



**BAZI YENİ SENTEZLENEN TRİFOSFAZENLERİN ANTİMİKROBİYAL  
AKTİVİTELERİ VE DNA ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dila KOYUNOĞLU**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2025**

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Dila KOYUNOĞLU

23/01/2025

# BAZI YENİ SENTEZLENEN TRİFOSFAZENLERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ VE DNA ÜZERİNE ETKİLERİ

(Doktora Tezi)

Dila KOYUNOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2025

## ÖZET

P-Cl bağında yüksek derecede reaktifliğe sahip olan klorosiklofosfazenler, farklı nükleofiller ile sübstitüsyon reaksiyonları verebilmektedir. Çalışmada, ferrosen sübstitüe yapılar ile biyouyumlu bir bileşik olan trimerik fosfazen bileşiği bir araya getirilerek sentezlenen monospirosiklotrifosfazen türevi 12 adet bileşik kullanılmıştır. Farklı patojen mikroorganizmalar üzerinde propilamin, bütilamin ve metronidazol sübstitüenti içeren bileşiklerin agar kuyu difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivite gösteren bileşiklerin, mikrodilüsyon yöntemi ile MİK, MBK ve MFK değerleri tespit edilmiştir. Yapılan biyolojik aktivite çalışmaları sonucunda MİK (<19,5 ile >2500  $\mu$ M), MBK (19,5 ile >2500  $\mu$ M) ve MFK değerlerinin (19,5 ile 2500  $\mu$ M) aralığında değiştiği gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan bileşiklerin genelinen patojen bakteri ve mayalar üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği; propilamin sübstitüenti taşıyan (4a-6a) ile bütilamin sübstitüenti taşıyan (4b-6b) bileşiklerinin referans antibiyotiklerine kıyasla daha etkili antimikrobiyal aktivite gösterdiği elde edilmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için (4a-6a) ve (4b-6b) bileşiklerinin DPPH serbest radikalini süpürücü etkisi ile demir şelatlama aktivitesi incelenmiştir ve bileşiklerin kullanılan konsantrasyonlarda (5000-312,5  $\mu$ M) herhangi bir antioksidan aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Ames testi yöntemi ile genotoksik aktivitesi incelenen (4a-6a) ve (4b-6b) bileşiklerinin (5000-2500  $\mu$ M) konsantrasyonlarda herhangi bir genotoksik aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimi agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Metronidazol sübstitüe (4c-4d), (5c-5d), (6c-6d) bileşiklerinin DNA'da çift zincir kırığı oluşturarak DNA'ya hasar verdiği, 4d dışındaki tüm bileşiklerin enzim kesimini kısmen veya tamamen engellediği ve DNA üzerindeki A/A, G/G bölgelerinden bağlanmış olabileceği tespit edilmiştir. (4a-6a) ve (4b-6b) bileşiklerinin sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi ile belirlenmiştir ve MDA-MB-231 (meme kanseri) ile Vero (epitel) hücre hatları üzerinde (50-3,1  $\mu$ M) konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. 5a bileşiğinin ise, sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı olarak daha fazla arttığı gösterilmiştir ( $p<0,05$ ).

Bilim Kodu : 20326  
Anahtar Kelimeler : Fosfazen, antimikrobiyal ve antioksidan aktivite, genotoksisite, plazmit DNA ile etkileşim, sitotoksisite  
Sayfa Adedi : 136  
Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES AND EFFECTS ON DNA OF SOME NEW  
SYNTHESIZED TRIPHOSHAZENES

(Ph. D. Thesis)

Dila KOYUNOĞLU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2025

ABSTRACT

Chlorocyclophosphazenes, which have highly reactive P-Cl bonds, can give substitution reactions with different nucleophiles. In the study, 12 monospirocyclotriphosphazene derivative compounds synthesized by combining ferrocene substituted structures with trimeric phosphazene compound, a biocompatible compound, were used. Antimicrobial activity of compounds containing propylamine, butylamine and metronidazole substituents on different pathogenic microorganisms was investigated by agar well diffusion method. MIC, MBC and MFC values of compounds showing antimicrobial activity were determined by microdilution method. As a result of the biological activity studies, it was observed that MIC (<19,5 to >2500  $\mu$ M), MBK (19,5 to >2500  $\mu$ M) and MFK values (19,5 to 2500  $\mu$ M) ranged. It was found that the compounds used in the study generally showed antimicrobial activity on pathogenic bacteria and yeasts; compounds carrying propylamine substituent (4a-6a) and butylamine substituent (4b-6b) showed more effective antimicrobial activity compared to reference antibiotics. To determine antioxidant activity, DPPH free radical scavenging effect and iron chelating activity of compounds (4a-6a) and (4b-6b) were examined and it was determined that the compounds didn't have any antioxidant activity at the concentrations used (5000-312.5  $\mu$ M). It was determined that the genotoxic activity of the compounds (4a-6a) and (4b-6b) examined with the Ames test method didn't have any genotoxic activity at concentrations (5000-2500  $\mu$ M). The interaction of the compounds with plasmid DNA was investigated by agarose gel electrophoresis. It was determined that metronidazole substituted (4c-4d), (5c-5d), (6c-6d) compounds damaged DNA by creating double-strand breaks in DNA, all compounds except 4d partially or completely inhibited enzyme cleavage and may have bound to A/A, G/G regions on DNA. The cytotoxic activity of compounds (4a-6a) and (4b-6b) was determined by the MTT method and it was determined that they showed a concentration-dependent cytotoxic effect on MDA-MB-231 (breast cancer) and Vero (epithelial) cell lines (50-3,1  $\mu$ M). It was shown that the cytotoxic effect of compound 5a on cancer cells increased more depending on the concentration compared to healthy cells ( $p < 0,05$ ).

Science Code : 20326

Keywords : Phosphazene, antimicrobial and antioxidant activity, genotoxicity,  
interaction with plasmid DNA, cytotoxicity

Page Number : 136

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgisini, deneyimini ve fikirlerini benimle paylaşarak bana her konuda destek olan, tez çalışmam sırasında karşılaştığım bütün zorluklarda her zaman yol göstererek sevgi ve anlayışını esirgemeyen, değerli görüş ve önerileriyle akademik alanda her yönden ilerlememi sağlayan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK’a teşekkür ve saygılarımı sunarım. Tez izleme komitesinde yer alarak bilgi ve deneyimlerini aktaran ve tezin değerlendirilmesinde önemli katkıları olan, akademik yolculuğa başlarken sevgi ve anlayışı ile bana ışık olan çok kıymetli yüksek lisans tez danışman hocam Prof. Dr. Hayat YURTER’e ve çok kıymetli hocam Prof. Dr. Ali DİŞLİ’ye teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamdaki kimyasal bileşiklerin sentezini sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Nuran ASMAFİLİZ ve Dr. Öğr. Üyesi Reşit CEMALOĞLU’na, laboratuvar desteği sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Hatice MERGEN ve Prof. Dr. Ahmet UYSAL’a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmasında deneylerimi yaptığım süreçte benden yardım ve desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Büşra Nur SABAH’a, laboratuvarında saatlerce birlikte çalışıp güzel anılar biriktirdiğim ekip arkadaşlarıma ve kalben her zaman yanımda olan kıymetli dostum Sema GEBECİK’e çok teşekkür ederim. Tez çalışmamı gerçekleştirmemde bana maddi olarak burs desteği sağlayan, YÖK 100/2000 Doktora Bursları Birimi’ne ve 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Bursu ile TÜBİTAK-BİDEB’e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam, hayatımda elde ettiğim tüm başarılarımda sevgi emeği olan ailemin eşsiz katkısı ile hazırlanmıştır. Bu nedenle bu çalışmayı her zaman kalbimde olduklarını hissettiğim babam, annem, halam ve ikiz kardeşlerime ithaf ediyorum. Çalışmamın iyi bir bilim insanı olmanın öncesinde, iyi bir insan olmanın önemine inanan ve bilgiyi paylaşabilen herkese katkı sağlamasını dilerim.

Bu tez çalışmasına, “FDK-2021-7335” numaralı Doktora Tez Projesi ile destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                     | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                          | iv    |
| ABSTRACT.....                                                       | v     |
| TEŞEKKÜR.....                                                       | vi    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                   | vii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                                           | x     |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....                                             | xi    |
| RESİMLERİN LİSTESİ .....                                            | xiii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                        | xiv   |
| 1. GİRİŞ.....                                                       | 1     |
| 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI .....                    | 5     |
| 2.1. Fosfazen Bileşiklerinin Özellikleri .....                      | 5     |
| 2.2. Ferrosenilfosfazen Bileşikleri ile İlgili Genel Bilgiler ..... | 6     |
| 2.3. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikroorganizmalar.....              | 8     |
| 2.3.1. Bakteriler .....                                             | 12    |
| 2.3.2. Funguslar (Mantarlar) alemi ve mayalar .....                 | 18    |
| 2.4. Antimikrobiyal Maddeler.....                                   | 20    |
| 2.4.1. Antibakteriyel ilaçlar.....                                  | 21    |
| 2.4.2. Antifungal ilaçlar .....                                     | 24    |
| 2.4.3. Antimikrobiyal direnç .....                                  | 25    |
| 2.5. Patojen Mikroorganizmaların Oluşturduğu Enfeksiyonlar .....    | 34    |
| 2.5.1. Patojen bakteri türleri.....                                 | 34    |
| 2.5.2. Patojen maya türleri .....                                   | 41    |
| 2.6. Serbest Radikaller .....                                       | 45    |
| 2.7. Antioksidanlar.....                                            | 47    |

|                                                                              | <b>Sayfa</b> |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.8. Kanser ve Etkenleri.....                                                | 48           |
| 2.8.1. Meme kanseri.....                                                     | 51           |
| 2.8.2. Meme kanseri tedavisinde kullanılan farklı yöntemler ve ilaçlar ..... | 53           |
| 2.9. DNA-İlaç Etkileşimi .....                                               | 54           |
| 2.9.1. DNA- ilaç etkileşim mekanizmaları .....                               | 56           |
| 2.10. Bileşiklerin Biyolojik Aktivitesini Belirleme Yöntemleri.....          | 59           |
| 2.10.1. Antimikrobiyal aktivite belirleme.....                               | 59           |
| 2.10.2. Antioksidan aktivite belirleme .....                                 | 60           |
| 2.10.3. Genotoksik aktivite belirleme .....                                  | 61           |
| 2.10.4. Sitotoksik Aktivite Belirleme .....                                  | 62           |
| 3. MATERYAL VE METOT.....                                                    | 65           |
| 3.1. Materyal.....                                                           | 65           |
| 3.1.1. Kullanılan fosfazen bileşikleri .....                                 | 65           |
| 3.1.2. Mikroorganizmaların gelişme ortamları.....                            | 67           |
| 3.1.3. Hücre hatları.....                                                    | 68           |
| 3.1.4. Kimyasal madde isimleri.....                                          | 68           |
| 3.1.5. Test suşları .....                                                    | 69           |
| 3.1.6. Alet, cihaz ve sarf malzeme.....                                      | 69           |
| 3.1.7. Çözeltiler.....                                                       | 70           |
| 3.2. Metot.....                                                              | 72           |
| 3.2.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....           | 72           |
| 3.2.2. Bileşiklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....              | 73           |
| 3.2.3. Bileşiklerin genotoksik aktivitesinin belirlenmesi.....               | 74           |
| 3.2.4. Bileşik-plazmit DNA etkileşimi .....                                  | 75           |
| 3.2.5. Bileşiklerin sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi.....               | 75           |

**Sayfa**

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....                                         | 77  |
| 4.1. Antimikrobiyal Aktivite.....                                   | 77  |
| 4.1.1. Bileşiklerin MİK, MBK ve MFK değerlerinin belirlenmesi ..... | 80  |
| 4.2. Antioksidan Aktivite.....                                      | 86  |
| 4.2.1. DPPH serbest radikalini süpürücü etki .....                  | 86  |
| 4.2.2. Demir (II) İyonlarını şelatlama aktivitesi .....             | 87  |
| 4.3. Genotoksik Aktivite.....                                       | 87  |
| 4.3.1. Ames testi sonuçları.....                                    | 87  |
| 4.4. Bileşiklerin plazmit DNA ile Etkileşimi.....                   | 90  |
| 4.5. Sitotoksik Aktivite .....                                      | 94  |
| 4.5.1. MTT testi sonuçları.....                                     | 94  |
| 5. TARTIŞMA .....                                                   | 97  |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                           | 115 |
| KAYNAKLAR .....                                                     | 119 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                      | 135 |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                                     | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 2.1. İnsan vücudunda bulunan bazı mikroorganizmalar .....                                                                           | 9     |
| Çizelge 2.2. Bazı antifungal ilaçlar ve hedef bölgeleri .....                                                                               | 25    |
| Çizelge 2.3. Antibiyotikler ve dirençli olduğu bakteriler .....                                                                             | 29    |
| Çizelge 2.4. Antifungal ajanların etkileri.....                                                                                             | 33    |
| Çizelge 2.5. Yeni antifungal ajanlar ve etkileri .....                                                                                      | 34    |
| Çizelge 3.1. Fosfazen bileşiklerinin isimleri.....                                                                                          | 67    |
| Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan bakteri ve mayaların inkübasyon koşulları .....                                                           | 68    |
| Çizelge 4.1. Bileşiklerin bakteri ve mayalar üzerinde gösterdiği inhibisyon zonları (mm) .....                                              | 79    |
| Çizelge 4.2. Bileşiklerin patojen mikroorganizmalar üzerindeki (MİK) değerleri (μM).....                                                    | 80    |
| Çizelge 4.3. Fosfazen bileşiklerinin MBK, MFK değerleri (μM) .....                                                                          | 86    |
| Çizelge 4.4. DPPH serbest radikalini süpürücü etki (IC50 değerleri) .....                                                                   | 87    |
| Çizelge 4.5. Bileşiklerin demir iyonlarını şelatlama aktivitesi (IC50 değerleri) .....                                                      | 87    |
| Çizelge 4.6. S. Typhimurium TA98 ve TA100 suşları üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda bileşiklerin mutajenite (Ames) testi sonuçları ..... | 88    |
| Çizelge 5.1. Pozitif kontrollerin MİK değeri ile bileşiklerin MİK değerleri arasındaki oran .....                                           | 102   |
| Çizelge 5.2. Pozitif kontrol ile bileşiklerin MBK ve MFK arasındaki oran .....                                                              | 103   |
| Çizelge 5.3. Bileşiklerin MİK ve MBK değerleri (bakteriyostatik/bakterisidal ilaç).....                                                     | 106   |
| Çizelge 6.1. Çalışma sonucunda alınan verilerin sonuçları ve değerlendirilmesi .....                                                        | 117   |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                             | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Fosfazenlerin yapıları .....                                                                           | 5     |
| Şekil 2.2. Ferrosen halkası .....                                                                                 | 7     |
| Şekil 2.3. Sübstitüe ferrosenilfosfazen bileşikler.....                                                           | 8     |
| Şekil 2.4. Disbiyotik flora ve insan sağlığına etkisi.....                                                        | 10    |
| Şekil 2.5. Prokaryotik ve ökaryotik hücre yapısı.....                                                             | 13    |
| Şekil 2.6. Bakteri yapısı.....                                                                                    | 14    |
| Şekil 2.7. Peptidoglikan yapısı.....                                                                              | 15    |
| Şekil 2.8. Bakterilerdeki hücre duvar yapısının gösterimi.....                                                    | 17    |
| Şekil 2.9. Funguslarda hücre duvarı yapısı.....                                                                   | 19    |
| Şekil 2.10. Antibiyotik hedefleri.....                                                                            | 22    |
| Şekil 2.11. Antifungal ilaçlar ve hedef aldığı bölgeler .....                                                     | 25    |
| Şekil 2.12. Bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı direnç mekanizmaları .....                                 | 28    |
| Şekil 2.13. Antifungal ilaç direnci mekanizmaları .....                                                           | 30    |
| Şekil 2.14. Histon asetilasyon ve metilasyonunun antifungal direnç üzerindeki etkileri .....                      | 31    |
| Şekil 2.15. Klinik dirence neden olan risk faktörleri .....                                                       | 32    |
| Şekil 2.16. C. albicans'ın tutunma ve kolonizasyonu (A), penetrasyonu ve istilas (B) .                            | 42    |
| Şekil 2.17. Candida albicans'ın enfeksiyon sürecindeki morfolojik değişimleri .....                               | 43    |
| Şekil 2.18. C. albicans biyofilm oluşumunun aşamaları.....                                                        | 44    |
| Şekil 2.19. Hücredeki ROS kaynakları .....                                                                        | 46    |
| Şekil 2.20. Serbest radikallerin hücredeki patofizyolojik değişikliklere yol açan mekanizmaları.....              | 47    |
| Şekil 2.21. Kanser hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişim .....                                            | 49    |
| Şekil 2.22. Tümör mikroçevresi.....                                                                               | 50    |
| Şekil 2.23. Kadınlar arasında 2020 yılında en yaygın görülen ilk on kanser türüne ait vaka ve ölüm dağılımı ..... | 52    |

| <b>Şekil</b>                                                                                                      | <b>Sayfa</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 2.24. Meme kanseri tedavisinde kullanılan farklı yöntemler .....                                            | 54           |
| Şekil 2.25. Plazmit DNA'nın formları .....                                                                        | 55           |
| Şekil 2.26. DNA zinciri ve moleküller arasındaki bağlanma türleri.....                                            | 56           |
| Şekil 2.27. DNA'daki oluk bağlama ve interkalasyon türleri.....                                                   | 59           |
| Şekil 2.28. Mitokondriyal redüktaz aracılığıyla tetrazolyum tuzunun parçalanarak<br>formazana dönüştürülmesi..... | 63           |
| Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılan fosfazen bileşikler .....                                                  | 66           |
| Şekil 4.1. Bileşiklerin kanser ve sağlıklı hücrelerde sitotoksik potansiyeli.....                                 | 96           |

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                                                                           | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 2.1. Bakterilerin morfolojik yapısı.....                                                                                                  | 13    |
| Resim 4.1. Bileşiklerin bakteriler ve mayalar üzerinde gösterdiği agar kuyu difüzyon sonuçları.....                                             | 78    |
| Resim 4.2. Bileşiklerin bakteri ve mayalar üzerindeki MİK, MBK ve MFK görüntüleri.....                                                          | 83    |
| Resim 4.3. <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon sisteminin (S9) yokluğunda bileşiklerin Ames test sonuçları .....  | 89    |
| Resim 4.4. <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon sisteminin (S9) yokluğunda bileşiklerin Ames test sonuçları ..... | 89    |
| Resim 4.5. <i>S. typhimurium</i> TA98 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon sisteminin (S9) varlığında bileşiklerin Ames test sonuçları.....   | 90    |
| Resim 4.6. <i>S. typhimurium</i> TA100 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon sisteminin (S9) varlığında bileşiklerin Ames test sonuçları.....  | 90    |
| Resim 4.7. Bileşik ve plazmit DNA etkileşiminin agaroz jel elektroforez sonuçları. ....                                                         | 92    |
| Resim 4.8. Fosfazen bileşikleri ile muamele edilen plazmit DNA'nın BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi .....         | 93    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Çalışmada kullanılan simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

### Açıklamalar

|     |                        |
|-----|------------------------|
| °C  | Santigrat derece       |
| ml  | Mililitre              |
| µl  | Mikrolitre             |
| M   | Molar                  |
| mM  | Milimolar              |
| µM  | Mikromolar             |
| mg  | Miligram               |
| µg  | Mikrogram              |
| µm  | Mikrometre             |
| mm  | Milimetre              |
| V   | Volt                   |
| cfu | Koloni oluşturan birim |
| %   | Yüzde                  |

### Kısaltmalar

### Açıklamalar

|              |                                         |
|--------------|-----------------------------------------|
| <b>AIDS</b>  | Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu  |
| <b>AIEC</b>  | Tutunan-invazif <i>E. coli</i>          |
| <b>AMP</b>   | Antimikrobiyal peptit                   |
| <b>BHT</b>   | Bütillenmiş Hidroksitoluen              |
| <b>BRCA1</b> | Meme Kanseri 1 Geni                     |
| <b>BRCA2</b> | Meme Kanseri 2 Geni                     |
| <b>CAUTI</b> | Kateter İlişkili İdrar Yolu Enfeksiyonu |
| <b>CytK</b>  | Sitotoksin K                            |
| <b>DAEC</b>  | Dağılarak-tutunan <i>E. coli</i>        |
| <b>DAP</b>   | Diaminopimelik asit                     |
| <b>DGS</b>   | Direkt Gram Boyama                      |

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|                               |                                                  |
|-------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>DMEM</b>                   | Dulbecco Modifikasyonlu Eagle Besiyeri           |
| <b>DMSO</b>                   | Dimetilsülfoksit                                 |
| <b>DNA</b>                    | Deoksiribonükleik Asit                           |
| <b>DPPH</b>                   | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil                     |
| <b>EAEC</b>                   | Enteroagregatif <i>E. coli</i>                   |
| <b>EDIN</b>                   | Epidermal Hücre Farklılaşma İnhibitörleri        |
| <b>EDTA</b>                   | Etilendiamintetraasetik Asit                     |
| <b>EHEC</b>                   | Enterohemorajik <i>E. coli</i>                   |
| <b>EIEC</b>                   | Enteroinvazif <i>E. coli</i>                     |
| <b>EPEC</b>                   | Enteropatojenik <i>E. coli</i>                   |
| <b>ER</b>                     | Östrojen Reseptörü                               |
| <b>ET</b>                     | Tek elektron transferi                           |
| <b>ET</b>                     | Eksfoliyatif Toksin                              |
| <b>ETEC</b>                   | Enterotoksijenik <i>E. coli</i>                  |
| <b>FBS</b>                    | Fetal Bovine Serum                               |
| <b>GC</b>                     | Guanin-Sitozin                                   |
| <b>HAT</b>                    | Hidrojen atom transferi                          |
| <b>Hbl</b>                    | Hemolizin BL                                     |
| <b>HCCP</b>                   | Hekzaklorosiklotrifosfazen                       |
| <b>HER2</b>                   | İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2       |
| <b>HGT</b>                    | Yatay Gen Transferi                              |
| <b>hvkp</b>                   | Hipervirülant <i>K. pneumoniae</i>               |
| <b>IC50</b>                   | %50'sini inhibe etmek için gereken konsantrasyon |
| <b>IFI</b>                    | İnvazif Fungal Enfeksiyonlar                     |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> | İnterlökin-1 Beta                                |
| <b>IL-8</b>                   | İnterlökin-8                                     |
| <b>KF</b>                     | Kistik Fibrozis                                  |
| <b>lncRNA</b>                 | Uzun kodlamayan RNAlar                           |
| <b>LPS</b>                    | Lipopolisakkarit                                 |
| <b>MBK</b>                    | Minimum Bakterisidal Konsantrasyon               |
| <b>MDR</b>                    | Çoklu İlaç Direnci                               |
| <b>MFK</b>                    | Minimum Fungisidal Konsantrasyon                 |

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|               |                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------|
| <b>MHA</b>    | Mueller Hinton Agar                                    |
| <b>MHB</b>    | Mueller Hinton Broth                                   |
| <b>MİK</b>    | Minimum İnhibitör Konsantrasyon                        |
| <b>MRSA</b>   | Metisiline dirençli <i>S.aureus</i>                    |
| <b>MTT</b>    | 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür) |
| <b>NaCl</b>   | Sodyum Klorür                                          |
| <b>NADPH</b>  | Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat                  |
| <b>NaOH</b>   | Sodyum Hidroksit                                       |
| <b>Nhe</b>    | Hemolitik Olmayan Enterotoksin                         |
| <b>PABA</b>   | P-aminobenzoik asit                                    |
| <b>PR</b>     | Progesteron Reseptörü                                  |
| <b>PVL</b>    | Panton-Valentine Lökosidin                             |
| <b>RNA</b>    | Ribonükleik Asit                                       |
| <b>RNS</b>    | Reaktif Azot Türleri                                   |
| <b>ROS</b>    | Reaktif Oksijen Türleri                                |
| <b>rRNA</b>   | ribozomal RNA                                          |
| <b>SCV</b>    | <i>Salmonella</i> içeren vakuol                        |
| <b>SDA</b>    | Sabouraud Dekstroze Agar                               |
| <b>SDB</b>    | Sabouraud Dextrose Broth                               |
| <b>SOD</b>    | Süperoksit dismutaz                                    |
| <b>TAE</b>    | Tris-asetik asit-EDTA                                  |
| <b>TE</b>     | Tris-EDTA                                              |
| <b>TNBC</b>   | Üçlü Negatif Meme Kanseri                              |
| <b>TNF</b>    | Tümör Nekroz Faktörü                                   |
| <b>TSA</b>    | Tryptic Soy Agar                                       |
| <b>TSST-1</b> | Toksik Şok Sendromu Toksini 1                          |
| <b>UV</b>     | Ultraviyole                                            |
| <b>VAP</b>    | Ventilatör ilişkili Pnömoni                            |
| <b>VEGF</b>   | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü                     |
| <b>DGS</b>    | Direkt Gram Boyama                                     |

## 1. GİRİŞ

Fosfazenler, inorganik bileşiklerin önemli bir sınıfı olup, P ve N atomlarının ardışık bağlanmasından  $(-X_2P=N-)_n$  ( $X = F, Cl, Br$  ve organik gruplar) ve bu birimlerin tekrarlanmasından oluşan açık zincirli, halkalı veya polimerik türevlerdir. Halofosfazenler genellikle organofosfazenler, poliorganofosfazenler ve fosfaza dendrimerlerinin sentezi için başlangıç bileşikleri olarak kullanılmaktadır. Özellikle heksaklorosiklotrifosfazen bileşiği  $[N_3P_3Cl_6]$  (HCCP), trimer] halkasının sağlam ve kararlı yapısı nedeniyle multiheterosiklik inorganik/organik hibrit siklotrifosfazenlerin sentezi için çok kullanışlı bir yapı iskelesi olarak bilinmektedir [1, 2]. Heksaklorosiklotrifosfazen molekülünün mono-, di-, tri- ve tetra-fonksiyonel reaktiflerle süstitüsyon reaksiyonu verebilmesi sayesinde çeşitli fosfazen türevlerinin elde edilmesinde önemli olduğu bilinmektedir [3]. Reaksiyona girmemiş Cl atomları içeren siklotrifosfazenler süstitüsyon (yer değiştirme) reaksiyonları verebilmektedir [1]. Siklotrifosfazenlerin yapısında altı adet aktif klor atomu bulunmaktadır ve çok işlevli moleküler düzenlemeler için uygun bir inorganik platform olarak kullanılabilir. Siklotrifosfazen halkası, yapısındaki klor atomlarının yerini alabilecek bileşik gruplarının sayısına, türüne ve özelliklerine bağlı olarak yeni biyoaktif moleküllere dönüştürülebilmektedir [2]. Fosfazen türevleri, kimyasal ve biyolojik tanıma, görüntüleme, alev geciktirme, kataliz ve biyoyumlu malzemeler dahil olmak üzere geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Ayrıca siklotrifosfazenler ve poliorganofosfazenler doku mühendisliğinde, antimikrobiyal ajan, antikanser terapileri ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisi gibi biyoaktivite çalışmalarında etkili olarak kullanılmaktadır [2, 4].

Bakteriyel patojenler ile gelişen antimikrobiyal direnç, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Gram pozitif ve negatif bakterilerin oluşturduğu çoklu ilaç direncinin, geleneksel antibiyotiklerle tedavi edilmesi zor olabilmektedir. Özellikle biyofilmler çoklu ilaç direncinde rol oynamakta ve enfeksiyonun kontrol edilmesini engellemektedir. Günümüzde etkili tedavi yöntemleri yetersiz kalmakla birlikte çok az sayıda yeni antibiyotik bulunmaktadır. Bu durum da yeni tedavi seçenekleri ile alternatif antimikrobiyal tedavilerin geliştirilmesini gerektirmektedir [5]. Yapılan çalışmalarda sentezlenen farklı fosfazen türevi bileşiklerin antimikrobiyal aktivite etkisinin olduğu gösterilmiştir [3, 6, 7] ve bu çalışmada da antimikrobiyal aktivite etkisi araştırılmak istenen fosfazen bileşikleri ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Radyasyona, çevre kirleticilerine maruz kalma ve metabolize edilen ilaçların yan ürünleri olarak oluşabilen serbest radikaller, antioksidan moleküller tarafından antagonize edilmektedir. Antioksidanlar, oksidasyonu engelleyen ve serbest radikal temizleyicileri olarak adlandırılan maddelerdir. Antioksidanlar, yaşlanma, kanser, diyabet, iltihaplanma, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, nefrotoksisite ve nörodejeneratif hastalıkların oluşumunu azaltmaktadır [8]. Son yapılan çalışmalarda çeşitli fosfazen türevlerinin antioksidan aktivitesinin olduğu gösterilmiştir [9].

Mutajenik kimyasallar kansere neden olabilmektedir ve bu durum mutajenite test yöntemlerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu nedenle genotoksisitenin test edilmesi, yeni sentezlenen kimyasalların güvenli ilaç olarak değerlendirilmesinde zorunlu ve ön bir adımdır. Ames testi, genlerde mutasyonlara neden olan maddeleri belirlemede kullanılan bir bakteriyel testtir. Bu testin yeni kimyasalların, ilaçların mutajen olma potansiyelini belirlemede bir ilk tarama olarak kullanıldığı bilinmektedir [10].

Genetik verilerin transkripsiyonu ve replikasyonunda önemli rol oynayan DNA, birçok ilacın hedefi durumundadır. İlaçlar, elektrostatik etkileşim, baz çiftleri arasındaki interkalasyon ve majör veya minör DNA oluklarına bağlanma gibi DNA ile kovalent olmayan geri dönüşümlü bağlar oluşturabilmektedir. Bununla birlikte, DNA ile kimyasal olarak reaksiyona girerek, DNA alkilasyonuna yol açabilen alkilatörler gibi kovalent etkileşimler yoluyla geri dönüşümsüz bağlar oluşturabilmektedir [11, 12]. DNA zincirleri üzerinde kırık oluşturabilen ajanlar da DNA'ya bağlanan moleküllerin ana sınıfını oluşturmaktadır. Böylelikle ilaç-DNA etkileşimi DNA replikasyonunu ve bölünmesini etkileyerek zincir kırılmaları ve mutasyonlar ile konformasyonel modifikasyonlara ve nükleobazların elektrokimyasal özelliklerinde değişime sebep olabilmektedir. Bu nedenle, ilaç-DNA etkileşiminin araştırılması ve ilaç etki mekanizmasını anlamak, DNA hedefli ilaçlar tasarlamak için gereklidir. Genomik DNA'ya bağlanan küçük moleküller antibiyotik, antiviral ve antikanser tedavi ajanları olarak kullanılabilir [12]. Özellikle kanser önleyici ilaçlar gibi küçük ligand molekülleri, DNA'ya bağlanarak işlevini değiştirebilmektedir [11]. Kanser, toplumu etkileyen ve ilerlemesini durdurmak için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini gerektiren çok yönlü küresel bir sağlık sorunudur [13]. Kanser türüne ve evresine bağlı olarak hastalar kemoterapi, radyasyon gibi geleneksel tedaviler veya daha yeni tedavi biçimleri olan hormon ve gen tedavisi, immünoterapi ve fotodinamik terapi yöntemi ile tedavi edilebilmektedir [14]. Antikanser ilaçlarının çoğunun

biyolojik aktivitelerini DNA ile etkileşime girerek gösterdiği bilinmektedir. Antikanser ilaçların DNA ile etkileşimi üç farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bu etkileşimlerden ilki, ilacın DNA'ya bağlanan proteinlerle etkileşime girmesi sonucu transkripsiyon faktörleri ve polimerazların kontrol edilmesidir. İkincisi, RNA'nın, DNA çift sarmalına bağlanarak nükleik asit üçlü sarmal yapıları oluşturmaya veya transkripsiyonel aktiviteye müdahale edebilecek DNA-RNA hibritleri meydana getirmesiyle, açıkta kalan DNA'nın tek zincirine bağlanması yoluyla gerçekleşmektedir. Üçüncü etkileşim türü, küçük aromatik yapıdaki ligand moleküllerinin DNA'nın çift sarmal yapısına bağlanma durumudur [12]. Böylelikle kanser tedavisinde kullanılan birçok ilacın DNA'yı hedef almasından dolayı, ilaçlar ve DNA arasındaki etkileşimler, özellikle kanser ilaçlarının geliştirilmesinde büyük ilgi görmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bileşiklerin DNA ile etkileşiminden kaynaklanan ve DNA konformasyonunda meydana gelen değişiklikler, DNA'nın nükleotitlerine bağlanma veya DNA zinciri üzerinde kırık oluşturabilmesiyle meydana gelebilmektedir [15]. Fosfazen bileşiklerinin DNA ile etkileşiminin incelenmesi, bileşiklerin DNA üzerindeki etkisini anlamak ve DNA ile bağlanma mekanizmasının tespit edilebilmesi için gereklidir. Bu araştırmalar sonucunda elde edilen bilgiler DNA ile etkileşimde bulunan yeni antikanser ilaçların keşfedilmesini sağlamaktadır [16].

Antikanser ilaçlar etki mekanizmalarına göre, antitübülin ve DNA etkileşimli ajan yapısında olanlar, antimetabolitler, hormonlar, monoklonal antikolar olarak sınıflandırılabilir. Alkilleme, çapraz bağlanma, topoizomera inhibitörü olarak ve DNA üzerinde kırık oluşturabilme potansiyeli bulunan DNA-interaktif ajanları, en önemli antikanser ilaç sınıfından biridir [17]. Bu nedenle kanser hücreleri üzerinde seçici toksisite oluşturabilen hedefe yönelik ilaçlar geliştirmek önemlidir. Kadınlarda meme kanseri dünya genelinde en sık görülen kanserdir ve TNBC olarak da adlandırılan üçlü negatif meme kanseri, meme kanserinin tedavisi en zor olan türüdür [18, 19]. Fosfazen bileşikler, bozunma ürünlerinin toksik etki göstermemesi nedeniyle kemoterapötik ilaç olarak kullanımında önemli bir avantaj sağlamaktadır [2]. Yapılan çalışmalarda fosfazen türevi bileşiklerinin, çeşitli meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivite etkisi gösterilmiştir [2, 20, 21] fakat literatürde bu çalışmadaki fosfazen türevlerinin sitotoksik aktivite etkisi ile ilgili yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

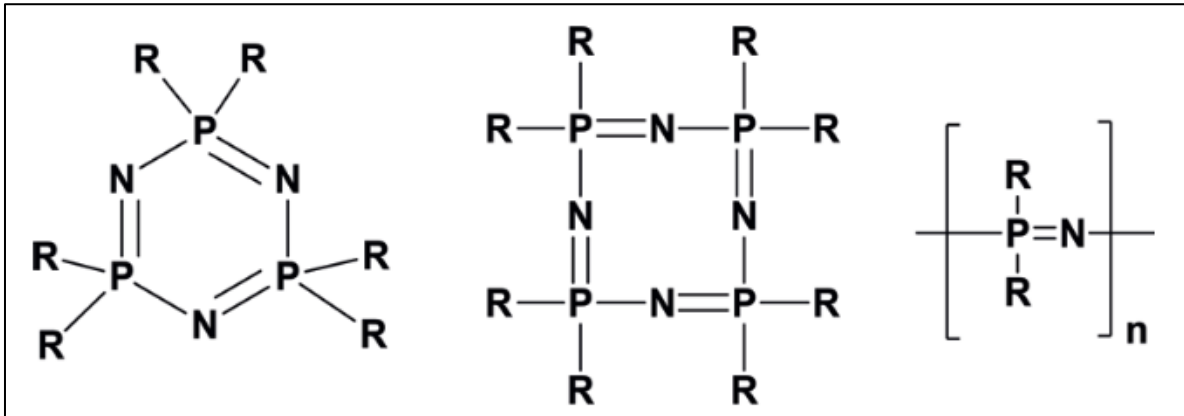
Çalışma kapsamında sentezlenen propilamin, bütülin ve metronidazol süstitüenti taşıyan fosfazen türevi bileşiklerin antimikrobiyal, antioksidan, genotoksik aktivitesi, plazmit DNA

ile olan etkileşimi ve sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Ana Bilim Dalı'nda sentezlenen fosfazen türevi bileşiklerin, patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivite etkisi olan fosfazen bileşiklerinin, mikrodilüsyon yöntemi ile MİK, MBK ve MFK değerleri gösterilmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde DPPH yöntemi ve demir iyonlarını şelatlama aktivitesine bakılmıştır. Bileşiklerin genotoksik aktivitesi, plak birleştirme yöntemi ile incelenmiştir ve *S. typhimurium* TA98/TA100 suşları kullanılmıştır. Bileşik-plazmit DNA arasındaki etkileşim agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bileşiklerin plazmit DNA üzerindeki nükleotitlere bağlanma durumunu belirlemek amacıyla fosfazen bileşikleri ile etkileşime bırakılan plazmit DNA'nın *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimleri yapılmıştır. Bileşiklerin sağlıklı Vero (epitel) ve MDA-MB-231 (meme kanseri) hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivite etkisinin belirlenmesinde MTT testi kullanılmıştır. Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulguların, farklı enfeksiyon hastalıkları ve kanser tedavisi üzerinde etkili olabilecek ilaçların geliştirilmesine ve yeni kimyasal bileşiklerin sentezlenmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Fosfazen Bileşiklerinin Özellikleri

P-N bağı çok sayıda P, N bazlı bileşiğin yapı taşıdır. Fosfazenler bu bileşikler arasında kapsamlı olarak incelenen ve bilinen inorganik makromoleküllerin en büyük sınıfını oluşturmaktadır [22]. Fosfazenler, fosfor ve azot atomlarının birbirine ardışık olarak bağlanması sonucu,  $-P=N-$  birimlerinden oluşan bileşiklerdir. Bu bileşikler düz zincirli, halkalı veya polimerik yapıda bulunabilmektedir (Şekil 2.1) [23-25]. Fosfazenlerin P merkezindeki zengin yer değiştirme kimyası, P-N omurgasının kolayca oluşabilmesini sağlamakta, yapıya hidroliz reaksiyonları bakımından stabilite kazandırmakta ve kullanışlı malzeme özelliklerinin oluşmasına izin vermektedir [22]. Böylelikle fosfazenler şarj edilebilir piller, membranlar, sıvı kristaller, biyolojik malzemeler, sentetik kemikler, alev geciktiriciler [25], cam, seramik ve metal yapıştırıcıları, yağlayıcı katkı maddeleri, çeşitli tiplerde biyositler, polimerler ve ko-polimerler, reçineler için modifiye edici maddeler [26], biyotıp, enerji depolama ve üretimi, elastomerler, fotonik [27], antikanser ilaç yapımı [25, 28], antibakteriyel ve mutajenite çalışmaları [29] olmak üzere birçok farklı alanda kullanılmaktadır.

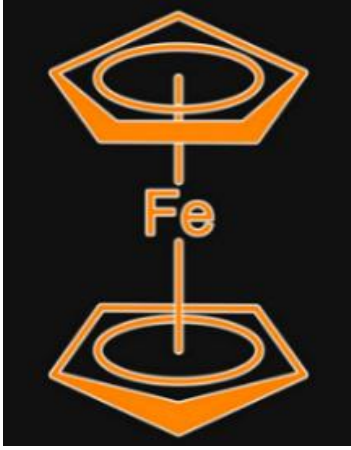


Şekil 2.1. Fosfazenlerin yapıları [25]

Fosfazenlerin farklı gruplarla süstitüsyon (yer değiştirme) reaksiyonları verebilmesi sayesinde bileşiklerin bağlanan gruplara göre farklı özellikler kazanması, fosfazen bileşiklerine olan ilginin artmasını ve kullanım alanlarının genişlemesini sağlamıştır [30]. Oligomerlerden polimerlere kadar birçok fosfazen bileşiği bulunmaktadır [25]. Siklik fosfazenler PN birimlerinin bir halka oluşturmak üzere birbirine bağlanmasıyla oluşmaktadır [9]. Hekzaklorosiklotrifosfazen ( $N_3P_3Cl_6$ , trimer; HCCP) ve oktaklorosiklotetrafosfazen ( $N_4P_4Cl_8$  tetramer) türevleri fosfazen kimyasında en çok çalışılan bileşiklerdir [9, 25]. Beş, altı ve daha fazla  $-P=N$  birimleri içeren siklik fosfazen bileşikleri de bilinmektedir, ancak bu bileşikler çok yaygın değildir [25]. Özellikle HCCP, fosfazen kimyası alanında yeni siklotrifosfazen türevlerinin tasarımında çok yaygın olarak kullanılmaktadır [9]. Ayrıca son zamanlarda, sentetik polimerler biyomedikal alanında büyük ilgi görmektedir. Bunlar arasında polifosfazenler, diğer malzemelere kıyasla yapısal esneklikleri ve biyolojik olarak paralanabilmeleri sayesinde en kullanışlı malzemelerden biri olarak kabul edilmektedir. Polifosfazenler terapötik moleküllerin hücre içindeki dağıtımı (düşük molekül ağırlıklı ilaçlar, genler ve proteinler), diş astarları, aşı, kemik rejenerasyonu, biyolojik görüntüleme, fototerapi ve tıbbi cihazlarda kullanılmaktadır [31].

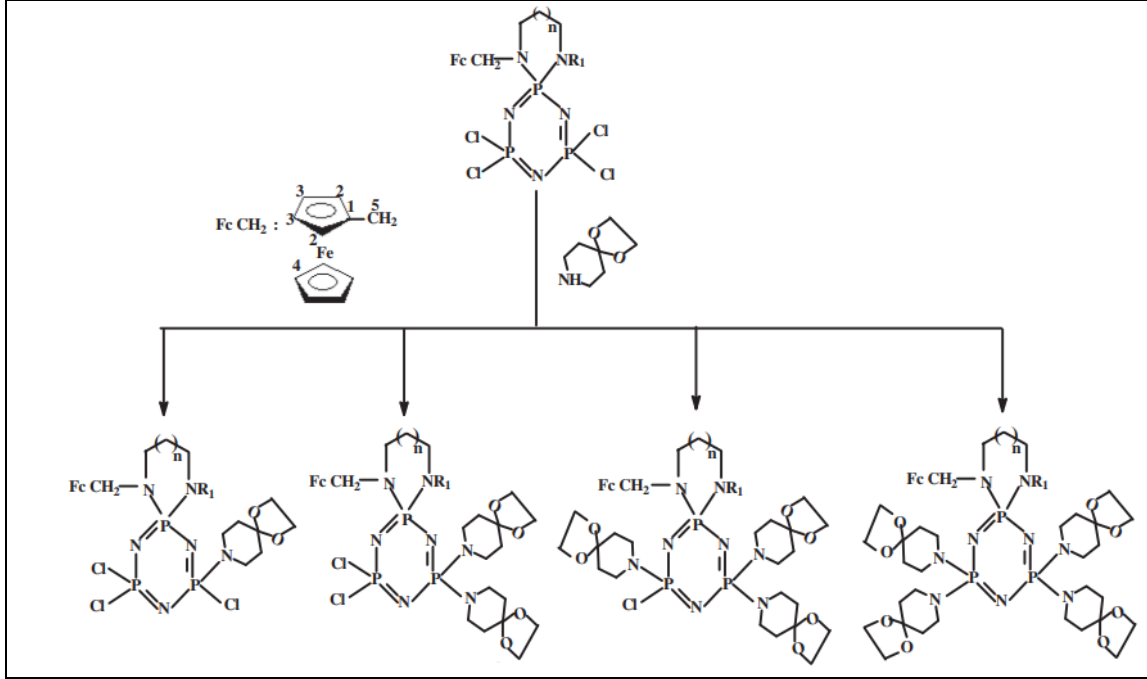
## 2.2. Ferrosenilfosfazen Bileşikleri ile İlgili Genel Bilgiler

Ferrosen halkasının herhangi bir yapıya entegre olması, yapıya spesifik özellikler kazandırabilmektedir (şekil 2.2.). Ferrosen halkası, entegrasyon ile birlikte yapının lipofilik karakterini artırarak hücre zarından penetrasyonu kolaylaştırmakta ve yapıya elektrokimyasal özellikler kazandırmaktadır. Bununla birlikte bileşiklerin biyolojik ortamdaki kararlılığını artırmakta ve canlı hücreler üzerindeki sitotoksik aktiviteyi önemli ölçüde azaltmaktadır. Metallosen yapılarının, özellikle de ferrosen halkası içeren yapıların bu dikkat çekici özellikleri, bu bileşiklerin, farmakolojik aktivite çalışmalarında (antianemik, antibakteriyal, antiproliferatif, antısıtma, antiviral ve antitümör) öncü bileşikler olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Ayrıca, ferrosen halkası içeren bir Schiff bazı yapısının, anti-koronavirüs aktivitesi molecular docking yöntemi ile değerlendirilmiştir [32].



