53)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(18)$
58	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1339						1342 ³²⁵ 1346 ³²⁴	1372	1340	1329	47	3	$\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(23)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(12)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(8)+\nu_{\text{CO}}(\text{in})(8)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(7)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(6)$
59	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1331							1361	1330	1319	30	0	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(38)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(19)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(15)$
60	$\nu_{\text{CC}}(\text{in})$		1326		1324 ³²¹					1355	1324	1313	2	18	$\nu_{\text{CC}}(\text{in})(33)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(31)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(17)$
61	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1320			1321 ³²³		1320 ³²³		1348	1317	1306	2	9	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(84)$
62	$\nu_{\text{CC}}(\text{in})$	1310								1338	1307	1296	8	6	$\nu_{\text{CC}}(\text{in})(17)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(15)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(13)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(8)$
63	$\delta_{\text{NCH}}(\text{in})$		1296			1291 ³²²		1291 ³²²		1328	1297	1287	11	5	$\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(37)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(6)$
64	$\delta_{\text{NCH}}(\text{in})$									1323	1293	1282	23	4	$\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(25)+\delta_{\text{CON}}(\text{in})(17)+\delta_{\text{CON}}(\text{in})(9)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(7)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(6)$
65	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1288							1318	1288	1277	0	9	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(57)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(13)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(6)$
66	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$									1314	1284	1273	1	1	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(66)$
67	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1269	1267					1247 ³²⁴ , 1246 ³²⁵	1296	1266	1256	11	6	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(49)+\delta_{\text{CON}}(\text{in})(17)$
68	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1258	1258						1294	1264	1254	16	3	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(57)$
69	$\nu_{\text{CO}}(\text{in})$	1249	1249	1249						1279	1250	1239	110	14	$\nu_{\text{CO}}(\text{in})(51)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(19)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(11)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(6)$
70	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1232							1262	1233	1223	10	4	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(25)+\nu_{\text{CN}}(\text{in})(18)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(9)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(6)$
71	$\nu_{\text{CN}}(\text{in})$	1214		1221	1228 ³²¹					1251	1222	1212	78	9	$\nu_{\text{CN}}(\text{in})(21)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(11)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(8)+\nu_{\text{CN}}(\text{in})(7)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(5)$
72	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1215	1213			1190 ³²²			1237	1209	1198	16	6	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(34)+\delta_{\text{CON}}(\text{in})(8)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(6)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(6)+\nu_{\text{CN}}(\text{in})(5)$
73	$\nu_{\text{CC}}(\text{in})$		1195							1225	1197	1187	2	28	$\nu_{\text{CC}}(\text{in})(38)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(13)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(15)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(8)$
74	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$		1181							1212	1184	1174	10	7	$\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(13)+\nu_{\text{CN}}(\text{in})(13)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(10)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(7)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(6)$
75	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$	1172	1173	1176						1198	1170	1161	48	3	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(16)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(15)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(8)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(5)$
76	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$									1196	1168	1159	2	4	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(67)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(8)$
77	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$									1191	1164	1154	132	16	$\delta_{\text{CON}}(\text{in})(41)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(13)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(8)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(7)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(6)$
78	$\nu_{\text{CN}}(\text{in})$		1161	1161						1184	1157	1147	66	3	$\nu_{\text{CN}}(\text{in})(11)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(8)+\nu_{\text{CO}}(\text{in})(7)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(7)+\delta_{\text{CON}}(\text{in})(5)+\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(5)$
79	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})$	1147	1150	1143						1174	1147	1137	25	2	$\delta_{\text{CCH}}(\text{in})(46)+\delta_{\text{NCH}}(\text{in})(8)+\nu_{\text{CC}}(\text{in})(6)$

EK 3. (Devam) YKT tripeptidine ait deneysel IR, Raman, ATR, hesaplanan dalga sayıları ve potansiyel enerji dağılımları.