Şekil 2.2. Ferrosen halkası [32]

Günümüzde, organometalik bileşikler elde edebilmek amacıyla çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlardan en bilineni moleküler hibritleşme stratejisidir. Moleküler hibritleşme yaklaşımı uyarınca farmakolojik etkinliği kanıtlanmış olan aktif bileşikler, lipofilikliği iyileştirmek, redoks aktif bileşiği yapıya dahil etmek ve canlı hücreler üzerindeki sitotoksitesiyi azaltmak amaçlı ferrosen ve diğer metallosenler ile modifiye edilmektedir. Ayrıca, çalışma kapsamında başlangıç bileşiği olarak kullanılan trimerik fosfazen bileşiği temelli mono ve bisferrosenil süstitüe yapılar daha önce sentezlenmiştir ve bu bileşiklerin biyolojik etkinlikleri (antibakteriyal, antifungal, antitüberküloz) araştırılmıştır [33]. Tüm bu çalışmalar ışığında ferrosen halkası içeren yapıların, biyolojik aktivite anlamında yüksek potansiyele sahip olduğu söylenebilmektedir. Tasarlanan bu çalışmada, biyolojik etkinliği kanıtlanmış olan ferrosen süstitüe yapılar (ferrosenildiaminler) ile biyouyumlu bir bileşik olan trimerik fosfazen bileşiği bir araya getirilerek sentezlenen orijinal bileşiklerin, biyolojik aktivitelerinin detaylı bir şekilde araştırılması, çalışmanın en özgün yanlarından biridir. Literatür verilerine göre, ferrosenil-pendant kollu pirolidino ve DASD-süstitüe siklotrifosfazenlerin (Şekil 2.3) bazı bakteri ve mantarlara karşı aktif olduğu [3, 6], tetramorfolino-süstitüe ferrosenilfosfazenlerin ise bakterilere karşı etkilerinin olmadığı [7] belirlenmiştir. Fosfazen türevlerinin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri, hidrojen bağlarının oluşumuna veya DNA ile fosfazen molekülleri arasındaki Van der Waals etkileşimlerine bağlı olabilmektedir. Dolayısıyla, fosfor atomlarına bağlı süstitüentler (pirolidino, DASD, piperidino ve morfolino vb.) önemli olmaktadır. Çalışma kapsamında metronidazol, propilamin ve bütülin gibi farklı süstitüentlerin seçilmiş olmasının biyolojik aktivite sonuçlarını etkileyebileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.3. Sübstitüe ferrosenilfosfazen bileşikleri [3, 6]

Antibiyotik grubu bir bileşik olan metronidazol, ilaç kimyası alanında çok önemli bir yer tutan ve birçok biyolojik aktiviteye sahip olan nitroimidazol temelli bileşikler sınıfında yer almaktadır. Metronidazol türevi yapıların antimikrobiyal, antikanser, antidiyabetik, antiinflammatuar, anti-HIV, antiparazitik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [34-36]. Tez çalışmasında metronidazol bileşiğinin monospirofosfazen bileşiklerine katılması ile biyolojik olarak daha etkin bileşiklerin elde edilebileceği düşünülmektedir. İlaç aktif özellik sergileyebilecek bileşikler geliştirmenin bir yolunun da aktif farmakofor grupları aynı temelde biraraya getirmek olduğu bilinmektedir. Bu stratejik yaklaşımla, ferrosen türevi diammin bileşikler ve metronidazol, biyoyumlu bir madde olan trimerik fosfazen halkası temelinde biraraya getirilmiştir. Metronidazol bileşiğinin yapıya katılması ile biyolojik aktivite ve muhtemel sinerjik bir etkinin varlığı araştırılmıştır.

### 2.3. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrorganizmalar

İnsan mikrobiyomu, insan vücudunda belirli bir bölgede yaşayan organizmaların (mikrobiyota) genomik içeriği olarak adlandırılmaktadır. Mikrobiyota ise insan vücudunda yaşayan ve ortak yaşam veya patojenik olmak üzere çeşitli yollarla etkileşime giren bir dizi organizma olarak tanımlanmaktadır. İnsan mikrobiyomu vücudun içinde ve dışında yaşayan bakterileri, arkeleri, virüsleri ve ökaryotları içermektedir. Bu organizmalar hem sağlıkta hem

de hastalıkta insan fizyolojisini etkileyerek metabolik ve bağışıklık fonksiyonlarının artmasını sağlamakta veya bozulmasına neden olmaktadır [37]. İnsan vücudunda trilyonlarca mikroorganizma bulunmaktadır [38]. Mikroorganizmalar deri, mukoza, gastrointestinal sistem, solunum yolu, ürogenital sistem gibi vücudun çeşitli anatomik bölgelerinde kolonize durumdadır ve burada her bir biyolojik nişin spesifik özelliklerine uyum sağlamaktadır [37]. İnsan vücudunda bulunan bazı mikroorganizmalar Çizelge 2.1’de gösterilmiştir [38-40].

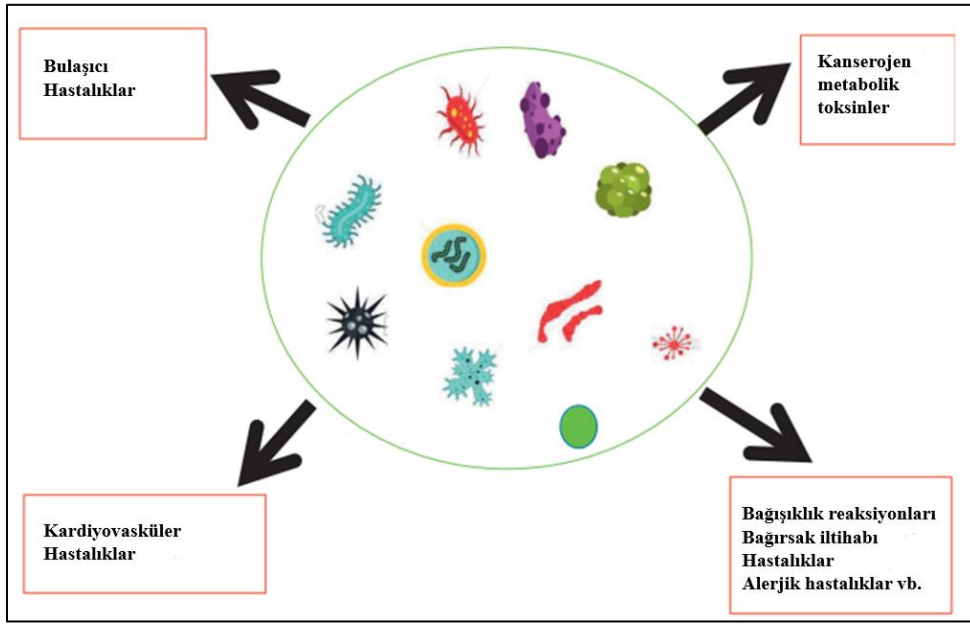
Çizelge 2.1. İnsan vücudunda bulunan bazı mikroorganizmalar [38-40]

| Mikroorganizma adı |                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cilt               | <i>Propionibacterium, Corynebacterium, Staphylococcus, Moraxella, Malassezia, Micrococcus</i>                                                                                                             |
| Ağız               | <i>Streptococcus, Peptostreptococci, Rothia, Lactobacillus, Fusobacterium, Veillonella, Neisseria, Actinomyces, Candida, Propionibacteria, Leptotrichia, Bifidobacteria, Spirochetes (Treponema)</i>      |
| Solunum Sistemi    | <i>Streptococcus, Staphylococcus, Prevotella, Haemophilus</i>                                                                                                                                             |
| Sindirim Sistemi   | <i>Bacteroidaceae, Clostridiaceae, Prevotellaceae, Eubacteriaceae, Eubacteriaceae, Ruminococcaceae, Bifidobacteriaceae, Lactobacillaceae, Enterobacteriaceae, Saccharomycetaceae, Methanobacteriaceae</i> |
| Ürogenital Sistem  | <i>Lactobacillus, Gardnerella, Ureaplasma, Mycoplasma</i>                                                                                                                                                 |

Doğumdan itibaren insan vücudu ile mikrobiyota arasında sürekli bir etkileşim (simbiyoz) bulunmaktadır. Bu etkileşimler genel sağlığın korunmasında önemli rol oynamaktadır. Biyolojik aktiviteleri sonucunda vücudun bir parçası olarak tanımlanan bu organizmalar, döllenmeden ölüme kadar çeşitli değişikliklere yol açmaktadır. İnsan mikrobiyomu, konakçı

faktörlere yanıt olarak sürekli olarak gelişmektedir. Yaş, beslenme, yaşam tarzı, hormonal değişiklikler, kalıtsal genler ve altta yatan hastalıklar gibi faktörler mikrobiyomun ana belirleyicileridir [37]. Dengeli bir mikrobiyotanın sağlığın sürdürülmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [37, 41].

Mikrobiyotanın yapısında meydana gelen bir değişiklik veya bozulma olarak karakterize edilen disbiyozis yaşamı tehdit eden çok çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. Mikroorganizmaların büyük bir kısmı bağırsakta bulunmaktadır. İnsan mikrobiyom projesi üzerine yapılan çalışmalar, bağışıklıkta meydana gelen değişikliklerin doğrudan bağırsaktaki disbiyotik flora ile bağlantılı olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte kanser, obezite, alerji, astım, otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve antibiyotik direncine bağlı tedavisi zor bakteriyel enfeksiyonlar gibi yaşamı tehdit eden sağlık koşulları da disbiyoz ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.4) [37, 38].



Şekil 2.4. Disbiyotik flora ve insan sağlığına etkisi [37]

Disbiyoz, mikrobiyotanın bileşimini ve işlevini değiştirmekte bu durum da bağışıklık tepkisinin bozulmasına ve enfeksiyona karşı duyarlılığın artmasına neden olmaktadır. İshale neden olan *C. difficile* enfeksiyonu, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar (bakteriyel vajinozis), gastrointestinal enfeksiyonlar, idrar yolu enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları, (akne, yara, atopik dermatit), oral enfeksiyonlar (diş çürükleri) disbiyoz ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte vajinal mikrobiyotada meydana gelen değişiklikler iltihaplanmaya ve

patojenik bakterilerin aşırı çoğalmasına yol açarak sağlıklı bir gebelik için gereken hassas ortamı bozabilmektedir. Böylece vajinal mikrobiyomun disbiyozu ile erken doğum ve diğer gebelik komplikasyonları gelişmektedir [38].

Mikrobiyom, antibiyotik etkinliğini ve direncini de etkileyebilmektedir. Özellikle antibiyotikleri metabolize ederek, mikrobiyal dengeyi bozarak ve biyofilm oluşumuna neden olarak antibiyotik etkinliğini etkileyebilmektedir. Vücudumuzda buluna çeşitli mikroorganizmalar, antibiyotiklere direnç kazandıran genleri barındırabilmektedir. Bu genler yatay gen transferi yoluyla bakteriler arasında aktarılabilmekte ve potansiyel olarak antibiyotiğe dirençli enfeksiyonların ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Bununla birlikte antibiyotiklerin de mikrobiyom üzerinde geniş etkileri olabilmektedir. Antibiyotikler bağırsak florasının sağlıklı dengesini bozarak bağırsaktaki mikroorganizma çeşitliliğinin azalmasına yol açmaktadır. Bu durum da hem mikroorganizmaların popülasyonunda hem de işlevlerinde değişiklikler oluşturarak antibiyotik direncinin oluşmasına neden olmaktadır. Ayrıca antibiyotiklerin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkileri, antibiyotik kullanımı kesildikten sonra bile uzun süre devam edebilmektedir. Mikrobiyom ilaç metabolizmasında rol oynamakta ve enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan ilaçların farmakokinetiğini etkileyebilmektedir. Bağırsaktaki mikrobiyal enzimler ilaçları aktive edebilmekte veya inaktif hale getirerek etkinliklerini değiştirebilmektedir. Özellikle ilaçların emilimlerini ve dağılımlarını etkileyebilmekte ve toksisite oluşturabilmektedir [38].

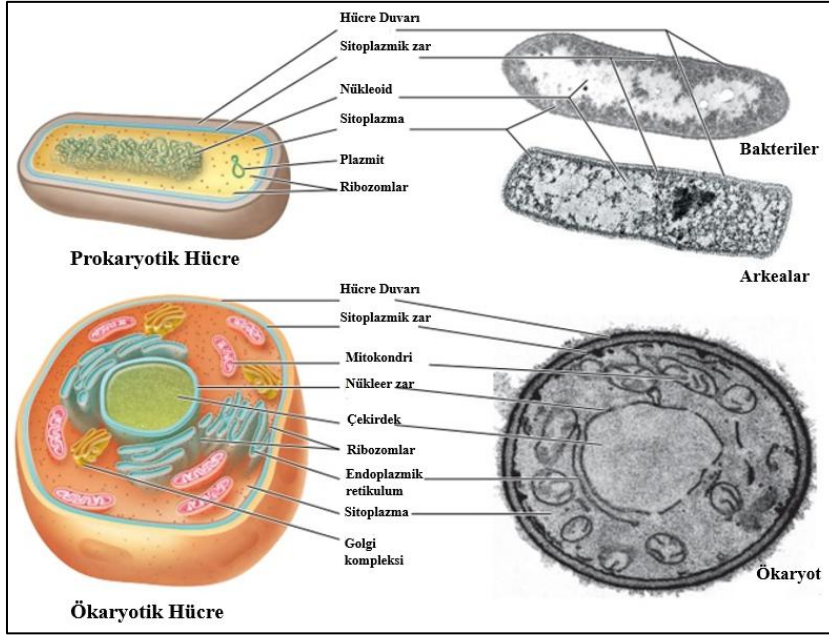
Mikrobiyom, DNA dizilerini değiştirmeden gen ifadesi kalıplarını değiştirerek konağın epigenetik düzenlemesini etkilemektedir. Mikrobiyal metabolitler ve bileşenler, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonunda yer alan enzimleri etkileyebilmekte ve konak hücrelerindeki gen ifadesi profillerini değiştirebilmektedir. Bu epigenetik değişiklikler de konağın bağışıklık tepkilerini, inflamasyon ve bulaşıcı hastalıklara duyarlılığı etkilemektedir [38].

Mikrobiyom, konaktaki inflamatuvar yanıtları düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır. Kommensal mikroorganizmalar, anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimini sağlayarak ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımını engelleyerek bağışıklık homeostazını korumaya yardımcı olmaktadır. Bu denge, doku hasarı ile patojenlerin büyümesini ve yayılmasına yol açan aşırı inflamasyonu önlemek için önemlidir. Bu hassas dengede meydana gelen bozulma (disbiyozis), bulaşıcı hastalıkların patogenezeine sebep olan kronik inflamasyona yol açmaktadır [38].

Virüsler, parazitler, bakteriler ve funguslar enfeksiyon hastalıklarında yer alan ajanlardır. Tez çalışmasında kullanılan fosfazen türevi bileşiklerinin bazı patojen bakteri ve mayalardaki antimikrobiyal aktivite etkisi incelendiği için aşağıdaki kısımda bakteri ve mayaların özellikleri ile ilgili bilgiler verilmektedir.

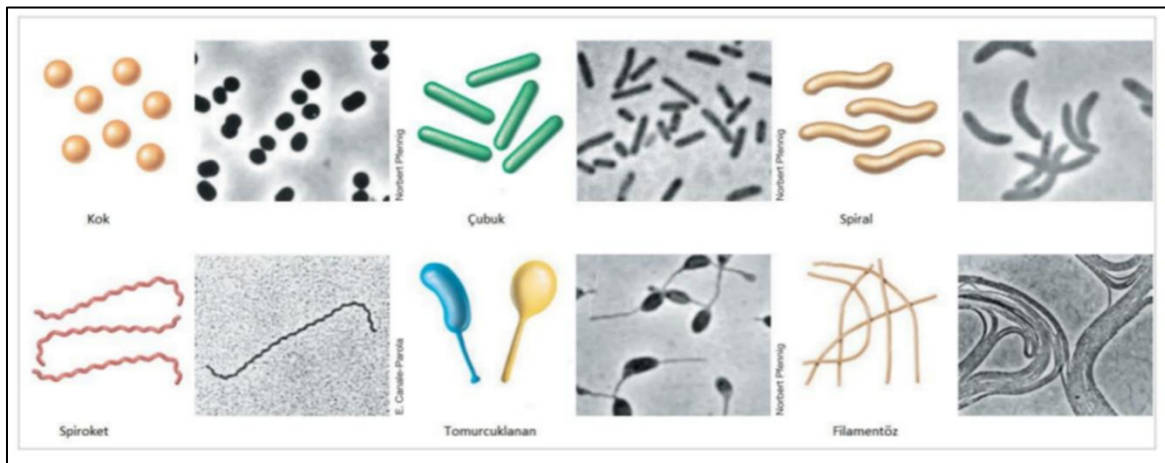
### **2.3.1. Bakteriler**

Hücreler temelde çekirdek bulundurma durumlarına göre tanımlanan iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Ökaryotik hücreler genetik materyali sitoplazmadan ayıran bir nükleusa sahiptir. Prokaryotik hücreler ise genellikle ökaryot hücrelerden daha küçük ve daha basit yapılıdır; nükleusdan yoksun olmalarının yanı sıra, genomları daha az karmaşıktır, sitoplazmik organellere ve hücre iskeletine sahip değildir. Genetik materyal hücre içinde serbest durumda, genomu diğer hücresel bileşenlerden ayıran nükleer kılıf bulunmamaktadır (Şekil 2.5) [42-44]. Bu nedenle DNA replikasyonu başta olmak üzere temel metabolik mekanizmalar; solunum, transkripsiyon ve translasyon sitoplazmada gerçekleşmektedir [45].



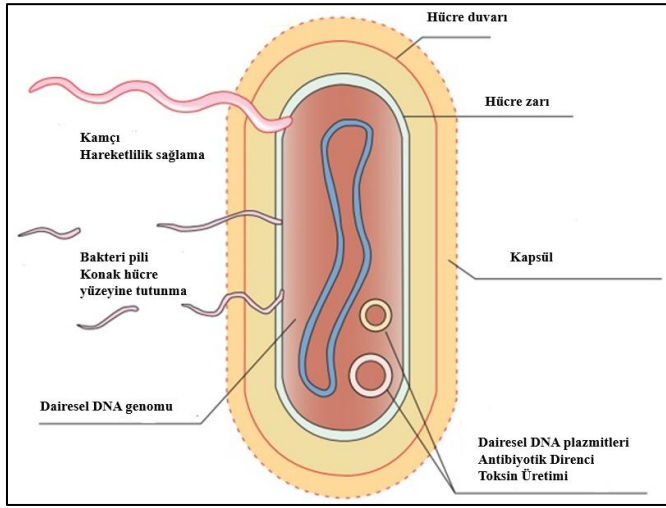
Şekil 2.5. Prokaryotik ve ökaryotik hücre yapısı [44]

Prokaryotik hücre yapısına sahip olan bakteriler uzunlukları 0,15  $\mu\text{m}$  ile 700  $\mu\text{m}$  arasında değişen farklılaşmamış, tek hücreli mikroskopik canlılardır. rRNA gen dizilerinin tamamının analizine göre en az 80 bakteri filumunun var olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin büyük çoğunluğu ribozomal RNA filogenetik sınıflandırmaya göre *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, ve *Bacteroidetes* olmak üzere dört önemli gruba ayrılmaktadır. Bakterilerin hücre morfolojileri çubuk, spiral, spiroket, kok (küresel), tomurcuklanan veya filamentöz gibi çok farklı yapılar gösterebilmektedir (Resim 2.1) [44].



Resim 2.1. Bakterilerin morfolojik yapısı [44]

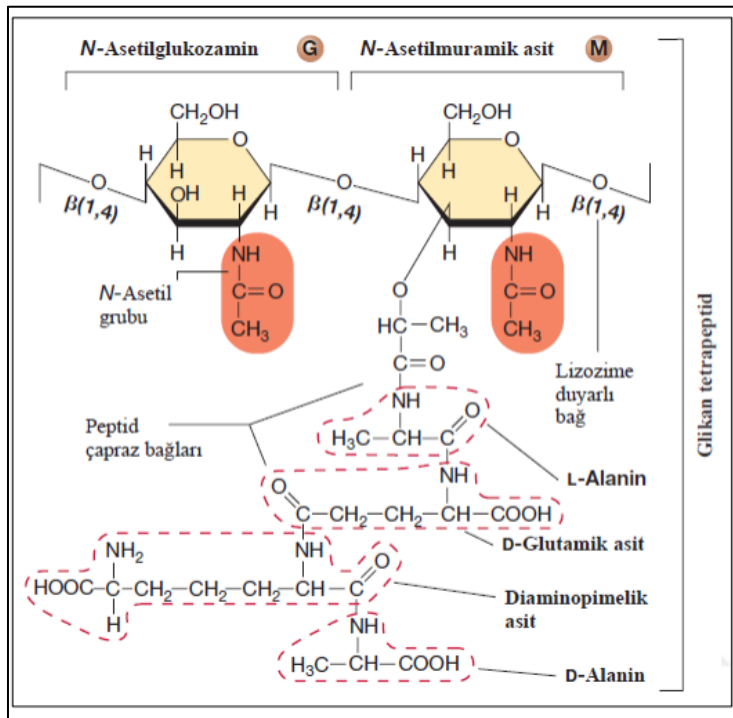
Bakteri hücresinin sitoplazması DNA kromozomu, ribozomlar, proteinler ve metabolitler içermektedir. Ökaryotların aksine, bakteri kromozomu çift iplikli, dairesel yapıdadır ve bu yapıya nükleoid adı verilmektedir. Sitoplazmadaki plazmidler daha küçük, dairesel, kromozom dışındaki DNAlar olarak bulunmakta; gen aktarımı ise plazmitler, bakteriyofajlar ve transpozonlar ile sağlanmaktadır [46]. Bakteri yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir [47]. Bakterilerin nükleer membranlarının olmaması protein sentezi için kontrol mekanizmalarını ve gereksinimlerini basitleştirmektedir. Bakteriyel ribozom 70S ribozomu oluşturan 30S + 50S subünitler içermektedir. Bakteri ribozomal RNA'ları ve proteinleri ökaryotların çoğundan önemli oranda farklıdır ve antibakteriyel ilaçların en önemli hedeflerini oluşturmaktadır [46].



Şekil 2.6. Bakteri yapısı [47]

Prokaryotların çoğunda sitoplazmik membran murein tabaka ile çevrilidir [46]. Bununla birlikte bakteri ve pek çok ökaryotik hücre çeşidini (mantar, alg ve daha yüksek yapılu bitkiler) çevreleyen sert hücre duvarları, hücre şeklini belirlemekte ve hücreleri ozmotik basıncın bir sonucu olarak ortaya çıkabilen şişme ve patlamaktan korumaktadır. Bakterilerin ve ökaryotların hücre duvarları yapısal olarak çok farklıdır [43]. Bakteri hücre duvarları, hücreye yapısal güç kazandıran peptidoglikan adı verilen sert bir polisakkarit içermektedir. Peptidoglikan tabakası ökaryot hücreler ve arkeler dışında, hücre duvarı içeren tüm bakterilerde bulunmaktadır. Bu tabaka N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitin, L-alanin, D-alanin, D-glutamik asit ve L-lizin veya Diaminopimelik asitin (DAP) biraraya gelerek  $\beta$ -1,4 glikozit bağı ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. Glikan tetrapeptidi oluşturacak şekilde düzenli bir şekilde bağlanan bu bileşenler uzun zincirlerle peptidoglikan

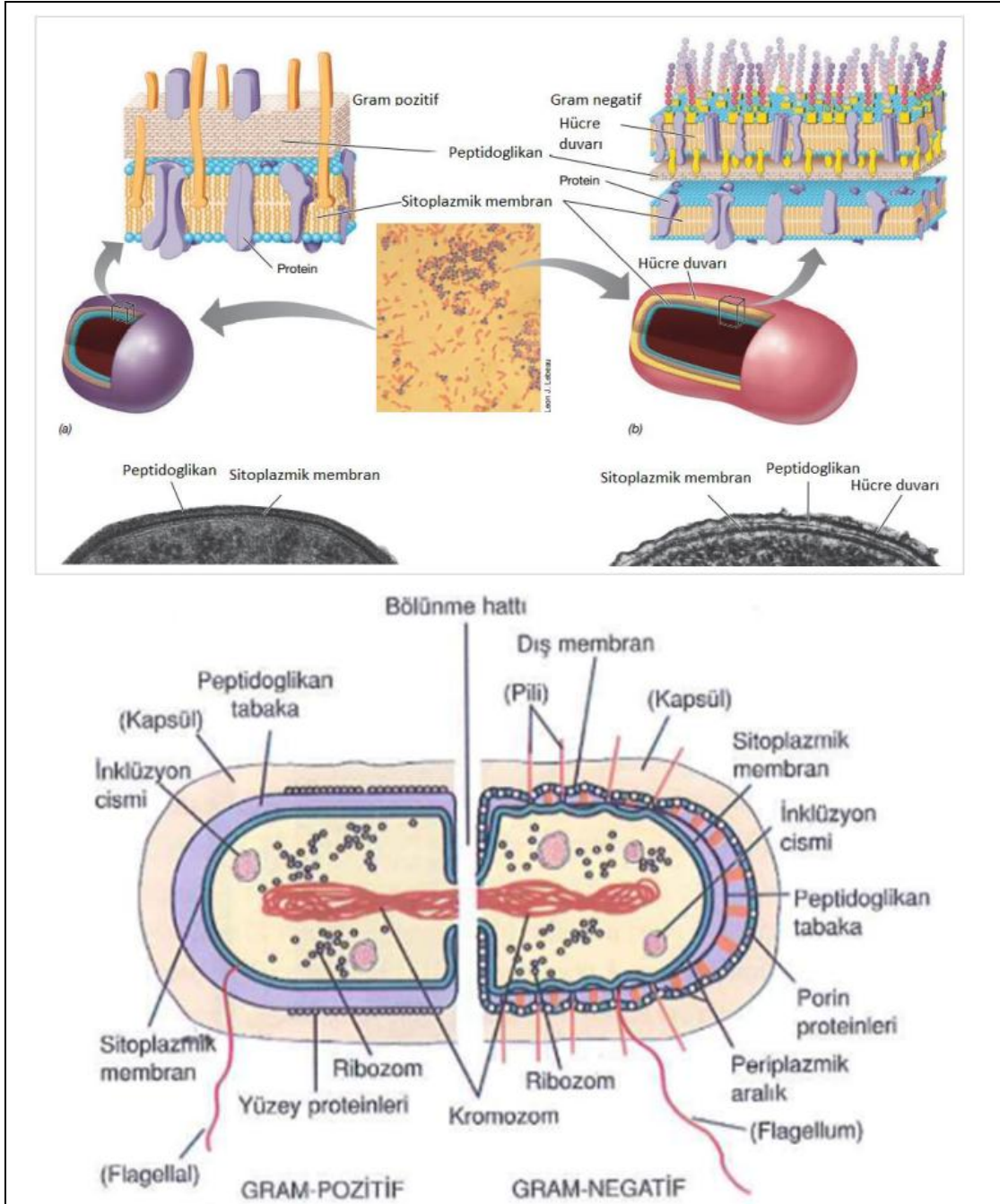
tabakasını meydana getirmektedir (Şekil 2.7) [48]. Çapraz bağlı peptidoglikan yapısı bakteri hücrelerinin çevresinde güçlü kovalent bir kabuk oluşturmaktadır. Bakterilerin hücre duvar yapısı, bakterileri bazı antibiyotiklere karşı duyarlı hale getirmektedir. Örneğin, penisilin, birbirinden ayrı peptidoglikan zincirleri arasında çapraz bağlantıları kuran enzimin oluşumunu engelleyerek hücre duvarı yapılanmasını ve bakteri üremesini durdurmaktadır [43].



Şekil 2.7. Peptidoglikan yapısı [19]

Hücre duvarının sert yapısı bakterilerin karakteristik şekillerini belirlemektedir. Ayrıca hücre duvarı yapısına göre bakteriler Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Gram boyama, 1884'de Hans Christian tarafından geliştirilmiştir ve bakterilerin ayırt edilmesini sağlamaktadır [43, 44, 46]. Gram pozitif bakteriler, kalın peptidoglikan tabakasından dolayı kalın hücre duvarına sahiptir ve bu nedenle kristal viyole boyası ile mor renge boyanmaktadır; gram negatif bakteriler ise ince peptidoglikan tabakasına sahip olduğundan safranin boyası ile kırmızı/pembe renge boyanmaktadır [49, 50]. Bakterilerin yanı sıra çeşitli mantar ve parazitleri tanımlamak için de gram boyama tekniği kullanılmaktadır [50].

Gram pozitif bakterilerde kalın bir peptidoglikan yapısı ile birlikte teikoik asit ve lipoteikoik asit bulunmaktadır (Şekil 2.8). Teikoik asit hücre yaşamı için esastır ve virülans için önemli bir faktördür. Lipoteikoik asit yağ asitidir ve sitoplazmik membranın yapısı içinde bulunmaktadır. Konağa ve ortama yayılarak endotoksine benzer doğal koruyucu cevabı başlatabilmektedir [46]. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı hem yapısal hem de kimyasal olarak gram pozitif bakterilerden daha komplekstir. Sitoplazmik membranın dışında ince bir peptidoglikan tabaka bulunmaktadır. Peptidoglikan tabakanın dışında periplazmik aralık yer almaktadır. Bu bölgede bakteri metabolizmasında yer alan (proteinler, şeker ve diğer metabolitler için transport elemanları gibi) büyük makromoleküllerin yıkılmasını sağlayan önemli enzimler bulunmaktadır. Bu enzimler proteazlar, fosfatazlar, lipazlar, nükleazlar ve karbonhidratları yıkan enzimlerdir. Patojen gram negatif vakalarında, beta-laktamaz, proteaz, kollejenaz ve hyalüronidaz gibi litik virülans faktörleri, periplazmik aralıkta yer almaktadır. Gram negatif bakterilerin dış zarında endotoksin olarak bilinen bir lipopolisakkarit (LPS) tabaka bulunmaktadır. LPS, bakteriden konak ve ortama yayılmaktadır ve B hücrelerini aktive ederek makrofaj, interlökin-1, interlökin-6, tümör nekroz faktör ile diğer faktörleri salan hücreleri uyarmaktadır [46]. LPS'nin kan dolaşımına salınması ateş, düşük kan basıncı ve inflamasyona neden olmaktadır [43]. Örneğin, Shwartzman reaksiyonu (yaygın damar içi koagülasyon) kan akımı içinde endotoksinlerin çok miktarda salınmasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [46]. Kontamine gıdalardan bulaşan, *Salmonella* ve enteropatojenik *E. coli* suşları tarafından üretilen endotoksinler de insanlarda ishal, kusma gibi şiddetli semptomlara neden olmaktadır [44].



Şekil 2.8. Bakterilerdeki hücre duvar yapısının gösterimi [44, 46]

Son yapılan çalışmalarda bakteriyel enfeksiyonların tanı ve kontrolünde Gram boyama yöntemi kullanılmaktadır. Aynı zamanda normal durumda steril olması gereken kan kültürü, beyin omurilik sıvısı, periton ve eklem sıvıları gibi klinik örneklerin değerlendirilmesinde, Gram boyama yönteminin kullanılması önemli olmaktadır. Bu yöntem normal durumda steril olması gereken örneklerde, nadir görülen bakteriyel patojenleri ortaya çıkarmaktadır. Bakteriyel menenjit, bakteremi, akciğer iltihaplanması, zatürre, erkeklerde bel soğukluğu, kampilobakteriyozis, bakteriyel vajinoz gibi çok sayıda hastalığa neden olan patojenlerin

teşhisinde bu yöntem kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntem ile *Candida* türlerinin neden olduğu fungal enfeksiyonları da ayırt edilebilmektedir [51].

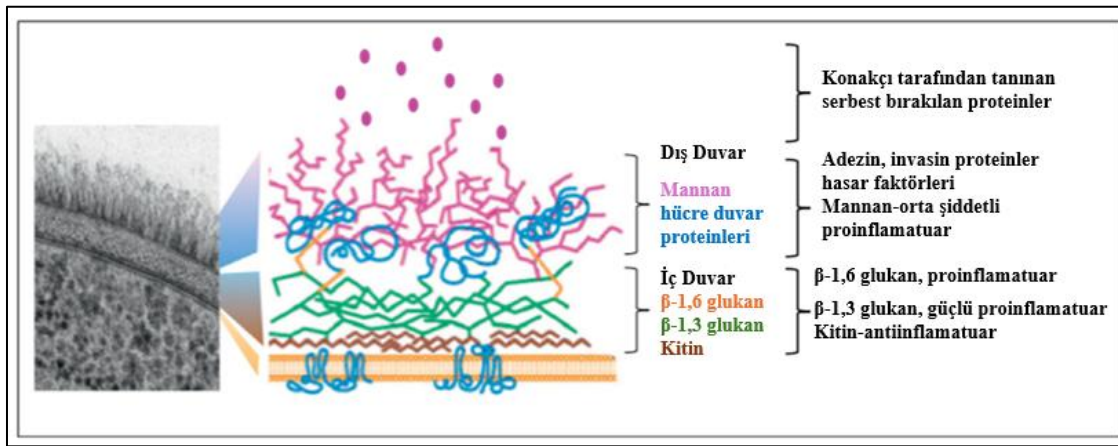
### 2.3.2. Funguslar (Mantarlar) alemi ve mayalar

Funguslar, tomurcuklanan mayalar veya filamentli hifler şeklinde gelişen bir grup mikroorganizmadır [52]. Funguslar Alemi içinde yer alan mayalar, tek hücreli ökaryotik canlılardır [46]. Mayalar birçok deneysel avantaja sahip olduğundan ökaryot hücre biyolojisinin özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda önemli bir model sağlamaktadır. Basit yapısına rağmen maya hücresi ökaryot hücrelerin özelliklerini göstermektedir. Nükleer zarla çevrili bir nükleusu ile sitoplazmasında hücre iskeleti elemanları ve hücre içi organeller bulunmaktadır. Bölünmeleri iki saatte bir olmakla birlikte tek bir hücreden koloni halinde çoğaltılabilmektedir. Maya mutantları, DNA replikasyonu, transkripsiyonu, RNA işlenmesi, proteinlerin sınıflandırılması ve hücre bölünmesi dahil olmak üzere ökaryotlardaki çok sayıda temel işlevin anlaşılmasında önemli olmaktadır [43].

Fungusların hücre duvarı yapısı plazma zarının dışında yer alarak hücrenin çevre ile tüm ilişkilerine aracılık etmektedir. Hücreyi ozmotik ve mekanik değişikliklerin neden olduğu farklı streslerden koruyan, hücresel bütünlüğü ve canlılığı sağlayan yüksek esnekliğe sahip bir iskelettir. Bununla birlikte hücre geçirgenliğinin kontrol edilmesi, hücrenin içeriğini koruyarak hücreye sağlamlık kazandırılması gibi biyolojik işlevlerde önemli rol oynamaktadır. Hücre duvarındaki proteinlerin bir kısmı adezin ve reseptör proteinleri olduğundan hücrenin dış ortamla etkileşimine izin vermektedir. Bazı bileşenler de yüksek immünojenik özelliğe sahip olduğundan fungusun büyümesini ve yayılmasını sağlamak için konağın bağışıklık tepkisini yönlendirebilmektedir [53].

Hücre duvarları, fungusların karakteristik bir yapısıdır ve esas olarak glukanlar, kitin, glikoproteinler, lipidler ve pigmentlerden oluşmaktadır. Bu bileşenlerin birlikte oluşturduğu yapı hücre duvarı sertliğini sağlamaktadır. Hücre duvarı bileşenleri insanlarda bulunmadığı için antifungal tedavilerde hedef olarak kullanılmaktadır. Özellikle bazı hücre duvarı bileşenleri oldukça immünojeniktir ve enfeksiyon sırasında hücresel ve humoral tepkileri uyarmaktadır.  $\beta$ -glukanlar ve mannanlar ile bu bileşenlere karşı yönlendirilen antikorlar, invazif fungal enfeksiyonu olan hastalarda tespit edilebildikleri için hastalıkların teşhis edilmesinde araç olarak kullanılmaktadır [53]. Mayalara ait bir tür olan *Candida albicans*,

insanlarda en yaygın patojenik *Candida* türüdür; cilt, mukozal ve sistemik enfeksiyonlar (kandidiyazis) dahil olmak üzere geniş bir hastalık yelpazesine neden olabilmektedir. Mukozal yüzeylerin *C. albicans* enfeksiyonları son derece yaygındır. *Candida* türleri, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde veya doğal bariyerlerin hasar gördüğü durumlarda yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu enfeksiyonlar sırasında funguslar insan vücudunun hemen hemen tüm organlarında kolonileşerek çoğalabilmektedir. *C. albicans* mayasının hücre duvar yapısı Şekil 2.9'da gösterilmektedir [54].



Şekil 2.9. Funguslarda hücre duvarı yapısı [54]

*C. albicans* hücre duvarı %90 karbonhidrat ve %10 proteinden oluşmaktadır. Karbonhidratlar bağışıklık cevabında önemlidir; proteinler ise konakçı hücre yüzeyleri ile etkileşimde anahtar role sahiptir. *C. albicans* mayasının hücre duvarı yapısında bulunan polisakkaritler, hücre duvarı proteinlerinin translasyon sonrası modifikasyonları olan mannanlar, (O-bağlı ve N-bağlı),  $\beta$  glukozlar, kitin ( $\beta$ -1,3 glukoz ve  $\beta$ -1,6 glukoz) ve deasetillenmiş formu olan kitosan olmak üzere üç ana formdadır. Kitin ve  $\beta$ -1,3 glukoz, iç hücre duvarı katmanında bulunan yapısal polisakkaritlerdir ve hücre duvarına şekil vererek dayanıklılığını sağlamaktadır. Mannan tabakası ise hücre duvarının antifungal ilaçlara karşı geçirgenliğini etkilemektedir [54, 55].

Enfeksiyona neden olan *Candida* türü 20'den fazladır [52]. Son yıllarda fırsatçı fungal enfeksiyonlarının görülme sıklığı, bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların fazla olması nedeniyle artmaktadır. Aynı zamanda insanlar için patojen olduğu belirlenen fungal türlerin sayısı da artmaktadır. *C. albicans*, kandidemiye neden olan en yaygın türdür ve bu türün

dışında *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* maya türlerinde de artış gözlenmektedir [56, 57].

#### 2.4. Antimikrobiyal Maddeler

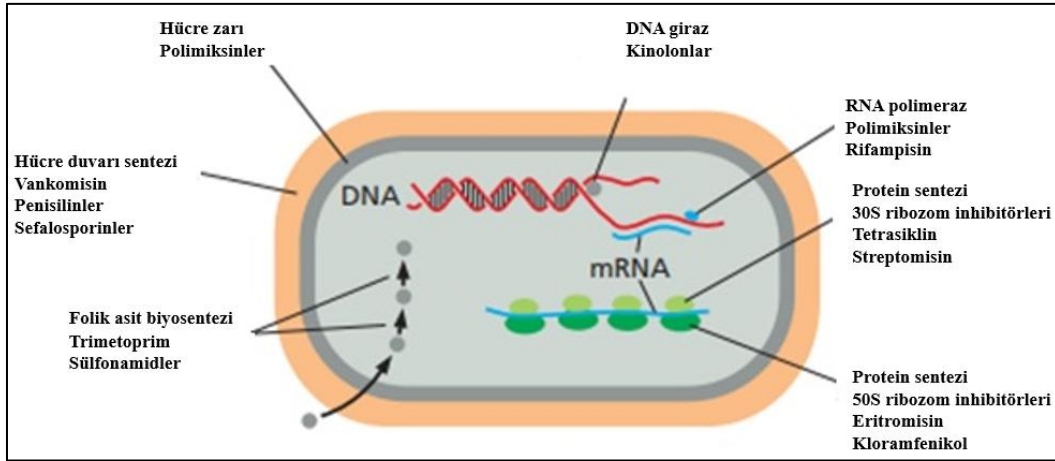
Antimikrobiyaller, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Antimikrobiyal maddelerin, yan etkilerinin olması ve duyarlı mikroorganizmalar üzerinde direnç geliştirebilmesi nedeniyle dezavantajları bulunmaktadır [58]. Mikroorganizmaların büyüme kapasitelerini azaltmak, çoğalmalarını engellemek veya onları öldürmek için kullanılan antibiyotikler, gıda koruyucuları ve dezenfektanlar gibi çeşitli antimikrobiyal ajan türleri bulunmaktadır. Bununla birlikte metabolik ve fizyolojik düzeyde büyük değişikliklere neden olabilen, kendine özgü mekanizmalara sahip doğal, yarı sentetik ve sentetik ajanlar da vardır. Bu ajanlar hücre duvarı sentezi üzerindeki değişikliklerinde  $\beta$ -laktamlar ve glikopeptidler; protein sentezi inhibisyonunda makrolidler ve tetrasiklinler; metabolik yolak inhibisyonunda sülfonamidler; DNA replikasyonu ve translasyonunu engellemede florokinolonlar gibi antimikrobiyal ilaçlardır [59]. Antimikrobiyal ilaçlar veya antibiyotikler, mikroorganizmalara karşı biyolojik olarak aktif moleküllerdir. Bu aktif moleküllerin doğal ürünler, sentetik türevler veya kimyasal olarak sentezlenen bileşikler olmak üzere farklı yapı ve kökenleri bulunmaktadır. DNA replikasyonu, protein ve hücre duvarı sentezi gibi temel mikrobiyal işlevleri engelleyerek etki etmektedirler [60].

Bağışıklık sisteminin hastalıkları önlemede yetersiz olduğu durumlarda antimikrobiyal ilaç tedavisi enfeksiyonlara karşı birincil silah durumundadır. Antimikrobiyal ilaçlar, konaktaki mikroorganizmaları öldürmekte veya büyümesini engellemektedir. Bu ilaçlar moleküler yapılarına, etki mekanizmalarına ve antimikrobiyal aktivite spektrumuna göre sınıflandırılmaktadır. Antibiyotikler, genellikle bakteri veya mantar türleri olmak üzere belirli mikroorganizmalar tarafından doğal olarak üretilen antimikrobiyal ajanlardır. Doğal antibiyotiklere ek olarak, çok sayıda ilaç sentetik olarak üretilmektedir ve kökenlerine bakılmaksızın antimikrobiyal ilaçların seçici toksisite göstermesi istenmektedir. Böylece antimikrobiyal ilaçlar konağı etkilemeyecek şekilde patojenleri inhibe ederek öldürmektedir. Çok sayıda antibiyotik olmasına rağmen, konak toksisitesi veya konak hücreleri tarafından alınamama nedeniyle bu antibiyotiklerin sadece %1'den az bir kısmının klinik olarak yararlı olduğu gösterilmiştir [44].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda artan antibiyotik direnci sorunlarının üstesinden gelebilmek için doğal antibiyotikler olarak adlandırılan Antimikrobiyal peptit (AMP) bileşiklerinin mikroorganizmalara karşı güçlü bir inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. AMPLer, hücre zarlarını veya belirli hücre içi bileşenleri hedef alarak özel mekanizmalar aracılığıyla çok çeşitli mikroorganizmaları inhibe etmektedir. AMPLerin gıda, tarım, çevre, hayvancılık ve ilaç endüstrilerinde antimikrobiyal ajanlar olarak potansiyel uygulamaları bulunmaktadır [61]. Bununla birlikte bazı fosfazen türevlerinin de patojen bakteri ve mayalar üzerinde güçlü bir antimikrobiyal aktivitesinin olduğu gösterilmiştir [4, 62]. Etkilediği mikroorganizmanın türüne bağlı olarak antimikrobiyal ajanlar; antiprotozoal, antiparazit, antibakteriyel, antiviral, antifungal ilaçlar olarak sınıflandırılabilir. Tez çalışmasında patojen bakteri ve mayalar kullanıldığından dolayı aşağıdaki kısımda antibakteriyel ve antifungal ilaçların özellikleri sunulmuştur.

#### **2.4.1. Antibakteriyel ilaçlar**

Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın olarak en etkili antibakteriyel ilaçlardır. 1928'de Alexander Fleming'in penisilini ilk doğal antibiyotik olarak keşfetmesiyle penicillium küflerinin, stafilokoklara karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte S.A. Waksman, antibiyotiği "mikroorganizmalar tarafından üretilen, bakterilerin ve diğer mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilen ve hatta onları yok edebilen bir kimyasal madde" olarak tanımlamaktadır [63]. Böylelikle antibakteriyel ajan olarak da bilinen antibiyotikler, bakteri büyümesini yavaşlatarak (bakteriyostatik) veya öldürerek (bakterisidal) etki etmektedir [58, 63]. Antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki önemli hedefleri arasında hücre duvarı, ribozomlar, nükleik asit sentezini kolaylaştıran veya metabolik süreçleri katalize eden enzimler ve sitoplazmik membran yapıları bulunmaktadır (Şekil 2.10) [44, 64].



Şekil 2.10. Antibiyotik hedefleri [64]

Antibiyotikler moleküler yapılarına, etki biçimlerine, uygulama yollarına (enjekte edilebilir, oral, topikal) ve aktivite spektrumlarına göre sınıflandırılmaktadır. En yaygın antibiyotik sınıfları kimyasal veya moleküler yapılarına göre Beta-laktamlar, Makrolidler, Tetrasiklinler, Kinolonlar, Aminoglikozidlerdir [63]. Her mikroorganizmanın farklı antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılığı önemli ölçüde değişmektedir. Örneğin, gram pozitif bakteriler genellikle doğal penisiline duyarlı olmasına rağmen gram negatif bakteriler dirençlidir. Bu nedenle, doğal penisilin nispeten daha dar bir aktivite spektrumu göstermektedir. Tetrasiklin gibi geniş spektrumlu aktivite gösteren antibiyotikler ise genellikle her iki gruba karşı da etkilidir. Ayrıca, dar bir aktivite spektrumuna sahip antibiyotikler, belirli patojenlere karşı oldukça etkili olabilmektedir. Özellikle vankomisin antibiyotiği *Enterococ*'lar, *Staphylococ*'lar ve *Clostridia* dahil olmak üzere penisiline dirençli, gram pozitif bakteriler için etkili bir bakterisidal ajandır. Antibakteriyel ilaçlar, etki mekanizmalarına göre incelenmektedir ve bu mekanizmalar aşağıda gösterilmiştir [44].

#### Hücre duvarına etki eden antibakteriyel ilaçlar

Penisilinler ve sefalosporinler de dahil olmak üzere  $\beta$ -laktam antibiyotikler, hücre duvarı sentezini sağlayan transpeptidasyon mekanizmasına müdahale ederek bakteriyel hücre duvarı sentezini engellemektedir. Bu antibiyotikler karakteristik bir yapısal bileşen olan  $\beta$ -laktam halkasını bulundurmaktadır. Peptidoglikan sentez mekanizmalarının bakterilere özgü olması sebebi ile  $\beta$ -laktam antibiyotikleri konak hücreleri için oldukça seçicidir ve toksik değildir. Dünya çapında kullanılan tüm antibiyotiklerin yaklaşık üçte ikisini bu grup oluşturmaktadır [44].

### Hücre zarı sentezine etki eden antibakteriyel ilaçlar

Daptomisin, *Streptomyces* bakterisinden üretilen, atipik hedefe sahip olan bir antibiyotiktir. Patojenik *Streptococ*'lar ve *Staphylococ*'lar dahil olmak üzere gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Bakterilerin sitoplazmik membranına bağlanarak membranın hızlı bir şekilde depolarizasyonuna yol açmaktadır. Depolarize olan hücrenin nükleik asitler ve proteinler gibi makromolekülleri sentezleme yeteneğini kaybetmesi ile hücre ölümü meydana gelmektedir [44].

### Protein sentezine etki eden antibakteriyel ilaçlar

Bazı antibiyotikler, genellikle ribozomal RNA'ya (rRNA) bağlanmayı içeren ribozomla etkileşimler yoluyla protein sentezini bozarak bakteriyel patojenleri engellemektedir. Bu ilaçların çoğu yalnızca bakteriyel ribozomları hedef almaktadır ve bu nedenle ökaryotik hücrelerin sitoplazmik ribozomları üzerinde etkisi bulunmamaktadır [44].

Aminoglikozitler, ribozomun 30S (küçük) alt birimini hedef alarak translasyonu engellemektedir. Bu geniş spektrumlu antibakteriyel ilaçlar, gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır ancak böbrek ve işitme hasarı gibi konak toksisite etkisi nedeniyle aminoglikozit kullanımı azaltılmıştır [44].

Aminoglikozitler gibi tetrasiklinler de ribozomun 30S alt biriminin işlevini engellemektedir. Tetrasiklinler, *Streptomyces* tarafından üretilen geniş spektrumlu antibakteriyel ilaçlardır gram pozitif/gram negatif bakterileri inhibe etmektedir. Makrolidler ise, bakteriyel ribozomun 50S (büyük) alt birimini hedef alarak translasyonu engellemektedir [44].

### Nükleik asitlere etki eden antibakteriyel ilaçlar

Kinolonlar, DNA giraz enzimine müdahale ederek bakteriyel metabolizmayı bozan sentetik antibakteriyel bileşiklerdir. Bakteri hücresinde bulunan DNA'nın süper sarmal yapısının oluşmasını ve paketlenmesini önlemektedir. DNA giraz enziminin tüm bakterilerde bulunması nedeniyle kinolonlar, gram pozitif ve gram negatif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkilidir. Rifampin, rifamisin antibiyotikleri bakterilerdeki RNA polimerazının  $\beta$ -alt birimine bağlanarak RNA sentezini inhibe etmektedir. Aktinomisin antibiyotiği ise,

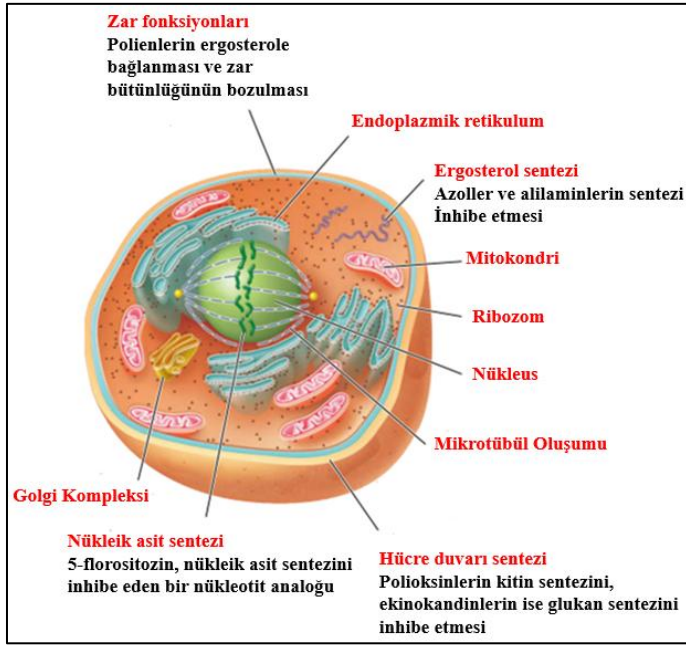
DNA ile birleşmekte ve RNA uzamasını engelleyerek RNA sentezini engellemektedir. Bu ajan, RNA'nın sentezlendiği çift zincirdeki ana oluğa yerleşerek, guanin-sitozin baz çiftleri üzerinden DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanmaktadır [44].

### Sülfanilamidler

Folik asit vitamininin bir bileşeni olan p-aminobenzoik asidin (PABA) bir analogu olan sülfanilamidler, PABA'yı taklit ederek, folik asit sentezini engellemekte ve nükleik asit sentezini inhibe etmektedir. Bakteriler, çoğu insan ve hayvanın aksine kendi folik asitlerini sentezlediği için bu antibiyotikler seçici toksiktir [44].

### **2.4.2. Antifungal ilaçlar**

Funguslar bir dizi ciddi hastalığa neden olmaktadır [44]. Özellikle invazif fungal enfeksiyonlar (IFI), insanlarda morbidite ve mortalite üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* ve *Pneumocystis* fungal kaynaklı ölümlere yol açan en önemli türlerdir. [65]. Tedavide kullanılan antifungal ilaçlar konak hücrelerde metabolik yollara etki ettiğinden dolayı toksik olabilmektedir. Bu nedenle birçok antifungal ilaç sadece topikal (yüzey) uygulamalar için kullanılmaktadır. Antifungal ilaçlar membran fonksiyonları, hücre duvarı sentezi ve mikrotübül oluşumunu inhibe ederek etkisini göstermektedir (Şekil 2.11) [44]. Antifungal ilaçlar Çizelge 2.2'de gösterilmektedir [44, 65].



Şekil 2.11. Antifungal ilaçlar ve hedef aldığı bölgeler [44]

Çizelge 2.2. Bazı antifungal ilaçlar ve hedef bölgeleri [44, 65]

| Antifungal İlaç Sınıfı   | Hedef Bölgesi        | Antifungal İlaç Örneği                  |
|--------------------------|----------------------|-----------------------------------------|
| Alilaminler              | Ergosterol sentezi   | Terbinafin                              |
| Azoller                  | Ergosterol sentezi   | Klortrimazol<br>Flukanozol<br>Mikonazol |
| Kitin sentezi inhibitörü | Kitin sentezi        | Nikomisin Z                             |
| Ekinokandinler           | Hücre duvarı sentezi | Kaspofungin                             |
| Nükleik asit analogları  | DNA sentezi          | 5-florositozin                          |
| Aromatik antibiyotik     | Mitoz inhibitörü     | Griseofulvin                            |

### 2.4.3. Antimikrobiyal direnç

Antimikrobiyal direnç gelişimi dünya genelinde önemli bir sağlık sorunudur [66]. Bir mikroorganizmanın, duyarlı olduğu bir antimikrobiyal ajanın etkilerine karşı direnç yeteneğini kazanması antimikrobiyal ilaç direnci olarak adlandırılmaktadır [44, 59]. Antimikrobiyal ajanlar bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır [59, 67] ve bu ajanların kullanılması ile mikrobiyal türlerden kaynaklanan hastalıklar ve ölümler başarılı

bir şekilde azalmaktadır. Bakteriler, mantarlar, parazitler ve virüslerin de dahil olduğu mikroorganizmaların, antimikrobiyal ajanları daha az etkili hale getiren direnç mekanizmaları geliştirebildiği bilinmektedir [67].

Mikroorganizmalar antimikrobiyal ilaçlara karşı doğal, kazanılmış, çapraz ve çevre koşullarına bağlı olmak üzere farklı şekillerde direnç geliştirebilmektedir. Doğal direnç mikroorganizmaların genetik özelliğiyle; kazanılmış direnç dirençli mikroorganizma tarafından konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyon aktarılmasıyla; çapraz direnç mikroorganizmaların aynı mekanizma üzerinde etki eden diğer ilaçlara karşı direnç göstermesi ile; çevre ve koşullara bağlı direnç ise, oksijen basıncı ve dokudaki pH değişiklikleri, antimikrobiyal ilacın infeksiyon bölgesine ulaşamaması gibi nedenlerle gerçekleşmektedir [68, 69]. Mikroorganizmaların türüne göre antimikrobiyal direnç sınıflandırılmaktadır. Bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için antimikrobiyal dirence neden olan moleküler mekanizmaları anlamak, yeni stratejilerin tasarlanmasına yardımcı olmaktadır.

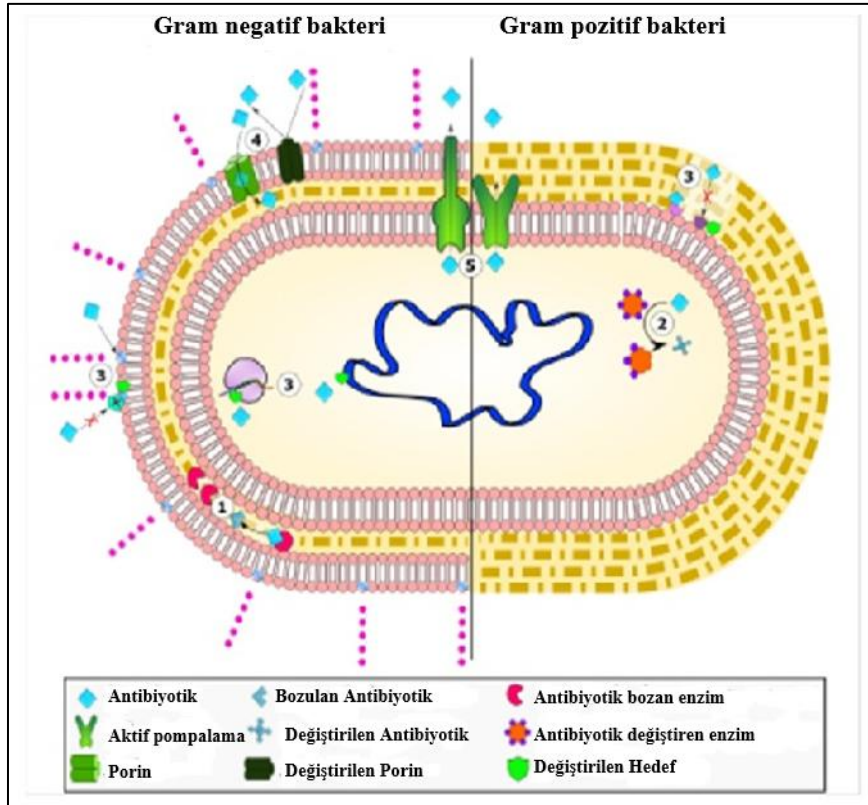
#### Antibakteriyel direnç

Bakteriyel patojenler halk sağlığı üzerinde endişe verici bir tehdit oluşturmaktadır [70]. İnsanların tarih boyunca mikroorganizmalarla özellikle de bakterilerle uzun süreli bir mücadele verdiği ve 1940'ların başlarında penisilinin bakteriler için etkili bir antimikrobiyal ajan olduğu bilinmektedir. Penisilin insanlar arasında çok sayıda bulaşıcı hastalığa karşı kullanılmıştır ancak penisilinin aşırı kullanımı bakterilerin çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmesine ve etkinliğinin azalmasına neden olmuştur [59]. Antibakteriyel direnç endojen veya ekzojen şekilde oluşabilmektedir. Endojen direnç patojenin içinde seleksiyon veya mutasyon yoluyla kendiliğinden gerçekleşmektedir. Ekzojen direnç ise çevresel organizmalardan horizontal gen transferi (HGT) yoluyla gerçekleşmektedir [71].

Mikroorganizmaların çoğundan antibiyotik üretilmektedir ve antibiyotik direncini kodlayan genler genellikle hepsinde bulunmaktadır. Antibiyotik direnci genetik olarak bakterilerin kromozomunda kodlanmaktadır ve hastalardan izole edilen antibiyotik dirençli bakteriler horizontal (yatay) olarak iletilen R (direnç) plazmidlerinde bulunan ilaç direnci genlerini içermektedir. R plazmidleri üzerindeki genler tarafından kodlanan enzimler, kullanılan ilacın değiştirilmesi, ilaç emiliminin engellenmesi ve antibiyotiğin hücre dışına aktif olarak

pompalanması olmak üzere üç farklı mekanizma ile direnç sağlamaktadır. Antibiyotiklerin yaygın kullanımı, R plazmidlerinin yayılmasına neden olmaktadır ve bu plazmidler seçici avantaj sağlayan genler taşımaktadır. Direnç genlerinin her yerde sıklıkla bulunması, herhangi bir antibiyotiğin etkili bir antimikrobiyal ajan olarak uzun süreli kullanımını sınırlamaktadır. İki farklı antimikrobiyal ajanı birleştirmek ise, genellikle direnci azaltmaktadır. Bunun nedeni bir antibiyotiğe dirençli bir mutant suşun ikinci antibiyotiğe de dirençli olma olasılığının daha düşük olmasıdır ancak R plazmidleri çoklu ilaç direnci sağlamakta ve çoklu antibiyotik tedavisini engelleyebilmektedir. Antibiyotiklerin aşırı kullanımı da direnç gelişimine neden olmaktadır. Antibiyotik direnci, ilaçlar yalnızca duyarlı patojenlerin tedavisi için kullanılırsa veya patojeni ortadan kaldırmak için yeterli yüksek doz ve süre boyunca verildiğinde en aza indirilebilmektedir.

Çoklu ilaca dirençli bakteriler, enfeksiyon hastalıklarına karşı uygulanacak tedavinin etkinliğini bozmakla birlikte bu bakteriler antimikrobiyal direnci geliştiren çok sayıda moleküler mekanizmaya sahiptir. Bu mekanizmalardan en sık gözlenenler; ilaçların hedef bölgesindeki değişiklik ve hedef bölgenin bakteriler tarafından korunması, aktif pompalama ile ilaçların hücre dışına atılması, ilacın enzimatik inaktivasyonu, biyofilm oluşumu, alternatif metabolik yolun kullanılması ve hücre zarı geçirgenliğinin azaltılmasıdır (Şekil 2.12) [68, 70] (Çizelge 2.3) [44].



Şekil 2.12. Bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı direnç mekanizmaları. 1. Enzimatik hidroliz, 2. Antibiyotiklerin grup transferi ve redoks işlemiyle enzimatik modifikasyonları, 3. Antibiyotik hedeflerinin modifikasyonları, 4. Porinlerin modifikasyonları ile antibiyotiklere karşı geçirgenliğin azaltılması, 5. Antibiyotiklerin membran aktif pompaları tarafından çıkarılması [70]

Çizelge 2.3. Antibiyotikler ve dirençli olduğu bakteriler [44]

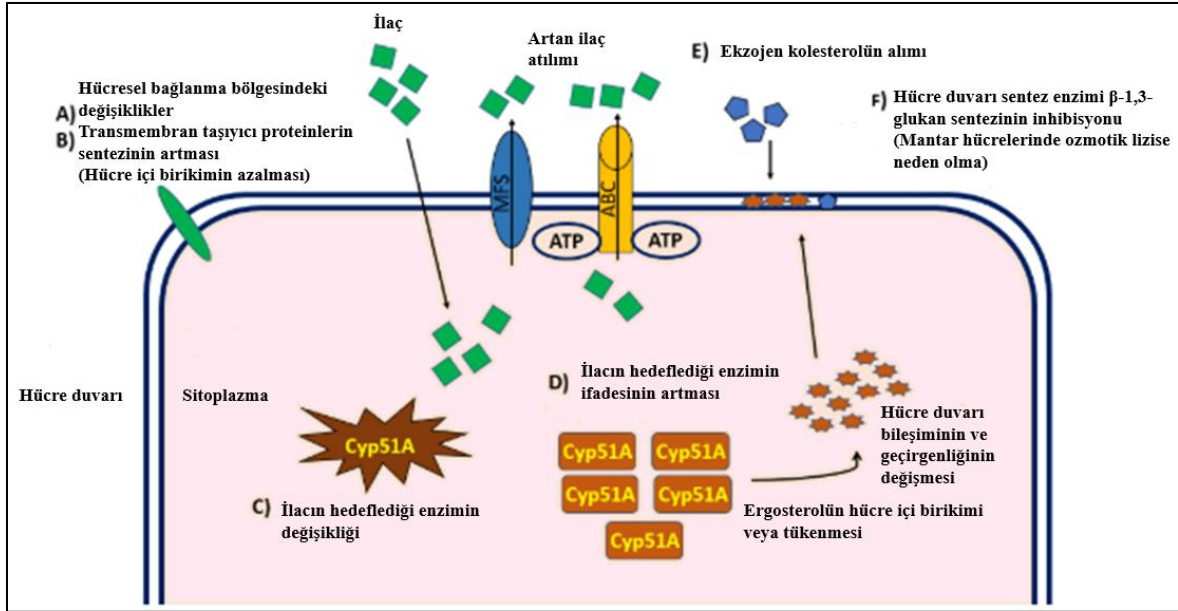
| Direnç mekanizması                                                                                         | Antibiyotik                                              | Genetik Etken         | Mekanizmanın Olduğu Mikroorganizma              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------|
| Geçirgenliğin azaltılması                                                                                  | Penisilinler                                             | Kromozomal            | Gram negatif bakteri                            |
| Antibiyotiğin inaktivasyonu<br>$\beta$ -laktamazlar, metilazlar, asetilazlar, fosforilazlar                | Penisilinler                                             | Plazmid ve kromozomal | <i>S. aureus</i> , <i>Enteric</i> bakteriler    |
|                                                                                                            | Kloromfenikol                                            | Plazmid ve kromozomal | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>S. aureus</i> |
|                                                                                                            | Aminoglikozidler                                         | Plazmit               | <i>Enteric</i> bakteriler                       |
| Hedef değişikliği<br>RNA polimeraz, rifamisin; ribozom, eritromisin ve streptomisin; DNA giraz, kinolonlar | Eritromisin<br>Rifamisin<br>Streptomisin<br>Norfloksasin | Kromozomal            | <i>S. aureus</i>                                |
|                                                                                                            |                                                          |                       | <i>Enteric</i> bakteriler                       |
|                                                                                                            |                                                          |                       | <i>Enteric</i> bakteriler                       |
|                                                                                                            |                                                          |                       | <i>S. aureus</i>                                |
| Dirençli biyokimyasal yolun geliştirilmesi                                                                 | Sülfonamidler                                            | Kromozomal            | <i>Enteric</i> bakteriler                       |
|                                                                                                            |                                                          |                       | <i>S. aureus</i>                                |
| Hücre dışına pompalama                                                                                     | Tetrasiklinler<br>Kloramfenikol<br>Eritromisin           | Plazmid               | <i>Enteric</i> bakteri                          |
|                                                                                                            |                                                          | Kromozomal            | <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>           |
|                                                                                                            |                                                          | Kromozomal            | <i>Staphylococcus</i>                           |

### Antifungal direnç

Antifungal direnç, fungal enfeksiyonların antifungal tedaviye yanıt vermemesi durumudur [72]. Mikozis olarak da adlandırılan fungal enfeksiyonlar, ölüme yol açabilen ciddi invazif ve sistemik hastalıklara neden olmaktadır. Son yıllarda bağışıklık sistemi baskılanan hastaların sayısının artması ve ilaç tedavilerine giderek daha dirençli patojenik formların ortaya çıkmasıyla fungal enfeksiyonlara bağlı ölüm oranlarında artış gözlenmektedir [73].

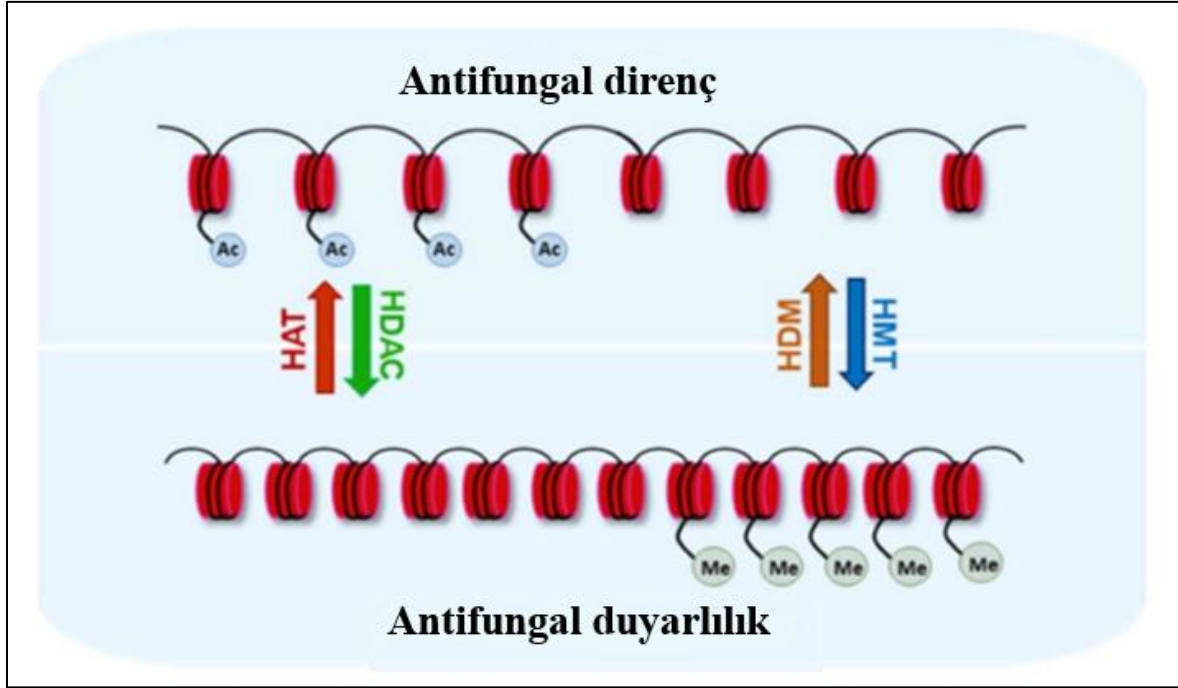
Antifungal direnç primer (yapısal), sekonder (kazanılmış) ve klinik direnç olarak sınıflandırılmaktadır [72-74]. Antifungal ilaçlara maruz kalmadan önce gelişen direnç primer; maruz kaldıktan sonra gelişen direnç sekonder; ilaçlara tamamen duyarlı görünen bir fungal enfeksiyonunun ilerlemesi veya tekrarlaması ile oluşan direnç ise klinik direnç olarak tanımlanmaktadır. Klinik direnç genellikle AIDS (Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu), nötropeni gibi kalıcı bağışıklık hastalığı olan kişilerde görülmektedir [72].

Antifungal tedaviye karşı gelişen direncin moleküler mekanizmaları, hücresel bağlanma bölgesindeki değişiklikler yoluyla meydana gelmektedir (Şekil 2.13) [73].



Şekil 2.13. Antifungal ilaç direnci mekanizmaları [73]

Epigenetik mekanizmaların da antifungal ilaç direncinin temel düzenleyicileri olduğu bilinmektedir. İnsanlardaki fungal patojenler, histonların asetilasyonu/metilasyonu, kromatinin yeniden modellenmesini içeren epigenetik mekanizmalar yoluyla ilaç direnci geliştirebilmektedir. Histonların asetilasyon/metilasyon mekanizmaları ile açık veya yoğun halde bulunan kromatin yapısı antifungal ilaç duyarlılığını etkilemektedir (Şekil 2.14). Özellikle histon asetilasyonu *C. albicans* ve *C. glabrata* mayalarında antifungal dirençle ilişkilendirilmiştir [75].



Şekil 2.14. Histon asetilasyon ve metilasyonunun antifungal direnç üzerindeki etkileri [75]

Antifungal direnç hasta, fungus ve ilaç kaynaklı olmak üzere çok sayıda faktörden oluşmaktadır (Şekil 2.15). Hastalara verilen eş zamanlı ilaçlar antifungal ilaçların farmakodinamiklerini etkileyebilmektedir. Özellikle yüksek riskli gruptaki hastalarda antibakteriyel ilaç kullanımı kandidiyazis gelişimine yol açan en önemli faktörlerden biridir. Fungal mikrobiyomda dengesizliğe neden olarak kolonizasyonu ve çoğalmayı arttırmaktadır [74].



Şekil 2.15. Klinik direnç neden olan risk faktörleri [74]

Fungus formları arasında ilaca en çok dirençli olanlar *Candida* ve *Aspergillus* türleridir [73]. *Candida albicans*, sağlıklı insan mikrobiyotasında yaygın olarak ve gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem, ağız, cilt dahil olmak üzere vücudun çeşitli nişlerini asemptomatik olarak kolonize etmektedir. Patojen *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyon durumunda ise, bu tür insan vücudunun her organına yayılmakta ve önemli bir tıbbi sorun haline gelmektedir. Özellikle bağışıklık sisteminin zayıflaması, mikrobiyotanın disbiyozu veya çevresel değişiklikler *C. albicans*'ın aşırı bir şekilde çoğalmasına ve yüzeysel mukozal enfeksiyonlardan hematogen enfeksiyonlara kadar değişen enfeksiyonlara neden olmaktadır. Aynı zamanda biyofilm oluşturabilen *Candida* enfeksiyonları çok yüksek konsantrasyonlarda antifungal ilaçlara dayanabilmektedir ve bu durum enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır [74, 76].

Fungal enfeksiyonları tedavi etmek için polienler primidin analogları, azoller ve ekinokandinler olmak üzere dört ana antimikotik ilaç sınıfı bulunmaktadır (Çizelge 2.4) [72-74]. Uzun süreli ilaç kullanımı, hastalıkların tedavisini engelleyerek ilaç toksisitesi ve antifungal direnç riskini arttırmaktadır. Fungusların çevresel koşullara uyum sağlayarak hızla mutasyona uğrama yeteneği de antifungal tedavilere dirençli formların ortaya çıkmasını kolaylaştırmakta ve tedavi sırasında kullanılacak minimum inhibitör konsantrasyonlarda (MİK) artışa neden olmaktadır [73].

Çizelge 2.4. Antifungal ajanların etkileri [74]

| Antifungal Sınıf     | Antifungal İlaç                            | Aktivite Spektrumu | İlacın Etki Mekanizmaları                                                                                                                                                              | Direnç Mekanizmaları                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------|--------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Polienler            | Amfoterisin B                              | Fungusidal         | Polien moleküllerinin lipid çift katmanlarına girerek fungus zarındaki ergosterole bağlanması ve plazma zarını bozan gözenekler oluşturmaları, oksidatif hasar                         | ERG3 genindeki mutasyonların ergosterol biyosentezini etkilemesi, ilacın hedefe ulaşmasında azalma, katalaz aktivitesinde artma, oksidatif hasara yatkınlık                                                                                                        |
| Pirimidin analogları | 5-Flusitozin                               | Fungusidal         | DNA ve RNA'ya toksik florlu pirimidin antimetabolitlerinin dahil edilmesi, hücre fonksiyon ve bölünmenin inhibisyonu                                                                   | Fur1p enziminde mutasyon, toksik antimetabolitlerin oluşumunda azalma                                                                                                                                                                                              |
| Azoller              | Flukanozol<br>Vorikonazol<br>Posakonazol   | Fungustatik        | Fungal sitokrom P450 14 $\alpha$ -lanosterol demetilazın inhibisyonu sonucu metillenen toksik ara maddelerin birikimi, fungal hücre zarı fonksiyonunun bozulması ve büyüme inhibisyonu | Aktif pompalama ile ilacın hücre dışına pompalanması ve ilaç konsantrasyonunda azalma<br>Hedef enzimin değişmesi, bağlanma bölgesine olan afinitenin azalması (ERG11 geninde nokta mutasyonu)<br>Hedef enzimin ifadesinin artması (ERG11 geninin ifadesinde artma) |
| Ekinokandinler       | Kaspofungin<br>Anidulafungin<br>Mikafungin | Fungusidal         | $\beta$ - (1,3) glukoz sentaz inhibisyonu ile fungus hücre duvarının ana bileşenlerinden biri olan $\beta$ -(1,3) glukoz üretiminde azalma                                             | FKS1 ve FKS2 genlerinde nokta mutasyonları                                                                                                                                                                                                                         |

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, antifungal aktiviteye sahip nanopartiküller/nanoformülasyonlar, monoklonal antikörler, rezafungin, ibrexafung ve fosmanogepix gibi yeni bileşikler dirençli fungal enfeksiyonlara etkili bir şekilde müdahale edebilmektedir (Çizelge 2.5) [73].

Çizelge 2.5. Yeni antifungal ajanlar ve etkileri [73]

| Antifungal Ajan                       | Etkiler                                                                                                      |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nanopartiküller<br>Nanoformülasyonlar | Yüksek etkinlik ve seçicilik sağlama                                                                         |
| Monoklonal Antikörler                 | Bağışıklık sistemi bakılanmış sistemik fungal enfeksiyonları olan hastaların bağışıklık cevabını güçlendirme |
| Rezafungin                            | İnvazif kandidiyazis tedavisi                                                                                |
| Ibrexafung<br>Fosmanogepix            | <i>Candida</i> türlerine karşı geniş bir antifungal spektruma sahip olma                                     |

## 2.5. Patojen Mikroorganizmaların Oluşturduğu Enfeksiyonlar

### 2.5.1. Patojen bakteri türleri

#### *Bacillus cereus* (B. cereus)

Gram pozitif bakterilerden olan *B. cereus*; fakültatif veya aerobik, spor oluşturabilen, çubuk formunda ve doğada geniş bir dağılım gösteren bir mikroorganizma türüdür. Metabolik aktivitesi olmamasına rağmen *B. cereus* sporunun ısı, donma, radyasyon gibi aşırı çevresel koşullara karşı dirençli olması, bu bakteri için enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmektedir. *B. cereus* birçok toprak türünde ve bitkilerde en yaygın aerobik spor taşıyıcısı olabilmektedir. Ayrıca *B. cereus*, endosporlarının yapışkan yapısından dolayı gıda üretim ortamlarında sıklıkla bulunmakta ve her türlü besine yayılabilmektedir [77].

*B. cereus* suşları yaygın olarak gıda zehirlenmesi ajanları olarak gastrointestinal hastalıklara neden olmakla birlikte bakteriyemi (kan dolaşımında bakteri varlığı), merkezi sinir sistemi

tutulumu (menenjit ve beyin apseleri), endoftalmi (gözün iç kısmındaki boşluğun iltihaplanması), göz enfeksiyonları ve sistemik hastalıklara da neden olmaktadır [77-79]. Bununla birlikte *B. cereus* hemolitik olmayan enterotoksin (Nhe), Hemolizin BL (Hbl) ve Sitotoksin K (CytK) olmak üzere çeşitli toksinler üretmektedir. Özellikle sitotoksin K, ishale neden olmaktadır [79].

#### *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)

*B. subtilis* hava, su ve toprak ortamında yaygın olarak bulunan Gram pozitif, çubuk şeklinde, katalaz pozitif bir mikroorganizma türüdür. Gram pozitif hücre duvarı yapısına sahiptir ve endospor oluşumu gözlenmektedir. Bu özellikler bakterinin aşırı sıcaklık, sınırlı beslenme gibi olumsuz çevre koşullarına iyi bir şekilde adapte olmasını sağlamaktadır [80]. Bununla birlikte güçlü bir biyofilm oluşturma yetenekleri de bulunmaktadır [80, 81].

*B. subtilis* genel olarak insanlarda patojenik potansiyeli olmayan fırsatçı bir mikroorganizma olarak kabul edilmektedir ancak bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlarla tedavi edilen hastalar bu zararsız mikroorganizma ile enfeksiyona duyarlı hale gelebilmektedir. *B. subtilis* suşlarının bazı gıda zehirlenmesi durumlarına da neden olduğu gösterilmiştir [82].

*Bacillus* türleri, özellikle bitki patojenleri üzerindeki biyopestisit rolleri nedeniyle en çok araştırılan biyokontrol ajanları arasındadır. Aynı zamanda nitrojen fiksasyonu yoluyla bitkilerin çevrelerinden belirli besinleri almasına yardımcı olarak veya bitki hormonlarının biyosentezi gibi işlemler yoluyla biyogübre/biyostimülatör olarak da görev yapabilmektedir. Özellikle *B. subtilis* enzim üretimi (amilaz, proteaz, lipaz), biyokontrol, biyoremediasyon (mikroorganizmalar yardımıyla çevre kirleticilerinin uzaklaştırılması), biyopolimer sentezi, probiyotik ve antibiyotik üretimi olmak üzere birçok biyoteknolojik alanda kullanılmaktadır [80].

#### *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

*S. aureus*, Gram pozitif, kok şeklinde olan mikroorganizma türüdür [44]. *S. aureus* cilt, akciğer enfeksiyonları, bakteriyemi, gıda zehirlenmesi, endokardit, osteomyelit gibi çok çeşitli enfeksiyonlara neden olan klinik açıdan önemli bir patojendir ve çoklu antibiyotik direncine sahiptir [83, 84]. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) türleri, özellikle hastane

enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir [84]. *S. aureus* enfeksiyonlarının oluşumu, bakteriyel yapışmayı başlatan yüzey proteinlerinin üretimine, konakçı hücreleri tahrip eden hücre dışı toksinlerin veya enzimlerin salgılanmasına, konakçı bağışıklık sisteminin etkisizleştirilmesine ve konakçı hücrelerde bakterilerin yayılmasına bağlıdır. *S. aureus*, konakta enfeksiyon geliştirmek için toksinler başta olmak üzere çok çeşitli virülans faktörleri kullanmaktadır. *S. aureus* patojenitesini artırmak ve konak içinde yayılmak için koagülaz, hiyaluronidaz, deoksiribonükleaz ve lipaz enzimlerini sentezlemektedir. Ayrıca patojeniteyi artıran hücre dışı protein toksinleri olarak; enterotoksinler, Toksik Şok Sendromu Toksini 1 (TSST-1), Eksfoliatif Toksinler (ET), hemolizinler, Epidermal Hücre Farklılaşma İnhibitörleri (EDIN) ve Panton-Valentine Lökosidin (PVL) sentezlemektedir [84]. *S. aureus* suşları biyofilm oluşturarak da ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Biyofilm, yerleşik tıbbi cihaz materyallerinde, endokardit durumunda kalp kapakçıklarının yüzeyinde oluşabilmektedir [83].

*S. aureus* nötrofiller, monositler, fagositler, epitel ve endotel hücreleri, keratinositler ve osteoblastlar gibi konak hücrelerinin içinde saklanarak konağın bağışıklık sistemi saldırılarından korunmaktadır. Nötrofillerde kalıcı olarak yerleşebilen *S. aureus* bulaşıcıdır ve herhangi bir enfeksiyon sırasında bu bakterinin yayılabilmektedir [83]. Kan dolaşımında *S. aureus*'un varlığı ise bakteriyemi olarak adlandırılmaktadır ve bu durum enfeksiyona karşı sistemik bir inflamatuvar yanıt olan sepsis gelişimine yol açabilmektedir. Sepsisin tipik bir özelliği, bazen inflamasyonla eş zamanlı oluşan immünoşüpresif yanıttır. İltihaplanma ve bağışıklık sisteminin baskılanması sonucunda dokularda hasar oluşmaktadır ve bu durum konağı hem etken patojene hem de ikincil enfeksiyonlara karşı savunmasız hale getirmektedir [85].

#### *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ve *Enterococcus hirae* (*E. hirae*)

*Enterokoklar* normal durumda bağırsak florasının bir parçasıdır. Hastane enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olan *E. faecalis* ve *E. faecium* insanlardaki başlıca patojenik türlerdir [86]. *E. faecalis*, hayvanların ve insanların gastrointestinal sisteminde bulunan Gram pozitif, fakültatif anaerobik bir laktik asit bakteri türüdür. Bağışıklık düzenleyici özelliklere sahip olduğu bilinen bu mikroorganizma probiyotik olarak, gıda fermentasyonunda ve bakteriyosin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte *E. faecalis* suşları antibiyotiklere, yüksek sıcaklıklara, pH değişimlerine ve kimyasallara karşı direnç

gösterebilmektedir. Bu türün bazı suşları bağışıklık sistemi zayıflayan kişilerde endokardit [87], menenjit, zatürre, septisemi (bakteri veya diğer mikroorganizmaların kan dolaşımına girip tüm vücuda yayılması) ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır [88].

*Enterokoklar* çeşitli bakteriyosinler üretmektedir. Bu bakteriyosinlerden biri de *E. faecalis* tarafından üretilen sitolizindir. Sitolizin, bağırsak paraziti gibi zararlı mikroorganizmalara karşı savunma sağlamak, koloni olarak hareket etmek ve prokaryotik veya ökaryotik kaynaklardan besin edinimini kolaylaştırmada görevlidir [89].

*E. hirae*, Gram pozitif, fakültatif anaerobik ve kok şeklinde olan bir bakteri türüdür [86, 90]. *E. hirae*'nin, insanlara göre çoğunlukla hayvanlarda enfeksiyona neden olduğu bilinmektedir [86]. *E. hirae*, insanlarda, kalp kapakçığı, idrar yolu enfeksiyonları, omurlar arası disk enfeksiyonları ve bakteriyemi ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte *E. hirae* biyofilm oluşturabilmektedir [90].

#### *Salmonella typhimurium* (S. typhimurium)

*Salmonella enterica serovar typhimurium* (S. typhimurium) fakültatif anaerob, Gram negatif bir patojendir. *S. typhimurium* enfeksiyonları, hayvansal kökenli kontamine gıdaların tüketilmesiyle bulaşmaktadır. Hayvancılık alanında önleme stratejileri ile bu bakterinin kontrol altına alınması amaçlanmaktadır. Bağışıklık aktivasyonunda görevli, birden fazla proinflamatuvar sinyal yolağında bulunabilen *Salmonella* türleri ishal, bakteriyemi, tifo, paratifo, invazif ve kronik enfeksiyonlara neden olmaktadır [91, 92]. Bununla birlikte *S. typhimurium*'un kronik inflamatuvar bağırsak iltihabı hastalıklarını tetiklediği mekanizmalar da bulunmaktadır [93]. *Salmonella*, oluşabilecek kolonizasyon direncini engellemek ve bağırsak iltihabını başlatmak için birçok virülans faktörü ve yöntem kullanmaktadır. Kolonizasyon direncini engellemek için kullanılan yöntemler; ortamda bulunan diğer bakterileri baskılayarak inflamasyonun başlatılması, konak ile mikrobiyota tarafından üretilen sinyallerin kesilmesi ve metabolizma ile sinyal yolları arasında bağlantıyı sağlayan genlerin düzenlenmesidir. Bağırsak lümenine girdikten sonra *Salmonella*, bağırsaktaki epitel hücrelerine doğru hareket etmede kamçılarını; yakınında bulunan hücrelere tutunmada ise fimbrialarını kullanmaktadır. Fimbrialar, hücre dışı matris glikoproteini laminini bağlamakta ve konak hücreye yapışmayı sağlamaktadır [94].

*S. typhimurium*, oral yolla konağa, daha sonra bağırsak epiteliyle temas kurduğı kalın bağırsağa ulaşmaktadır. Bu durum T3SS1 geni tarafından kodlanan tip III salgılama sisteminin aktivasyonu ile başlamaktadır. Salgılama sistemi tarafından iletilen efektör proteinler, *Salmonella* içeren bir vakuol (SCV) oluşturarak konak hücrenin tepkilerini etkilemektedir. Hücre içi ortam, *S. typhimurium*'un T3SS2 geni ile kodlanan başka bir tip III protein salgılama sistemini ifade etmesine neden olmaktadır ve patojen konağın bağışıklık sistemi mekanizmalarından etkilenmeden hücre içinde çoğalabilmektedir. Ardından enfekte hücreler tarafından Tümör Nekroz Faktörü (TNF), İnterlökin-8 (IL-8) ve İnterlökin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ) gibi proinflatuar sitokinlerin üretimi, makrofajlar ve nötrofiller dahil olmak üzere inflammatuar hücrelerin toplanmasına yol açan bir dizi olayı başlatmaktadır. Doku tarafından oluşturulan inflammatuar yanıt, bağışıklık hücrelerinin varlığı ve antimikrobiyal peptitlerin artması ile bağırsak, lümen ortamını değiştirmektedir. Bu durum da bağırsaktaki mikrobiyotanın azalıp, tükenmesine neden olmaktadır. Sonuç itibarıyla oluşan iltihaplı dokular, *S. typhimurium* popülasyonunun çoğalmasını destekleyen besinler ve elektron alıcıları sağlamaktadır [93].

İnsanlarda meydana gelen *Salmonella* enfeksiyonu tedavi olmaksızın 5-7 gün içinde iyileşmektedir. Bazı durumlarda ise yetişkinler için siprofloksasin antibiyotiğı ile çocuklar için de seftriakzon antibiyotiğinin kullanıldığı antimikrobiyal tedavi gerekmektedir. Bununla birlikte tedavi, patojenin antibiyotik direnci nedeniyle zor olabilmektedir. *S. typhimurium* özellikle piperasilin, tetrasiklin, doksisisiklin, nalidiksik asit ve ampisilin antibiyotiklerine karşı direnç geliştirebilmektedir. İnsanlarda *S. typhimurium* suşlarındaki DT104 fajı çoklu ilaca direncine neden olmakla birlikte çoklu ilaca dirençli *S. typhimurium* enfeksiyonları birçok ülkede önemli ölçüde artmış bulunmaktadır [95].

### *Escherichia coli (E. coli)*

*E. coli*, basil formunda olan gram negatif bir bakteri türüdür. *E. coli*, doğumdan birkaç saat sonra bebeklerin gastrointestinal sistemine yerleşerek, burada fayda sağlayacak şekilde yaşamaktadır ancak bağışıklık sisteminin baskılandığı durumda bağırsak ve bağırsak dışı gelişen hastalıklara neden olmaktadır. İnsanlarda çeşitli hastalıklara neden olan *E. coli* patotipleri tanımlanmıştır. Bu *E. coli* patotiplerinin Enteropatojenik (EPEC), Enterohemorajik (EHEC), Enterotoksijenik (ETEC), Enteroinvazif (EIEC), Enteroagregatif (EAEC), Dağılarak-tutunan (DAEC) ve Tutunan-invazif (AIEC) olduğu bilinmektedir.