80	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)$		1135	1128						1165	1138	1129	63	3	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)(12)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(8)+\nu_{\text{CO}}(\text{carboxyl})(7)+\delta_{\text{CONH}}(\text{carboxyl})(6)$
81	$\nu_{\text{CN}}(\nu_r)$									1135	1109	1100	62	1	$\nu_{\text{CN}}(\nu_r)(17)+\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})(14)+\nu_{\text{CO}}(\text{lib})(9)+\delta_{\text{CONH}}(\text{lib})(6)$
82	$\nu_{\text{CN}}(\nu_r)$	1107	1105	1104	1093 ³²⁴					1134	1108	1099	52	1	$\nu_{\text{CN}}(\nu_r)(24)+\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})(7)+\nu_{\text{CO}}(\text{lib})(6)+\nu_{\text{CO}}(\text{carboxyl})(5)+\nu_{\text{CN}}(\nu_s)(5)$
83	$\nu_{\text{CO}}(\text{carboxyl})$									1123	1097	1088	203	3	$\nu_{\text{CO}}(\text{carboxyl})(27)+\delta_{\text{CONH}}(\text{carboxyl})(12)+\nu_{\text{CO}}(\text{lib})(11)+\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})(9)+\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(7)+\nu_{\text{CN}}(\text{lib})(5)$
84	$\delta_{\text{CCH}}(\text{img})$									1123	1097	1088	13	1	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_r+\text{img})(47)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_r+\text{img})(22)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_r+\text{twist})(6)$
85	$\nu_{\text{CN}}(\nu_s)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)$	1081	1084	1089		1069 ³²²	1071 ³²²			1109	1083	1074	5	8	$\nu_{\text{CN}}(\nu_s)(14)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(13)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_r+\text{img}+\text{twist})(11)+\nu_{\text{CN}}(\nu_r)(8)+\nu_{\text{CN}}(\nu_s)(8)+\delta_{\text{CCO}}(\nu_s)(6)+\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(14)+\nu_{\text{CO}}(\text{lib})(6)$
86	$\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})$		1074	1070						1093	1068	1059	17	3	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(17)+\nu_{\text{CN}}(\nu_s)(14)+\nu_{\text{CO}}(\text{lib})(6)$
87	$\nu_{\text{CN}}(\nu_s)$		1066	1066						1090	1065	1056	4	5	$\nu_{\text{CN}}(\nu_s)(44)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(31)$
88	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_s+\text{twist})$	1049	1056	1056		1052 ³²²	1055 ³²²			1075	1050	1041	23	4	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_s+\text{twist})(32)+\nu_{\text{CN}}(\nu_s)(7)+\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(5)$
89	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_s+\text{twist}+\text{twist})$									1059	1035	1026	16	7	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_s+\text{twist}+\text{twist})(23)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)(16)+\nu_{\text{CN}}(\nu_s)(12)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)(10)$
90	$\nu_{\text{CN}}(\nu_s)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)$		1028	1029		1028 ³²²	1029 ³²²			1048	1024	1015	6	3	$\nu_{\text{CN}}(\nu_s)(31)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s+\text{twist})(30)+\nu_{\text{CN}}(\nu_r)(5)$
91	$\nu_{\text{CCO}}(\text{img})$	1013	1008	1008	994 ³²¹					1029	1005	997	1	0	$\nu_{\text{CCO}}(\text{img})(34)+\delta_{\text{CCO}}(\text{img})(10)+\delta_{\text{CCH}}(\text{img})(5)$
92	$\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})$									1027	1003	995	1	2	$\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})(19)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s+\text{twist})(10)+\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(8)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)(7)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(6)+\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(5)+\nu_{\text{CN}}(\text{lib})(5)$
93	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)+\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})$		994	990		983 ³²²	983 ³²²			1018	995	986	17	6	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(23)+\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})(13)+\nu_{\text{CO}}(\text{lib})(8)+\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(7)$
94	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_r)$									1010	987	978	20	22	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_r)(41)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_r)(8)+\delta_{\text{CCO}}(\nu_r)(7)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_r)(5)+\Gamma_{\text{CONH}}(5)$
95	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_r)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_r)$		965							986	963	955	1	3	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_r)(9)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_r)(9)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)(7)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(7)+\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)(6)$
96	$\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})$							932 ³²⁴		974	952	944	2	3	$\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})(21)+\nu_{\text{CO}}(\text{lib})(19)+\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})(7)+\delta_{\text{CNC}}(6)+\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})(5)$
97	$\Gamma_{\text{CCCH}}(\text{img})$									971	949	941	0	1	$\Gamma_{\text{CCCH}}(\text{img})(88)+\Gamma_{\text{CCCO}}(\text{img})(5)$
98	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_r)$		944							963	941	933	7	2	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_r)(19)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(6)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(5)$
99	$\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})$								910 ³²⁵	954	932	924	6	6	$\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(21)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s)(9)+\nu_{\text{CO}}(\text{lib})(7)$
100	$\Gamma_{\text{CCCH}}(\text{img})$	925	926	928						947	925	917	6	3	$\Gamma_{\text{CCCH}}(\text{img})(69)+\Gamma_{\text{CCCO}}(\text{img})(15)$
101	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)$	885	890							910	889	882	24	7	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)(16)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_s+\text{twist})(9)+\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(9)+\delta_{\text{CCO}}(\text{lib})(6)$
102	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_r)$	867								890	870	862	24	3	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_r+\text{twist})(11)+\delta_{\text{NCO}}(\text{carboxyl})(9)+\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(8)+\nu_{\text{CCO}}(\nu_r)(7)$
103	$\nu_{\text{CO}}(\text{lib})$		856	856						875	855	848	34	2	$\nu_{\text{CO}}(\text{lib})(25)+\nu_{\text{CCO}}(\text{lib})(10)+\delta_{\text{CCH}}(\text{lib})(5)+\Gamma_{\text{CONH}}(\nu_s)(5)$
104	$\Gamma_{\text{CCNH}}(\nu_s)$	849	848							866	846	839	155	1	$\Gamma_{\text{CCNH}}(\nu_s)(56)+\nu_{\text{CN}}(\nu_r+\text{img})(13)$
105	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_r)$		839		841 ³²¹					860	840	833	15	26	$\nu_{\text{CCO}}(\nu_r)(48)+\delta_{\text{CCO}}(\text{img}+\text{twist})(11)+\nu_{\text{CO}}(\nu_r)(9)$
106	$\Gamma_{\text{CCCH}}(\text{img})$	827	828	832						845	826	819	44	7	$\Gamma_{\text{CCCH}}(\text{img})(52)+\Gamma_{\text{CCNH}}(\nu_r)(15)+\Gamma_{\text{CCCO}}(\nu_r)(8)+\Gamma_{\text{CCCO}}(\text{img})(6)$
107	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)$									839	820	813	10	1	$\delta_{\text{CCH}}(\nu_s)(21)+\delta_{\text{CCNH}}-\text{CNH}(\nu_s)(8)+\Gamma_{\text{CCNH}}(\nu_s)(7)+\Gamma_{\text{CCO}}(\text{lib})(6)$