*E.coli* patotipleri konakçı hücrelerin fonksiyonlarının bozulmasına neden olan çok sayıda virülans faktörü kullanmaktadır. EPEC bebeklerde ishale, EHEC hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom hastalıklarına, ETEC ince bağırsakta enterotoksin salgılanması ve ishale, EIEC basilli dizanteriye; EAEC çocuklarda ishal ve büyüme geriliğine, DAEC idrar yolu enfeksiyonları, gebelik komplikasyonlarına ve AIEC inflamatuvar hastalıklara neden olmaktadır [96].

Gram negatif bakteriler arasında kan dolaşımı enfeksiyonu ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olduğu bilinen bakteri türü *E. coli*'dir. Ayrıca *E. coli* kadınların genital sisteminde en sık bulunan enterik Gram negatif basildir ve yenidoğan sepsisi ile endoservikal kolonizasyonun yanı sıra hamile kadınlarda intra-amniyotik enfeksiyonlara da neden olmaktadır. *E. coli*'nin ampisilin gibi uzun süre kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı antimikrobiyal direnç geliştirdiği bilinmektedir. Bununla birlikte son yirmi yılda, florokinolonlar ve geniş spektrumlu sefalosporin antibiyotiklerine karşı çoklu ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında ve yayılmasında artış gözlemlenmektedir. *E. coli*'de antimikrobiyal direncin oluşması genellikle tür içi ve türler arası DNA değişimi ile gerçekleşmektedir. Plazmidlerde bulunan genlerin yatay transferi, dirence neden olan yaygın bir mekanizmadır. Plazmidler, genomda hücre içi hareketliliğin sağlanması, farklı bakteri hücreleri arasındaki genlerin harekete geçirilmesi ve yeniden düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. *E. coli*'de geniş spektrumlu beta-laktamaz genleri taşıyan IncFII, IncN ve IncI1 salgın direnç plazmidleri olarak kabul edilmektedir ve belirli direnç genlerinin yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır [97].

#### *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*

*P. aeruginosa*, immün sistemi baskılanan bireylerde ölümcül enfeksiyonlara neden olan gram negatif bir bakteridir. *P. aeruginosa* 2017 yılında, yaşamı tehdit eden en önemli bakterilerden biri olarak kabul edilmiştir ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi için öncelikli patojen olarak listelenmiştir. Ayrıca bu bakteri türü hastane enfeksiyonlarına da yol açmaktadır [98]. Çok yönlü fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*, hem akut hem de kronik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Özellikle çok sayıda virülans faktörüne sahip olmasından dolayı kistik fibrozlu (KF) hastalarda kronik enfeksiyon oluşturan baskın bir patojendir [99].

*P. aeruginosa*, sarı yeşil (pyoverdine) ve mavi-yeşil (piyosiyanin) gibi suda çözünen floresan pigmentlerini üretmektedir [100]. Bununla birlikte *P. aeruginosa*, hücre hücre iletişimi ve çevresel değişikliklere uyumu sağlayan bir mekanizmaya da (*quorum sensing*) sahiptir [98, 99].

Antibiyotikler gibi yaygın antimikrobiyal ajanlar, *P. aeruginosa* üzerinde yüksek antibiyotik direnci nedeniyle sınırlı etkinlik göstermektedir. Enfeksiyonların tedavisi, bu bakteriyi çevresel streslerden koruyan, fagositozunu engelleyen ve böylece kolonizasyon ile uzun süreli kalıcılık kapasitesi kazandıran biyofilm oluşturma yeteneği tarafından engellenmektedir [98]. Biyofilm oluşumu, bağışıklık sistemi baskılanan hastalarda çoklu ilaca dirençli enfeksiyonlara yol açarak büyük bir tehdit ve sağlık sorunu oluşturmaktadır. *P. aeruginosa* özellikle hastane kaynaklı, Ventilatör İlişkili Pnömoni (VAP), akciğer enfeksiyonları ve Kateter İlişkili İdrar Yolu Enfeksiyonlarında (CAUTI) biyofilm oluşturan en tehlikeli bakterilerden biridir. *P. aeruginosa*, pirolitik karbon kalp kapakçıkları, kalp pilleri, kontakt lensler, idrar kateterleri ve santral venöz kateterler gibi çeşitli tıbbi cihazlarda biyofilm geliştirebilmektedir. Ayrıca bu durum endoftalmit, dış kulak iltihabı, endokardit, menenjit, septisemi gibi ciddi kronik enfeksiyonlarına da yol açabilmektedir. *P. aeruginosa* biyofilm enfeksiyonu tehdidiyle mücadele etmek için antibiyotikler, fitokimyasallar, enzimler, metal şelatörler, antikorlar, faj terapisi, antimikrobiyal peptitler ve nanopartiküllerin kombinasyonunu içeren çeşitli stratejiler ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda nanoteknoloji alanında yapılan çalışmalar biyofilm oluşturan mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için en iyi yöntem olarak temsil edilmektedir [101].

### *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*)

*Enterobacteriaceae* familyasında yer alan *P. vulgaris*, fakültatif anaerobik, Gram-negatif çubuk şeklinde olan fırsatçı bir patojendir [102, 103]. *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* ve *Proteus penneri* olmak üzere insanlarda enfeksiyon oluşturan üç tür bulunmaktadır [102]. Toprak veya suda bulunan *Proteus* bakterileri genellikle dışkı sonucu oluşan kirli ortamlarda yaşamaktadır ve kirlenen su veya deniz ürünleri tüketildiğinde zehirlenme tehlikesi oluşturmaktadır. *Proteus* türleri bağışıklık sistemi zayıflayan kişilerde idrar yolu enfeksiyonları (sistit, prostatit, piyelonefrit, böbrek taşı oluşumu) yara ve yanık enfeksiyonları, apseler, solunum yolu enfeksiyonları, bakteriyemi, menenjit ve hastane

enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bununla birlikte bu bakteriler bağırsak mikroflorasının istenmeyen bir unsuru olarak kabul edilmekte ve ishale de yol açabilmektedir [103].

#### *Klebsiella pneumoniae* (K. pneumoniae)

*K. pneumoniae*, bakteriyemi, zatürre ve karaciğer apseleri dahil olmak üzere çeşitli bulaşıcı hastalıklara neden olan gram negatif fırsatçı patojen bakteri türüdür. *K. pneumoniae*, çevrede yaygın olarak bulunmakla birlikte hayvanlarda mukoza yüzeyinde, insanlarda ise gastrointestinal sistemde ve nazofarenkste yoğunlaşmaktadır. Bakteriler bu bölgelerden kan dolaşımına veya diğer dokulara girerek enfeksiyonlara yol açmaktadır. *K. pneumoniae* suşları fırsatçı, hipervirülant (hvKp) ve çoklu ilaca dirençli (MDR) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. hvKp enfeksiyonu genellikle birden fazla bölgede meydana gelmekte ve daha sonra yayılmaktadır. Bu durum da enfeksiyonların tedavi edilmesini ve kontrol edilmesini daha zor hale getirmektedir. hvKp diyabet, karaciğer apseleri, endoftalmit, menenjit ve gençlerde septik artrit enfeksiyonlarına yol açmaktadır [104].

*K. pneumoniae*'nin pili, kapsül, lipopolisakkarit (LPS) ve demir taşıyıcıları olmak üzere tanımlanan dört virülans faktörü bulunmaktadır. Ayrıca tip 1 ve tip 3 pili adı verilen adhezinler ile epitel, bağışıklık hücreleri ve abiyotik yüzeylere tutunmaktadır. *K. pneumoniae* biyofilmi ise kateter ve dahili cihazların iç yüzeyinde oluşabilmektedir. Bu biyofilmler solunum, gastrointestinal, idrar yollarında kolonizasyona ve ayrıca invaziv enfeksiyonların gelişmesine yol açmaktadır. Bununla birlikte *K. pneumoniae*'nin aminoglikozit,  $\beta$ -laktam, polimiksin ve tigesiklin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu gösterilmiştir [104].

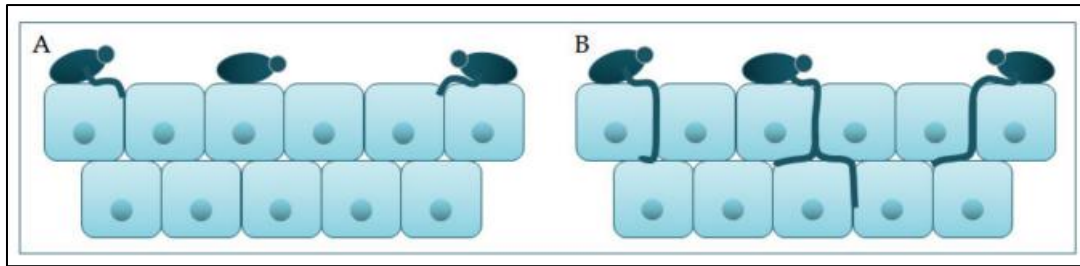
#### **2.5.2. Patojen maya türleri**

##### *Candida albicans*

*Candida* türleri en yaygın insan fungal patojenler arasında olmakla birlikte hem yüzeysel (mukozal ve kutanöz) hem de sistemik enfeksiyondan sorumludur. Nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının da yaklaşık %8'i *Candida* türlerinden kaynaklanmaktadır [57]. Bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda *Candida* türlerine bağlı sistemik fungal enfeksiyonlarının yüksek insidans/prevalans oranları, morbidite ve mortaliteyi büyük ölçüde

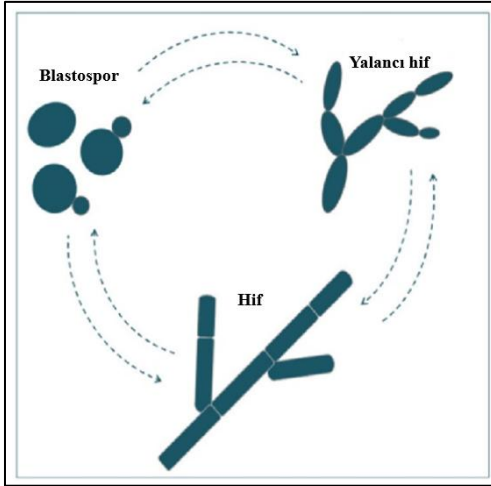
artırmaktadır. “Kandidiyaz” olarak bilinen *Candida* türleri ile ilişkili fungal enfeksiyonlar, deri, tırnaklar, ağız, deri, üreme organları ve gastrointestinal sistem gibi mukozal yüzeyleri etkilemektedir. Bununla birlikte kan dolaşımına da girebilmekte (kandidemi) gözler, kalp, beyin, böbrekler de dahil olmak üzere vücudun diğer bölgelerine yayılarak tedavisi zor, invazif kandidiyaza neden olabilmektedir.

*C. albicans* mayasının çoğalması, konakçının bağışıklık sistemi tarafından kontrol edilmektedir. *C. albicans* insan mukozasında kommensal mikroflora durumunda, asemptomatik olarak kolonize olmaktadır. Konakçının bağışıklık sisteminin zayıfladığı durumda patojenik hale gelerek çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle fungal enfeksiyonlar, enfeksiyona neden olan maya ile konakçının immünolojik durumu arasındaki dengeye bağlı durumdadır [105]. Konakçı hücrelere yapışma ve istila etmeye aracılık eden moleküller (adhezin ve invasinler), hidrolitik enzimlerin salgılanması, maya ve hif formları arasındaki morfolojik geçiş, temas algılama ve tigmotropizm (yönlü hif büyümesi), biyofilm oluşumu, fenotipik değişim gibi özellikler fungusun patojenik potansiyelini artıran virülans faktörleridir. Bu virülans faktörleri ile fungal patojen konağı enfekte etmektedir (Şekil 2.16) [106, 107]. Bununla birlikte çevresel şartlardaki değişimlere hızlı bir şekilde uyum sağlama (pH), metabolik esneklik, güçlü besin toplama sistemleri ve stres tepki mekanizmaları bu patojenlerin hayatta kalmasını sağlayan önemli faktörlerdir [106].



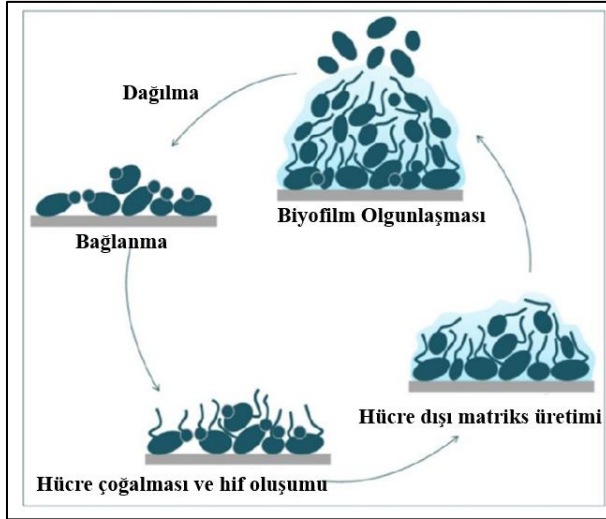
Şekil 2.16. *C. albicans*'ın tutunma ve kolonizasyonu (A), penetrasyonu ve istilasını (B) [107]

*C. albicans* enfeksiyon sürecinde, blastospordan yalancı hife ve hife morfolojik değişimler geçirmektedir. Blastosporlar tomurcuklanarak eşeysiz olarak bölünmektedir. Bu işlem sırasında blastosporun yüzeyinde yeni hücreler oluşmaktadır. Yeni oluşan tomurcuk, seçilen küçük bir blastospordan büyümektedir. Büyüme evresi sona erdikten sonra hücreler bölünmektedir ve yavru hücre ana hücreden bir ara bölme oluşturarak ayrılmaktadır (Şekil 2.17) [107].



Şekil 2.17. *Candida albicans*'ın enfeksiyon sürecindeki morfolojik değişimleri [107]

Biyofilm oluşumu *C. albicans*'ın patogenezinin bir özelliğidir [107]. Biyofilm, koruyucu bir hücre dışı matris ile birbirine kenetlenen, biyotik veya abiyotik bir yüzeye bağlanan yapılandırılmış bir mikrobiyal topluluk olarak tanımlanmaktadır. Biyofilmler, tedaviye dirençli mikroorganizmaların bulundukları dokuyu istila ederek aynı anda yeni enfeksiyon bölgeleri oluşturabileceği güvenli bir alan sağlayarak enfeksiyonları başlatabilmektedir. Ayrıca implante edilen tıbbi cihazların arızalanmasına da yol açabilmektedir. *Candida* biyofilmlerinin oluşumu canlı yüzeyler (mukoza zarları, organlar, kan damarları) ve çoğunlukla hastaların vücutlarıyla temas eden tıbbi cihazlarda (stentler, kalp pilleri, implantlar) gözlemlenmiştir. Biyofilm tek bir tür veya karışık bakteri ve maya kültürü tarafından oluşabilmektedir. Dünya çapında biyofilm oluşturan mantar patojenlerinin neden olduğu enfeksiyonların sayısı oldukça yüksektir ve ölümlerin büyük bir kısmı tıbbi açıdan önemli *Candida* türlerinin neden olduğu kandidemiden kaynaklanmaktadır. Klinik açıdan önemli olan türler arasında *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. auris* yer almaktadır. Bu patojen türlerin biyofilm oluşturma ciddi bir tedavi sorunudur. Biyofilm oluşturacak şekilde gelişen *Candida* hücreleri, koruyucu mekanizmaları ve vücudun diğer bölgelerine yayılma kabiliyetleri sonucunda tedaviye direnebilmektedir. Bu nedenle kalıcı enfeksiyon kaynağı açısından bir tehdit oluşturmaktadır [108]. *C. albicans* hücrelerinin biyofilm oluşturmalarının ilk evresi çoğalma ve hif oluşumu ile gerçekleşmektedir. Ardından hücre dışı matris üretimi meydana gelmektedir. Son olarak da maya hücreleri bir bölgeye dağılarak yeni bir biyofilm oluşturmaktadır (Şekil 2.18) [107].



Şekil 2.18. *C. albicans* biyofilm oluşumunun aşamaları [107]

### *Candida tropicalis*

*C. albicans*'tan sonra ikinci en tehlikeli *Candida* türü olarak kabul edilmektedir. *C. tropicalis* güçlü bir biyofilm oluşturma, epitel ve endotel hücrelere bağlanma, tomurcuk durumundan hif yapısına geçiş, proteinazlar, fosfolipazlar ve hemolizinler gibi litik enzimlerin salgılanması olmak üzere geniş çapta virülans faktörleri üretmektedir. Tüm bu özelliklerinin dışında, *C. tropicalis* ozmotolerant bir mikroorganizma olarak kabul edilmiştir ve yüksek tuz konsantrasyonunda hayatta kalabilmektedir. *C. tropicalis* sağlıklı insan mikrobiyotasının deri, gastrointestinal, genitoüriner ve solunum yollarında bulunmaktadır. Bununla birlikte özellikle nötropenik hastalarda veya antimikrobiyal ilaç kullanımı nedeniyle mikrobiyotası bozulan, mide-bağırsak mukozası hasarlı olan bireylerde sistemik enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. *C. tropicalis*'in solunum yolu enfeksiyonlarının ajanı olarak, kistik fibrozis hastalarında da *C. albicans*'tan sonra en sık görülen maya türü olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde başka bir çalışmada, *Mycobacterium tuberculosis* ile pulmoner koenfeksiyon vakalarında *C. tropicalis*'in en yaygın ikinci *Candida* türü olduğu bildirilmektedir [109].

### *Candida krusei*

*C. krusei* bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda artrit, endokardit, fungemi, endoftalmi hastalıklarına neden olan patojendir [110]. *C. krusei* diğer *Candida* türleri gibi, konakçı makromoleküllerini parçalayabilen, besin alımını sağlayan, bağışıklık efektörlerini bozabilen ve konakçı dokusu içinde yayılmaya neden olan hidrolitik enzimler

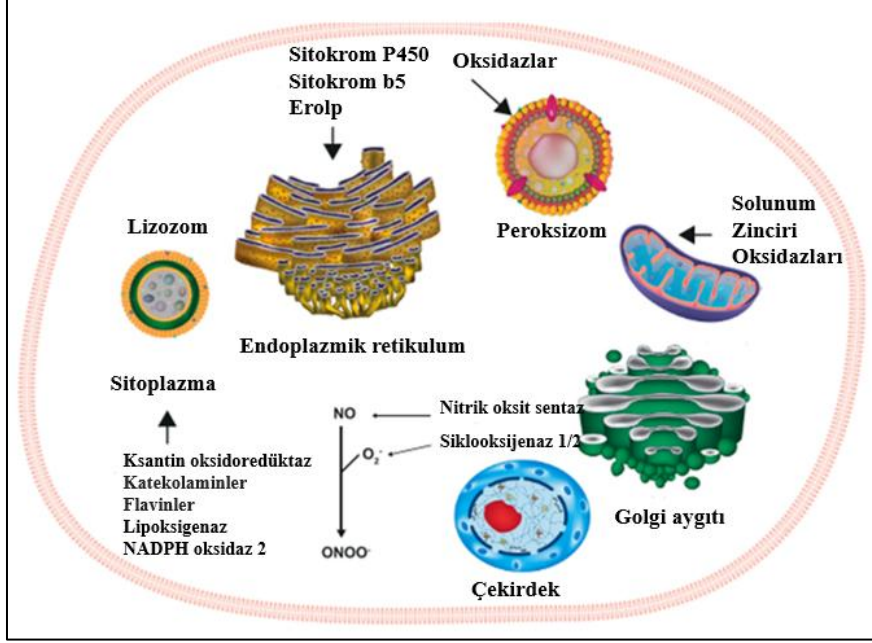
salgılayabilmektedir [111]. Fungal enfeksiyonları tedavi etmek için flukonazol ilacının yaygın kullanılmasıyla bu antifungal maddeye karşı direnç gelişmekte ve *C. krusei* enfeksiyonları ortaya çıkmaktadır. *C. krusei* virülansını artıracak bir özellik olan psödohif (yalancı hif) oluşturabilmektedir. Fare makrofajları üzerinde yapılan bir çalışmada *C. krusei*'nin makrofajlardan kaçarak organizmada yayılabildiği ve makrofajları kendi replikasyonu için kullanabildiği gösterilmiştir [110].

## 2.6. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, hücrelerdeki metabolik reaksiyonlar sırasında üretilen, elektron açısından zengin gruplara sahip reaktif moleküllerdir ve insan vücudunda birçok fizyolojik veya patolojik durumda ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller hücre zarı, proteinler, yağlar, enzimler ve DNA gibi hücresel yapılara zarar vermekte ve genellikle hücre ölümüne neden olmaktadır. Serbest radikallerdeki redoks sisteminin değişmesi, DNA hasarının oluşumuna ve pro-karsinojenlerin aktivasyonu ile kansere yol açmaktadır. İnsanlarda, serbest radikallerin aşırı üretiminin kanser de dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalıklara neden olduğu gösterilmiştir [9].

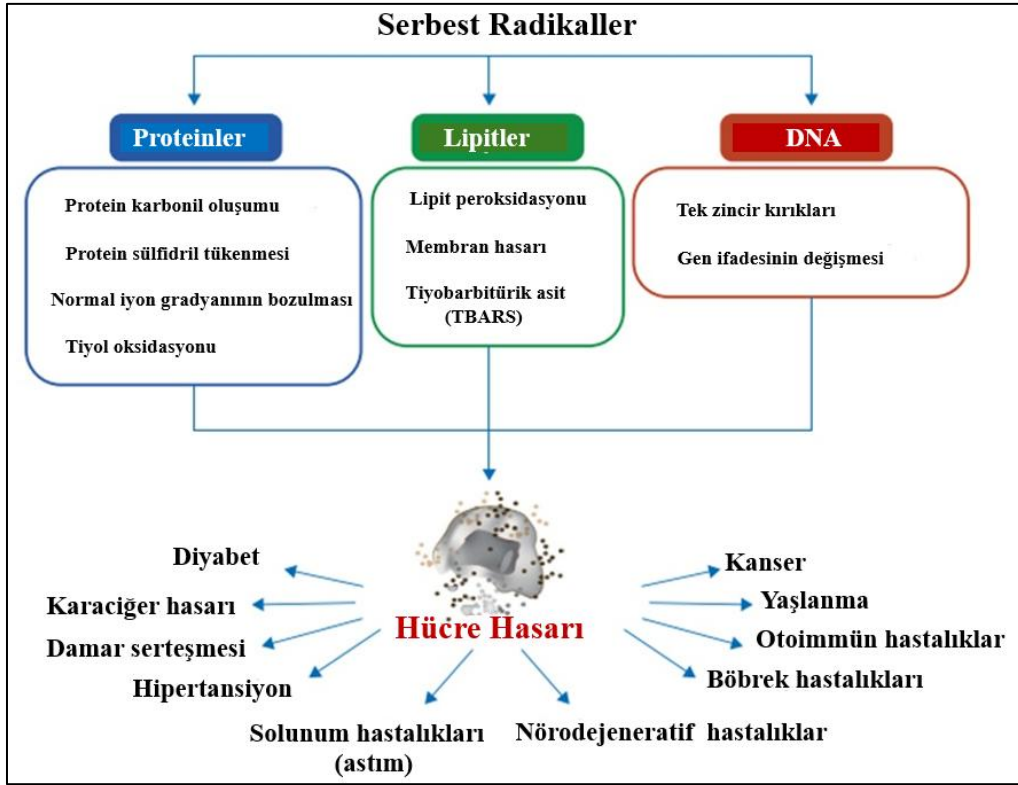
Oksijen, karbon, azot ve kükürt merkezli olmak üzere dört çeşit radikal türü bulunmaktadır. Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerdeki en yaygın serbest radikallerdir. Oksijenin varlığı aerobik organizmaların hayatta kalmasını belirlemektedir. Biyolojik sistemlerde oksijen merkezli radikallerin önemi nedeniyle serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak da adlandırılmaktadır [112]. ROS, normal hücre metabolizmasının ikincil ürünüdür. Oksidatif stres ise, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ile oksidanların lehine sonuçlanan bir durumdur. Bu durum redoks sinyalizasyonunun bozulmasına ve moleküler hasara neden olmaktadır [113]. İnflamasyon, fagositoz, egzersiz ve iskemi/reperfüzyon hasarı, serbest metal iyonları, solunum patlaması (oksidatif patlama), sigara dumanı, endüstriyel çözücüler, çevre kirleticileri ve UV ışınları ROS gelişimine neden olan ekzojen kaynaklardır. ROS, DNA'ya zarar veren ve hücre hasarına neden olan birçok molekülü içermektedir [8]. Canlı organizmalarda üretilen dört tip serbest radikalden reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türlerinin (RNS) önemli rolleri bulunmaktadır. Mitokondri, normal fizyolojik süreçler sırasında hücre içi ROS'un yaklaşık %90'ını üretmektedir. ROS ve RNS, lizozomlar, peroksizomlar, sitozol, endoplazmik retikulum ve

çekirdekteki oksidatif metabolizma tarafından üretilmektedir. Hücredeki reaktif oksijen türlerinin kaynakları Şekil 2.19’da gösterilmiştir [112].



Şekil 2.19. Hücredeki ROS kaynakları [112]

ROS'un konsantrasyona bağlı olarak hem olumlu hem de olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir [112]. ROS, yüksek konsantrasyonda biyolojik sisteme zararlı, daha az ve orta düzeydeki konsantrasyonlarda ise fizyolojik süreçleri kontrol etmekte ve enfeksiyona karşı korumayı sağlamaktadır. Bununla birlikte ROS, hücresel homeostaz, sinyal iletimi, embriyonik gelişim, kan basıncı kontrolü ve çeşitli biyolojik durumlar için gereklidir [8, 112]. Özellikle antikanser tedavisinde, ROS'un etkili olduğu sinyal iletim yollarını kontrol etmek için yöntemler geliştirilmektedir [112]. Serbest radikallerden olan  $H_2O_2$  molekülü de hücresel farklılaşma, göç ve çoğalmada görevlidir [8]. Hücre içinde fazla miktarda ROS birikimi ise DNA, protein, lipid gibi hücresel bileşenlere zarar vermektedir [8, 112]. ROS çift sarmallı DNA'daki azotlu bazları parçalayarak ve proteinlerle çapraz bağ yaparak DNA yapısını değiştirmektedir. DNA'da meydana gelen bu değişiklik yaşlanmaya, karsinogenez, nörodejeneratif, otoimmün, kardiyovasküler ve diğer hastalıklara yol açmaktadır (Şekil 2.20) [8, 112]. Örneğin, 8-OH-G oksidatif stres yoluyla takip edilen DNA modifikasyonudur ve kanserojeniz için kullanılan bir belirteçtir [8].



Şekil 2.20. Serbest radikallerin hücredeki patofizyolojik değişikliklere yol açan mekanizmaları [112]

## 2.7. Antioksidanlar

Hücre içindeki oksidasyonu engelleyebilen bileşikler antioksidan olarak adlandırılmaktadır. Biyomoleküllerin oksidasyonu vücutta zincirleme reaksiyonları uyaran ve hücre hasarına neden olabilen serbest radikaller üretmesi nedeniyle antioksidanların sağlık açısından çok birçok faydası bulunmaktadır. Antioksidanlar elektronlarını serbest radikallere aktararak hücreleri serbest radikallerin verdiği hasardan korumaktadır. Ayrıca antioksidanlar serbest radikalleri temizleyerek oluşabilecek hasarları en aza indirebilmektedir. Vücutta yeterli antioksidan molekül olmadığında serbest radikal/antioksidan dengesi bozulmakta ve oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres, kanser, diyabet, nörolojik, kardiyovasküler ve bağışıklık sistemi hastalıkları olmak üzere birçok sağlık sorununa neden olmaktadır. Bu nedenle antioksidanların vücuttaki koruyucu rolleri ve oksidatif stres kaynaklı patolojik süreçlere karşı olan ilgi giderek artmaktadır. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin (ROS) indüklenen oksidatif stres yoluyla karsinogenezi tetiklemesinden dolayı serbest radikallerin antioksidanlar aracılığıyla nötralize edilmesi gerekmektedir [9]. Bu dengeyi sağlamak için de antioksidanların gıdalar veya gıda takviyeleri yoluyla alınması önemli olmaktadır [114].

Antioksidanlar, yaşlanma, kanser, diyabet, iltihaplanma, katarakt, nefrotoksisite, nörodejeneratif bozukluklar, karaciğer ve kardiyovasküler hastalıkların oluşumunu azaltmaktadır. Doğal veya sentetik çok sayıda antioksidan bulunmaktadır. Antioksidanlar endojen ve ekzojen şekilde olabilmektedir. Endojen antioksidanlar ise enzimatik veya enzimatik olmayan yapıda bulunabilmektedir [8].

## 2.8. Kanser ve Etkenleri

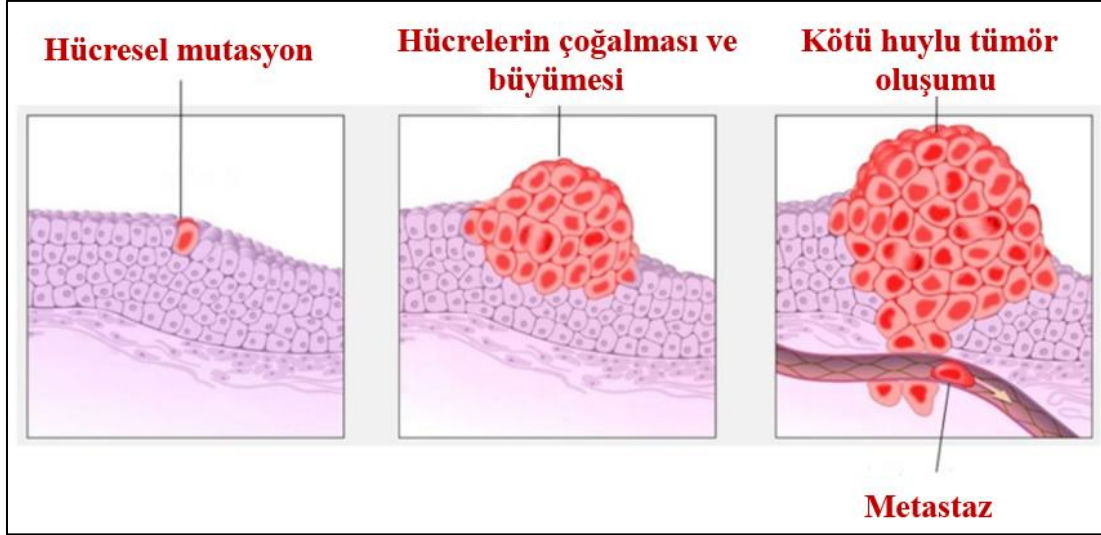
Tespit ve tedavi alanındaki ilerlemelere rağmen kanser küresel çapta önemli bir halk sağlığı sorunudur. 2020 yılında, dünya genelinde kanserden ölen 10 milyon hasta olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte meme, akciğer ve kolorektal kanser görülme sıklığı olarak en fazla artış beklenen kanser türleri arasında yer almaktadır [115].

Kanser, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki bozulmalar sonucu meydana gelen bir hastalık olduğu için bu hastalığın moleküler ve hücresel düzeyde incelenmesi gerekmektedir. Kansere yol açan maddeler karsinojen olarak adlandırılmaktadır [43]. Genetik yatkınlık, beslenme bozuklukları, çevresel toksik maddeler, ultraviyole (UV) radyasyonu, enfeksiyon ajanları gibi birçok faktör karsinogenezi başlatabilmektedir [116].

Hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı çok hücreli organizmaların gereksinimlerine göre düzenlenmektedir. Kanser hücrelerinde bu olayları düzenleyen mekanizmaların işlevi bozulmaktadır. Özellikle sinyal iletimi, hücre döngüsü ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde görev alan proteinlerin çoğu, hücrenin kontrolsüz çoğalmasına yol açacak şekilde anormal aktivite göstermektedir. Kontrolsüz bölünme ve çoğalmanın sonucunda oluşan tümör vücudun diğer bölgelerine yayılarak sağlıklı doku ve organların işlevini etkilemektedir. Kanserlerin çoğu karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadır. İnsanlarda oluşan kanserlerin %90'ını epitel hücrelerden kaynaklanan karsinomlar; %8'ini kan veya immün sistem hücrelerinden gelişen lenfomalar ve daha az oranda kas, kemik, kıkırdak, fibröz ve bağ dokularından gelişen tümörleri oluşturmaktadır [43].

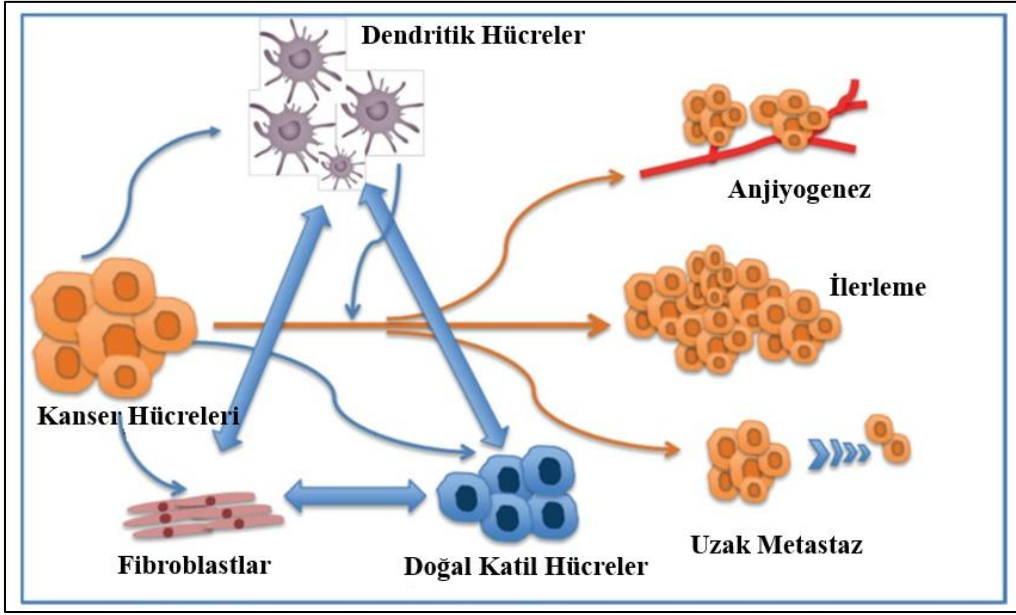
Kanser tedavisinde, iyi huylu ve kötü huylu tümörleri birbirinden ayırt edebilmek önemlidir. İyi huylu tümörler, çevredeki normal dokuya veya vücudun diğer bölgelerine yayılmayacak şekilde bulunmaktadır [43]. Kötü huylu tümörler ise, sağlıklı dokulara ve lenfatik sistem

yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılarak metastaza neden olmaktadır (Şekil 2.21) [43, 117]. Metastaz, değişime uğrayan bir hücrenin çoğalan bir hücre topluluğu oluşturmasıyla başlamaktadır. Bu şekilde primer tümör oluşturan hücreler daha sonra primer tümörden ayrılarak vücudun diğer bölgelerinde ikincil tümörler oluşturmaktadır [43].



Şekil 2.21. Kanser hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişim [117]

Tümör mikroçevresi, kan damarları, fibroblastlar, bağışıklık sistemi hücreleri, kemik iliğinden türetilen inflamatuvar hücreler, lenfositler, sinyal iletimi ve hücre dışı matrisi içeren hücresel bir ortamdır. Tümörler, hücre dışı sinyaller yayarak bu mikroçevreyle etkileşime girme, tümör anjiyogenezini destekleme ve periferik bağışıklık toleransını indükleme durumlarını gerçekleştirebilmektedir. Mikroçevredeki bağışıklık hücreleri, kanserli hücrelerin büyümesini ve evrimini etkileyebilmektedir. Tümör mikroçevreleri, kanserin ilerlemesini ve kanser tedavisine karşı gelişen ilaç direncini incelemeye temel faktörler olarak kabul edilmektedir. Şekil 2.22 kanser hücrelerinin ilerlemesine, invazyonuna ve metastazına katkıda bulunan tümör mikroçevresini göstermektedir [118].



Şekil 2.22. Tümör mikroçevresi [118]

Protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki genel gen sınıfı, kanser hücrelerinde mutasyona uğramaktadır [119].

#### Protoonkogenler ve Onkogenler

Protoonkogenler, kodladıkları transkripsiyon faktörleri ile diğer genlerin ifadelerini, hücre bölünmesini uyaran sinyal iletim moleküllerini ve hücre döngüsü düzenleyicilerini uyaran gen sınıfıdır. Siklinler, c-myc, c-kit, Ras, RAR $\alpha$ , E6 genleri iyi bilinen protoonkogenlerdir. Onkogenler, protoonkogenlerin mutasyona uğraması veya hatalı ifade edilmesi sonucunda kanser gelişimine neden olan genlerdir [119].

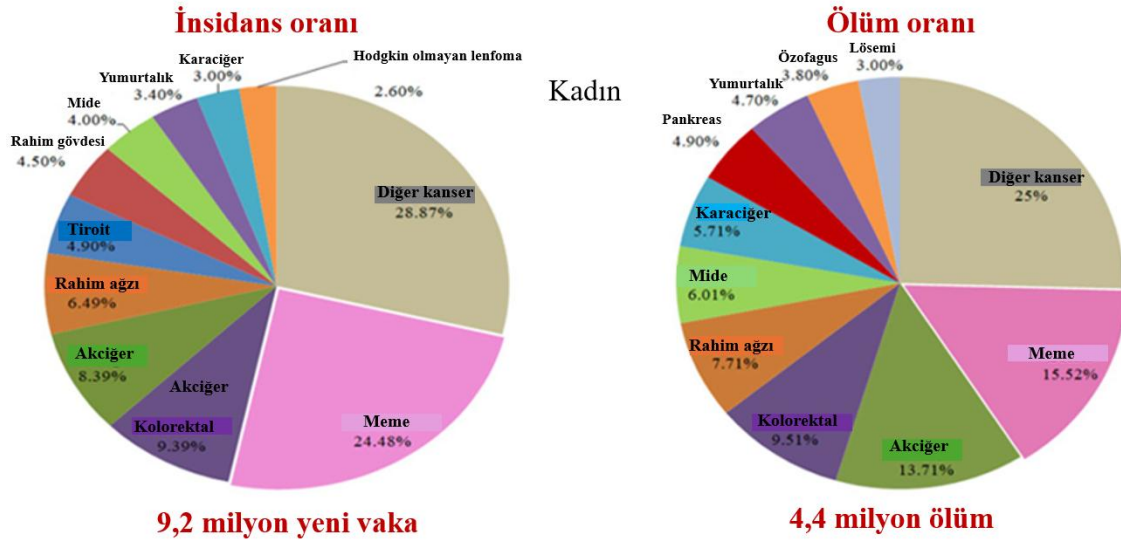
#### Tümör baskılayıcı genler

Hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen ve apoptoz sürecini başlatan genlerdir. RB1, APC, p53, BRCA1 ve BRCA2 genleri iyi bilinen tümör baskılayıcı genlerdir. Sağlıklı hücrelerde tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinler, DNA hasarına bağlı olarak hücre döngüsü sürecini durdurmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğradığı durumda hücreler, hücre döngüsü kontrol noktalarına cevap verme veya DNA hasarı arttığında apoptoz sürecini yönetme yeteneğini kaybetmektedir. Bu durum da daha fazla mutasyonun oluşmasına ve kanserin gelişimine neden olmaktadır [119].

### 2.8.1. Meme kanseri

Her yıl dünya çapında 2,1 milyondan fazla yeni tanı ile kadınlar için küresel bir sorun olan meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü, 2020 yılında 2,3 milyon kadının meme kanserine yakalandığını ve 68.500 kadının bu nedenle öldüğünü bildirmektedir [117]. Kadınlar arasında 2020 yılında en yaygın görülen ilk on kanser türüne ait vaka ve ölüm dağılımı Şekil 2.23’de gösterilmiştir [117].

Meme kanserinden iyileşen hastaların çoğunda hastalık ciddi bir şekilde tekrar edebilmektedir. Bu durum meme kanseri tümörlerinin oldukça heterojen ve hedeflenmesi zor olmasıyla açıklanmaktadır [120]. Vakaların %85’lik kısmı meme kanallarındaki epitel hücrelerinden, %15’lik kısmı ise meme bezi dokusunun lobüllerinden kaynaklanmaktadır. Hastalığın başlangıcında kötü huylu lezyon, kanal veya lobüle yerleşmektedir. Lezyon yerleştiği yerde hiçbir belirtiye neden olmamaktadır ve yayılma riski de düşüktür ancak tedavi edilmezse komşu lenf düğümlerine ve sonunda vücuttaki diğer organlara yayılmaktadır. Meme kanserinin bu şekildeki metastazı kadınlar arasında birincil ölüm nedenidir [117]. Meme kanseri için risk faktörleri üreme ve üreme dışı faktörler olarak sınıflandırılmaktadır. Başlıca üreme faktörleri arasında yaş durumu, yumurtalık aktivitesi, gebelik ve menopoz yaşı, emzirme süresi, nulliparite, ailede meme kanseri öyküsü ve genetik durum bulunmaktadır. Üreme dışı risk faktörlerinde ise obezite, fazla şeker tüketimi, yaşam tarzı, menopoz sonrası dönemde aşırı kilo almak, alkol alımı ve sigara kullanımı bulunmaktadır [120].



Şekil 2.23. Kadınlar arasında 2020 yılında en yaygın görülen ilk on kanser türüne ait vaka ve ölüm dağılımı [117]

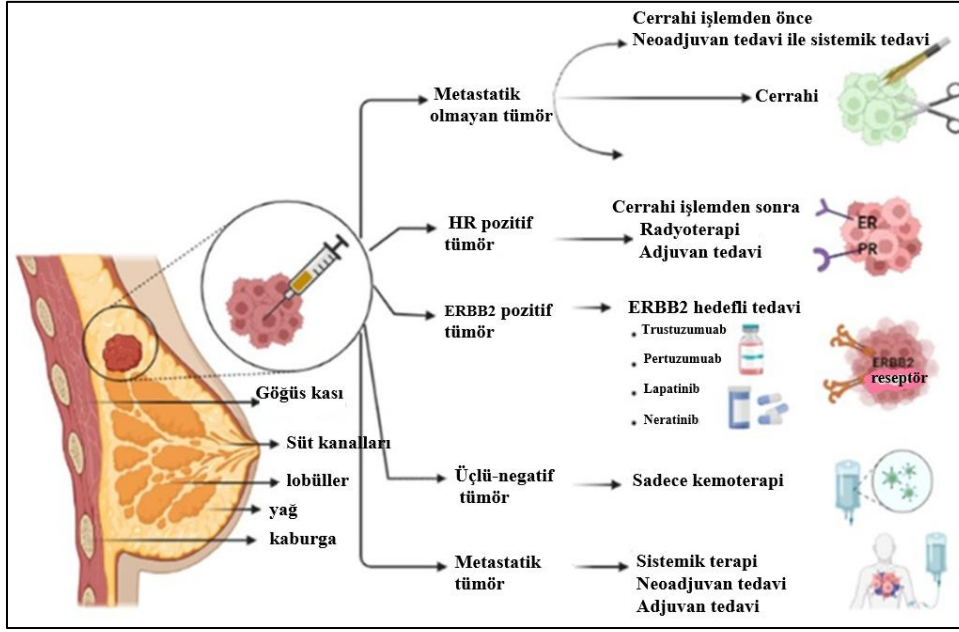
Proteinler, nükleik asitler, ribonükleik asitler ve metabolitler, kanser göstergesi olarak kullanılan biyomoleküllerdir [117, 121]. Klinisyenler, bu biyobelirteçleri analiz ederek hastalığın tedavisi ile ilgili daha iyi kararlar alabilmektedir [117]. Sirküler RNAlar hepatosit karsinomu hastalarında kullanılan tanı belirteçleridir. Uzun kodlamayan RNAlar (lncRNA), mide kanserinde tanı belirteçleri olarak kabul edilmektedir [121]. Ayrıca Östrojen Reseptörü (ER), Progesteron Reseptörü (PR) ve İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (HER2) genlerinin ifadesi meme kanserinin tanısında kullanılan biyobelirteçlerdir. Bu biyobelirteçler, tümör oluşumu sonucu kan, idrar veya doku örneklerinden tanımlanabilmektedir [117]. Meme kanserinin en önemli bir diğer genetik belirteçleri, ailesel nedenle meydana gelen BRCA1 ve BRCA2 meme kanseri mutasyon genleri olarak tanımlanmaktadır [120, 122]. BRCA1 ve BRCA2 genleri kanser hücrelerinin büyümesini düzenlemedeki rolleri nedeniyle tümör baskılayıcılar olarak da bilinmektedir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar genlerin, kanser gelişimini düzenleme yeteneklerini kaybetmesine neden olmaktadır [122]. BRCA1 ve BRCA2 genleri %40-%80 oranında meme ve yumurtalık kanseri olan hastaları tespit etmede kullanılan en güçlü araçlardır [120, 122].