EK 3. (Devam) YKT tripeptidine ait deneysel IR, Raman, ATR, hesaplanan dalga sayıları ve potansiyel enerji dağılımları.

[illegible]

[illegible]

EK 3. (Devam) YKT tripeptidine ait deneysel IR, Raman, ATR, hesaplanan dalga sayıları ve potansiyel enerji dağılımları.

164	$\Gamma_{\text{CNCH}(4a)}$												54	53	52	4	1	$\Gamma_{\text{CNCH}(4a)}(29)+\Gamma_{\text{NCCO}}(18)+\Gamma_{\text{NCCO}(6)}(12)+\Gamma_{\text{CNCH}}(7)+\Gamma_{\text{CNCH}}(5)$
165	$\Gamma_{\text{CCCO}(9a)}$												49	48	47	2	3	$\Gamma_{\text{CCCO}(9a)}(43)+\Gamma_{\text{CNCD}}(7)+\Gamma_{\text{NCH}(9a)}(6)$
166	$\Gamma_{\text{CCCH}(9a)}+\Gamma_{\text{CNCH}}$												43	42	42	0	1	$\Gamma_{\text{CCCH}(9a)}(12)+\Gamma_{\text{CNCH}}(11)+\Gamma_{\text{NCCO}(6)}(9)+\Gamma_{\text{CCCH}(9a)}(8)+\Gamma_{\text{CNCD}}(6)$
167	Γ_{NCCO}												29	28	28	1	1	$\Gamma_{\text{NCCO}}(43)+\Gamma_{\text{CNCH}}(13)+\Gamma_{\text{CNCD}}(6)+\Gamma_{\text{NCCO}(9a)}(5)$
168	$\Gamma_{\text{NCH}(9a)}+\Gamma_{\text{CNCH}}$												23	22	22	1	1	$\Gamma_{\text{NCH}(9a)}(26)+\Gamma_{\text{CNCH}}(18)+\Gamma_{\text{CCCO}(9a)}(10)+\Gamma_{\text{CCCO}(9a)}(8)+\Gamma_{\text{NCCO}(9a)}(8)+\Gamma_{\text{NCCO}(6)}(5)$
169	Γ_{NCCO}												20	20	19	1	1	$\Gamma_{\text{NCCO}}(28)+\Gamma_{\text{NCH}(9a)}(10)+\Gamma_{\text{CNCH}}(10)+\Gamma_{\text{CCCO}(9a)}(9)+\Gamma_{\text{CCCH}(9a)}(8)+\Gamma_{\text{CNCH}}(7)+\Gamma_{\text{NCCO}(9a)}(5)$
170	$\Gamma_{\text{NCH}(9a)}+\Gamma_{\text{CCCO}(9a)}$												15	15	15	0	3	$\Gamma_{\text{NCH}(9a)}(35)+\Gamma_{\text{CCCO}(9a)}(23)+\Gamma_{\text{NCH}(9a)}(6)+\Gamma_{\text{CNCH}}(5)$
171	$\Gamma_{\text{NCCO}(9a)}$												10	10	10	0	2	$\Gamma_{\text{NCCO}(9a)}(41)+\Gamma_{\text{CNCH}}(7)+\Gamma_{\text{CNCH}}(13)+\Gamma_{\text{CNCH}(9a)}(12)$

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Bilge Bıçak
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Fizik Bölümü
Mezuniyet Yılı	08.06.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Fizik Anabilim Dalı
Programı	Atom ve Molekül Fiziği

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Fizik Anabilim Dalı
Programı	Atom ve Molekül Fiziği Programı

Makale ve Bildiriler
<i>SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler</i>
Budama-Kilinc, Y., Kecel-Gunduz, S., Cakir-Koc, R., Aslan, B., Bicak, B., Kokcu, Y., ... & Akyuz, S. (2021). Structural Characterization and Drug Delivery System of Natural Growth-Modulating Peptide Against Glioblastoma Cancer. <i>International Journal of Peptide Research and Therapeutics</i> , 1-14.
Bicak, B., Budama-Kilinc, Y., Kecel-Gunduz, S., Zorlud, T., & Akman, G. (2021). Peptide based nano-drug candidate for cancer treatment: Preparation, characterization, in vitro and in silico evaluation. <i>Journal of Molecular Structure</i> , 1240, 130573.

Kecel-Gunduz, S., Budama-Kilinc, Y., Gok, B., Bicak, B., Akman, G., Arvas, B., ... & Yolacan, C. (2021). Computer-aided anticancer drug design: In vitro and in silico studies of new iminocoumarin derivative. *Journal of Molecular Structure*, 1239, 130539.

Budama- Kilinc, Y., Kecel- Gunduz, S., Ozdemir, B., Bicak, B., Akman, G., Arvas, B., ... & Yolacan, C. (2020). New nanodrug design for cancer therapy: Its synthesis, formulation, in vitro and in silico evaluations. *Archiv der Pharmazie*, 353(11), 2000137.

Kecel-Gunduz, S., Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Zorlu, T., Bicak, B., Kokcu, Y., ... & Akyuz, S. (2020). In Silico design of AVP (4–5) peptide and synthesis, characterization and in vitro activity of chitosan nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-19.

Kokcu, Y., Kecel-Gunduz, S., Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Bicak, B., Zorlu, T., ... & Akyuz, S. (2020). Structural analysis, molecular dynamics and docking calculations of skin protective tripeptide and design, characterization, cytotoxicity studies of its PLGA nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*, 1200, 127046.

Kecel-Gunduz, S., Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Zorlu, T., Bicak, B., Kokcu, Y., ... & Akyuz, S. (2020). In silico Analysis of Sulpiride, Synthesis, Characterization and In vitro Studies of its Nanoparticle for the Treatment of Schizophrenia. *Current Computer-Aided Drug Design*, 16(2), 104-121.

Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Kecel-Gunduz, S., Zorlu, T., Kokcu, Y., Bicak, B., ... & Ozel, A. E. (2018). Papain Loaded Poly (ϵ -Caprolactone) Nanoparticles: In-silico and In-Vitro Studies. *Journal of Fluorescence*, 28(5), 1127-1142.

Kecel-Gündüz, S., Budama-Kilinc, Y., Cakir Koc, R., Kökcü, Y., Bicak, B., Aslan, B., & Özel, A. E. (2018). Computational design of Phe-Tyr dipeptide and preparation, characterization, cytotoxicity studies of Phe-Tyr dipeptide loaded PLGA nanoparticles for the treatment of hypertension. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(11), 2893-2907.

Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Kecel-Gunduz, S., Kokcu, Y., Bicak, B., Mutlu, H., & Ozel, A. E. (2018). Novel NAC-loaded poly (lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for cataract treatment: preparation, characterization, evaluation of structure, cytotoxicity, and molecular docking studies. *PeerJ*, 6, e4270.

Kecel-Gunduz, S., Bicak, B., Celik, S., Akyuz, S., & Ozel, A. E. (2017). Structural and spectroscopic investigation on antioxidant dipeptide, l-Methionyl-l-Serine: A combined experimental and DFT study. *Journal of Molecular Structure*, 1137, 756-770.

Diğer Dergilerde Yayınlanan Makaleler

Kecel-Gunduz, S., Koc, E., Bicak, B., Kokcu, Y., Ozel, A. E., & Akyuz, S. (2020). IN SILICO ANALYSIS FOR CHARACTERIZING THE STRUCTURE AND

BINDING PROPERTIES OF ALA-HIS-LYS (AHK) TRIPEPTIDE. *The Online Journal of Science and Technology*-July, 10(3).

Bicak, B., Kokcu, Y., Kecel-Gunduz, S., & AKYUZ, S. The Interaction of Ile-Phe Dipeptide with Phosphatidylinositide 3-Kinase (PI3K): Molecular Dynamics and Molecular Docking Studies. *Natural and Engineering Sciences*, 5(1), 18-29.

Bicak, B., Gündüz, S. K., Kökcü, Y., Özel, A. E., & Akyüz, S. (2019). Molecular docking and molecular dynamics studies of l-glycyl-l-glutamic acid dipeptide. *Bilge International Journal of Science and Technology Research*, 3(1), 1-9.

ŞENER, L. T., GÜNDÜZ, S. K., ŞENER, A., Bicak, B., KÖKCÜ, Y., & ALBENİZ, İ. (2019). Computerised designing of doxorubicin with breast cancer cells. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 82(1), 40-46.

Sener, L. T., Gunduz, S. K., Sener, A., Celikok, Y., Bicak, B., Kokcu, Y., ... & Albeniz, I. (2018). Use of the Comet Assay and Molecular Docking Techniques to Evaluate the Effect of Nicotine in Human Breast Cancer Cell Line. *cancer*, 4(10).

Kitap & Kitap Bölümleri

Bicak, B., Gunduz, S. K., & Ozel, A. E. Advancements in Cancer Therapeutics: Targeted Drug Delivery in Cancer Treatment. In *Handbook of Research on Advancements in Cancer Therapeutics* (pp. 382-412). IGI Global.

Gunduz, S. K., Bicak, B., & Ozel, A. E. Advancements in Cancer Therapeutics: Computational Drug Design Methods Used in Cancer Studies. In *Handbook of Research on Advancements in Cancer Therapeutics* (pp. 89-115). IGI Global.

Kecel-Gunduz, S., Bicak, B., & Ozel, A. E. (2020). Drug delivery nanosystems for neural regenerative medicine. In *Neural Regenerative Nanomedicine* (pp. 89-122). Academic Press.

Hakemli Kongre / Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

MOLECULAR DOCKING CALCULATIONS OF PIXANTRONE WITH TOPOISOMERASE II

Salari A., Kandemir M. C. , BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S.