Hastalığın seyrine göre meme kanseri dört alt gruba ayrılmaktadır:

1. Luminal A: Östrojen (ER+) ve progesteron (PR+) hormon reseptörü pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2-) negatif tümörlerdir. Bu grup meme kanserinin en yaygın türüdür ve hormonoterapi en sık kullanılan tedavi yaklaşımıdır. Tedavide kullanılan ilaçlar, östrojen engelleyici olarak kullanılan tamoksifen ve yumurtalıktan hormon üretimini engelleyen letrozol, anastrozol ve eksemestan gibi aromataz inhibitörleridir.
2. Luminal B (ER+, HER2+, PR-): Östrojen hormon reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 pozitif, progesteron hormon reseptörü negatif tümörlerdir.
3. (HER2+, ER-, PR-): Sadece insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 pozitif, östrojen ve progesteron hormon reseptörü negatif tümörlerdir. Anti-HER2 monoklonal antikor ve kemoterapi tedavi olarak uygulanmaktadır.
4. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) (ER-, PR-, HER2-): Tedavisi diğer meme kanseri türlerine göre en zor olan gruptur. Kemoterapi ile birlikte Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörüne (VEGF) karşı geliştirilen, monoklonal antikor olan bevacizumab ilacı uygulanmaktadır [123, 124].

### 2.8.2. Meme kanseri tedavisinde kullanılan farklı yöntemler ve ilaçlar

Kanser için kullanılan tedavilerin yan etkileri ve ilaç direnci bulunmaktadır. Antikanser tedavilerde ilk amaç kanserli hücrelerin işlevini spesifik olarak inhibe ederek kanserli olmayan hücrelerin sağlıklı kalmasını sağlamaktır. Erken evrelerde tanı ve yeni tedaviler, beklenen kanser görülme sıklığında azalma sağlayabilmektedir. Meme kanseri tedavisinde konvansiyonel kemoterapi, hücreleri seçici olmayan bir şekilde hedef alarak hem sağlıklı hem de kanserli hücrelerin çoğalmasını engellemektedir. Bu nedenle tedavi sürecinde gastrointestinal sistemde bozulma, saç dökülmesi gibi önemli yan etkiler meydana gelmekte ve ilaç direnci gelişmektedir. Şekil 2.24 meme kanseri tedavisinde kullanılan farklı yöntemleri göstermektedir [120].



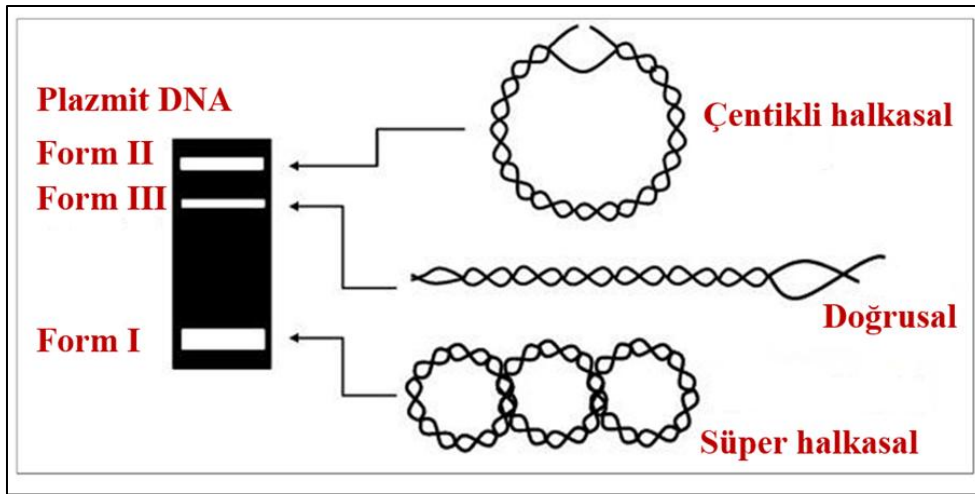
Şekil 2.24. Meme kanseri tedavisinde kullanılan farklı yöntemler [120]

## 2.9. DNA-İlaç Etkileşimi

DNA, hücrelerin büyümesi, farklılaşması, yaşlanması ve genetik bilginin taşınmasını sağlayarak yaşam sürecinde önemli bir rol oynamaktadır [125, 126]. Aynı zamanda transkripsiyon mekanizması ile enzimlerin ve proteinlerin biyolojik sentezine aracılık etmektedir. Kanser başta olmak üzere DNA kaynaklı çok sayıda hastalık bulunmaktadır. DNA kaynaklı hastalıkların meydana gelmesinde temel sebep hatalı DNA replikasyonu ile oluşan hücre bölünmeleridir. DNA'nın yapısal özelliklerini, gen mutasyonlarını ve bazı antitümör/antimikrobiyal ilaçların etki mekanizmalarını anlayarak yeni DNA hedefli ilaçları tasarlamak çok sayıda hastalığın tedavisine yardımcı olmaktadır [126]. Bununla birlikte DNA dizileriyle özel olarak etkileşime giren bu moleküllerin tasarımı, gen ifadesinin kontrol edilmesini sağlamaktadır [127].

Nükleik asitlerin organizmadaki rolünün anlaşılmasından bu yana bileşiklerin DNA ile etkileşimleri incelenmektedir [127]. İnorganik ve organik olmak üzere çok sayıda bileşik DNA'ya bağlanarak kompleks oluşturabilmektedir. Bu bileşiklerin arasında özellikle ilaçlar oldukça önemlidir [125]. Özgül DNA hedefli ilaç tasarlamak için ilaç etkisini moleküler düzeyde bilmek ve DNA-ilaç etkileşiminin araştırılması önemlidir. Kromotografik, elektrokimyasal ve spektroskopik yöntemlerle DNA-ilaç etkileşimleri incelenmektedir [126].

DNA'nın bileşiklerle etkileşimini değerlendirebilmede sıklıkla uygulanan tekniklerden biri de plazmit DNA'nın kullanıldığı, agaroz jel elektroforezi tekniğidir [128]. Birçok bakteride bulunan plazmit DNA halkasal DNA yapısındadır. Normal durumda süpersarmal şekilde bulunan plazmit DNA, ilaçlar veya başka bileşikler tarafından kesildiğinde, süpersarmal yapıda değişiklik meydana gelmekte ve plazmit DNA'nın farklı formları oluşmaktadır. Oluşan farklı konformasyonlarının agaroz jel elektroforezinde yürüme hızının farklı olması ile DNA-ilâç etkileşimi hakkında bilgi edinilebilmektedir. Plazmit DNA'nın jel elektroforezindeki farklı konformasyonlarının görüntüsü Şekil 2.25'de gösterilmiştir [129, 130]. Normal durumda plazmit DNA'nın Form I olarak gösterilen süpersarmal yapısı elektroforezde en uzağa geç etmektedir. Plazmit DNA'nın tek zincirinde kırılma meydana gelirse süpersarmal form, Form II olarak adlandırılan ve elektroforezde en yavaş şekilde hareket eden çentikli açık halkasal formun oluşmasını sağlamaktadır. Eğer iki zincirde kırılma meydana gelirse süper sarmal yapı, Form III olarak adlandırılan doğrusal form yapısına dönüşmektedir [9, 129-132].



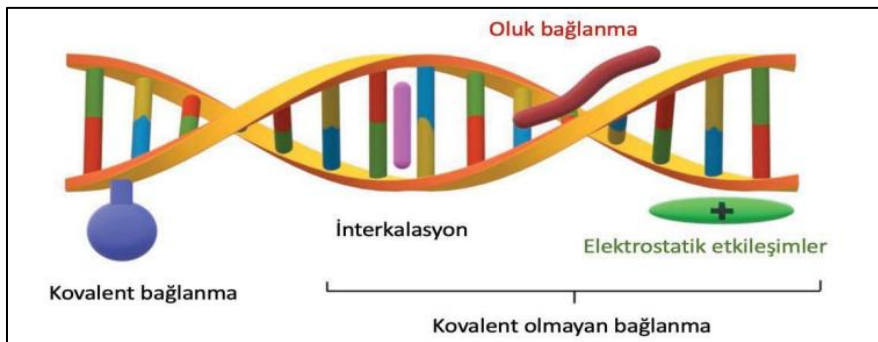
Şekil 2.25. Plazmit DNA'nın formları [129, 130]

Agaroz jel elektroforezi, topoizomeraz çalışmalarında da uygulanabilmektedir. Bu çalışmalarda Topoizomeraz I ve II ile muamele edilen süpersarmal plazmit DNA üzerinde farklı konsantrasyonlardaki bileşiklerin uygulanması durumunda oluşan konformasyonel değişiklikler hakkında bilgi edinilmektedir. Bileşiklerin uygulanmasının ardından jelde oluşan süpersarmal veya doğrusal formlar Topoizomeraz I ve II enzimlerinin bileşik tarafından inhibe edilebilme durumunun tespit edilmesini sağlamaktadır. Hücre sihirbazları olarak bilinen topoizomerazlar, DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon, onarım

ve kromatinin yeniden şekillendirilmesi gibi önemli hücresel süreçlerde temel rol oynayan enzimlerdir [13]. Topoizomeraz I ve II süper sarmal yapıdaki DNA'da tek ve çift sarmallı kırılmalara neden olan iki ana topoizomeraz türüdür [16]. Topoizomeraz I, DNA replikasyonu sırasında DNA zincirlerinden birinde bir çentik oluşturmaktadır ve süperheliks gerginliğinin serbest duruma gelmesini sağlayarak DNA'nın bükülme sayısını en aza indirmektedir. Böylelikle DNA'yı daha rahat bir forma dönüştürmektedir. Topoizomeraz I, hücresel işlevlerde oynadığı bu önemli rolleri nedeniyle, antikanser ilaç keşfi için önemli bir hedeftir. Topoizomeraz I inhibitörlerinin, DNA-topoizomeraz kesme (cleavage) komplekslerini biriktirerek DNA'yı birleştirme adımını engellediği ve böylece kesili halde kalan DNA ipliği oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerinde DNA Topoizomeraz I'in inhibisyonu, genom bütünlüğüne zarar vererek hücre ölümüne yol açmaktadır [13].

### 2.9.1. DNA- ilaç etkileşim mekanizmaları

Organik ve inorganik moleküllerin DNA'ya bağlanması, DNA'nın transkripsiyon ve replikasyon gibi katıldığı çok sayıda önemli biyolojik süreci etkileyebilmektedir. Küçük bir molekül DNA'ya bağlandığı zaman hücre büyümesini önleyebilir veya kontrolsüz hücre bölünmesi ve bazı proteinlerin aşırı üretilmesine yol açabilmektedir. Bu küçük moleküller DNA fonksiyonunu aktive veya inhibe ederek bir hastalığı tedavi etme veya kontrol etme şeklinde hareket ettiğinde ilaç olarak, aksi durumda ise, sitotoksik ajan olarak tanımlanmaktadır [125]. İlaçlar DNA molekülüyle kovalent ve kovalent olmayan şekilde etkileşime girmektedir (Şekil 2.26) [125, 127].



Şekil 2.26. DNA zinciri ve moleküller arasındaki bağlanma türleri [127]

### Kovalent bağlanma

DNA'daki kovalent bağlanma geri dönüşümsüz bir bağlanma şeklidir. DNA işlevinin tamamen engellenmesine ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Kovalent bağlanan ajanların en büyük avantajlarından biri yüksek bağlanma gücüdür. DNA omurgasının bozulmasına neden olarak transkripsiyonu ve replikasyonu etkilemektedir. DNA'ya kovalent bağlanma azotlu bazların yer değiştirmesi, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlanma ve azotlu bazların alkilasyonu ile olmaktadır. Cisplatin en iyi bilinen kovalent bağlanan antikanser ilacıdır. Bununla birlikte antitümör antibiyotik olarak kullanılan mitomisin C ve antramisin de kovalent bağlanan ilaçlardır. DNA'ya kovalent bağlanan bir diğer grup alkilleyici ajanlar olarak adlandırılmaktadır [125].

### *Alkilleyici ajanlar*

Alkilleyici ajanlar, sitotoksik DNA hasarına neden olan önemli bir grubu oluşturmaktadır. Çevrede bol miktarda bulunan alkilleyici ajanların başlıca kaynakları arasında hava, su, gıda bileşenleri ve kirleticiler (sigara dumanı ve yakıt ürünleri) bulunmaktadır. DNA tamir mekanizmaları ve hücresel sinyal yollarının çoğu, hücre ölümü veya oluşan mutasyona karşı savunmak için alkilasyon hasarına cevap vermektedir. Bu mekanizmaların düzgün bir şekilde aktivite dengesinin sürdürülebilmesi, organizmanın alkilasyon ajanlarına olumlu bir yanıt vermesi için çok önemlidir. Alkilasyon sonucunda DNA tamir mekanizmaları ve hücresel sinyal yollarının işlevinde meydana gelen bir bozulma toksik maddelerin birikmesine yol açmaktadır. Bu nedenle teratojenik, sitotoksik ve kanserojen etkileri olan alkilleyici ajanlar insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır [133].

Alkilleyici ajanlar, kimyasal etkileşimler yoluyla DNA ile kovalent bağlar oluşturmaktadır. Bu durum DNA'da yanlış eşleşme ve kesip çıkarma ile sonuçlanabilen hatalara neden olmaktadır. Bu hataların hücresel tepkisi, DNA sentezi ile çoğalmasının engellenmesi ve apoptozis oluşumudur. Alkilleyici ajanlar üç mekanizma yoluyla DNA ile etkileşime girebilmektedir. İlk mekanizma, alkil gruplarının DNA bazlarına bağlanmasıdır. Bu durum, DNA tamir enzimlerinin alkilenen bazları değiştirmesine ve DNA'nın parçalanmasına neden olmaktadır. DNA'daki atomlar arasında çapraz bağların oluşumu ise, ikinci mekanizmadır. Çift zincirli DNA ipliğinde meydana gelen çapraz bağlanma, replikasyon ve transkripsiyonun inhibisyonu ile birlikte hücre ölümüne yol açmaktadır.

Üçüncü etki mekanizma ise nükleotidlerin yanlış eşleşmesine neden olarak mutasyonların oluşumudur [134]. Alkilleyici ajanlar, kanser hastalarında kemoterapi ilaçları olarak da kullanılmaktadır [133]. Temozolomid, klorambusil ve nimustin gibi alkilleyici ilaçlar en yaygın antikanser ilaçlarıdır [125].

#### Kovalent olmayan bağlanma

İlaçların DNA'ya kovalent olmayan bağlanması tersine çevrilebilir bir mekanizmadır ve kovalent bağlanma ile karşılaştırıldığında daha az toksiktir. Kovalent olmayan DNA etkileşimli ajanlar, DNA zincirinde kırılma ve protein DNA etkileşimine müdahale etme gibi etkilere yol açmaktadır. İlaç molekülleri DNA'ya elektrostatik, van der Waals ve hidrojen bağları ile etkileşim sağlamaktadır. Kovalent olmayan DNA-ilaç bağlanması interkalasyon (araya girme), oluk bağlanma ve dış bağlanma olmak üzere üç ayrı grupta sınıflandırılmaktadır [125].

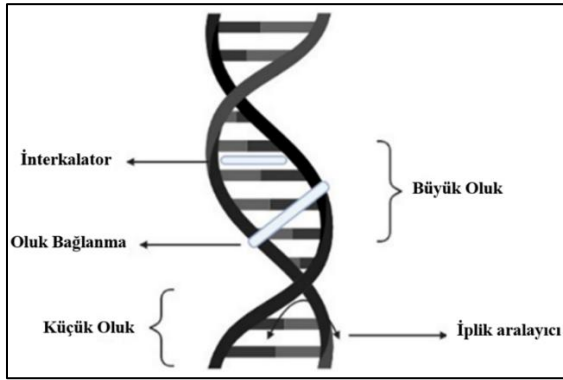
#### *İnterkalasyon*

İnterkalatörler, kovalent bağlar oluşturmada ve DNA bazları arasındaki hidrojen bağlarını koparmadan DNA omurgasına yerleşen moleküllerdir [125]. DNA'nın çift sarmal yapısıyla geri dönüşümlü olarak interkalasyon yapan bu ajanlar, baz çiftleriyle etkileşime girerek DNA'nın yapısını bozmaktadır ve böylece hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle interkalatörler kanser tedavisinde kullanılabilmektedir [135].

DNA'da interkalasyon yoluyla oluşan yapısal değişiklikler, polimerazlar, transkripsiyon faktörleri, DNA onarım sistemi ve özellikle topoizomerazların işlevinde bozulmaya yol açmaktadır [136]. DNA interkalatörleri, Topoizomeraz I ve II ile etkileşime girdiklerinde sitotoksikiteye neden olmaktadır. Topoizomeraz I tek zincirli bir kırılmaya, Topoizomeraz II ise her iki zincirde kırılmaya neden olmaktadır. DNA-Topoizomeraz kompleksi ile ilaçların interkalasyonu tümör baskılayıcı protein olan P53'ü aktive ederek apoptoza yol açmaktadır [135]. Etidyum bromür, akridinler, alkaloidler, antrasiklinler, antrasenedionlar, aril amino alkoller, kumarinler, fenantridinler, kinolinler ve kinoksalinler kullanılan interkalatör ajanlardır [135, 137].

### Oluk bağlanma

DNA üzerinde küçük ve büyük olmak üzere iki türlü oluk bağlanma bölgesi bulunmaktadır. DNA oluğuna bağlanan ilaçların çoğu hedef olarak küçük oluğu seçmektedir ve hilal şeklinde bağlanmaktadır [16]. İlaçlar, van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları ile DNA üzerindeki küçük oluk bölgesine bağlanmaktadır. Netropsin, berenil, distamisin ve mitramisin küçük oluğa bağlanan ilaçlardır [125]. Oluk bağlama, DNA'da konformasyonel değişikliklere neden olmamaktadır. Bununla birlikte oluğa bağlanan moleküllerin de antikanser ve antibakteriyel etkileri bulunmaktadır [16]. DNA'da oluşan oluk bağlama ve interkalasyon türleri Şekil 2.27'de gösterilmiştir [135].



Şekil 2.27. DNA'daki oluk bağlama ve interkalasyon türleri [137]

### Dış bağlanma

Dış bağlanma, elektrostatik olarak gerçekleşmektedir [125].

## 2.10. Bileşiklerin Biyolojik Aktivitesini Belirleme Yöntemleri

### 2.10.1. Antimikrobiyal aktivite belirleme

Bir bileşiğin *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmede farklı yöntemler kullanılmaktadır. En bilinen temel yöntemler disk difüzyon, kuyu difüzyon ve dilüsyon yöntemleridir. Agar kuyu difüzyon yöntemi, antimikrobiyal bileşiklerin, bitkilerin veya mikrobiyal özütlerin antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Agar petrinin tüm yüzeyine mikroorganizmalar eklenerek yayma ekim

yapılmakta ve daha sonra agar petri yüzeyi 6 ile 8 mm çapında steril bir delici ile delinmektedir. Ardından belirlenen konsantrasyonlarda antimikrobiyal bileşik veya özüt çözeltisi kuyuya eklenmektedir ve petri kapları test edilen mikroorganizmaya bağlı olarak uygun koşullar altında inkübe edilmektedir. Bileşiğin etkili bir antimikrobiyal aktivitesi olduğunda, agar ortamında yayılmakta ve test edilen mikrobiyal suşun büyümesini engellemektedir. Dilüsyon yöntemi ise test edilen antimikrobiyal ajanın agar veya sıvı besiyeri ortamındaki makroseyreltme veya mikroseyreltme konsantrasyonunu tahmin etme olanağı sunduğu için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), minimum bakterisidal (MBK) ve minimum fungusidal konsantrasyon (MFK) değerlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [138].

### 2.10.2. Antioksidan aktivite belirleme

Serbest radikallerin canlı organizmalar üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu ve oksidatif stres oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Hücreler, oksijeni metabolize ederek potansiyel olarak zararlı olan reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır. Normal koşullar altında oksidan oluşumunun hızı, uzaklaştırılma hızıyla dengelense de, pro-oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ile oksidatif stres meydana gelmektedir. Biyolojik hücrelerdeki ROS seviyesinin artması hücrelerin yetersiz şekilde çalışmasına, yaşlanmaya ve çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Oksidatif stres, diyabet, yüksek tansiyon, ateroskleroz, akut böbrek yetmezliği, Alzheimer ve Parkinson gibi çok yaygın hastalıkların fizyolojisinde aktif bir rol oynamaktadır. Antioksidanlar biyolojik hücrelerdeki serbest radikalleri nötralize etmektedir. Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin etkilerini nötralize etmede süperoksit dismutaz (SOD) enzimi görevlidir. Bu enzim biyolojik hücrelerdeki oksidasyon süreçlerinin ana düzenleyicisidir ve oksijen radikallerinin rekombinasyon reaksiyonunu katalize etmektedir. Antioksidan tedavisinin uygulanmasında SOD enziminin kullanılması, insan vücudunun çeşitli patolojik durumlarını tedavi etmede ve hidrojen peroksit ile üçlü oksijen oluşumunu önlemede etkili olduğu bilinmektedir [139].

Antioksidan aktivite, hidrojen atom transferi (HAT), tek elektron transferi (ET), indirgeyici güç ve metal şelatlama gibi farklı mekanizmalara sahip çeşitli analiz yöntemleri ile izlenebilmektedir [139-141]. Bu analiz yöntemleri arasından yaygın olarak kullanılanlardan biri DPPH serbest radikalini süpürücü etkidir ve yöntem mor renge sahip olan DPPH serbest

radikalinin antioksidanlar ile reaksiyona girdiğinde, renksiz, radikal olmayan kararlı bir moleküle dönüşümüne bağlı olarak spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır [9, 114, 140]. Bir diğer yöntem ise, Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesidir ve bu yöntem  $Fe^{+2}$  iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı antioksidan moleküllerin yarışmasına dayanmaktadır. Antioksidan moleküllerin şelatlama gücü yüksekse  $Fe^{+2}$ /ferrozin kompleksinin oluşumu engellenmektedir [114, 142]. Birçok proteinin ve metabolik yolların yapısına katılarak tüm hücrel ve fizyolojik olaylarda anahtar rol oynayan demir, canlı organizmalar için esansiyel bir elementtir ve insan vücudunda gerekli miktarda demirin yokluğu veya daha fazlası hücreleri olumsuz etkileyerek çeşitli patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Belirli miktarda alındığında ferritin gibi proteinlerin yapısına katılan demir, aşırı miktarda alındığında serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda dokularda oksidatif stres meydana gelerek kanser, nörodejenerasyon ve diğer hastalıklar meydana gelmektedir. Bu nedenle, diyet veya diyet dışı kaynaklardan elde edilen doğal demir şelatörlerinin, demirin neden olduğu oksidatif hasarı düzenleyerek oksidatif stresi azaltabileceği bildirilmiştir [114].

### 2.10.3. Genotoksik aktivite belirleme

Genotoksitesisi test edilmek istenen bileşiklerin karsinojen ve mutajen etkilerinin belirlenmesinde Ames, Komet, Kromozom anormallikleri, Kardeş kromatit değişimi Mikronükleus testleri kullanılmaktadır [143]

#### Mutajenite (Ames) testi

Kısa zamanlı bir geri mutasyon testi olan Ames testi [144, 145] genellikle antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tayinininde kullanılmaktadır. Aynı zamanda Ames testinin tümör baskılayıcı genlerde oluşan nokta mutasyonların saptanmasında da kullanıldığı bilinmektedir. Bu testte, histidin operonunda farklı mutasyonlar içeren *Salmonella typhimurium*'un mutant olan suşları kullanılmaktadır. Testin uygulanma amacı, *S. typhimurium* bakterisinin histidin sentezleme yeteneğini kaybeden mutant suşlarının, mitokondriyal enzim karışımını içeren metabolik aktivasyon (S9) varlığı/yokluğunda, test edilmek istenen bileşikler ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirerek histidini sentezleyebilen duruma dönebilmesine ve çoğalmasına dayanmaktadır. Mutajenite,

histidin olmayan ortamda çoğalan bakteriler sayılarak tespit edilmektedir. Test edilen bileşiklerin mutajenik bir özelliğe sahip olduğu durumda, geri mutasyonla çoğalan bakteri sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir [143, 146].

#### **2.10.4. Sitotoksik aktivite belirleme**

Hücre canlılığı, belirli bir popülasyondaki canlı hücre sayısıdır ve çoğalan hücre miktarının ölçülmesinde, ilaçlara veya kimyasal maddelere yanıt olarak hücrenin hayatta kalması veya ölümü önemli bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Bir ilacın etkisi, toksik olma ve hücreleri öldürme anlamına gelen sitotoksik veya hücre büyümesinin inhibisyonu olarak tanımlanan sitostatik olarak ortaya çıkabilmektedir [147].

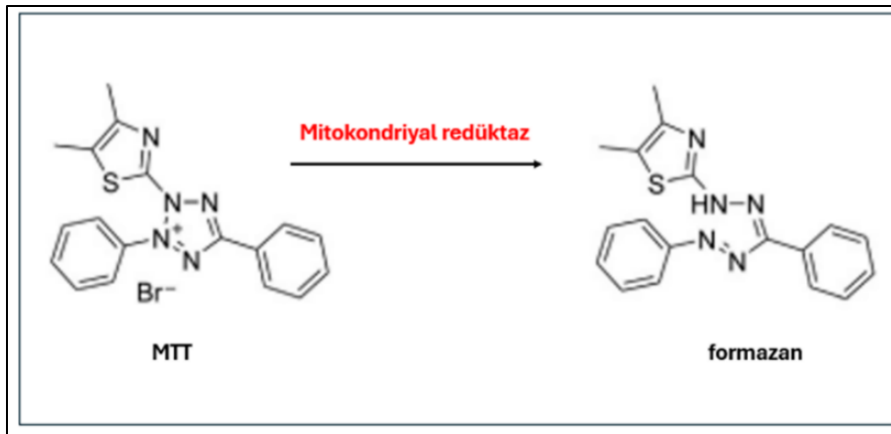
Biyolojik çalışmalarda belirli bir popülasyondaki canlı hücre sayısını tespit etmenin önemli olduğu bilinmektedir. Hücre sitotoksitesi ve çoğalma testleri temel olarak hücrelerin bir ilaca veya herhangi bir kimyasal maddeye karşı tepkisini taramak için kullanılmaktadır. Özellikle ilaç endüstrisi, geliştirilen ajanların hücreler üzerindeki etkilerini belirlemek için sitotoksite testlerinden yararlanmaktadır. Kanser hücrelerini hedef alan bir terapötik maddenin etkisini incelemek için birçok test kullanılmaktadır. Bileşiklerin sitotoksik/sitostatik etkilerini saptamak ve hücresel canlılığı ölçmek için de çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler, hücre zarı geçirgenliği, boya alımı, metabolik aktiviteler, enzim salınımı, hücre yapışması, ATP üretimi, koenzim üretimi, DNA sentezi ve nükleotit alım aktivitesi dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevlere dayanabilmektedir [147].

Hücre çoğalması ve sitotoksite inceleme yöntemleri farklı kategorilere ayrılmaktadır. Trypan mavisi, temel olarak canlı hücreler üzerinde ölü hücrelerin boyanmasına dayanan ve diğer testlerden daha kolay olarak uygulanan bir yöntemdir. İlaçların sitotoksik etkilerinin incelenmesinde MTT, XTT, MTS, WST1, Alamar mavisi, kalsein AM, LDH ve G6PD salınım testleri gibi farklı metabolik hücre çoğalma testleri kullanılmaktadır. H3 timidin alımı, BrdU, PCNA, fosfohiston H3 veya Ki67 tespiti, DNA sentezine veya hücre çoğalma belirteçlerine dayalı yöntemler olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, ATP testi, proteaz canlılık belirteci testi, klonojenik hücre sağkalım testi, sülförhodamin B testleri ve raman mikrospektrometrisinin yaygın olarak kullanılan etkili testler olduğu bilinmektedir [147].

### MTT yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi

MTT yöntemi, hücrelerin metabolik aktivitesini ölçen kolorimetrik bir testtir. Ayrıca hücre çoğalmasını ve canlılığını analiz etme amacıyla kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Bu test yöntemi Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimlerinin, tetrazolyum boyası olan MTT kimyasalını mor renkli çözünmeyen formazan kristallerine indirgeme yeteneğine dayanmaktadır (Şekil 2.28) [148].

Tetrazolyum tuzları, heterosiklik organik yapıda bileşiklerdir. Tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri, formazan denilen yapıya dönüşmelerini sağlayarak, renk değişikliğini beraberinde getirmektedir. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilmekte ve böylece renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilmektedir. Canlı hücreler metabolik olarak mor renge boyanmaktadır. Ölü hücrelerde ise, herhangi bir renk değişimi olmamaktadır [149].



Şekil 2.28. Mitokondriyal redüktaz aracılığıyla tetrazolyum tuzunun parçalanarak formazana dönüştürülmesi [148]

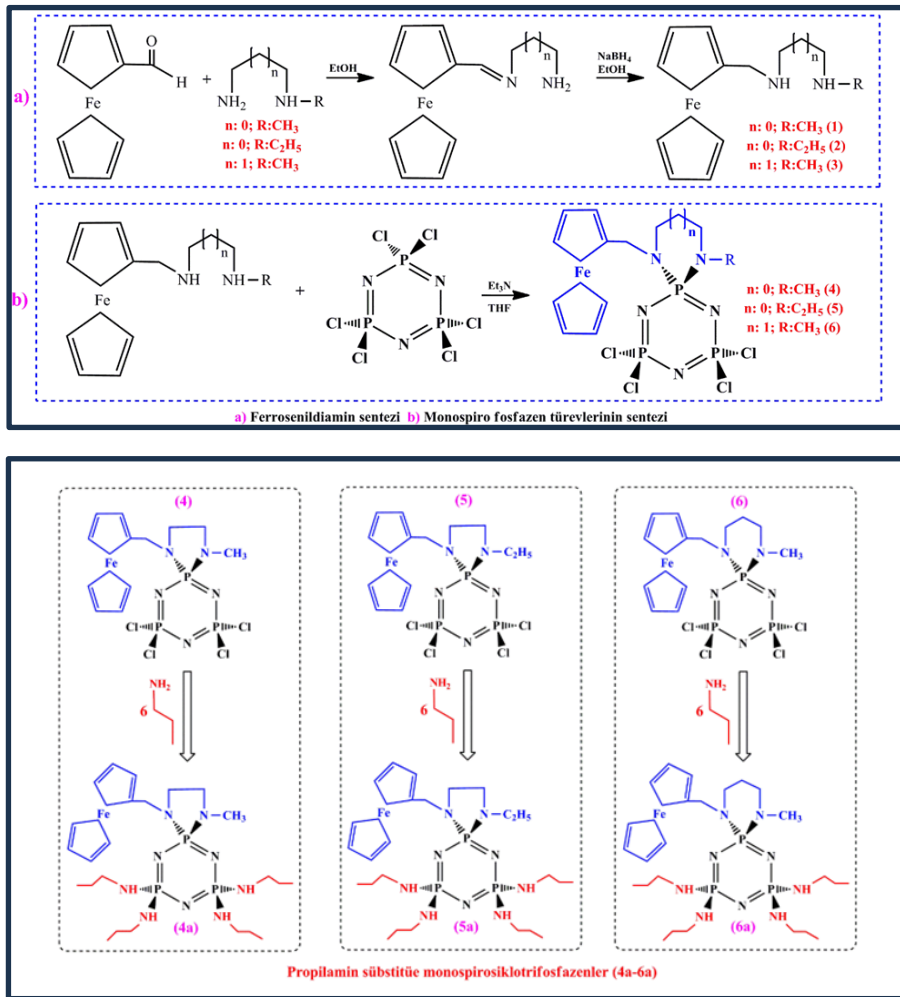


### 3. MATERYAL VE METOT

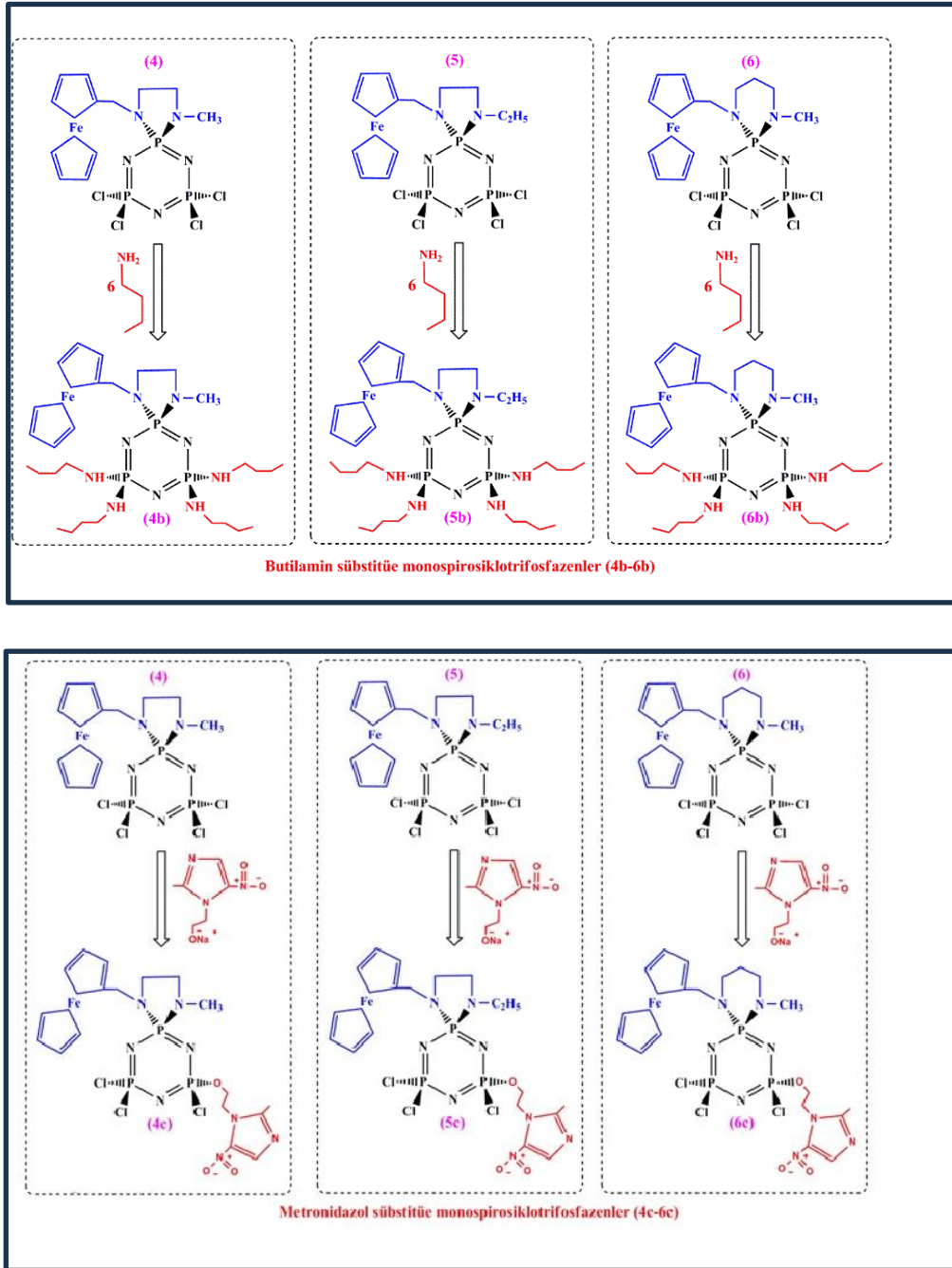
#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan fosfazen bileşikleri

Çalışmada kullanılan monospirosiklotrifosfazen türevi bileşikler Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Ana Bilim Dalı'nda Prof. Dr. Nuran ASMAFİLİZ ve Dr. Öğr. Üyesi Reşit CEMALOĞLU tarafından sentezlenmiştir. Sentezlenen 12 fosfazen bileşiğinin biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Bu bileşikler 4a-6a, 4b-6b, 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d olarak isimlendirilmiş olup sentez aşamaları ile moleküler yapısı Şekil 3.1'de, açık isimleri ise Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözölen bileşikler enjektör uçlu filtre kullanılarak steril edilmiştir.



Şekil 3.1. (devam) Tez çalışmasında kullanılan fosfazen bileşikleri



Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılan fosfazen bileşikleri

(4c-4d), (5c-5d) ve (6c-6d) numaralı metronidazol süstitüe bileşikler, birbirlerinin diastereoizomeri (RR/RS veya SS/SR) olarak elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. Fosfazen bileşiklerinin isimleri

|       | Bileşik Kodu | Süstituent   | Bileşiğin ismi                                                                                                         |
|-------|--------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | 4a           | Propilamin   | Spiro[(2-metil-1-ferrosenilmetil)] etan-1,2-diamino-4,4,6,6-tetrakispropilaminosiklotrifosfazatrien                    |
| 2     | 5a           | Propilamin   | Spiro[(2-etil-1-ferrosenilmetil)] etan-1,2-diamino-4,4,6,6-tetrakispropilaminosiklotrifosfazatrien                     |
| 3     | 6a           | Propilamin   | Spiro[(3-metil-1-ferrosenilmetil)] propan-1,3-diamino-4,4,6,6-tetrakispropilaminosiklotrifosfazatrien                  |
| 4     | 4b           | Bütilamin    | Spiro[(2-metil-1-ferrosenilmetil)] etan-1,2-diamino-4,4,6,6-tetrakisbütilaminosiklotrifosfazatrien                     |
| 5     | 5b           | Bütilamin    | Spiro[(2-etil-1-ferrosenilmetil)] etan-1,2-diamino-4,4,6,6-tetrakisbütilaminosiklotrifosfazatrien                      |
| 6     | 6b           | Bütilamin    | Spiro[(3-metil-1-ferrosenilmetil)] propan-1,3-diamino-4,4,6,6-tetrakisbütilaminosiklotrifosfazatrien                   |
| 7/8   | 4c-4d        | Metronidazol | Spiro[(2-metil-1-ferrosenilmetil)] etan-1,2-diamino-4-metronidazol-4,6,6-triklorosiklotrifosfazatrien (diastereomer)   |
| 9/10  | 5c-5d        | Metronidazol | Spiro[(2-etil-1-ferrosenilmetil)] etan-1,2-diamino-4-metronidazol-4,6,6-triklorosiklotrifosfazatrien (diastereomer)    |
| 11/12 | 6c-6d        | Metronidazol | Spiro[(3-metil-1-ferrosenilmetil)] propan-1,3-diamino-4-metronidazol-4,6,6-triklorosiklotrifosfazatrien (diastereomer) |

### 3.1.2. Mikroorganizmaların gelişme ortamları

Test edilen bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için 11 adet bakteri ve 3 adet maya suşu kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Stok kültürden alınan mikroorganizmalar, bakteriler için Tryptic Soy Agar (TSA), mayalar için Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyeri üzerinde belirli inkübasyon koşullarında aktifleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan bakteri ve mayaların inkübasyon koşulları

| Bakteriler ve Mayalar                 | Sıcaklık (°C)<br>Süre (Saat) | Besiyeri |
|---------------------------------------|------------------------------|----------|
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 G(-)        | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 G(-)        | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>B. cereus</i> NRRL B-3711 G(-)     | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 G(+)     | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 G(+)      | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 G(+)    | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 G(-)  | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 G(-)  | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028 G(-) | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>E. hirae</i> ATCC 9790 G(+)        | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>P. vulgaris</i> RSKK 96029 G(-)    | 37 °C/24 saat                | TSA      |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231         | 30 °C/48 saat                | SDA      |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258            | 30 °C/48 saat                | SDA      |
| <i>C. tropicalis</i> NRRL Y-12968     | 30 °C/48 saat                | SDA      |

### 3.1.3. Hücre hatları

MDA-MB-231 (meme kanseri) ve Vero (epitel) sağlıklı hücre hattı, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki hücre kültürü laboratuvarından sağlanmıştır.

### 3.1.4. Kimyasal madde isimleri

Sodyum Klorür (NaCl) (Applichem), Mueller hinton agar (MHA), Mueller hinton broth (MHB), Tryptic soy agar (TSA), Sabouraud dekstroz broth (SDB), Sabouraud dextrose agar (SDA)

(Merck), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma), Tris (Merck), Asetik asit (Merck), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Merck), Agaroz (Applichem), Etidyum bromür (Sigma), Etanol (Merck), Bromfenol mavisi (Merck), Ksilen siyanol (Merck), Tris-EDTA (TE), pBR322 DNA (Thermo Scientific), *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri (Thermo Scientific), MTT (3-(4,5- Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolium Bromür) (Sigma), Penisilin-streptomisin (Bioind), DMEM ve RPMI hücre kültürü besiyerleri (Bioind), Fetal Bovine Serum (FBS) (Serena), Tripsin-EDTA solüsyonu (Bioind), 1X Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) steril pH 7.4 (Bioind), Cisplatin, Ferrozin (Sigma), Demir (II) klorür (Sigma), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma), Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Top Agar, 4-nitro-O-fenilendiamin, 2-aminoantrasen, L-histidin (Merck) D-biyotin (Sigma-Aldrich), Sodyum azit ve 2-aminofloren (Merck), S9 fare karaciğer fraksiyonu (Sigma)

### 3.1.5. Test suşları

Tez çalışmasında kullanılan *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Bölümü'nden sağlanmıştır.

### 3.1.6. Alet, cihaz ve sarf malzeme

Petri kabı (90x15 mm) (İsolab), mikropipet ucu (Kirgen), mikrosantrifüj tüpü (İsolab), filtreli enjektör ucu (0,45 µm) (İsolab), mezürler, erlenler, beherler gibi farklı cam malzemeler, parafilm (İsolab), nitril eldivenler, drigalski spatülleri, halka ucu şeklinde özeler, pamuklar, 10 cc'lik şırıngalar, 96 kuyucuklu mikropate (Biosigma), mikropipet (Gilson), hücre kültürü sarf malzemeleri, mikroskop, karbondioksitli etüv, otoklav (Tomy SX-500), etüvler (37 °C ve 30 °C sıcaklık değerinde), +4 °C sıcaklık değerinde kit saklama dolabı (Sanyo), (-30 ve -80 °C sıcaklık değerlerinde) derin dondurucu (Sanyo), jel görüntüleme cihaz (Biometra), elektroforez güç kaynağı cihazı, pH ölçen cihaz (Mettler Toledo), hassas terazi cihazı, steril kabin cihazı, manyetik karıştırıcı cihazı, saf su cihazı, mini santrifüj cihazı, yatay elektroforez cihazı, agaroz jel tarakları, vorteks cihazı, mikropate ölçen cihaz, mikrodalga fırın cihazı (Vestel)

### 3.1.7. Çözeltiler

#### Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan çözeltiler

- *Serum fizyolojik çözeltisi:* NaCl (%0,9), distile suda hazırlanmıştır ve 120°C, 1,5 atm basınçtaki otoklav cihazında 15 dakika süreyle sterilizasyon işlemi yapılmıştır.
- *Bakteri ve mayaların besiyeri ortamı:* Distile su içerisinde çözölen ve steril edilen katı besiyerleri TSA ve SDA; sıvı besiyerleri MHB ve SDB, 50 °C sıcaklığa kadar soğutma işlemi gerçekleştirildikten sonra katı besiyeri steril kabin içinde steril petri kabına 20 ml dökölmüştür. Sıvı besiyerleri ise 50 ml hacimdeki cam şişelere konulmuştur. Sterilizasyonu kontrol etmek için katı besiyerinin bulunduğı petri kapları ve sıvı besiyerleri, soğutulduktan sonra bir gece etüvde bekletilmiştir. Ardından çalışmada kullanılacak şekilde +4 °C sıcaklık değeriindeki dolaba bırakılmıştır.

#### Antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılan çözeltiler

- *DPPH çözeltisi:* DPPH (%0,004) etanol içerisinde çözülmüştür.
- *Ferrozin çözeltisi:* 12,31 mg/5 ml olacak şekilde distile suda çözülmüştür.
- *Demir(II) Klorür çözeltisi:* 2mg/5ml olacak şekilde distile suda çözülmüştür.