Türk Fizik Derneği 35. Uluslararası Fizik Kongresi, Muğla, Türkiye, 4 - 08 Eylül 2019, ss.166

DNA INTERACTION OF SOME HYDANTOIN-BASED DRUGS WITH MOLECULAR DOCKING CALCULATIONS

Kandemir M. C. , Salari A., BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S.

Türk Fizik Derneği 35. Uluslararası Fizik Kongresi, Muğla, Türkiye, 4 - 08 Eylül 2019, ss.158

MOLECULAR DOCKING INVESTIGATION OF PIXANTRONE WITH B-DNA DODECAMER

Saları A., Kandemir M. C. , BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S.

Türk Fizik Derneği 35. Uluslararası Fizik Kongresi, Muğla, Türkiye, 4 - 08 Eylül 2019, ss.331

MOLECULAR DOCKING STUDIES OF PHENYTOIN, MEPHENYTOIN, AND ETHOTOIN WITH CYTOCHROME P450 3A4

Kandemir M. C. , Saları A., BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S.

Türk Fizik Derneği 35. Uluslararası Fizik Kongresi, Muğla, Türkiye, 4 - 08 Eylül 2019, ss.331

IN SILICO ANALYSIS OF HAIR GROWTH PEPTIDE

KECEL GÜNDÜZ S. , KOÇ E., BIÇAK B. , ÖZEL A. , AKYÜZ S.

Türk Fizik Derneği 35. Uluslararası Fizik Kongresi, Muğla, Türkiye, 4 - 08 Eylül 2019, ss.163

IN SILICO ANALYSIS FOR CHARACTERIZING THE STRUCTURE,VIBRATIONASSIGNMENT, AND BINDING PROPERTIES OF ALA-HIS-LYS (AHK) TRIPEPTIDE

Kecel Gündüz S. , Koç E., Bıçak B. , Özel A. , Akyüz S.

International Science and Technology Conference (ISTEC), Praha, Çek Cumhuriyeti, 3 - 05 Temmuz 2019, ss.86

THE THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS AND QUANTUM CHEMICAL CALCULATIONS OF ANTIOXIDANT TRIPEPTIDE

KÖKCÜ Y., BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A.

1st International Symposium on Graduate Research in Science, İstanbul, Türkiye, 4 - 06 Ekim 2018, ss.9

THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF L-ISOLEUCYL-L-PHENYLALANINE DIPEPTIDE

BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A.

1st International Symposium on Graduate Research in Science, İstanbul, Türkiye, 4 - 06 Ekim 2018, ss.9

Neuroprotective dipeptide AVP(4-5)-NH₂ loaded Chitosan Nanoparticle; In-silico and In-vitro Studies

KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A. , BIÇAK B. , Kokcu Y., Budama Kilinc Y., Çakır Koç R., et al.

ICINSE 2018, Kiev, Ukrayna, 7 - 10 Eylül 2018, ss.5

Molecular Docking And Molecular Dynamics Studies of L-Glycyl-L-Glutamic Acid Dipeptide

BIÇAK B. , Kokcu Y., KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A. , AKYÜZ S.

ICINSE 2018, Kiev, Ukrayna, 7 - 10 Eylül 2018, ss.3

Molecular Dynamic, Molecular Docking, Characterization And In-Vitro Studies of Sulpiride Loaded Chitosan Nanoparticles

KECEL GÜNDÜZ S. , BIÇAK B. , Kokcu Y., Budama Kilinc Y., Çakır Koç R., Zorlu T., et al.

ICINSE 2018, Kiev, Ukrayna, 7 - 10 Eylül 2018, ss.1

MOLECULAR DOCKING AND MOLECULAR DYNAMICS STUDIES OF L- ISOLEUCYL-LPHENYLALANINE DIPEPTIDE

BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S. , Kokcu Y., ÖZEL A.

Turkish Physical Society 34 th International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 5 - 09 Eylül 2018, ss.28

MOLECULAR DOCKING AND MOLECULAR DYNAMICS STUDIES OF N- TERMINAL FRAGMENT OF THE MAJOR VASOPRESSIN METABOLITE

KECEL GÜNDÜZ S. , BIÇAK B. , Kokcu Y., ÖZEL A.