#### Genotoksik aktivite çalışmaları için kullanılan çözeltiler

- *S9 karışımı:* %4 S9 fraksiyonu, %1 0,4 M MgCl<sub>2</sub>, %1 1,65 M KCl, %0,5 1 M D-glikoz-6-fosfat disodyum ve %4 0,1 M NADP, %50 0,2 M fosfat tamponu ve %39,5 steril distile su ile hazırlanmıştır.
- *Na-P Tamponu:* S9 karışımı olmayan deney için 500 µl 0,2 M (pH 7.4) olacak şekilde hazırlanmıştır.
- *L-histidin/D-biyotin çözeltisi:* 0,5 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

#### DNA etkileşimi çalışmaları için kullanılan çözeltiler

- *Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu (50X):* 242 g Tris base, 57,1 ml glacial asetik asit ve 100 ml 0,5M EDTA (pH:8) distile suda çözülmüştür. Ardından son hacim 1 litreye

tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere 1X olacak şekilde seyreltilmiştir.

- *0,5M EDTA (pH 8.0)*: 186,12 g EDTA distile suda çözülmüştür ve son hacim 800 ml'ye tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır. pH değeri 8 gösterene kadar Sodyum hidroksit (NaOH) tableti eklenmiştir. pH değerinin ayarlanmasının ardından distile su ile son hacim 1 litreye tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır.
- *1 M Tris-HCl*: 12,11 g Tris tartılmıştır ve distile suda çözülmüştür. Ardından konsantre Hidroklorik asit (HCl) ile pH değeri 8 olacak şekilde ayarlanmıştır. pH değerinin ayarlanmasından sonra distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır.
- *TE (Tris-EDTA)*: 1 ml 1 M Tris-HCl (pH değeri 8) ve 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH değeri 8) karıştırılmıştır. Ardından distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır.
- *Agaroz jel*: Agaroz (%1), 1X TAE tamponu içerisinde olacak şekilde hazırlanmıştır.
- *Jel yükleme boyası*: %40 sükröz, %0,025 bromfenol mavisi ve %0,25 ksilen siyanol kullanılarak hazırlanmıştır.
- *Etidyum bromür*: Görüntüleme aşamasından önce 10mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır ve jeli görüntülemeye kullanılmıştır.

#### Sitotoksik aktivite çalışmalarında kullanılan çözeltiler

- *Hücre hatlarının çoğaltılması için hazırlanan besiyerleri*: Vero (epitel) hücre hattı için besiyeri; Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde %10 FBS (Fetal Bovine Serum), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenerek hazırlanmıştır. MDA-MB-231 (meme kanseri) hücre hattı için besiyeri; %10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenerek RPMI-1640 besiyeri içerisinde hazırlanmıştır.
- *MTT (3-(4,5- Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolium Bromür)*: 5 mg/ml olacak şekilde distile su içerisinde hazırlanmıştır.

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde agar kuyu difüzyon yöntemi; minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerlerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

##### Agar kuyu difüzyon yöntemi

Sentezlenen bileşiklerin 11 patojen bakteri ile 3 maya türü üzerinde gösterdiği antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır [20]. Bu amaçla, çalışma öncesinde uygun besiyerinde aktifleştirilen mikroorganizmalar steril serum fizyolojik içerisinde MacFarland 0,5 ( $1 \times 10^7$  cfu/ml) olacak şekilde hazırlanmıştır. İçerisinde besiyeri bulunan petrilere 100 µl bakteri ve maya eklenerek yayma ekim yapılmıştır. Bakteri veya maya yayma ekimi yapıldıktan sonra besiyerlerine steril delgeç yardımıyla 6 mm çapında kuyular açılmıştır. 5000 µM konsantrasyondaki bileşikler, her kuyuya 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Bakteri ekimi yapılan petri kapları 37°C'lik etüvde 24 saat, maya ekimi yapılan petri kapları ise 30°C'lik etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. Bakteriler için ampisilin ve kloramfenikol antibiyotikleri, mayalar için ketokanazol antibiyotikleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu antibiyotikler, bileşiklerle aynı konsantrasyonda olacak şekilde mikroorganizmalara uygulanmıştır ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyular etrafında meydana gelen inhibisyon zonları milimetre (mm) cinsinden ölçülmüştür ve sonuçlar kaydedilmiştir.

##### Mikrodilüsyon yöntemi

Çalışmada kullanılan fosfazen bileşiklerinin, mikrodilüsyon yöntemi ile MİK, MBK ve MFK değerleri belirlenmiştir [20]. 96 kuyulu mikropate kuyularına bakteriler için 100 µl MHB sıvı besiyeri, mayalar için SDB sıvı besiyeri eklenmiştir. İlk kuyucuğa, 5000 µM konsantrasyondaki bileşiklerden 100 µl eklenmiştir ve daha sonra ilk kuyudan da 100 µl alınıp bir sonraki kuyucuğa ilave edilmiştir. Kuyucuklarda yarı yarıya seyreltme olacak şekilde bileşiklerin sekiz farklı konsantrasyonu hazırlanmıştır. Daha sonra MacFarland (0,5) olacak şekilde ayarlanan patojen bakteri ve mayalar endorfların içinde serum fizyolojik

çözeltisi ile seyreltilmiştir (1/10). Bu çözeltinin içinden bakteri ve mayalar 5 µl hacminde alınarak mikrolate içindeki kuyucuklara eklenmiştir ve inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak sıvı besiyeri mikroorganizmalarla birlikte, negatif kontrol olarak da sadece sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bakterilerin olduğu mikrolate 37 °C’lik etüvde 24 saat, mayaların olduğu mikrolate 30 °C’lik etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra fosfazen bileşiklerinin MİK, MBK ve MFK değerlerini belirlemek amacıyla mikrolate kuyularının içinden 10 µl bakteri/maya alınmıştır ve bakteriler için TSA, mayalar için SDA besiyerine sekiz farklı konsantrasyonda agar spot ekim yapılmıştır. Bakterilerin spot ekiminin olduğu petri kapları 37 °C’lik etüvde 24 saat, mayaların spot ekiminin olduğu petri kapları 30 °C’lik etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra patojen bakteri ve mayaların sekiz farklı konsantrasyondaki üreme durumuna bakılmıştır. MBK değeri, bakteri üremesinin olmadığı en düşük konsantrasyon; MFK değeri, maya üremesinin olmadığı en düşük konsantrasyon olacak şekilde belirlenmiştir. MİK değeri ise, bakteri ve maya üremesinin engellendiği ilk konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

### **3.2.2. Bileşiklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi**

(4a-6a) ve (4b-6b) fosfazen bileşiklerinin antioksidan aktivite etkisi DPPH yöntemi [150] ve demir şelatlama aktivite yöntemi [151] ile gösterilmiştir.

#### DPPH serbest radikalini süpürücü etki

Çalışmada bileşikler DMSO içerisinde (5000-312,5 µM) konsantrasyonlarında ara stoklar olarak hazırlanmıştır ve üzerine %0,004 DPPH çözeltisi eklenmiştir. Karışım 30 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Ardından mikrolate okuyucu cihazında 517 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Bununla birlikte, aynı yöntem içinde bileşik içermeyen, sadece bileşiğin çözücüsü bulunan negatif kontrol grubuna da uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak da Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) kullanılmıştır.

#### Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi

Çalışmada bileşikler DMSO içerisinde (5000-312,5 µM) konsantrasyonlarında ara stoklar halinde hazırlanmıştır. Çözücü-bileşik karışımı üzerine FeCl<sub>2</sub> çözeltisi eklenip 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir ve karışımın üzerine ferrozin çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında

10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından mikropate okuyucu cihazında 562 nm dalga boyunda absorbanlar ölçülmüştür. Bununla birlikte, aynı yöntem içinde bileşik içermeyen, sadece bileşiğin çözücüsü bulunan negatif kontrol grubuna da uygulanmıştır.

Deneyler her iki deney için de üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin DPPH radikalini (%) inhibisyon aktivitesi ve % demir iyonu şelatlama aktivitesi,  $[(A0-A1)/A0] \times 100$  denklemi ile hesaplanmıştır. Bu denklemde A0, negatif kontrolün absorbanı; A1, reaksiyon karışımının veya referans standardın absorbanıdır. Demir iyonlarının ve DPPH radikallerinin %50'sini inhibe etmek için gereken konsantrasyon (IC50) doğrusal regresyon analizinden hesaplanmıştır. Düşük IC50 değeri daha yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir.

### 3.2.3. Bileşiklerin genotoksik aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmada, altı bileşiğin (4a-6a), (4b-6b) mutajenik potansiyeli aynı anda metabolik aktivasyonun (S9) varlığında ve yokluğunda Ames testi ile Selçuk Üniversitesi'nde çalışılmıştır. S9, 2-aminofloren ve 2-aminoantrasen gibi dolaylı etkili mutajenlerin metabolik aktivasyonu için gerekli olan mitokondriyal enzim karışımıdır [144]. Poliklorlu bifenil karışımı Aroclor 1254 (500 mg/kg) ile muamele edilen erkek Sprague-Dawley sıçanlarının karaciğerlerinden hazırlanan metabolik aktivasyon karışımı (S9 fraksiyonu), Moleküler Toksikoloji (Boone, NC, ABD) şirketinden satın alınmıştır.

Plak birleştirme yöntemi kullanılmıştır ve yöntem iki mutant *Salmonella* suşu ile gerçekleştirilmiştir. *S. typhimurium* TA98 suşu, çerçeve kayması mutasyonlarını tespit etmede kullanılırken, *S. typhimurium* TA100 suşu ise baz çifti değişim mutasyonlarını belirlemede kullanılmaktadır. Test suşlarının kültürü, 16 saat gece boyunca çalkalayıcıda bırakılarak elde edilmiştir ve yoğunluğu (Mcfarland)  $1-2 \times 10^9$  cfu/ml olacak şekilde bulanıklığa ayarlanmıştır. 100 µl taze bakteri kültürü, 500 µl Na-P tamponu (0,2 M, S9 karışımı olmayan deney için pH 7,4) ve 100 µl farklı bileşik konsantrasyonları (0,5 mM L-histidin/D-biyotin çözeltisi) ile desteklenen top agara (2,5 ml) eklenmiştir ve vorteksle yavaşça karıştırılmıştır. Karışımın tamamı minimal agar petri kaplarına dökülmüştür. Petri kapları 37°C' de 48-72 saat süreyle inkübe edilmiştir ve her petri kabındaki geri dönen bakteri kolonileri sayılmıştır. Her deneyde pozitif ve negatif kontroller rutin olarak dahil edilmiştir. Bir doz-cevap ilişkisi tespit edildiğinde ve en az bir konsantrasyon için geri dönen

bakteri sayısında iki kat artış gözlemlendiğinde bileşikler için potansiyel mutajenite olabileceği dikkate alınmıştır [10, 144].

#### 3.2.4. Bileşik-plazmit DNA etkileşimi

4a-6a, 4b-6b, 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d kodlu siklotrifosfazatrien bileşiklerinin plazmit DNA ile etkileşimi agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir [152]. Bileşiklerin stok çözeltisi Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde hazırlanmıştır. 5000 µM'dan başlamak üzere beş farklı konsantrasyondan seyreltme ile hazırlanan bileşikler plazmit DNA ile 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından TAE tamponu kullanılarak agaroz jel elektroforezi (70 Volt/3saat) uygulanmıştır. Jeldeki ilk kuyuya bileşik ile muamele edilmeyen plazmit DNA, pozitif kontrol olarak yüklenmiştir. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel etidyum bromür boyası içinde 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jel, görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülenmiştir.

#### Restriksiyon endonükleaz enzimleri (*Bam*HI ve *Hind*III) ile kesim

*Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimi DNA'daki 5'-G/GATCC-3' bölgesini, *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimi ise 5'-A/AGCTT-3' bölgesini tanıyarak kesmektedir [15]. Bileşik-plazmit DNA karışımının 24 saatlik inkübasyonundan sonra, fosfazen bileşiklerinin plazmit DNA'daki bu nükleotitlere bağlanma durumunun belirlenmesi için *Bam*HI veya *Hind*III enzimleri ile kesimleri yapılmıştır ve 2 saat boyunca 37 °C'lik etüve bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 90 Volt akımda 1 saat süre ile elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından jel 10 dakika boyunca etidyum bromür boyasında bekletilmiştir ve jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

#### 3.2.5. Bileşiklerin sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi

##### Hücre kültürlerinin hazırlanması

4a-6a ve 4b-6b kodlu fosfazen bileşiklerinin MDA-MB-231 (meme kanseri) hücre hattı ve Vero (epitel) hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivite etkisi incelenmiştir. Vero (epitel) hücre hattı, DMEM besiyeri içerisinde %10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenerek üretilmiştir. MDA-MB-231 (meme kanseri) hücre hattı %10 FBS,

100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılarak üretilmiştir. Her iki hücre hattı da %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler %80-90 oranında konfluent olduklarında pasajlama işlemi yapılmıştır. Ardından Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır. MTT testi için Vero sağlıklı ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 1x10<sup>4</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu mikropate içerisine ekilmiştir. Negatif kontrol olarak %1 DMSO, pozitif kontrol olarak ise cisplatin ilacı kullanılmıştır.

#### Bileşiklerin hücrelere uygulanması

Bileşikler ve pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatin ilacı (3,1-50) µM arasında değişen konsantrasyonlarda olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. Bileşiklerin uygulanması sonrasında hücreler 24 saat süreyle 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edilmiştir. Ardından hücre canlılığı MTT test yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir [20].

#### MTT testi

Hücreler üzerinde bileşiklerin ve cisplatin ilacının farklı konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyonu sonrası besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır ve işlemde sonra deney karanlık ortamda devam etmiştir. 1:9 (5 mg/ml MTT: Serumsuz Besiyeri) oranında karışım hazırlanarak 100 µl olacak şekilde kuyucuklara ilave edilmiştir. Hücreler 37°C’de etüvde 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından besiyeri-MTT karışımı ortamdan uzaklaştırılmıştır ve kuyucuklara 100 µl izopropil alkol ilave edilerek formazan kristallerinin mor renge dönüşmesi sağlanmıştır. Deneyler 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir ve mikropate okuyucuda 570 nm’de absorban ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlardan % canlılık değeri hesaplanmıştır.

% Canlılık Değeri:  $\frac{\text{Bileşiğin Uygulandığı Hücre Absorbansı}}{\text{Negatif Kontrol Absorbansı}} \times 100$

Negatif Kontrol Absorbansı

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

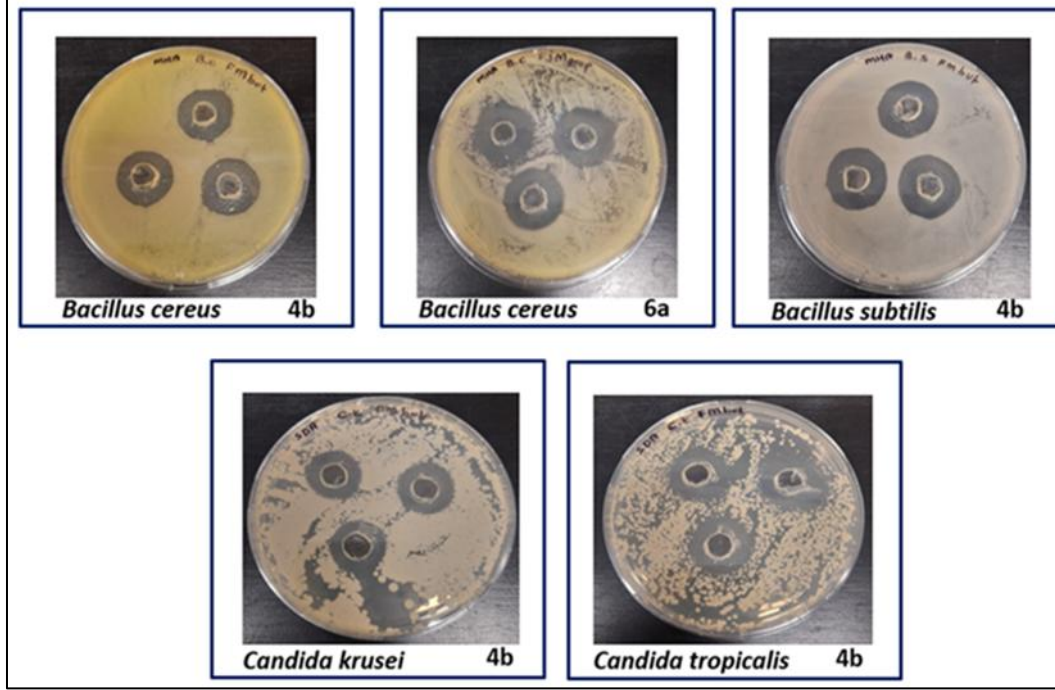
### 4.1. Antimikrobiyal Aktivite

5000 µM konsantrasyondaki 4a-6a, 4b-6b, 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesi kuyu difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir [153]. Bileşiklerin bazı mikroorganizmalara karşı oluşturdıkları inhibisyon zonları Resim 4.1’de gösterilmiştir. Çalışma sonunda mikroorganizmalara karşı oluşan inhibisyon zonları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Bulgular sonucunda, 4c bileşiği *E. hirae* bakterisi üzerinde  $21\pm0$  mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 4d bileşiği *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ve *S. typhimurium* bakterileri üzerinde sırasıyla  $15\pm0$ ,  $20\pm0$  ve  $20\pm0$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. 5c bileşiği *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerinde sırasıyla  $13\pm0$ ,  $17\pm0$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. 5d bileşiği *B. cereus*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* bakterileri üzerinde sırasıyla  $8\pm0$ ,  $17\pm0,5$  ve  $13\pm2$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. 6c bileşiği *B. subtilis* ve *K. pneumoniae* bakterileri üzerinde sırasıyla  $15\pm0$  ve  $12\pm0$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. 6d bileşiği *B. subtilis* ve *K. pneumoniae* bakterileri üzerinde sırasıyla  $17\pm0$  ve  $13\pm0$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. 4a bileşiği *S. aureus* bakterisi üzerinde  $12\pm0$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur.

5a bileşiği *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* bakterileri üzerinde sırasıyla  $12\pm0,5$ ,  $12\pm0$  ve  $20\pm0$  ve  $11\pm0$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. 6a bileşiği *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. hirae* bakterileri ve *C. tropicalis* mayası üzerinde sırasıyla  $25\pm0$ ,  $23\pm0$ ,  $20\pm0$ ,  $20\pm0$ ,  $20\pm0$  ve  $17\pm0$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. 4b bileşiği *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. hirae* bakterileri ve *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* mayaları üzerinde sırasıyla  $22\pm0$ ,  $22\pm0$ ,  $20\pm1$ ,  $20\pm0$ ,  $20\pm0$ ,  $20\pm0$ ,  $20\pm0$ ,  $21\pm0$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. 5b bileşiği *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *E. hirae* bakterileri ve *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* mayaları üzerinde sırasıyla  $25\pm0$ ,  $20\pm0,5$ ,  $22\pm0$ ,  $20\pm0$ ,  $21\pm0$ ,  $15\pm0$ ,  $17\pm0$ ,  $17\pm0$ ,  $17\pm0$ ,  $20\pm0$  mm’lik inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. 6b bileşiği *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. hirae* bakterileri ve *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis*

mayaları üzerinde sırasıyla  $20\pm0$ ,  $21\pm0$ ,  $23\pm1$ ,  $20\pm0$ ,  $16\pm0$ ,  $18\pm0$ ,  $16\pm0$ ,  $18\pm0$  mm'lik zon çapı oluşturmuştur.



Resim 4.1. Bileşiklerin bakteriler ve mayalar üzerinde gösterdiği agar kuyu difüzyon sonuçları

4d ve 5c bileşiklerinin etkinliği, *E. coli* ATCC 35218 bakterisi üzerinde oluşturduğu  $15\pm0$  ve  $13\pm0$  zon çapları ile kloramfenikolden yüksek çıkmıştır. 5b bileşiğinin etkinliği, *E. coli* ATCC 25922 bakterisi üzerinde oluşturduğu  $25\pm0$  zon çapı ile ampsilinden yüksek çıkmıştır. 5d, 5a, 6a, 4b-6b bileşiklerinin etkinliği, *B.cereus* bakterisi üzerinde oluşturduğu  $8\pm0$ ,  $12\pm0,5$ ,  $25\pm0$ ,  $22\pm0$ ,  $20\pm0,5$ ,  $20\pm0$  zon çapları ile ampisilin ve kloramfenikolden yüksek çıkmıştır. 6a, 4b-5b bileşiklerinin etkinliği, *B. subtilis* bakterisi üzerinde oluşturduğu  $23\pm0$ ,  $22\pm0$ ,  $22\pm0$  zon çapları ile kloramfenikolden yüksek çıkmıştır.

6b bileşiğinin *B. subtilis* bakterisine karşı olan etkinliği kloramfenikol antibiyotiğinin etkinliğiyle aynıdır ( $21\pm0$ ) ve 6a, 4b, 5b bileşiklerinin *B. subtilis* bakterisine karşı olan etkinliği ise kloramfenikol antibiyotiğinin etkinliğinden yüksek çıkmıştır ( $23\pm0$ ,  $22\pm0$ ,  $22\pm0$ ). 5a, 6a, 4b, ve 6b bileşiklerinin *E. faecalis* bakterisine karşı olan etkinliği kloramfenikol antibiyotiğinin etkinliğiyle aynıdır ( $20\pm0$ ).

5b bileşiğinin ise *E. faecalis* bakterisine karşı olan etkinliği kloramfenikolden yüksek çıkmıştır (21±0). 5d, 6c, 6d, 5a, 5b bileşiklerinin *K. pneumoniae* bakterisine karşı olan etkinliği ampsilinden yüksek çıkmıştır (13±2, 12±0, 13±0, 11±0, 15±0). 4d bileşiğinin *S. typhimurium* bakterisine karşı olan etkinliği ampsilinden yüksek çıkmıştır (20±0). 4c, 6a, 4b-6b bileşiklerinin *E. hirae* bakterisine karşı olan etkinliği ampsilinden yüksek çıkmıştır (21±0, 20±0, 20±0, 17±0, 16±0). 4b-6b bileşiklerinin *C. albicans* mayasına karşı olan etkinliği ketokanozolden yüksek çıkmıştır (20±0, 17±0, 18±0). 4b bileşiğinin *C. krusei* mayasına karşı olan etkinliği ketokanozolden yüksek çıkmıştır (20±0).

Çizelge 4.1. Bileşiklerin bakteri ve mayalar üzerinde gösterdiği inhibisyon zonları (mm)

| Test Mikroorganizmaları              | Bileşiklerin inhibisyon zon çapları |      |      |        |      |      |      |        |      |      |        |      | Pozitif Kontrol |      |      |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------|------|--------|------|------|------|--------|------|------|--------|------|-----------------|------|------|
|                                      | Bileşikler (5000 µM)                |      |      |        |      |      |      |        |      |      |        |      | Amp             | C    | Keto |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 G(-)       | -                                   | 15±0 | 13±0 | -      | -    | -    | -    | -      | -    | -    | -      | -    | -               | 8±0  | NS   |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 G(-)       | -                                   | -    | -    | -      | -    | -    | -    | -      | -    | -    | 25±0   | -    | 18±0            | 25±0 | NS   |
| <i>B. cereus</i> NRRL B-3711 G(-)    | -                                   | -    | -    | 8±0    | -    | -    | -    | 12±0,5 | 25±0 | 22±0 | 20±0,5 | 20±0 | -               | -    | NS   |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 G(+)    | -                                   | -    | -    | -      | 15±0 | 17±0 | -    | -      | 23±0 | 22±0 | 22±0   | 21±0 | 23±1            | 21±0 | NS   |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 G(+)     | -                                   | -    | -    | -      | -    | -    | 12±0 | 12±0   | 20±0 | 20±1 | 20±0   | 23±1 | 44±1            | 24±1 | NS   |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 G(+)   | -                                   | -    | -    | -      | -    | -    | -    | 20±0   | 20±0 | 20±0 | 21±0   | 20±0 | 27±0            | 20±0 | NS   |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 G(-) | -                                   | 20±0 | 17±0 | 17±0,5 | -    | -    | -    | -      | -    | -    | -      | -    | 60±0            | 34±0 | NS   |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883G(-)  | -                                   | -    | -    | 13±2   | 12±0 | 13±0 | -    | 11±0   | -    | -    | 15±0   | -    | -               | 31±1 | NS   |
| <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028G(-) | -                                   | 20±0 | -    | -      | -    | -    | -    | -      | -    | -    | -      | -    | 19±1            | 38±1 | NS   |
| <i>E. hirae</i> ATCC 9790 G(+)       | 21±0                                | -    | -    | -      | -    | -    | -    | -      | 20±0 | 20±0 | 17±0   | 16±0 | 9±1             | 22±1 | NS   |
| <i>P. vulgaris</i> RSKK 96029 G(-)   | -                                   | -    | -    | -      | -    | -    | -    | -      | -    | -    | -      | -    | -               | 32±1 | NS   |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231        | -                                   | -    | -    | -      | -    | -    | -    | -      | -    | 20±0 | 17±0   | 18±0 | NS              | NS   | 11±1 |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258           | -                                   | -    | -    | -      | -    | -    | -    | -      | -    | 20±0 | 17±0   | 16±0 | NS              | NS   | 18±1 |
| <i>C. tropicalis</i> Y-12968         | -                                   | -    | -    | -      | -    | -    | -    | -      | 17±0 | 21±0 | 20±0   | 18±0 | NS              | NS   | 34±2 |

(Amp: Ampisilin, 10 mg), (C: Kloramfenikol, 30 mg) (antibakteriyel) ve (Keto: Ketokonazol, 50 mg) (antifungal) NS:(Çalışılmadı)

Patojen mikroorganizmalar üzerinde, propilamin ve bütülinamin sübstitüenti taşıyan bileşiklerin (4a-6a), (4b-6b), metronidazol sübstitüenti taşıyan bileşiklere (4c-4d), (5c-5d), (6c-6d) göre antimikrobiyal aktivite etkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *C. albicans* üzerinde oluşturdıkları 20±1, 17±0 ve 18±0 mm zon çapı ile bütülinamin sübstitüenti

taşıyan (4b-6b) siklotrifosfazatrien bileşikler, mayalar üzerinde antimikrobiyal aktivitenin en etkili olduğu bileşikler olmuştur.

#### 4.1.1. Bileşiklerin MİK, MBK ve MFK değerlerinin belirlenmesi

4a-6a, 4b-6b, 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d bileşiklerinin değerlerinin belirlenmesi için mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır [153, 154]. Elde edilen MİK sonuçları Çizelge 4.2’de, MBK ve MFK sonuçları Çizelge 4.3’de belirtilmiştir. Fosfazen bileşiklerinin patojen mikroorganizmaların büyümesi üzerinde etki ettiği görüntüler Resim 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Bileşiklerin patojen mikroorganizmalar üzerindeki (MİK) değerleri (µM)

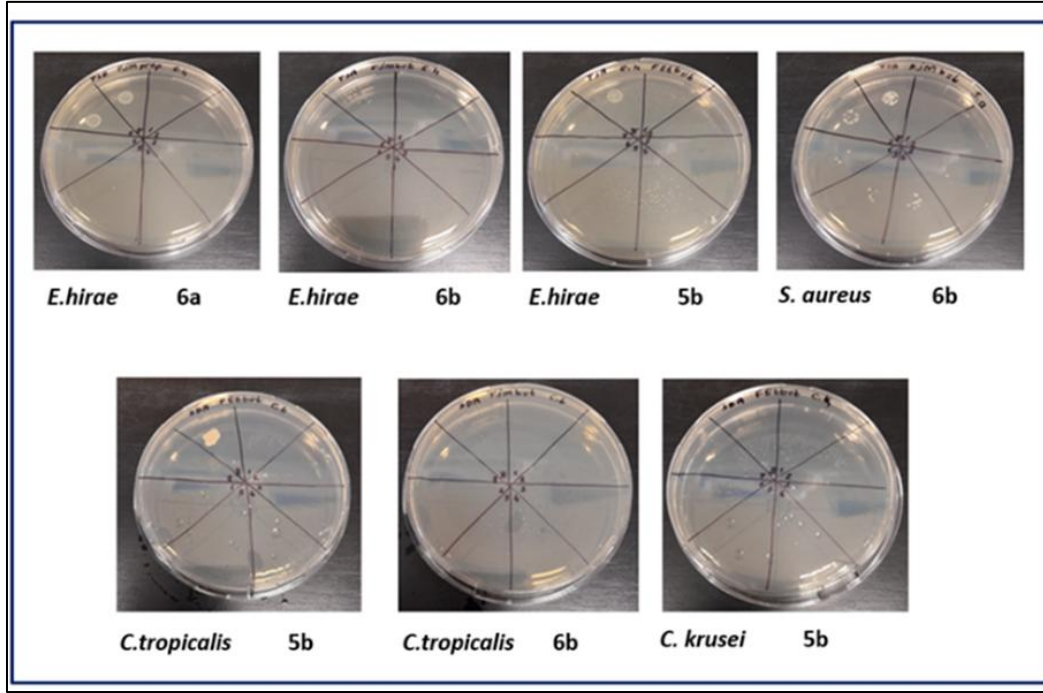
| Test Mikroorganizmaları               | MİK Değerleri        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | Pozitif Kontrol |       |       |
|---------------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
|                                       | Bileşikler (5000 µM) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | Amp             | C     | Keto  |
|                                       | 4c                   | 4d    | 5c    | 5d    | 6c    | 6d    | 4a    | 5a    | 6a    | 4b    | 5b    | 6b    |                 |       |       |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 G(-)        | 1250                 | 1250  | 1250  | 1250  | 2500  | 1250  | 2500  | 2500  | 625   | 625   | 625   | 625   | 2500            | 625   | -     |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 G(-)        | 625                  | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 312,5 | 312,5 | 312,5 | 312,5 | <19,5           | 78,1  | -     |
| <i>B. cereus</i> NRRL B-3711 G(-)     | 625                  | 312,5 | 625   | 625   | 625   | 312,5 | 625   | 156,3 | 39,1  | 156,3 | <19,5 | 156,3 | 156,3           | 156,3 | -     |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 G(+)     | >2500                | >2500 | 312,5 | 312,5 | 312,5 | 156,3 | 39,1  | 39,1  | 39,1  | 39,1  | <19,5 | <19,5 | <19,5           | 78,1  | -     |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 G(+)      | 1250                 | 625   | 1250  | 625   | 1250  | 1250  | 156,3 | 156,3 | 39,1  | 19,5  | 19,5  | 19,5  | <19,5           | 156,3 | -     |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 G(+)    | 625                  | 625   | 625   | 1250  | 1250  | 1250  | 156,3 | 156,3 | 78,1  | 19,5  | <19,5 | <19,5 | <19,5           | 312,5 | -     |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 G(-)  | 625                  | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 1250  | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | >2500           | >2500 | -     |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 G(-)  | 625                  | 625   | 2500  | 2500  | 1250  | 1250  | 625   | 2500  | 625   | 2500  | 1250  | 2500  | 1250            | 625   | -     |
| <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028 G(-) | 2500                 | 625   | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | <19,5           | 156,3 | -     |
| <i>E. hirae</i> ATCC 9790 G(+)        | 625                  | 312,5 | 2500  | >2500 | 2500  | 2500  | 156,3 | 156,3 | 78,1  | 19,5  | 39,1  | 19,5  | 19,5            | 156,3 | -     |
| <i>P. vulgaris</i> RSKK 96029 G(-)    | 625                  | 625   | 1250  | 1250  | 1250  | 2500  | 1250  | 2500  | 1250  | 2500  | 2500  | 1250  | 1250            | 1250  | -     |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231         | 156,3                | 156,3 | 625   | 625   | 625   | 625   | 312,5 | 156,3 | 156,3 | 156,3 | 78,1  | 78,1  | -               | -     | 312,5 |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258            | 625                  | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 39,1  | <19,5 | <19,5 | -               | -     | <19,5 |
| <i>C. tropicalis</i> Y-12968          | 625                  | 312,5 | 625   | 625   | 625   | 625   | 312,5 | 312,5 | 156,3 | 39,1  | 19,5  | <19,5 | -               | -     | 78,1  |

Bileşiklerin MİK değerlerinin <19.5 ile >2500 µM arasında değiştiği gözlenmiştir. 4c ve 4d bileşiklerinin *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* bakterileri üzerinde gösterdiği MİK değerlerinin 625 µM; *C. albicans* mayasına karşı gösterdiği MİK değerinin ise 156,3 µM olduğu gözlenmiştir. 4c ve 4d bileşiklerinin *P. aeruginosa* ve *P. vulgaris* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampicilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *K. pneumoniae* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampicilin antibiyotiklerinden;

*C. albicans* mayası üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden yüksek çıkmıştır. 5c, 5d, 6c, 6d bileşiklerinin *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 625  $\mu$ M olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiklerin *P. aeruginosa* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisinin, ampisilin ve kloramfenikol pozitif kontrol ilaçlarının gösterdiği etkiye göre 4 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. 4a bileşiğinin *B. subtilis* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 39,1  $\mu$ M; *E. faecalis* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 156,3  $\mu$ M; *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 1250  $\mu$ M; *K. pneumoniae* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 625  $\mu$ M olduğu gösterilmiştir. 4a bileşiğinin *B. subtilis*, *E. faecalis* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikolden; *P. aeruginosa* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikolden; *K. pneumoniae* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilinden yüksek çıkmıştır. 5a bileşiğinin *B. subtilis* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 39,1  $\mu$ M; *E. faecalis* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 156,3  $\mu$ M; *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 625  $\mu$ M; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MİK değerinin 156,3  $\mu$ M olduğu gözlenmiştir. 5a bileşiğinin *B. subtilis*, *E. faecalis* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiklerinden; *P. aeruginosa* bakterisi üzerine olan etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *C. albicans* mayası üzerine olan etkisi ketakonazol antibiyotiğinden yüksek çıkmıştır. 6a bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* bakterileri üzerinde gösterdiği MİK değerinin 625  $\mu$ M; *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* bakterileri üzerinde gösterdiği MİK değerinin 39,1  $\mu$ M; *E. faecalis* ve *E. hirae* bakterileri üzerinde gösterdiği MİK değerinin 78,1  $\mu$ M; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MİK değerinin 156,3  $\mu$ M olduğu gözlenmiştir. 6a bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 ve *K. pneumoniae* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin antibiyotiğinden; *B. cereus* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *B. subtilis*, *S. aureus* ve *E. faecalis* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *E. hirae* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *C. albicans* mayası üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır.

4b-6b bileşiklerinin *E. coli* ATCC 35218 bakterisine karşı gösterdiği MİK değerlerinin 625  $\mu$ M olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiklerin *E. coli* ATCC 35218 bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır. 4b

bileşiminin *B. subtilis* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 39,1 µM; *S. aureus*, *E. faecalis* ve *E. hirae* bakterileri üzerinde gösterdiği MİK değerlerinin 19,5 µM; *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 625 µM; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MİK değerinin 156,3 µM; *C. tropicalis* mayası üzerinde gösterdiği MİK değerinin 39,1 µM olduğu belirlenmiştir. 4b bileşiminin *B. subtilis*, *S. aureus* ve *E. faecalis*, *E. hirae* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *P. aeruginosa* bakterisine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *C. albicans* ve *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır. 5b bileşiminin *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* bakterileri üzerinde gösterdiği MİK değerlerinin <19,5 µM; *S. aureus* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 19,5 µM; *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 625 µM; *E. hirae* bakterisi üzerinde gösterdiği MİK değerinin 39,1 µM; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MİK değerinin 78,1 µM; *C. krusei* mayası üzerinde gösterdiği MİK değerinin <19,5 µM ve *C. tropicalis* mayası üzerinde gösterdiği MİK değerinin 19,5 µM olduğu belirlenmiştir. 5b bileşiminin *B. cereus*, *P. aeruginosa* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. hirae* bakterileri üzerine olan etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır. Bununla birlikte bu bileşimin *C. krusei* mayası üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisinin ise ketakonazol antibiyotiği ile aynı değerde olduğu tespit edilmiştir. 6b bileşiminin *B. subtilis*, *E. faecalis* bakterileri ile *C. krusei* ve *C. tropicalis* mayaları üzerinde gösterdiği MİK değerlerinin <19,5 µM; *S. aureus* ve *E. hirae* bakterileri üzerinde gösterdiği MİK değerlerinin 19,5 µM; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MİK değerinin 78,1 µM olduğu belirlenmiştir. 6b bileşiminin *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. hirae* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır. Bununla birlikte bu bileşimin *C. krusei* mayası üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisinin ise ketakonazol antibiyotiği ile aynı değerde olduğu tespit edilmiştir.



Resim 4.2. Bileşiklerin bakteri ve mayalar üzerindeki MİK, MBK ve MFK görüntüleri

Bileşiklerin MBK değerlerinin 19,5 ile >2500  $\mu\text{M}$  arasında, MFK değerlerinin ise 19,5 ile 2500  $\mu\text{M}$  arasında değiştiği tespit edilmiştir. 4c-4d bileşiklerinin *P. vulgaris* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerlerinin 1250  $\mu\text{M}$  olduğu belirlenmiştir. 4c-4d bileşiklerinin *P. vulgaris* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden daha yüksek çıkmıştır. 5c bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218, *P. vulgaris* bakterileri üzerinde gösterdiği MBK değerlerinin 1250  $\mu\text{M}$ ; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerinde gösterdiği MFK değerlerinin 625  $\mu\text{M}$  olduğu elde edilmiştir. 5c bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218, *P. vulgaris* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır. 5d bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 1250  $\mu\text{M}$ ; *B. cereus*, *S. aureus* bakterileri üzerinde gösterdiği MBK değerlerinin 625  $\mu\text{M}$ ; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerinde gösterdiği MFK değerlerinin 625  $\mu\text{M}$  olduğu belirlenmiştir. 5d bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 ve *B. cereus* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *S. aureus* bakterisine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiklerinden; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiklerinden daha yüksek çıkmıştır.

6c bileşiğinin *C. tropicalis* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 625 µM olduğu elde edilmiştir. 6c bileşiğinin *C. tropicalis* mayası üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır. 6d bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 1250 µM; *B. cereus* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 625 µM; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerinde gösterdiği MFK değerlerinin 625 µM olduğu belirlenmiştir. 6d bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 ve *B. cereus* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır.

4a bileşiğinin *K. pneumoniae* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 625 µM; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerinde gösterdiği MFK değerlerinin 625 µM olduğu belirlenmiştir. 4a bileşiğinin *K. pneumoniae* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır. 5a bileşiğinin *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerinde gösterdiği MFK değerlerinin 312,5 µM olduğu belirlenmiştir. 5a bileşiğinin *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden 4 kat daha yüksek çıkmıştır. 6a bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 1250 µM; *S. aureus* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 156,3 µM; *E. faecalis* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 312,5 µM; *E. hirae* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 78,1 µM; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 625 µM; *C. tropicalis* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 156,3 µM olduğu belirlenmiştir. 6a bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *S. aureus* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *E. hirae* bakterisi üzerine olan etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *C. albicans*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır.

4b bileşiğinin *S. aureus* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 625 µM; *E. faecalis* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 156,3 µM; *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 625 µM; *E. hirae* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 78,1 µM; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 625 µM; *C. krusei* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 78,1 µM; *C. tropicalis* mayası üzerinde gösterdiği MFK

değerinin 39,1  $\mu$ M olduğu elde edilmiştir. 4b bileşiğinin *S. aureus* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *E. faecalis*, *P. aeruginosa* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *E. hirae* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır. 5b bileşiğinin *B. cereus*, *B. subtilis* ve *E. faecalis* bakterileri üzerinde gösterdiği MBK değerinin 19,5  $\mu$ M; *S. aureus* bakterileri üzerinde gösterdiği MBK değerinin 312,5  $\mu$ M; *E. hirae* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 156,3  $\mu$ M; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 156,3  $\mu$ M; *C. krusei* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 19,5  $\mu$ M; *C. tropicalis* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 39,1  $\mu$ M olduğu elde edilmiştir. 5b bileşiğinin *B. cereus*, *B. subtilis* ve *E. faecalis* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *S. aureus*, *E. hirae* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır. 6b bileşiğinin *B. subtilis*, *E. faecalis* bakterileri üzerinde gösterdiği MBK değerinin 19,5  $\mu$ M; *E. hirae* bakterisi üzerinde gösterdiği MBK değerinin 39,1  $\mu$ M; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 156,3  $\mu$ M; *C. albicans* mayası üzerinde gösterdiği MFK değerinin 156,3  $\mu$ M; *C. krusei* ve *C. tropicalis* mayaları üzerinde gösterdiği MFK değerinin 19,5  $\mu$ M olduğu elde edilmiştir. 6b bileşiğinin *B. cereus* ve *E. hirae* bakterileri üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi kloramfenikol antibiyotiğinden; *E. faecalis* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinden; *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* mayaları üzerine olan antimikrobiyal aktivite etkisi ketakonazol antibiyotiğinden daha yüksek çıkmıştır.

Çizelge 4.3. Fosfazen bileşiklerinin MBK, MFK değerleri (µM)

| Test Microorganizmaları              | MBK / MFK Değerleri  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |                 |       |       |
|--------------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
|                                      | Bileşikler (5000 µM) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | Pozitif Kontrol |       |       |
|                                      | 4c                   | 4d    | 5c    | 5d    | 6c    | 6d    | 4a    | 5a    | 6a    | 4b    | 5b    | 6b    | Amp             | C     | Keto  |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 G(-)       | 2500                 | 2500  | 1250  | 1250  | 2500  | 1250  | 2500  | 2500  | 1250  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500            | >2500 | -     |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 G(-)       | 1250                 | 1250  | 2500  | 2500  | 2500  | 1250  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | <19,5           | 1250  | -     |
| <i>B. cereus</i> NRRL B-3711 G(-)    | >2500                | >2500 | >2500 | 625   | 1250  | 625   | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | 19,5  | 1250  | 2500            | 1250  | -     |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 G(+)    | >2500                | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | 625   | >2500 | >2500 | >2500 | 312,5 | 19,5  | 19,5  | 19,5            | 78,1  | -     |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 G(+)     | 2500                 | 2500  | 2500  | 625   | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 156,3 | 625   | 312,5 | 1250  | <19,5           | 2500  | -     |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 G(+)   | 2500                 | 2500  | 2500  | >2500 | >2500 | >2500 | 2500  | 2500  | 312,5 | 156,3 | 19,5  | 19,5  | 312,5           | 625   | -     |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 G(-) | 1250                 | 1250  | 1250  | 1250  | 1250  | 1250  | 1250  | 1250  | 1250  | 625   | 1250  | 1250  | 2500            | 2500  | -     |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883G(-)  | 2500                 | 2500  | 2500  | 2500  | 1250  | 1250  | 625   | 2500  | 1250  | 2500  | 2500  | 2500  | 1250            | 2500  | -     |
| <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028G(-) | 2500                 | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | <19,5           | 1250  | -     |
| <i>E. hirae</i> ATCC 9790 G(+)       | 2500                 | 2500  | >2500 | >2500 | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 78,1  | 78,1  | 156,3 | 39,1  | 39,1            | 2500  | -     |
| <i>P. vulgaris</i> RSKK 96029 G(-)   | 1250                 | 1250  | 1250  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | 2500  | >2500           | 2500  | -     |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231        | 1250                 | 2500  | 625   | 625   | 2500  | 625   | 625   | 312,5 | 625   | 625   | 156,3 | 156,3 | -               | -     | 1250  |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258           | 2500                 | 2500  | 2500  | 625   | 2500  | 625   | 1250  | 625   | 625   | 78,1  | 19,5  | 19,5  | -               | -     | 156,3 |
| <i>C. tropicalis</i> Y-12968         | 1250                 | 1250  | 625   | 625   | 625   | 625   | 625   | 312,5 | 156,3 | 39,1  | 39,1  | 19,5  | -               | -     | 1250  |

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, (4a-6a) ve (4b-6b) bileşiklerinin bakteri ve maya suşlarına karşı etkili MİK ve MBK/MFK aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Bu bileşiklerin bakteri ve mayalar üzerindeki aktivite değerlerinin referans antibiyotiklere göre çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. Sonraki çalışmalarda antimikrobiyal aktivite etkisinin yüksek olduğu elde edilen bu altı bileşiğin antioksidan, genotoksik ve sitotoksik aktivite deneyleri yapılmıştır.

## 4.2. Antioksidan Aktivite

### 4.2.1. DPPH serbest radikalini süpürücü etki

(4a-6a), (4b-6b) bileşiklerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Deney üç kez tekrarlanmıştır. 5000-312,5 µM konsantrasyonlardaki bileşiklerin IC50 değerleri Çizelge 4.4’ de gösterilmiştir. Düşük IC50 değeri daha yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir. Elde edilen bulgulara göre tüm bileşiklerin belirlenen konsantrasyonlarda etkili bir antioksidan aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.4. DPPH serbest radikalini süpürücü etki (IC50 değerleri)

| Bileşikler | IC50 ( $\mu$ M )    |
|------------|---------------------|
| 4a         | 15490,27 $\pm$ 3,23 |
| 5a         | 17378,07 $\pm$ 5,33 |
| 6a         | 17321,17 $\pm$ 3,28 |
| 4b         | 23829,4 $\pm$ 4,04  |
| 5b         | 14331 $\pm$ 5,07    |
| 6b         | 48295,8 $\pm$ 2,28  |
| BHT        | 229,70 $\pm$ 2,92   |

#### 4.2.2. Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi

(4a-6a), (4b-6b) bileşiklerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için bir diğer yöntem olan demir iyonlarını şelatlama aktivitesi araştırılmıştır. 5000-312,5  $\mu$ M konsantrasyonlardaki bileşiklerin IC50 değerleri Çizelge 4.5’de gösterilmiştir. Düşük IC50 değeri daha yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir. Elde edilen bulgulara göre, tüm bileşiklerin belirlenen konsantrasyonlarda etkili bir antioksidan aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5. Bileşiklerin demir iyonlarını şelatlama aktivitesi (IC50 değerleri)

| Bileşikler | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
|------------|-----------------------------|
| 4a         | 43003,82 $\pm$ 2,07         |
| 5a         | 17338,15 $\pm$ 1,7          |
| 6a         | 25921,3 $\pm$ 3,91          |
| 4b         | 9785,5 $\pm$ 2,24           |
| 5b         | 6827,4 $\pm$ 7,23           |
| 6b         | 13638,7 $\pm$ 2,94          |

#### 4.3. Genotoksik Aktivite

Ames testi, bileşiklerin genotoksik aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

##### 4.3.1. Ames testi sonuçları

(4a-6a), (4b-6b) bileşiklerinin genotoksik aktivitesi metabolik aktivasyonun (S9) varlığında ve yokluğunda Ames testi ile değerlendirilmiştir. Bileşiklere toksisite testi uygulanarak toksik olmayan doz seviyeleri belirlenmiştir [155]. Test sonuçlarına göre, 5000  $\mu$ M/plak ve

2500 µM/plak dozlarının S9 karışımı olan ve olmayan *Salmonella* TA98 ve TA100 suşları için herhangi bir toksisite göstermediği belirlenmiştir.

Plak birleştirme yöntemiyle gerçekleştirilen mutajenite testinin geri dönen koloni sayısını ve standart sapmalarını gösteren sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Bileşikler toksik olmayan dozlarda mutajenite açısından test edilmiştir. Deneyler hem metabolik aktivasyonun varlığında hem de yokluğunda yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, bileşiklerin uygulandığı bakteri petri kapları, kontrol petri kapları ile karşılaştırıldığında iki katından fazla bakteri sayısına neden olmadığı gösterilmiştir (Resim 4.3 ve Resim 4.4). Bileşiklerin tamamının toksik olmayan dozlarda mutajenik etkiye sahip olmadığı, bir diğer ifadeyle çerçeve kayması ve baz çifti değişim mutasyonlarına yol açmadığı belirlenmiştir. Bu durum S9 karışımı varlığında da aynı şekilde olmuştur. (Resim 4.5 ve Resim 4.6). Sonuç olarak bileşiklerin promutajenik potansiyele sahip olmadıkları ortaya çıkmıştır.

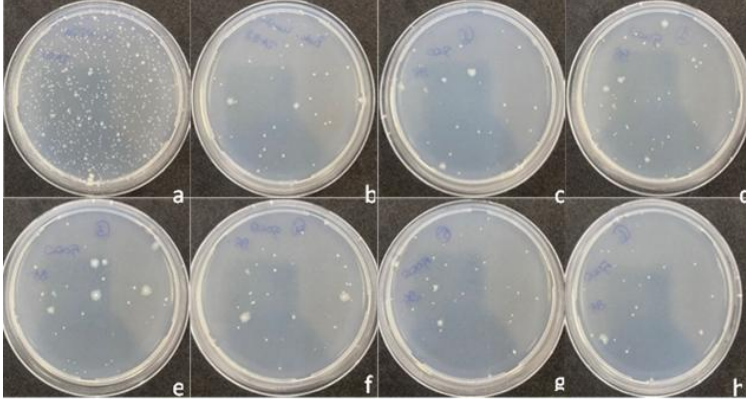
Çizelge 4.6. *S. Typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda bileşiklerin mutajenite (Ames) testi sonuçları

|                              | Konsantrasyon<br>µM/plak | TA 98  |          | TA 100  |          |
|------------------------------|--------------------------|--------|----------|---------|----------|
|                              |                          | S9 (-) | S9 (+)   | S9 (-)  | S9 (+)   |
| <sup>a</sup> Pozitif kontrol |                          | 803±56 | 3068±122 | 2662±36 | 7161±370 |
| <sup>b</sup> Negatif kontrol | 100 µl                   | 40±5   | 45±5     | 144±4   | 131±5    |
| Bakteri kontrol              | 0                        | 39±4   | 41±4     | 146±9   | 162±13   |
| 5a                           | 5000                     | 36±2   | 33±1     | 123±4   | 116±7    |
|                              | 2500                     | 35±4   | 43±3     | 119±11  | 112±6    |
| 6a                           | 5000                     | 54±4   | 64±8     | 209±8   | 221±14   |
|                              | 2500                     | 43±6   | 54±6     | 186±2   | 142±8    |
| 4a                           | 5000                     | 35±2   | 51±6     | 123±2   | 125±14   |
|                              | 2500                     | 30±1   | 44±6     | 131±3   | 118±4    |
| 5b                           | 5000                     | 36±4   | 49±3     | 134±12  | 128±9    |
|                              | 2500                     | 34±3   | 44±2     | 139±6   | 113±14   |
| 6b                           | 5000                     | 37±1   | 41±2     | 130±3   | 112±10   |
|                              | 2500                     | 29±2   | 40±3     | 132±13  | 107±7    |
| 4b                           | 5000                     | 30±3   | 34±5     | 114±3   | 103±1    |
|                              | 2500                     | 37±1   | 42±2     | 133±15  | 104±8    |

<sup>a</sup> Pozitif Kontrol: 2-Aminofloren (7.5 µg/plak) TA98 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanılmıştır; 4-nitro-O-fenilendiamin (5 µg/plak) TA98 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanılmıştır.

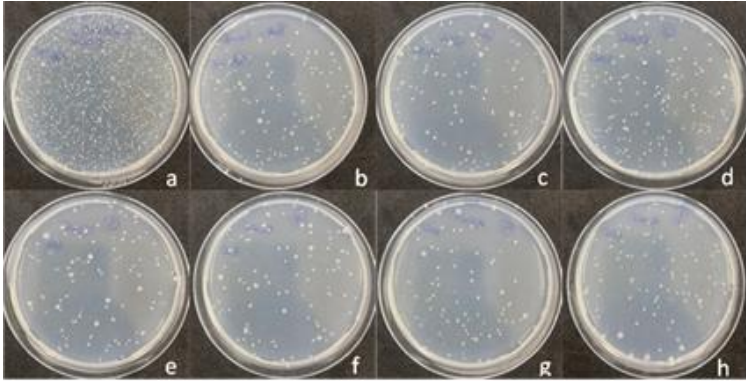
2-Aminoantrasen: (5 µg/plak) TA100 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanılmıştır; Sodyum azit (5 µg/plak) TA100 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanılmıştır.

<sup>b</sup> Negatif Kontrol: DMSO (100 µl/plak) *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları için S9 varlığında ve yokluğunda negatif kontrol olarak kullanılmıştır.



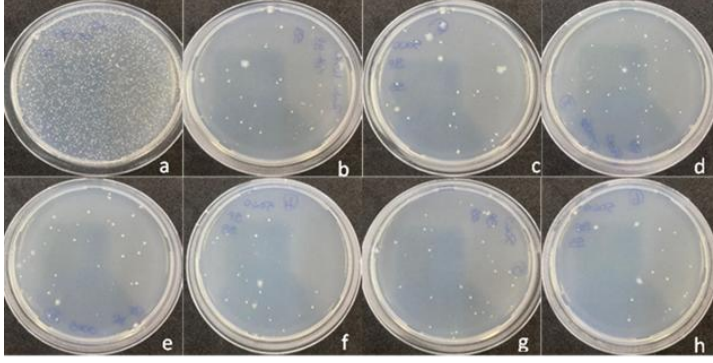
Resim 4.3. *S. typhimurium* TA98 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon sisteminin (S9) yokluğunda bileşiklerin Ames test sonuçları

a) Pozitif kontrol petri kabı (S9 karışımı olmadan 4-NPDA) b) Bakteri kontrol petri kabı (TA98 suşu) c) 5a 5000  $\mu$ M doz d) 6a 5000  $\mu$ M doz e) 4a 5000  $\mu$ M doz f) 5b 5000  $\mu$ M doz g) 6b 5000  $\mu$ M doz h) 4b 5000  $\mu$ M doz



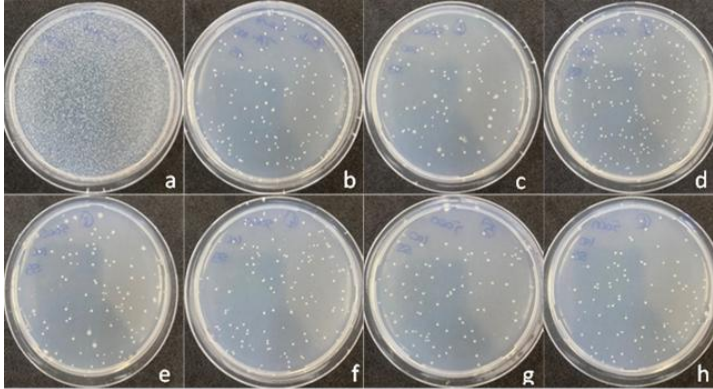
Resim 4.4. *S. typhimurium* TA100 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon sisteminin (S9) yokluğunda bileşiklerin Ames test sonuçları

a) Pozitif kontrol petri kabı (S9 karışımı olmadan Sodium azide) b) Bakteri kontrol petri kabı (TA100 suşu) c) 5a 5000  $\mu$ M doz d) 6a 5000  $\mu$ M doz e) 4a 5000  $\mu$ M doz f) 5b 5000  $\mu$ M doz g) 6b 5000  $\mu$ M doz h) 4b 5000  $\mu$ M doz



Resim 4.5. *S. typhimurium* TA98 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon sisteminin (S9) varlığında bileşiklerin Ames test sonuçları

a) Pozitif kontrol petri kabı (2-AF ile S9 karışımı) b) Bakteri kontrol petri kabı (TA98 suşu)  
c) 5a 5000 µM doz d) 6a 5000 µM doz e) 4a 5000 µM doz f) 5b 5000 µM doz g) 6b 5000 µM doz h) 4b 5000 µM doz



Resim 4.6. *S. typhimurium* TA100 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon sisteminin (S9) varlığında bileşiklerin Ames test sonuçları

a) Pozitif kontrol petri kabı (2-AA ile S9 karışımı) b) Bakteri kontrol petri kabı (TA100 suşu)  
c) 5a 5000 µM doz d) 6a 5000 µM doz e) 4a 5000 µM doz f) 5b 5000 µM doz g) 6b 5000 µM doz h) 4b 5000 µM doz

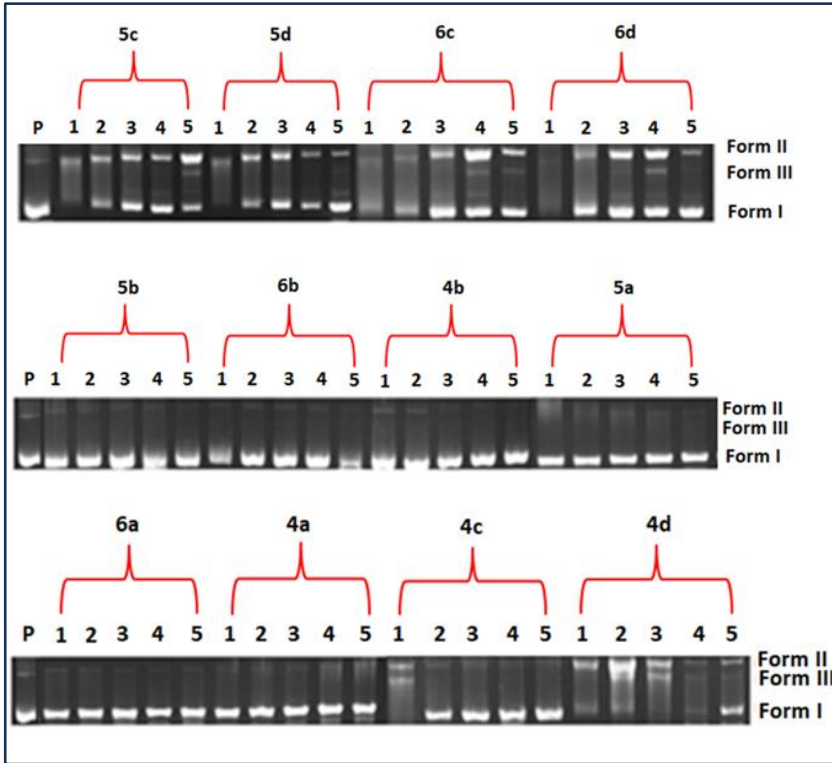
#### 4.4. Bileşiklerin Plazmit DNA ile Etkileşimi

DNA-bileşik etkileşim çalışmaları, bileşiklerin DNA üzerinde degradasyon yapabilme ve bunun sonucunda kırık oluşturabilme aktivitelerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Sağlam çift sarmallı plazmit DNA, süpersarmal DNA adı verilen yapıda, dairesel ve kapalı bir konformasyonda bulunmaktadır. Jel elektroforezi sırasında dairesel plazmit DNA'nın (kapalı

halkasal) Form I, (açık halkasal) Form II ve (doğrusal) Form III olmak üzere üç farklı formu bulunmaktadır. Form I plazmit DNA'nın kesilmeyen, en önde ilerleyen ve en yoğun olan formudur. Eğer plazmit DNA'nın tek zincirinde bir kırılma meydana gelirse, plazmitin yoğun sargılı hali gevşeyerek Form II'ye dönüşmektedir. Form II jelde en yavaş ilerleyen formu oluşturmaktadır. İki zincirin birlikte kırılma durumunda, plazmit DNA Form I ve Form II arasında doğrusal bir form olan Form III'e dönüşmektedir [9, 156, 157].

Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimi, elektroforez ile hızlı bir şekilde görüntülenebilmekte ve bu sayede plazmit DNA konformasyonlarına, boyutlarına ve uzunluklarına göre bantlara ayrılabilir. 4a-6a, 4b-6b, 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d siklotrifosfazatrien bileşiklerinin beş farklı konsantrasyonda değişen konsantrasyonlarının plazmit DNA'nın süpersarmal yapısına etkisi agaroz jel elektroforezi ile araştırılmıştır. Bir sonraki çalışma ile de bileşiklerin belirli nükleotidlere bağlanıp bağlanmadığı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, elde edilen jel görüntüleri Resim 4.7'de verilmiştir. Bileşik ile etkileşime bırakılmayan plazmit DNA pozitif kontrol grubu olarak ilk kuyucuğa yerleştirilmiştir ve "P" ile gösterilmiştir. Jel elektroforezinde genellikle test bileşikleriyle muamele edilmeyen pozitif kontrol için iki temel bant bulunmaktadır [131]. Bu nedenle ilk kuyucukta iki bant olduğu ve bu bantlardan önde yürüyen Form I'in daha yoğun olduğu gözlenmiştir. 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d bileşiklerinin yüksek konsantrasyonlarda uygulandığı durumda Form I bandının yoğunluğunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni, DNA'yı çözebilen bu bileşiklerin süpersarmal sayısını azaltarak kapalı dairesel DNA'nın süpersarmal yoğunluğunu azaltmasıdır. 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d bileşikleriyle plazmit DNA'nın çift zincirinde kılmaya neden olarak Form I yapısını Form III'e dönüştürmüştür. Bununla birlikte 4d bileşiği plazmit DNA'nın konformasyonu üzerinde en çok etki eden bileşik olmuştur. 4a-6a ve 4b-6b bileşiklerinin uygulandığı durumda ise plazmid DNA üzerinde Form I ve Form II DNA'ya karşılık gelen iki bant gözlenmiştir. 4c bileşiği için en yüksek konsantrasyonda Form I bandı gözlenmezken, düşük konsantrasyonlarda Form I bandının yoğunluğu artmaktadır. Ayrıca 6d bileşiği için en yüksek konsantrasyonda Form I ve Form II bantları gözlenmezken, daha düşük konsantrasyonlarda hem Form I hem de Form II bantlarının yoğunlukları artmaktadır. 5c-5d ve 6c bileşiklerinin konsantrasyonu azaldıkça Form I'in hareketliliğini arttırdığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak doğrusal DNA'ya karşılık gelen Form III bandı 4c-4d, 5c-5d ve 6c-6d bileşiklerinin uygulandığı durumda gösterilmiştir. Bu bileşiklerin plazmit DNA üzerinde Form I bandının Form III bandına dönüşümü nedeniyle en etkili olan bileşikler olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmadan sonra bileşiklerin DNA'nın konformasyonu üzerinde oluşturduğu değişikliklere ilişkin daha fazla bilgi edinebilmek için *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir.



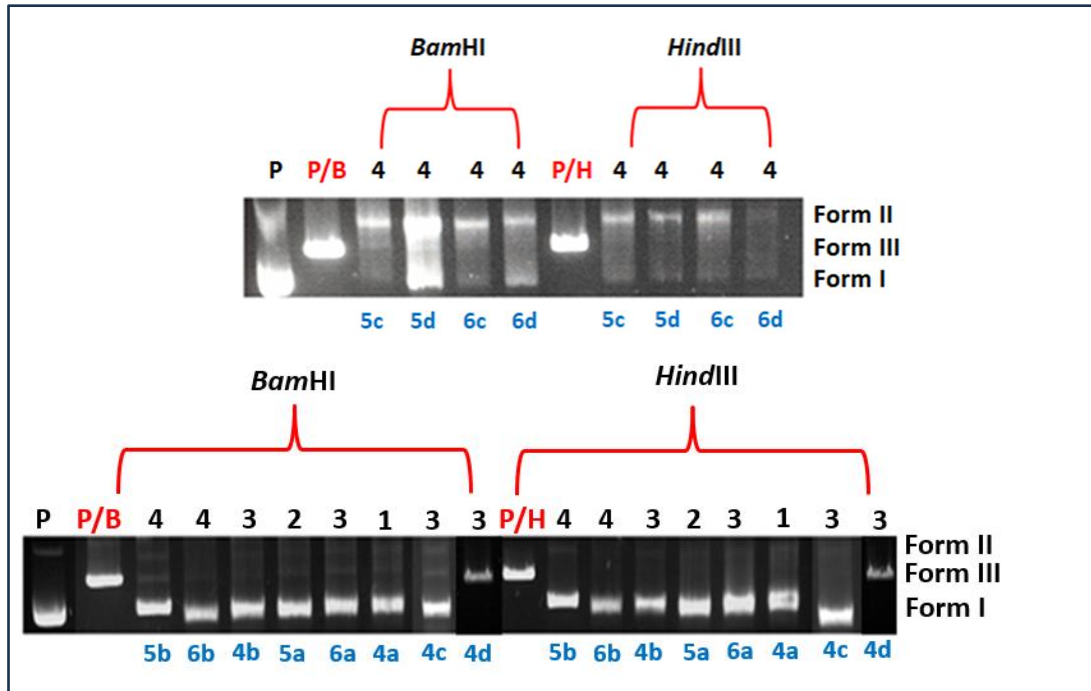
Resim 4.7. Bileşik ve plazmit DNA etkileşiminin agaroz jel elektroforez sonuçları (P): Bileşiklerle muamele edilmemiş plazmit DNA. (5c-5d) ve (6c-6d) bileşikleri için (1): 1250  $\mu$ M; (2): 625  $\mu$ M; (3): 312,5  $\mu$ M; (4): 156,3  $\mu$ M; (5): 78,15  $\mu$ M. (4a-6a), (4b-6b) ve (4c-4d) bileşikleri için (1): 625  $\mu$ M; (2): 312,5  $\mu$ M; (3): 156,3  $\mu$ M; (4): 78,15  $\mu$ M; (5): 39,1  $\mu$ M. Form I: Kapalı halkasal plazmit DNA, Form II: Açık halkasal plazmit DNA, Form III: Doğrusal plazmit DNA.

#### Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri (*Bam*HI ve *Hind*III) ile kesim sonuçları

Bileşiklerin DNA'daki nükleotitlere bağlanma durumlarını belirlemek için farklı konsantrasyondaki bileşiklerle muamele edilen plazmit DNA, *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri Resim 4.8'de verilmiştir. *Bam*HI enzimi plazmit DNA üzerindeki 5'-G/GATCC-3' bölgesini, *Hind*III enzimi ise, 5'-A/AGCTT-3' bölgesini tanıyarak kesmektedir. pBR322 plazmid DNA'nın her

iki enzim için de yalnızca bir bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu nedenle pBR322 plazmid DNA, her iki enzim için süpersarmal Form I ve açık halkasal Form II DNA'yı doğrusal Form III DNA'ya dönüştüren tek bir kesim bölgesi içermektedir [9, 158]. Bileşiklerle muamele edilmeyen kontrol plazmit DNA, *Bam*HI ve *Hind*III enzimleriyle kesildiğinde sadece Form III bandı gözlenmiştir. *Bam*HI enzimi ile kesilen bileşik-DNA karışımlarından 4c, 5c-5d, 4a-6a, 4b-6b bileşiklerinin uygulandığı durumda Form I, II ve III'e karşılık gelen üç bant gözlenmiştir. Bu durum kısmi kesim olduğunu göstermektedir. 6c-6d bileşiklerinin uygulandığı durumda kesim olmadığından Form I, II'ye karşılık gelen iki bant tespit edilmiştir. *Hind*III enzimi ile kesilen bileşik-DNA karışımlarından 4c, 5c-5d, 6c,6d, 4a-6a, 4b-6b bileşiklerinin uygulandığı durumda kesim olmadığından Form I ve II'ye karşılık gelen iki bant gözlenmiştir. Bileşik 4d'nin uygulandığı ve her iki enzimle kesildiği durumda ise, kesimden dolayı Form III'e karşılık gelen tek bant gözlenmektedir.

Sonuç olarak 4d dışındaki tüm bileşiklerin enzim kesimini kısmen veya tamamen engellediği ve DNA üzerindeki A/A, G/G nükleotidlerine bağlanabildiği tespit edilmiştir. 4d bileşiğinin ise plazmit DNA'ya A/A ve G/G nükleotitlerinden bağlanmadığı ve enzim kesiminin gerçekleştiği tespit edilmiştir.



Resim 4.8. Fosfazen bileşikleri ile muamele edilen plazmit DNA'nın *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi (P): Bileşiklerle muamele edilmeyen plazmit DNA; (P/B): *Bam*HI ile kesilen plazmit DNA; (P/H): *Hind*III ile kesilen plazmit DNA

#### 4.5. Sitotoksik Aktivite

Bileşiklerin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi için MTT hücre canlılığı testi uygulanmıştır.

##### 4.5.1. MTT testi sonuçları

Meme kanseri hücrelerine (MDA-MB-231) ve sağlıklı hücrelere (Vero) 24 saat boyunca 50-3,1  $\mu$ M arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanan 4a-6a ve 4b-6b bileşiklerinin sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiştir [20]. Bileşiklerin her iki hücre hattına karşı gösterdiği sitotoksik etki Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak %1 DMSO ve pozitif kontrol olarak cisplatin kullanılmıştır. İstatistiksel analiz ve değerlendirmeler için GraphPad Prism 10.0.2 (232) programı ve Two-way Anova, Mann- Whitney U / T testleri ve korelasyon analizi yapılmıştır.

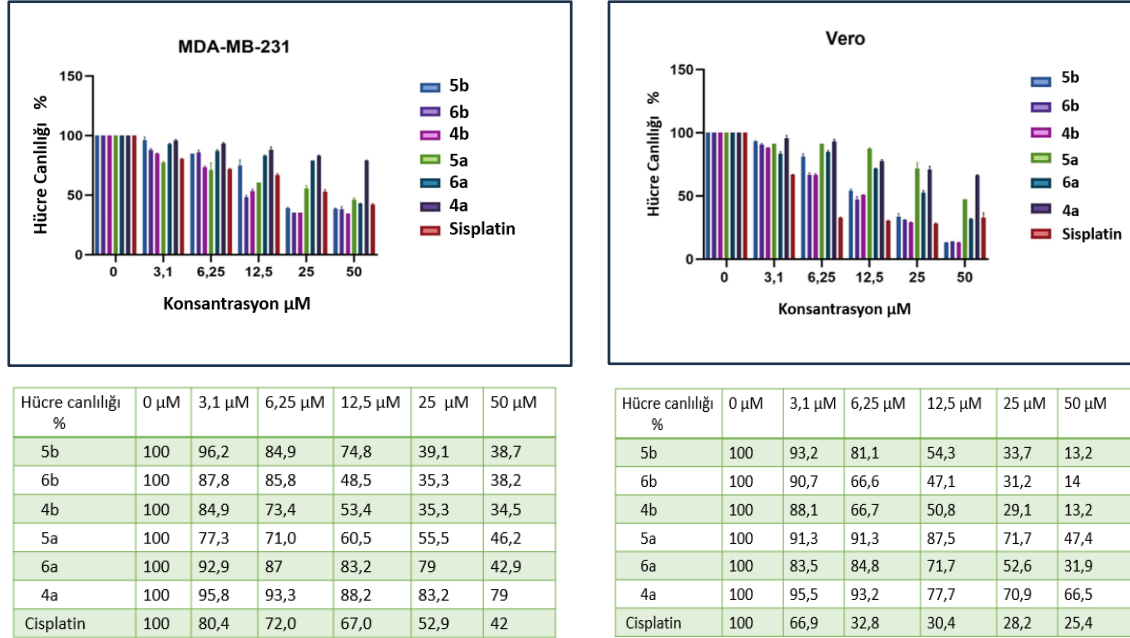
5b bileşiğinin (50-3,1)  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 38,7; 39,1; 74,8; 84,9 ve 96,2 olarak hesaplanmıştır. 6b bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 38,2; 35,3; 48,5; 85,8 ve 87,8 olarak hesaplanmıştır. 4b bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 34,5; 35,3; 53,4; 73,4 ve 84,9 olarak hesaplanmıştır. 5a bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 46,2; 55,5; 60,5; 71,0 ve 77,3 olarak hesaplanmıştır. 6a bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 42,9; 79; 83,2; 87 ve 92,9 olarak hesaplanmıştır. 4a bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 79; 83,2; 88,2; 93,3 ve 95,8 olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatin ilacının ise 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 42; 52,9; 67,0; 72,0 ve 80,4 olarak hesaplanmıştır.

5b bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda Vero sağlıklı hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 13,2; 33,7; 54,3; 81,1 ve 93,2 olarak hesaplanmıştır. 6b bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda Vero sağlıklı hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 14; 31,2; 47,1; 66,6 ve 90,7 olarak hesaplanmıştır. 4b bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda Vero sağlıklı hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 13,2; 29,1; 50,8; 66,7 ve 88,1 olarak hesaplanmıştır. 5a bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda Vero sağlıklı hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 47,4; 71,7; 87,5; 91,3 ve 91,3 olarak hesaplanmıştır. 6a bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda Vero sağlıklı hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 31,9; 52,6; 71,7; 84,8 ve 83,5 olarak hesaplanmıştır. 4a bileşiğinin 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda Vero sağlıklı hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 66,5; 70,9; 77,7; 93,2 ve 95,5 olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan Cisplatin ilacının ise 50-3,1  $\mu$ M aralığında değişen beş farklı konsantrasyonunun uygulanması durumunda Vero sağlıklı hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 25,4; 28,2; 30,4; 32,8 ve 66,9 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen bulgulara göre, bileşiklerin konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak her iki hücre hattında hücre canlılığı yüzdesinin azaldığı tespit edilmiştir. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde, cisplatin ilacına göre en yüksek sitotoksik aktiviteyi 4b bileşiği göstermiştir. 4b bileşiğinden sonra MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde cisplatin ilacına göre bileşiklerin sitotoksik aktivite sıralaması 5a, 5b, 6b, 6a, 4a olarak elde edilmiştir. Bileşiklerin (Vero) sağlıklı hücre hattına etkilerine bakıldığında ise, cisplatin ilacına göre en yüksek sitotoksik aktiviteyi 6b bileşiği göstermiştir. Bununla birlikte bu bileşikten sonra (Vero) sağlıklı hücre hattı üzerinde cisplatin ilacına göre bileşiklerin sitotoksik aktivite sıralaması 4b, 5b, 6a, 5a, 4a olarak elde edilmiştir.

İki farklı hücre hattının birbiriyle karşılaştırıldığı durumda ise, sadece 5a bileşiğinin sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı olarak daha fazla arttığı gösterilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, konsantrasyona bağlı olarak 5a (Spiro[(2-etil-1-ferrosenilmetil)]etan-1, 2-diamino-4, 4, 6, 6-tetrakispropilaminosiklotrifosfazatrien) bileşiği sağlıklı hücrelere göre kanser hücrelerinde

daha yüksek bir sitotoksik etki oluşturmaktadır. T test kullanılarak elde edilen bu sonuca göre p değeri 0,038 bulunarak istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4.1. Bileşiklerin kanser ve sağlıklı hücrelerde sitotoksik potansiyeli

## 5. TARTIŞMA

Bulaşıcı hastalıklar, dünya çapında morbidite ve mortaliteye yol açan küresel bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu hastalıkların nedeni sadece bakteri, virüs ve parazit gibi patojenlere atfedilse de ortaya çıkan araştırmalar, mikrobiyomun da konağın enfeksiyonlara duyarlılığını şekillendirmede ve hastalık sonuçlarını etkilemede önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu ekosistem insan vücudunda cilt, ağız, gastrointestinal sistem ve üreme organları gibi çeşitli yüzeylerde yaşayan bakteriler, virüsler, fungusların bulunduğu çok sayıda mikroorganizmadan oluşmaktadır [38]. Bakteriler mikrobiyal patojenler olarak yaşamı tehdit eden bulaşıcı hastalıkların etken maddeleridir. Bakteriyel patojenler, evrimsel tarih boyunca antimikrobiyal ajanların inhibe eden ve bakterisidal etkilerine direnmenin çeşitli yollarını geliştirmiştir [70]. Bakteriyel direnç, sağlık kuruluşlarında büyük bir endişeye sebep olmaktadır ve dünya çapında antibiyotik kullanımı arttıkça bakteriler antibiyotiklere karşı güçlü bir direnç mekanizması oluşturabilmektedir [59]. Bu nedenle, antimikrobiyal ajanlara karşı bakteriyel direncin önlenmesi için yeni stratejilerin geliştirilmesi istenmektedir [70].

Fosfazen türevleri antikanser, antibakteriyel reaktifler, biyomedikal malzemeler olmak üzere teknolojik ve tıbbi öneme sahip çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [6]. Fosfazen bileşikleri üzerine yapılan çok sayıda çalışmada bu bileşiklerin çeşitli türevlerinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [1, 4, 159, 160]. Biyolojik aktivite çalışmalarında fosfor atomlarına bağlı süstitüentler (pirolidin, piperidin, morfolin, DASD, propilamin, bütüilamin vb.) önemli olmaktadır [159, 161] ve fosfazenlerin biyolojik aktiviteleri, bağlı olan bu yan gruplara göre farklılık göstermektedir.

Cemaloğlu ve çalışma arkadaşlarının (2024) çalışmasında, dispiro- ve trispiro(N/N)siklotrifosfazen bileşikleri sentezlenmiştir. Sentezledikleri cis-3, trans-4, cis-5, trans-6, tct-11 ve ttc-13 olarak isimlendirilen tüm bileşiklerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği, özellikle de *E. coli* 35218, *K. pneumoniae* (ttc-13 hariç), *P. vulgaris* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı pozitif kontrol ampisiline göre çok güçlü antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir [1].

Cemaloğlu ve çalışma arkadaşlarının (2024) çalışmasında, dispiro(N/N)siklotrifosfazen bileşikler sentezlenmiştir. Sentezledikleri fosfazen bileşiklerinin bazı patojen bakteri ve maya türleri üzerinde oldukça güçlü antimikrobiyal aktivite etkisinin olduğu gösterilmiştir. Özellikle trans-8a olarak isimlendirilen bileşiğin *B. cereus* bakterisine karşı (MBC = 78,1  $\mu$ M); cis6b, trans-9a ve cis-9b olarak isimlendirilen bileşiklerin ise, *C. albicans* mayasına karşı (MFC = 156,3  $\mu$ M) oldukça etkili olduğu bildirilmiştir [4].

Tanrikulu ve çalışma arkadaşlarının (2024) çalışmasında, pirolidino (4a-6a), tetrapiperidino (4b-6b), tetramorfolinofosfazenler (4c ve 6c), diklorodimorfolinofosfazen (5c) ve tetra-1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekanofosfazenler(DASD) (4d-6d), tetrakloro-(pdimetilaminobenzil)spiro-(N/N)-siklotrifosfazenler (4, 5, 6) bileşikler sentezlenmiştir. Sentezlenen bütün bileşiklerin patojen bakteri ve mayalar üzerinde etki gösterdiği, özellikle 6b olarak isimlendirilen bileşiğin, *S. aureus* (MIC: 78,1  $\mu$ M) ve *C. tropicalis* (MIC: 19,54  $\mu$ M) mikroorganizmaları üzerinde güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir [159].

Okumuş ve çalışma arkadaşlarının (2022) çalışmasında, tetraaminobis (4-florobenzil)spiro(N/N)siklotrifosfazen bileşikler sentezlenmiştir. Fosfazen bileşiklerinin MİK, MBK ve MFK değerlerinin 312,5 ile > 2500  $\mu$ M arasında değiştiği tespit edilmiştir. (2a-2c) olarak isimlendirilen bileşikler arasından özellikle 2a bileşiğinin kloramfenikol antibiyotiğine kıyasla *E. coli* ATCC 35218 bakterisi üzerinde güçlü bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 2b ve 2c bileşiklerinin ise, *K. pneumoniae* bakterisine karşı, ampisilin antibiyotiğinden daha güçlü aktivite gösterdiği belirlenmiştir [9].

Kuzey ve çalışma arkadaşlarının (2020) çalışmasında, 4-bromobenzil içeren mono- ve dispirosiklotrifosfazen bileşikler sentezlenmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin çalışılan tüm patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle tüm bileşiklerin *E. coli* ATCC 25922 bakterisi üzerinde kloramfenikol referans antibiyotiğinden daha etkili olduğu (5b ve 6b bileşikler dışında), 6a, 7b, 6c ve 7c bileşiklerinin, *E. coli* ATCC 35218 bakterisi üzerinde ampisilin referans antibiyotiği kadar etkili olduğu tespit edilmiştir. Pirolidino-(6a), tetrakloro-(5-7) ve DASD-süstitüe (7b) fosfazenlerin *C. krusei* mayası üzerinde ketokonazol referans antibiyotiği kadar etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, DASD süstitüe fosfazen bileşiklerinin ise, *C. albicans* mayası üzerinde ketokonazol referans antibiyotiğinden daha etkili olduğu bildirilmiştir [162].

Öztürk ve çalışma arkadaşlarının (2019) çalışmasında, N/N-izopropil köprülü bisiklotrifosfazen bileşikler sentezlenmiştir. Sentezledikleri 2a ve 2h olarak isimlendirilen bileşiklerin *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *B. cereus* bakterileri ve *C.krusei* mayası üzerinde güçlü bir antimikrobiyal aktivitesinin olduğu bildirilmiştir [163].

Okumuş ve çalışma arkadaşlarının (2016) çalışmasında, mono(4-nitrobenzil) spirosiklotrifosfazen bileşikler sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşikler arasından 5a ve 6a olarak isimlendirilen bileşiklerin *B. subtilis*; 6a bileşiğinin *B. cereus*, 6 bileşiğinin *S. typhimurium*, *E. coli* ATCC 35218 bakterilerine; 5b ve 6b olarak isimlendirilen bileşiklerin ise *C. tropicalis* mayasına karşı güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir [164].

Elmas ve çalışma arkadaşlarının (2016) çalışmasında, 4-florobenzilspiro (N/O) siklotrifosfazen bileşikler sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşikler arasından 4-florobenzilspiro(N/O)tetrabütülamino (3c) fosfazen bazı ile fosfazenyum tuzları (4c) olarak isimlendirilen bileşiklerin *E. faecalis* bakterisi üzerinde diğer bileşiklere göre daha etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. 4-florobenzilspiro(N/O)tetrapropilamino (3d) ve fosfazenyum tuzları olarak isimlendirilen (4a, 4c, 4d) bileşiklerin *C. albicans mayası* üzerinde önemli ölçüde antimikrobiyal aktivite etkisinin olduğu bulunmuştur [161]. Bu tez çalışmasında da propilamin ve bütülamın süstitüe fosfazen bileşiklerinin güçlü antibakteriyel ve antifungal etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

Farmakolojik aktivite çalışmalarında (antibakteriyel ve antiviral) ferrosen halkası içeren yapıların öncü bileşikler olarak kullanıldığı bilinmektedir [32]. Bu tez çalışması kapsamında başlangıç bileşiği olarak trimerik fosfazen bileşiğinin kullanıldığı mono ve bisferrosenil süstitüe yapılar daha önce sentezlenmiştir ve bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri (antibakteriyel, antifungal, antitüberküloz) araştırılmıştır [33]. Bu tez çalışmasında, biyolojik etkinliği kanıtlanmış olan ferrosenildiaminler ve farklı aminler ile biyoyumlu bir bileşik olan trimerik fosfazen bileşiği bir araya getirilerek orijinal bileşikler sentezlenmiştir. Biyolojik aktivitelerinin detaylı bir şekilde araştırılması için ilk olarak, sentezlenen 4a-6a (propilamin), 4b-6b (bütülamın) ve 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d (metronidazol) süstitüentleri taşıyan monospirosiklotrifosfazen bileşiklerinin patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, bakteri ve mayalarda

referans antibiyotiklerine kıyasla en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren fosfazen bileşikler propilamino (4a-6a) ve bütilamino sübstitüe (4b-6b) türevler olmuştur. Özellikle mayalarda ketokonazol antibiyotiğine kıyasla en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren bileşikler *C. albicans* üzerinde oluşturduğu  $20\pm1$ ,  $17\pm0$  ve  $18\pm0$  mm'lik zon çapı ile bütilamin sübstitüenti taşıyan (4b-6b) siklotrifosfazatrien bileşikler olmuştur. Antimikrobiyal aktiviteye sahip olan propilamino (4a-6a) ve bütilamino sübstitüe (4b-6b) bileşiklerinin bu etkiyi oldukça düşük konsantrasyonlarda (MİK;  $<19,5$  ile  $2500 \mu\text{M}$ ), (MBK;  $19,5$  ile  $>2500 \mu\text{M}$ ), (MFK;  $19,5$  ile  $2500 \mu\text{M}$ ) gösterdiği belirlenmiştir.

Metronidazol molekülü, parazitlere, mikroaerofilik ve anaerobik bakterilere karşı yeni tedavilerin geliştirilmesi için tıbbi kimya alanında büyük ilgi görmektedir. Metronidazol, *Bacteroides fragilis* (penisiline dirençli), *Fusobacterium*, *Helicobacter pylori* ve *Clostridium* anaerobik bakteri türlerinin neden olduğu Crohn hastalığı ve *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* ve *Entamoeba histolytica* bakteri türlerinin neden olduğu trikomoniyaz, giardiyaz ve amipli dizanteri gibi protozoal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, metronidazolün koronavirüs (COVID-19) enfeksiyonunun immünopatolojik belirtilerinin çoğunu etkisiz hale getirebileceği bildirilmiştir. Metronidazol, pasif difüzyon yoluyla bakteri hücre duvarına geçen ve bakterisidal aktivitelerini göstermeden önce hücre içinde aktive olan bir pro-ilaç olarak kullanılmaktadır [36]. Bununla birlikte metronidazol türevi yapıların da antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [34-36]. Bu çalışmada, metronidazol sübstitüenti taşıyan fosfazen bileşiklerinden 4c bileşiği *E. hirae* bakterisine karşı  $21\pm0$  mm'lik zon çapı ile; 4d bileşiği *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ve *S. typhimurium* bakterileri üzerinde sırasıyla  $15\pm0$ ,  $20\pm0$  ve  $20\pm0$  mm'lik inhibisyon zon çapı ile 5c bileşiği *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerinde sırasıyla  $13\pm0$ ,  $17\pm0$  mm'lik zon çapı ile; 5d bileşiği *B. cereus*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* bakterilerine karşı sırasıyla  $8\pm0$ ,  $17\pm0,5$  ve  $13\pm2$  mm'lik inhibisyon zon çapı ile; 6c bileşiği *B. subtilis* ve *K. pneumoniae* bakterileri üzerinde sırasıyla  $15\pm0$  ve  $12\pm0$  mm'lik inhibisyon zon çapı ile; 6d bileşiği *B. subtilis* ve *K. pneumoniae* bakterilerine karşı sırasıyla  $17\pm0$  ve  $13\pm0$  mm'lik inhibisyon zon çapı ile oluşturduğu antimikrobiyal aktivite, ampisilin veya kloramfenikol antibiyotiklerinden daha yüksek çıkmıştır. Tüm mikroorganizmalar göz önüne alındığında,  $5000 \mu\text{M}$  konsantrasyondaki propilamin (4a-6a) ve bütilamin sübstitüenti taşıyan (4b-6b) bileşiklerinin, metronidazol sübstitüenti taşıyan bileşiklere (4c-4d), (5c-5d), (6c-6d) göre daha güçlü bir antimikrobiyal aktivite etkisinin olduğu belirlenmiştir.