Turkish Physical Society 34 th International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 5 - 09 Eylül 2018, ss.28

PAPAIN LOADED POLYCAPROLACTON NANOPARTICLES: IN-SILICO AND IN-VITRO STUDIES

BUDAMA-KILINC Y., Çakır Koç R., KECEL GÜNDÜZ S. , Zorlu T., Kokcu Y., BIÇAK B. , et al.

2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB), 25 - 30 Haziran 2018, ss.1

MOLECULAR DOCKING, MOLECULAR DYNAMICS, OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF GHK-LOADED POLY(?- CAPROLACTONE) NANOPARTICLES AS POTENTIAL ANTI-CANCEROGENIC EFFECT ON GLIOBLASTOMA CANCER CELLS

KECEL GÜNDÜZ S. , BUDAMA-KILINC Y., Çakır Koç R., Aslan B., Kokcu Y., BIÇAK B. , et al.

2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB), 25 - 30 Haziran 2018, ss.1

Antioxidant peptide Loaded poly(lactic-coglycolic acid) Nanoparticles: Molecular Design, Characterization and Molecular Docking Study

KECEL GÜNDÜZ S. , KÖKCÜ Y., BIÇAK B. , BUDAMA KILINÇ Y., ÇAKIR KOÇ R., ÖZEL A.

International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), Ankara, Türkiye, 26 - 27 Nisan 2018, ss.1280-1281

STRUCTURAL ANALYSIS OF SDKGATLTIKKEAFPAESKS PEPTIDE

BIÇAK B. , KÖKCÜ Y., KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A.

Turkish Physical Society 33 th International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 6 - 09 Eylül 2017, ss.1

MOLECULAR DYNAMIC MOLECULAR DOCKING HOMOLUMO MEP AND UVVIS ANALYSIS OF PHETYL DIPEPTIDE FOR THE TREATMENT OF HYPERTENSION

KECEL GÜNDÜZ S. , Kokcu Y., Bıçak B. , ÖZEL A.

Turkish Physical Society 33 th International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 6 - 10 Eylül 2017, ss.251

MOLECULAR DYNAMIC SIMULATION OF NAC MOLECULE

KÖKCÜ Y., BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A.

Turkish Physical Society 33 th International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 6 - 09 Eylül 2017, ss.1

MOLECULAR MODELING OF FAGAAGSAKSAAGTASHVSI PEPTIDE

KÖKCÜ Y., BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A.

Turkish Physical Society 33 th International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 6 - 09 Eylül 2017, ss.1

COMPUTATIONAL DESIGN OF IMMUNOGENIC PEPTIDE

KECEL GÜNDÜZ S. , KÖKCÜ Y., BIÇAK B. , ÖZEL A.

Turkish Physical Society 33 th International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 6 - 09 Eylül 2017, ss.1

MOLECULAR DYNAMIC AND DOCKING STUDIES OF RGD PEPTIDE

BIÇAK B. , KÖKCÜ Y., KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A.

Turkish Physical Society 33 th International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 6 - 09 Eylül 2017, ss.1

DETERMINATION OF CONFORMATIONAL AND STRUCTURAL FEATURES OF L-GLY-L-GLU DIPEPTIDE

BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A.

32nd International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 6 - 09 Eylül 2016, ss.1

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL VIBRATIONAL STUDY OF MET-SER DIPEPTIDE

BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A. , ÇELİK S.

9th International Physics Conference of the Balkan Physical Union, İstanbul, Türkiye, 24 - 27 Ağustos 2015, ss.1

VIBRATIONAL SPECTROSCOPIC INVESTIGATION OF PROLINE-TYROSINE DIPEPTIDE

BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S.

10th International Student Conference Of The Balkan Physical Union, İstanbul, Türkiye, 3 - 05 Eylül 2013, ss.18

Vibrational Spectroscopic Studies Of Analgesic Peptide

BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S.

Turkish Physical Society 30 th International Physics Congress, İstanbul, Türkiye, 2 - 05 Eylül 2013, ss.1

Conformational Analysis Of L-Methionyl-L-Serine Dipeptide

BIÇAK B. , KECEL GÜNDÜZ S. , ÖZEL A.

29th International Physics Congress, Muğla, Türkiye, 5 - 08 Eylül 2012, ss.1