### *Bileşiklerin etkinliği*

MİK, MBK/MFK tablolarından elde edilen verilere göre, incelenen bileşiklerin test edilen 14 mikroorganizmayı belirli değerlerde inhibe edebildiği belirlenmiştir. Belirli konsantrasyonlarda mikroorganizmaların üreme ve büyümesini engelleyebilen veya mikroorganizmaları öldürebilen bileşikler, pozitif kontrole kıyasla daha az konsantrasyonun gerektiği durumda etkilidir. Bileşiklerin etkinliği, Çizelge 5.1’de pozitif kontrollerin MİK değeri ile bileşiklerin MİK değerleri arasındaki oran sonucu elde edilerek gösterilmiştir. MİK oranının 1’den yüksek olduğu değerlerde bileşiklerin etkili olduğu mikroorganizmalar Çizelge 5.1’e dahil edilmiştir. Aynı şekilde pozitif kontrollerin MBK/MFK değeri ile bileşiklerin MBK/MFK değerleri arasındaki oran sonucu elde edilerek Çizelge 5.2’de gösterilmiştir ve MBK/MFK oranlarının 1’den yüksek olduğu değerlerde bileşiklerin etkili olduğu mikroorganizmalar Çizelge 5.2’ye dahil edilmiştir. Çizelge 5.1’deki MİK oranına göre, *E. coli* ATCC 35218 bakterisinin, ampisiline kıyasla 4c-4d, 5c-5d ve 6d bileşiklerine 2 kat daha duyarlıyken, 6a, 4b-6b bileşiklerine 4 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *B. cereus* bakterisinin ampisilin ve kloramfenikole kıyasla 6a bileşiğine 4 kat daha duyarlıyken, 5b bileşiğine 8 kattan daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir. *B. subtilis* bakterisinin kloramfenikole kıyasla 4a-6a ve 4b bileşiklerine 2 kat daha duyarlıyken, 5b-6b bileşiklerine 4 kattan daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir. *S. aureus* bakterisinin kloramfenikole kıyasla 6a bileşiğine 4 kat daha duyarlıyken, 4b-6b bileşiklerine 8 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* bakterisinin kloramfenikole kıyasla 4a-5a bileşiklerine 2 kat, 6a bileşiğine 4 kat, 4b bileşiğine 16 kat, 5b-6b bileşiklerine 16 kattan daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir. *P. aeruginosa*, bakterisinin ampisilin ve kloramfenikole kıyasla 4a dışındaki test edilen tüm bileşiklere 4 kattan daha fazla duyarlıyken, 4a bileşiğine 4 kattan daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir. *K. pneumoniae* bakterisinin ampisiline kıyasla 4c-4d, 4a ve 6a bileşiklerine 2 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *E. hirae* bakterisinin kloramfenikole kıyasla 6a bileşiğine 2 kat daha duyarlı, 4b ile 6b bileşiklerine 8 kat daha duyarlı, 5b bileşiğine 4 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *P. vulgaris* bakterisinin hem ampisiline hem de kloramfenikole kıyasla 4c-4d bileşiklerine 2 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *C. albicans* mayasının ketokonazole kıyasla 4c-4d, 5a-6a,4b bileşiklerine 2 kat daha duyarlıyken, 5b-6b bileşiklerine 4 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *C. tropicalis* mayasının ketokonazole kıyasla bileşik 4b’ye 2 kat, 5b’ye 4 kat, bileşik 6b’ye ise 4 kattan daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 5.1. Pozitif kontrollerin MİK değeri ile bileşiklerin MİK değerleri arasındaki oran

| Pozitif Kontrol ile Bileşiklerin MİK Oranı                                                              |          |          |          |    |    |    |    |     |     |                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----|----|----|----|-----|-----|-----------------|
| Bileşiklerin Adı                                                                                        |          |          |          |    |    |    |    |     |     |                 |
| Test Mikroorganizmaları                                                                                 | 4c ve 4d | 5c ve 5d | 6c ve 6d | 4a | 5a | 6a | 4b | 5b  | 6b  | Pozitif Kontrol |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 G(-)                                                                          | 2        | 2        | 6d → 2   |    |    | 4  | 4  | 4   | 4   | AMP             |
| <i>B.cereus</i> NRRL B-3711 G(-)                                                                        |          |          |          |    |    | 4  |    | >8  |     | AMP ve C        |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 G(+)                                                                       |          |          |          | 2  | 2  | 2  | 2  | >4  | >4  | C               |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 G(+)                                                                        |          |          |          |    |    | 4  | 8  | 8   | 8   | C               |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 G(+)                                                                      |          |          |          | 2  | 2  | 4  | 16 | >16 | >16 | C               |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 G(-)                                                                    | >4       | >4       | >4       | >2 | >4 | >4 | >4 | >4  | >4  | AMP ve C        |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 G(-)                                                                    | 2        |          |          | 2  |    | 2  |    |     |     | AMP             |
| <i>E. hirae</i> ATCC 9790 G(+)                                                                          |          |          |          |    |    | 2  | 8  | 4   | 8   | C               |
| <i>P. vulgaris</i> RSKK 96029 G(-)                                                                      | 2        |          |          |    |    |    |    |     |     | AMP ve C        |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231                                                                           | 2        |          |          |    | 2  | 2  | 2  | 4   | 4   | K               |
| <i>C. tropicalis</i> Y-12968                                                                            |          |          |          |    |    |    | 2  | 4   | >4  | K               |
| *Ampisilin (AMP), Kloramfenikol (C) (antibakteriyel) ve Ketokonazol (K) (antifungal) pozitif kontroller |          |          |          |    |    |    |    |     |     |                 |

Çizelge 5.2'deki MBK/MFK oranlarına göre, mikroorganizmaların öldürülmesinde ampisilin, kloramfenikol ve ketokonazol referans antibiyotiklerine kıyasla tüm bileşiklerin genel olarak 2, >2, 4, 8 kat etkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle *B.cereus* bakterisinin ampisiline göre 5b bileşiğine 128 kat, kloramfenikole göre 64 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* bakterisinin ampisilin göre 5b-6b bileşiklerine 16 kat, kloramfenikole göre 32 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *E. hirae* bakterisinin kloramfenikole göre 6a ve 4b bileşiklerine 32 kat, 6b bileşiğine 64 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *C. tropicalis* mayasının ketokonazole kıyasla 4b-5b bileşiklerine 32 kat, 6b bileşiğine ise 64 kat daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 5.2. Pozitif kontrol ile bileşiklerin MBK ve MFK arasındaki oran

| Pozitif Kontrol ile Bileşiklerin MBK ve MFK oranı |       |       |       |       |         |       |     |    |       |      |         |         |                 |
|---------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-----|----|-------|------|---------|---------|-----------------|
| Bileşiklerin Adı                                  |       |       |       |       |         |       |     |    |       |      |         |         |                 |
| Test Microorganizmaları                           | 4c    | 4d    | 5c    | 5d    | 6c      | 6d    | 4a  | 5a | 6a    | 4b   | 5b      | 6b      | Pozitif Kontrol |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 G(-)                    |       |       | 2, >2 | 2, >2 |         | 2, >2 |     |    | 2, >2 |      |         |         | AMP ve C        |
| <i>B. cereus</i> NRRL B-3711 G(-)                 |       |       |       | 4, 2  | 2 (AMP) | 4, 2  |     |    |       |      | 128, 64 | 2 (AMP) | AMP ve C        |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 G(+)                 |       |       |       |       |         |       |     |    |       |      | 4       | 4       | C<br>AMP (6c)   |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 G(+)                  |       |       |       | 4     |         |       |     |    | 16    | 4    | 8       | 2 (C)   | C               |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 G(+)                |       |       |       |       |         |       |     |    | 2     | 2, 4 | 16, 32  | 16, 32  | AMP ve C        |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 G(-)              | 2     | 2     | 2     | 2     | 2       | 2     | 2   | 2  | 2     | 4    | 2       | 2       | AMP ve C        |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 G(-)              |       |       |       |       | 2 (C)   | 2 (C) | 2,4 |    | 2 (C) |      |         |         | AMP ve C        |
| <i>E. hirae</i> ATCC 9790 G(+)                    |       |       |       |       |         |       |     |    | 32    | 32   | 16      | 64      | C               |
| <i>P. vulgaris</i> RSKK 96029 G(-)                | >2, 2 | >2, 2 | >2, 2 |       |         |       |     |    |       |      |         |         | AMP ve C        |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231                     |       |       | 2     | 2     |         | 2     | 2   | 4  | 2     | 2    | 8       | 8       | K               |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258                        |       |       |       |       |         |       |     |    |       | 2    | 8       | 8       | K               |
| <i>C. tropicalis</i> Y-12968                      |       |       | 2     | 2     | 2       | 2     | 2   | 4  | 8     | 32   | 32      | 64      | K               |

\*Ampisilin (AMP), Kloramfenikol (C) (antibakteriyel) ve Ketokonazol (K) (antifungal) pozitif kontroller

### Bakteriyel ve fungal duyarlılık

Çalışmada kullanılan monospirosiklotrifosfazen bileşiklerinin patojenik mikroorganizmalar üzerindeki MİK sonuçlarına göre, <19,5 µM konsantrasyonu ile 5b bileşiğinin *B.cereus* bakterisi; 5b-6b bileşiklerinin *B. subtilis*, *E. faecalis* bakterileri ve *C. krusei* mayası; 6b bileşiğinin ise *C. tropicalis* mayası üzerinde güçlü bir şekilde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte 19,5 µM konsantrasyonu ile 4b bileşiğinin *E. faecalis* ve *E.hirae*; 4b-6b bileşiklerinin *S.aureus*; 5b bileşiğinin ise *C. tropicalis* mayası üzerinde güçlü bir şekilde etkili olduğu tespit edilmiştir. 4a dışındaki test edilen tüm bileşikler *P. aeruginosa* bakterisini 625 µM konsantrasyonunda etkilemiştir. Genel olarak MİK sonuçları bileşiklerin patojen büyümesini yaklaşık 625 µM'daki ortalama bir konsantrasyonda engellemede etkili olduğunu gösterirken, MBK sonuçları ise bileşiklerin mikroorganizmayı yaklaşık 1250 ve 2500 µM'daki konsantrasyonlarda öldürmede etkili olduğunu göstermektedir. Mikroorganizmaların büyümesini engellemede en etkili bileşiklerin *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* bakterileri ve *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* mayaları üzerinde, 4a-6a bileşikleri ile 4b-6b bileşikleri olduğu belirlenmiştir.

MBK ve MFK sonuçlarına göre bakıldığında *B.cereus*, *B.subtilis*, *E. faecalis*, *C.krusei*, *C.tropicalis* mikroorganizmalarının bu çalışmadaki monospirosiklotrifosfazen bileşikler tarafından en çok etkilenen türler olduğu tespit edilmiştir. Tüm bileşikler çeşitli patojenik mikroorganizmalar üzerinde bir etkiye sahip olmakla birlikte 5b-6b bileşikler *B.cereus*, *B.subtilis*, *E. faecalis*, *C.krusei*, *C.tropicalis* mikroorganizmalarını öldürmede en etkili bileşiklerdir. Özellikle bileşik 5b, *B.cereus* bakterisi üzerinde ampisilin antibiyotiğine kıyasla 124 kat, ketokonazol antibiyotiğine kıyasla 64 kat daha yüksek bir hassasiyete sahiptir. Elde edilen verilere göre, çalışmada kullanılan tüm bileşiklerin çeşitli patojen bakteri ve mayalar üzerinde antimikrobiyal ajan olma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle propilamin ve bütülin fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerin metronidazol grubuna sahip olanlardan daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışması, kullanılan bileşiklerle yapılan ilk antimikrobiyal aktivite çalışmasıdır ve propilamin/bütülin fonksiyonel gruplarına sahip bileşiklerin, yeni bir antibiyotiğin geliştirilmesinde potansiyel açıdan önemli olan antimikrobiyal etkilere sahip olabileceğini göstermektedir.

#### *Bakteriyostatik ve bakterisidal ilaç*

Antibakteriyel ilaçlar bakteriyostatik ve bakterisidal olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. İlaçların in vitro antimikrobiyal aktivitesi genellikle MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesiyle değerlendirilmektedir. MİK bakteriyel büyümenin engellendiği minimum ilaç konsantrasyonunu ifade ederken, MBK bakterilerin öldürüldüğü minimum konsantrasyonu göstermektedir [165]. Bakterisidal antibiyotikler bakterileri öldürerek etki etmektedir [166]. Bakterisidal ilaçlar için genellikle MBK değeri, MİK değeri ile aynıdır veya en çok dört katıdır. Bakterisidal ilaçlar arasında beta-laktamlar (ampisilin), vankomisin, aminoglikozitler, florokinolonlar, daptomisin ve metronidazol bulunmaktadır [165, 167]. Bakteriyostatik antibiyotikler ise bakterilerin büyümesini engelleyerek etki etmektedir [166]. Bakteriyostatik ilaçların MBK değeri, MİK değerinin dört katından daha yüksek olmaktadır. Bakteriyostatik ilaçlar arasında makrolidler, klindamisin, tetrasiklinler, sülfonamidler, linezolid ve kloramfenikol bulunmaktadır [165].

Çizelge 5.3 mevcut çalışmada farklı bakteri türleri üzerinde test edilen bileşiklerin MİK ve MBK değerlerini göstermektedir. Bakteriyostatik bir ilaç olarak sınıflandırılan kloramfenikol açık yeşil renkte gösterilmiştir [165]. Kloramfenikolün test edilen çeşitli

bakterilere etkisi, bakteri türleri ile hem MBK hem de MİK değerlerinin değişmesinden dolayı farklılık gösterebilmektedir. Bakteriyostatik bir ilaç için MBK değeri genellikle MİK değerinden dört katından daha yüksek olmaktadır ve bu durumda yeşilin tonu daha açık olarak gösterilmiştir [165]. Beklendiği gibi, kloramfenikolün MBK değerleri çoğunlukla MİK değerlerinin dört katından daha fazladır ve test edilen 11 bakterinin 6'sında bu durum görülmektedir. Bu gözlem, kloramfenikolün bakteriyostatik bir ilaç olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır. Kloramfenikolden ayırt etmek için ampisilin ilacına ise, turuncu rengi verilmiştir (Çizelge 5.3). Bakteriyostatik bir ilaç olan kloramfenikolün aksine, ampisilin bir bakterisidal bir ilaçtır [167]. Bakterisidal ilaçlar için MBK değerinin MİK değerine eşit olması veya en çok dört katı olması gerekmektedir ve bu durum çizelgede koyu turuncu rengi ile gösterilmiştir [165]. Beklendiği gibi ampisilin ilacı için MBK değeri, MİK değeri ile aynıdır veya MBK değeri MİK değerinin en çok dört katıdır. Test edilen 11 bakteriden 9'unda bu analiz sonucu koyu turuncu rengi ile gösterilmiştir.

Çizelge 5.3'ten elde edilen verilerin analizi sonucunda, bu çalışmada test edilen fosfazen bileşiklerinin çoğunluğu ampisilinin gösterdiği bakterisidal etkiye benzer bir etki göstermektedir. Bu durum, çoğunlukla bileşiklerin MBK değerinin MİK değerine eşit olması veya en çok dört katı olması ile desteklenmektedir (daha koyu turuncu rengi). Bazı durumlarda ise MBK değeri MİK değerinin dört katından fazladır (daha açık turuncu rengi). Bu nedenle, mevcut çalışmada test edilen fosfazen bileşiklerinin bakteriyostatik ilaçlardan ziyade bakterisidal ilaç olarak kullanılmaya aday olduğu sonucuna varılabilmektedir.



hesaplanması, bu moleküllerin tıbbi uygulamalarda kullanımının belirlenmesinde önemli bir göstergedir [168]. Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında en sık kullanılanlar DPPH serbest radikalini süpürücü etki ve Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesidir [114, 169-171]. Literatürde farklı siklotrifosfazen türevi bileşiklerinin antioksidan aktivite gösterdiği ve polifosfazen bileşiklerine antioksidan moleküllerinin bağlandığı çalışmalar bulunmaktadır [9, 168, 172, 173]. Bu tez çalışmasındaki fosfazen türevlerinin antioksidan aktivitelerini incelemek için DPPH ve Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivite yöntemi kullanılmıştır ve bileşiklerin antioksidan aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. DPPH ve demir şelatlama yöntemlerindeki DPPH, ferrozin ve  $\text{FeCl}_2$  konsantrasyonu, ışık, inkübasyon süresi gibi reaksiyon koşullarındaki farklılıkların sonuçlarda değişikliğe neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte bu yöntemler için kullanılan bileşik konsantrasyonlarında antioksidan aktivitenin olmaması, reaksiyon koşullarından dolayı veya bileşik konsantrasyonunun düşük olması olasılığını düşündürmektedir. Bu nedenle kullanılan bileşikler için farklı antioksidan aktivite belirleme yöntemleri kullanılarak, daha yüksek konsantrasyonlarda antioksidan aktivitenin incelenmesi önerilmektedir.

Genotoksisite testleri çok sayıda kimyasal ajanın genotoksik, kanserojenik ve mutajenik etkilerinin tespitinde, ilaçların piyasada kullanılmadan önce güvenirliliğinin ve ilaç tedavisi gören hastalardaki genetik etkilerinin incelenmesinde, oluşan genetik hasar ve hastalıklar arasındaki ilişkinin saptanmasında, kansere duyarlılığının belirlenmesi ve takibinin yapılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [143]. Bileşiklerin genotoksik aktivitesinin belirlenmesinde tek bir testin yeterli olmadığı, bundan dolayı bileşiklerin genotoksik aktivitesinin tayininde birden fazla testin kullanılması gerektiği bildirilmiştir [143, 174-180]. Ames, Komet, Kromozom anormallikleri testi, Kardeş kromatit değişimi testi ve Mikronükleus testleri, genotoksisitesi araştırılmak istenen bileşiklerin karsinojenik ve mutajenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan mutajenite testleridir [143]. Yapılan çalışmalarda, bazı fosfazen türevleri ve farklı bileşiklerin genotoksik aktivitesinin belirlenebilmesi için Ames ve Komet test yöntemleri kullanılmıştır [2, 10, 181-184]. Ames testi gen mutasyonlarına yol açan genetik hasara neden olabilen bileşiklerin tanımlamada kullanılan bakteriyel testtir [10]. Bu tez çalışmasında da propilamin (4a-6a) ve bütülin (4b-6b) sübstitüenti taşıyan bileşiklerin genotoksik aktivitelerinin tespiti için Ames testi kullanılmıştır ve bileşiklerin promutajenik potansiyele sahip olmadığı gözlenmiştir.

Küresel bir sağlık problemi olan kanser, organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi, çoğalması ve birikmesi sonucu oluşarak tek bir organı etkileyebilmekte veya diğer organlara yayılabilmektedir. Kanser tedavisinde bazı standartlar belirlenmiş olsa da her kanser türü için cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, kök hücre tedavisi ve fotodinamik tedavi gibi birçok farklı yöntem uygulanmaktadır. Antitümör ilaçlar patolojik olarak hızla çoğalan kanser hücreleri ile birlikte normal hücreler üzerinde de etkili olmaktadır. Bu nedenle, çoğu kanser ilacı, kemik iliği, kan hücreleri ve hızla çoğalan hücreleri içeren diğer dokular üzerinde de yan etkilere sahiptir. Bu ilaçlar, DNA'da önemli bir yan etkiye neden olmadan sadece kontrolsüzce bölünen hücreleri hızla öldürebilecek yeni moleküller olarak, tasarlanıp geliştirilmekte ve bu alandaki araştırmalar hızla artmaya devam etmektedir. Yaygın olarak kullanılan birçok antikanser ilacının, DNA molekülleriyle doğrudan etkileşime girerek veya DNA'ya bağlı protein ve enzimlerin çalışmasını engellediği düşünülmektedir [2]. Yapılan çok sayıda çalışmada peptidler ve fosfazen türevlerinin antikanser ajanları olarak kullanıldığı bilinmektedir [1, 2, 159].

DNA ile bileşiklerin etkileşiminden kaynaklanan ve DNA konformasyonunda meydana gelen değişiklikler, DNA'yı kesme veya DNA'nın nükleotitlerine bağlanma nedeniyle meydana gelebilmektedir [15]. Plazmit DNA'nın bileşiklerle etkileşimini değerlendirilmesinde agaroz jel elektroforezi tekniği kullanılmaktadır [128]. Agaroz jelde meydana gelen elektroforetik hareketlilik, her bileşiğin plazmit DNA'nın süper sarmal konformasyonunu çözme yeteneğiyle belirlenmektedir. Agaroz jel elektroforezinde genellikle test edilecek bileşik ile muamele edilmeyen pBR322 plazmit DNA (pozitif kontrol) için iki temel bant bulunmaktadır. Bileşiklerin DNA'yı kesme yeteneği, dairesel (süpersarmallı) Form I DNA'nın, (çentikli, açık halkasal) Form II ve (doğrusal) Form III DNA'ya dönüşümüyle belirlenmektedir [1, 159]. *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri, G/GATCC ve A/AGCTT dizilerini tanıyarak işlev görmektedir [159, 185]. Bu enzimler de bileşik ve pBR322 plazmid DNA'sı arasındaki endonükleaz restriksiyonunu analiz ederek, bileşiklerin G/G veya A/A bölgelerine olan afinitesini belirlemek için kullanılmaktadır. Plazmit DNA bu restriksiyon endonükleaz enzimleri tarafından kesildiğinde Form I ve Form II DNA bantları, doğrusal Form III yapısına dönüşmektedir [131, 159].

Bileşik-DNA etkileşimleri üzerine yapılan çalışmalarda fosfazenlerin DNA'ya bağlanabildiği bilinmektedir [2]. Fosfazen türevlerinin DNA üzerindeki etkisi, fosfazen

bileşigine bağlı fonksiyonel gruplara göre değişebilmektedir. Aziridin sübstitüenti taşıyan siklotrifosfazenlerle yapılan bir çalışmada, bu bileşiklerin DNA'yı parçaladığı ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir [2, 186]. (4-florobenzil) spiro grupları ve ikincil amino grupları olan fosfazen türevleri ile ilgili yapılan bir çalışmada da, bu bileşiklerin pBR322 plazmid DNA süpersarmal yapısının çözülmesinde ve hareketliliğini değiştirmede etkili olduğu gösterilmiştir [2, 187].

Cemaloğlu ve çalışma arkadaşlarının (2024), dispiro- ve trispiro(N/N)siklotrifosfazen bileşiklerini sentezlediği çalışmada, (cis-3, trans-4, cis-5, trans-6, tct-11 ve ttc-13) olarak isimlendirilen bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimi incelenmiştir. Bileşikler (2500-156,2  $\mu$ M) arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Cis-3, cis-5 ve trans-6 bileşiklerinin plazmit DNA'nın çift sarmal yapısında kırılmaya neden olduğu ve Form III doğrusal DNA'nın oluştuğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin konsantrasyonunun artmasıyla, Form I DNA bandının yoğunluğu kademeli olarak azalırken, Form II DNA bandı ve Form III DNA bandı yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda Form I bandının hareketliliğinin tüm bileşiklerin konsantrasyonlarının artmasıyla azaldığını tespit edilmiştir. Bileşiklerin DNA konformasyonunda oluşturduğu değişikliklere ilişkin daha fazla bilgi sağlamak için *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesimi incelenmiştir. Test edilen bileşiklerle muamele edilmeyen pBR322 plazmit DNA enzimlerle kesildiğinde sadece Form III bandının oluştuğu gösterilmiştir. Cis-3, trans-4, cis-5, trans-6, tct-11 ve ttc-13 bileşik-DNA karışımın *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesiyle, çalışmada kullanılan fosfazen türevi bileşiklerin DNA'daki G/G ve A/A nükleotitlerine bağlanarak enzim kesimini kısmi olarak engellediği bildirilmiştir [1].

Cemaloğlu ve çalışma arkadaşlarının (2024) çalışmasında, dispiro(N/N)siklotrifosfazen bileşikleri sentezlenmiştir ve (6a–11a ve 6b–11b) olarak isimlendirilen bu bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimi incelenmiştir. Bileşikler (2500-156,3  $\mu$ M) arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Trans-8a, cis-8b ve trans-9a bileşiklerinin en yüksek konsantrasyonda uygulandığı durumda (2500  $\mu$ M) herhangi bir DNA bandı gözlenmemiştir. Aynı zamanda, trans-6a, trans-7a, cis-9b, trans-10a ve cis-11b bileşiklerinin plazmit DNA'nın tek zincirinde kırılmaya neden olması sonucunda Form I DNA konsantrasyonunda azalma ve Form II DNA konsantrasyonunda artma tespit edilmiştir. Trans-7a, trans-9a ve trans-10a bileşiklerinin ise plazmit DNA'nın çift zincirinde kırılmaya neden olduğu ve doğrusal Form III DNA bandının oluştuğu tespit edilmiştir. (Trans 6a–11a ve cis 6b–11b)

bileşik-DNA karışımlarının *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesiyle, bu bileşiklerin plazmit DNA'nın G/G, A/A nükleotidlerine bağlanarak enzim kesimini kısmi olarak engellediği bildirilmiştir [4].

Tanrikulu ve çalışma arkadaşlarının (2024) çalışmasında, pirolidino (4a-6a), tetrapiperidino (4b-6b), tetramorfolinofosfazenler (4c ve 6c), diklorodimorfolinofosfazen (5c) ve tetra-1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekanofosfazenler(DASD) (4d-6d), tetrakloro-(pdimetilaminobenzil)spiro-(N/N)-siklotrifosfazenler (4, 5, 6) bileşikleri sentezlenmiştir ve bu bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimi incelenmiştir. Bileşikler (5000-312,5  $\mu$ M ve 1250-78,1  $\mu$ M) arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda 4, 5, 6 ve 5c bileşiklerinin plazmit DNA'nın parçalanmasına neden olduğu ve Form III DNA'nın oluştuğu tespit edilmiştir. 5c bileşiğinin uygulandığı durumda Form I ve Form II'nin hareketliliğinin azaldığı ve 4, 5, 6 ve 5c'nin test edilen bileşikler içinde en etkili bileşikler olduğu gösterilmiştir. Bileşik-DNA karışımlarının *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesildiği durumda, 4a-6d bileşiklerinin (5c) hariç Form I, II ve III DNA bantlarının oluşumuna neden olduğu ve bileşiklerin plazmit DNA'daki G/G, A/A nükleotitlerine bağlanarak enzim kesimini kısmi olarak engellediği bildirilmiştir.

Okumuş ve çalışma arkadaşlarının (2022), tetraaminobis (4-florobenzil)spiro(N/N)siklotrifosfazen bileşiklerini sentezlediği çalışmada, (2a-2c) olarak isimlendirilen bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimi incelenmiştir. Bileşikler (5000-312,5 $\mu$ M) arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. 2b-2c bileşiklerinin uygulandığı durumda, plazmit DNA'nın çift sarmal yapısında kırılmaya sebep olduğu ve Form III doğrusal DNA'nın oluştuğu tespit edilmiştir. Bileşik-DNA karışımlarının *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesiyle, Form I ve Form II DNA bantları gözlemlenmiştir ve bileşiklerin plazmit DNA'daki G/G, A/A nükleotit bölgelerine bağlanarak enzim kesimini engellediği bildirilmiştir [9].

İşcan ve çalışma arkadaşlarının (2020) çalışmasında, benzil pendant kollarına sahip (N/O) mono- ve dispirosiklotrifosfazen türevleri sentezlenerek bu bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimine bakılmıştır. Bileşikler (2500-312,5  $\mu$ M) arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, 3,4,15 olarak isimlendirilen bileşiklerin uygulandığı durumun dışında, konsantrasyonun azalması ile birlikte Form I ve Form II DNA gözlemlenmiştir. 3 ve 4 olarak isimlendirilen bileşiklerin plazmit DNA'yı parçaladığı

gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda bileşik 15'in kullanıldığı durumda ise, Form III doğrusal DNA bandı tespit edilmiştir. Konsantrasyonun azalmasıyla birlikte Form I ve II bant yoğunluğunun arttığı bildirilmiştir [188].

Öztürk ve çalışma arkadaşlarının (2019) çalışmasında, N/N-izopropil köprülü bisiklotrifosfazen bileşikler sentezlenmiştir ve bu bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimine bakılmıştır. Bileşikler (2500-78  $\mu$ M) arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. 2d ve 2h olarak isimlendirilen bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşiminde genel olarak Form I ve Form II DNA bantlarının oluştuğu, özellikle pirolidin süstitüe olan 2h bileşiğinin konsantrasyonun azalmasına bağlı olarak Form I bandının yoğunluğunda artış olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, 2h bileşiğinin uygulanmasına bağlı olarak doğrusal Form III bandının oluştuğu tespit edilmiştir. Bileşik-DNA karışımlarının *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesildiği durumda ise, tüm bileşiklerin enzim kesimini engelleyerek DNA'nın G/G, A/A nükleotit bölgelerine bağlandığı bildirilmiştir. [163].

Tanrikulu ve çalışma arkadaşlarının (2019), Cl değiştirme reaksiyonları ile heksaklorosiklotrifofazen, spirosiklotrifosfazen türevlerinin sentezlediği çalışmada, (1b, 1c, 3b-5b ve 6) olarak isimlendirilen bileşiklerin, plazmit DNA ile etkileşimleri incelenmiştir. Bileşikler (2000-125  $\mu$ M) arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, 3b-5b bileşiklerinin, Form I, Form II plazmit DNA'nın hareketliliğinde ve yoğunluğunda azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. 1b, 1c ve 6 bileşiklerinin ise plazmit DNA'nın çift sarmal yapısında kırılmaya sebep olduğu ve Form III doğrusal DNA bandının oluştuğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte tüm bileşiklerin *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildiği durumda, G/G, A/A nükleotitlerine bağlanarak enzim kesimini inhibe ettiği bildirilmiştir [131].

Bu tez çalışmasında da kullanılan siklotrifosfazen bileşiklerinin plazmit DNA ile olan etkileşimi agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Bileşikler (1250-78,15  $\mu$ M ve 625-39,1  $\mu$ M) arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda özellikle metronidazol süstitüenti taşıyan (4c-4d), (5c-5d), (6c-6d) bileşiklerinin plazmit DNA'nın çift sarmal yapısında kırılmaya neden olarak Form III doğrusal DNA'nın oluştuğu tespit edilmiştir. Propilamin (4a-6a) ve bütülin süstitüenti taşıyan (4b-6b) bileşiklerinin uygulandığı durumda, plazmid DNA üzerinde Form I ve Form II DNA'ya karşılık gelen iki bant gözlenmiştir. Test edilen bileşikler arasından 4d bileşiğinin ise plazmit DNA'nın

konformasyonu üzerinde en çok etki eden bileşik olduğu gözlemlenmiştir. (5c-5d) ve 6c bileşiklerinin yüksek konsantrasyonlarda uygulandığı durumda Form I yapısının hareketliliğini azalttığı belirlenmiştir. Aynı zamanda, 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d bileşiklerinin yüksek konsantrasyonlarda uygulandığı durumda Form I bandının yoğunluğunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. 4c bileşiği için en yüksek konsantrasyonda Form I bandı gözlenmezken, düşük konsantrasyonlarda Form I bandının yoğunluğu artmaktadır. 6d bileşiği için en yüksek konsantrasyonda Form I ve Form II bantları gözlenmezken, daha düşük konsantrasyonlarda hem Form I hem de Form II bantlarının yoğunlukları artmaktadır. Çalışmada kullanılan fosfazen bileşikleriyle etkileşime giren DNA, *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildiği durumda ise, 4d dışındaki tüm bileşiklerin enzim kesimini kısmen veya tamamen engellediği ve DNA üzerindeki A/A, G/G bölgelerinden bağlanabileceği tespit edilmiştir.

Literatürde, çalışmada kullanılan fosfazen bileşiklerinin plazmit DNA ile olan etkileşimi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır ve çalışma sonucunda elde edilen veriler mevcut olan araştırmaları desteklemektedir. Bu tez çalışmasında fosfazen türevi bileşiklerin biyolojik aktivitesi ve DNA ile etkileşimi, diğer fosfazen türevi bileşiklerinin çalışma sonuçları ile karşılaştırılarak, fosfazen gruplarına bağlı olan yan grupların etkililiği üzerine değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, (4c-4d), (5c-5d), (6c-6d) fosfazen bileşiklerinin taşıdığı metronidazol grubu nedeniyle plazmit DNA'nın konformasyonu üzerinde etkili olduğu ve DNA'ya bağlanarak hasar verebildiği gösterilmiştir.

Kanser tedavisinde cisplatin, yaygın olarak kullanılan ve ilk metal bazlı kemoterapötik ilaçlardan biridir [187]. Cisplatin, kanser tedavisinde nefrotoksik, ototoksik, hepatotoksik, nörotoksik ve gastrointestinal sistemde toksik yan etkilere neden olmaktadır. Aynı zamanda cisplatin kullanımı ile hastalarda ilaç direnci gelişebilmektedir [13]. Bu nedenle hastalar için tedavi süreci oldukça zor bir duruma dönüşmektedir. Yapılan çalışmalarda birçok fosfazen türevinin farklı kanser hattı üzerindeki sitotoksik etkisi gösterilmiştir [3, 21, 153, 160, 189-192].

Elmas ve çalışma arkadaşlarının (2023), 4-florobenzil-spiro(N/O)siklotrifosfazen türevlerini sentezlediği çalışmada, 2a-2d olarak isimlendirilen bileşiklerin, prostat kanseri (PC3), meme kanseri (MCF7) ve kolon kanseri (HT29) hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivite etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Bileşikler hücrelere (20-640  $\mu$ M) aralığındaki

konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, 2c bileşiğinin üç kanser hücresine karşı sitotoksik aktivitesinin olduğu bildirilmiştir [153].

Bozkurt ve çalışma arkadaşlarının (2022), tetrakloro ve tetraamino-2-piridilmetilspiro(N/N) etilendiaminosiklotrifosfazenlerini sentezlediği çalışmada, fosfazen bileşiklerinin ve nanopartiküller halinde kapsüllenen örneklerinin L929 fare fibroblastı ve A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Bileşikler hücrelere (15,62-1000  $\mu$ M) aralığındaki konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, tüm fosfazen bileşiklerinin ve nanopartiküllerle kapsüllenen fosfazenlerin konsantrasyona bağlı olacak şekilde her iki hücre hattında da sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. 5a ve nanopartiküllerle kapsüllenmiş 5a olarak isimlendirilen bileşiklerin A549 akciğer kanseri hücre hattında en yüksek sitotoksik aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. 4a, 5a ve 5c olarak isimlendirilen bileşiklerin nanopartiküllerle kapsüllenen versiyonlarının 1000  $\mu$ M konsantrasyonda cisplatin ilacından daha etkili olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, nanopartiküllerle kapsüllenen 4a, 5a, ve 5c'nin L929 hücrelerinde 1000  $\mu$ M konsantrasyonda cisplatinden daha düşük sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [193].

Öztürk ve çalışma arkadaşlarının (2019), N/N-izopropil köprülü bisiklotrifosfazen bileşiklerini sentezlediği çalışmada, 2d ve 2h olarak isimlendirilen bileşiklerin L929 (fibroblast) ve A549 (akciğer) kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivite etkisi MTT test yöntemi ile incelenmiştir. Bileşikler hücrelere (7,81-250  $\mu$ M) konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Çalışmada pirolidin, aziridin, spermin ve spermidin yan grupları bulunduran aminosiklotrifosfazenlerin antikarsinojen özellikler sergilediği, HT29 (kolon kanseri hücre hattı), Vero hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstererek apoptozu uyardığı belirtilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, konsantrasyonun artmasına bağlı olarak, 2d ve 2h olarak isimlendirilen bileşiklerin sitotoksik aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Kanser hücrelerine karşı en yüksek sitotoksik etkiyi (31,25–250  $\mu$ M) aralığındaki konsantrasyonlarda 2d bileşiğinin gösterdiği belirlenmiştir. Kanser ve fibroblast hücreleri üzerinde 2h bileşiğinin sitotoksik aktivitesinin (62,50–7,81)  $\mu$ M konsantrasyonda 2d bileşiğinden daha düşük olduğu gösterilmiştir. Her iki bileşiğin de A549 hücrelerine karşı etkili bir antikanser aktiviteye sahip olmakla birlikte L929 fibroblast hücreleri üzerinde de sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [163].

Tümer ve çalışma arkadaşlarının (2015), vanillinato-sübstitüe N/N veya N/O spirosiklik monoferrosenil siklotrifosfazenlerini sentezlediği çalışmada, 2d, 5d ve cis-5b olarak isimlendirilen bileşiklerin HeLa rahim ağzı kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivite etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Bileşikler hücrelere (5-50 µg/mL) aralığındaki konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, 5d ve cis-5b bileşikleri, pozitif kontrol ilaçlarıyla karşılaştırıldığında HeLa rahim ağzı kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [194].

Asmafiliz ve çalışma arkadaşlarının (2013), mono ve bisferrosenilspirosiklotrifosfazenlerini sentezlediği çalışmada, 2b, 1d, 2d ve 4d olarak isimlendirilen bileşiklerin HeLa rahim ağzı kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivite etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Bileşikler hücrelere (5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL) konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, 4d bileşiğinin HeLa kanser hücre hatlarına karşı anti-proliferatif aktivitesinin diğer bileşikler ve pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatin, paklitaksel ilaçlarından daha yüksek olduğu bildirilmiştir [3].

Tez çalışmasında propilamin ve bütilamin sübstitüe siklotrifosfazen türevlerinin sitotoksik aktivitesi incelenmiştir ve çalışmada kullanılan bileşiklerin antikanser ajan olma potansiyelleri ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma kapsamında, (4a-6a) ve (4b-6b) bileşiklerinin Vero epitel ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT test yöntemi ile araştırılmıştır ve bir antikanser ilaç olan cisplatin ile karşılaştırılmıştır. Bileşikler hücrelere (3,1-50 µM) konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, bileşiklerin cisplatin ilacına kıyasla, konsantrasyona bağlı olacak şekilde her iki hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. İki farklı hücre hattının birbiriyle karşılaştırıldığı durumda, sadece 5a bileşiğinin sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı olarak daha fazla arttığı gösterilmiştir ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte 5a bileşiğinin kanser hücreleri üzerinde, etkili sitotoksik aktivite göstermesi ve sağlıklı hücreler üzerinde ise daha az sitotoksik aktivite göstermesi bu bileşiği antikanser ajan olma potansiyeli açısından iyi bir aday yapmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doktora tezindeki çalışmalardan elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda sunulmuştur:

1. Tez çalışması, biyolojik etkinliği bilinen ferrosenildiaminler ile biyouyumlu bir bileşik olan trimerik fosfazen bileşiğinin bir araya getirildiği ve propilamin, bütülamın, metronidazol sübstitüenti taşıyan monospirosiklotrifosfazen bileşikleri ile yapılan biyolojik aktivite çalışmasıdır.
2. Çalışmadaki 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d, 4a-6a ve 4b-6b bileşiklerinin çeşitli patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi kuyu difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Propilamin (4a-6a) ve bütülamın sübstitüenti taşıyan bileşiklerin (4b-6b) patojen bakteri ve mayalar üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin mikroorganizmaları oldukça düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği (MİK; <19,5 ile >2500  $\mu$ M) veya öldürdüğü (MBK; 19,5 ile >2500  $\mu$ M), (MFK; 19,5 ile 2500  $\mu$ M) tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre, çalışmada kullanılan propilamin ve bütülamın sübstitüenti taşıyan bileşiklerin antimikrobiyal ajan olabilme potansiyeli ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte çalışmada test edilen fosfazen bileşiklerinin bakteriyostatik ilaçlardan ziyade bakterisidal ilaç olarak kullanılmaya aday olduğu sonucuna varılabilmektedir.
3. Çalışmada kullanılan (4a-6a) ve (4b-6b) fosfazen bileşiklerinin antioksidan aktivite etkisini tespit etmek için DPPH serbest radikalini süpürücü etki ve demir şelatlama aktivitesi incelenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, bileşiklerin etkili bir antioksidan aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin antioksidan aktiviteye sahip olmaları için daha yüksek konsantrasyon kullanılarak ve farklı antioksidan aktivite tespit yöntemleri ile antioksidan aktivite etkisinin değerlendirilmesi önerilmektedir.
4. Çalışmada kullanılan (4a-6a) ve (4b-6b) bileşiklerinin genotoksik aktivitelerinin tespit edilebilmesi için Ames testi kullanılmıştır. Bileşikler toksik olmayan dozlarda mutajenite açısından test edilmiştir ve deneyler hem metabolik aktivasyonun (S9) varlığında hem de yokluğunda yapılmıştır. Tüm bileşiklerin çerçeve kayması ve baz çifti değişim mutasyonlarına yol açmadığı ve promutajenik potansiyele sahip olmadığı tespit edilmiştir.
5. Çalışmada kullanılan 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d, 4a-6a ve 4b-6b bileşiklerinin plazmit DNA ile etkileşimi agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Metronidazol sübstitüenti taşıyan 4c-4d, 5c-5d, 6c-6d bileşiklerinin kapalı halkasal yapıda olan plazmit DNA'da çift zincir

kırılmasına neden olduğu belirlenmiştir. 4d bileşiği plazmit DNA'nın konformasyonu üzerinde en çok etki eden bileşik olmuştur. Fosfazen bileşikler ile etkileşime giren plazmit DNA'nın *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak enzim kesimleri yapılmıştır. 4d dışındaki tüm bileşiklerin enzim kesimini kısmen veya tamamen engellediği ve DNA üzerindeki A/A, G/G bölgelerinden bağlandığı tespit edilmiştir. Plazmit DNA'ya bu nükleotit bölgelerinden bağlanmadığı gösterilen 4d bileşiğinin ise, farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak DNA üzerindeki farklı bölgelere bağlanma durumunun tespit edilmesi önerilmektedir.

6. Çalışmada kullanılan propilamin (4a-6a) ve bütülin (4b-6b) süstitüenti taşıyan siklotrifosfazen bileşiklerinin Vero epitel ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivite etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Bileşiklerin sitotoksik aktivite etkisi bir antikanser ilaç olan cisplatin ilacı ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda, kullanılan bileşiklerin konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak her iki hücre hattında hücre canlılığı yüzdesinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. İki farklı hücre hattının birbiriyle karşılaştırıldığı durumda sadece 5a bileşiğinin sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı olarak daha fazla arttığı gösterilmiştir ( $p < 0,05$ ). Böylelikle 5a bileşiğinin sağlıklı hücrelere göre kanser hücrelerinde daha yüksek bir sitotoksik etki oluşturduğu belirlenmiştir ve bu bileşiğin antikanser ajan olarak değerlendirilebileceği anlaşılmıştır.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, propilamin, bütülin ve metronidazol süstitüenti taşıyan bileşiklerin bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterdiği; propilamin (4a-6a) ve bütülin (4b-6b) süstitüenti taşıyan bileşiklerin güçlü bir antimikrobiyal ajan olabileceği; metronidazol süstitüenti taşıyan (4c-4d), (5c-5d), (6c-6d) bileşiklerinin DNA'da çift zincir kırığı oluşturarak DNA'ya hasar verebileceği; propilamin süstitüenti taşıyan 5a bileşiğinin ise etkili bir sitotoksik aktivite göstererek antikanser ajanı olarak değerlendirilebileceği anlaşılmıştır. Çalışma sonucunda alınan verilerin sonuçları ve değerlendirilmesi detaylı olarak Çizelge 6.1'de yer almaktadır. Bu doktora tez çalışmasından elde edilen sonuçların, yeni araştırmalara katkısının olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 6.1. Çalışma sonucunda alınan verilerin sonuçları ve değerlendirilmesi

| Bileşikler        | DNA Etkileşimi | <i>Bam</i> HI Enzim Kesimi | <i>Hind</i> III Enzim Kesimi | Antimikrobiyal Aktivite | Bakterisidal Etki | MDA-MB-231 Sitotoksik Aktivite | Vero Hücresi Sitotoksik Aktivite |
|-------------------|----------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 4c (Metronidazol) | +              | +                          |                              | +                       | +                 |                                |                                  |
| 4d (Metronidazol) | +              | +                          | +                            | +                       | +                 |                                |                                  |
| 5c (Metronidazol) | +              | +                          |                              | +                       | +                 |                                |                                  |
| 5d (Metronidazol) | +              | +                          |                              | +                       | +                 |                                |                                  |
| 6c (Metronidazol) | +              |                            |                              | +                       | +                 |                                |                                  |
| 6d (Metronidazol) | +              |                            |                              | +                       | +                 |                                |                                  |
| 5b (Bütülinamin)  |                | +                          |                              | ++                      | +                 | ++++                           | ++++                             |
| 6b (Bütülinamin)  |                | +                          |                              | ++                      | +                 | +++                            | ++++++                           |
| 4b (Bütülinamin)  |                | +                          |                              | ++                      | +                 | ++++++                         | ++++++                           |
| 5a (Propilamin)   |                | +                          |                              | ++                      | +                 | ↑+++++                         | ++                               |
| 6a (Propilamin)   |                | +                          |                              | ++                      | +                 | ++                             | +++                              |
| 4a (Propilamin)   |                | +                          |                              | ++                      | +                 | +                              | +                                |



## KAYNAKLAR

1. Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Tümer, Y., Hökelek, T., Kılıç, Z., Çelik, N. N., Açık, L., Güzel, R. and Güzel Erdal, G. I. (2024). Phosphorus–Nitrogen Compounds: Part 76. Design and Syntheses of Dispiro-and Trispiro (N/N) cyclotriphosphazenes: Conformational and Structural Analyses, Chirality, Electrochemical, Dye-Sensitized Solar Cells, and Bioactivity Studies. *Inorganic Chemistry*, 63(39), 18389-18407.
2. Çalışkan, E., Çapan, İ., Tekin, S., Qaoud, M. T., Biryani, F., Koran, K., Sandal, S. and Görgülü, A. O. (2024). Tripeptide linked dispiro cyclotriphosphazene conjugates: Synthesis, molecular docking analysis of compounds binding within cancer cell line receptors and in vitro cytotoxic and genotoxic activities. *Bioorganic Chemistry*, 150, 107621.
3. Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Süzen, Y. and Öner, Y. (2013). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 26. Syntheses, spectroscopic and structural investigations, biological and cytotoxic activities, and DNA interactions of mono and bisferrocenylspirocyclotriphosphazenes. *Inorganica Chimica Acta*, 400, 250-261.
4. Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Topaloğlu Aksoy, B., Sabah, B. N., Açık, L. and Hökelek, T. (2024). Phosphorus–nitrogen compounds: part 75—design, synthesis, stereogenic and conformational properties of chiral dispiro (N/N) cyclotriphosphazenes: structural analysis and photophysical and bioactivity studies. *Research on Chemical Intermediates*, 50(6), 2603-2628.
5. MacGowan, A., Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10), 622-628.
6. Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Öztürk, A., Hökelek, T., Koc, L. Y., Açık, L., Kısa, O. z. I., Albay, A., Üstündağ, Z. and Solak, A. O. (2009). Phosphorus– Nitrogen Compounds. 18. Syntheses, stereogenic properties, structural and electrochemical investigations, biological activities, and DNA interactions of new spirocyclic Mono-and bisferrocenylphosphazene derivatives. *Inorganic Chemistry*, 48(21), 10102-10116.
7. Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Öztürk, A., Süzen, Y., Hökelek, T., Açık, L., Çelik, Z. B., Koc, L. Y., Yola, M. L. and Üstündağ, Z. (2013). Phosphorus-nitrogen compounds: Part 25. Syntheses, spectroscopic, structural and electrochemical investigations, antimicrobial activities, and DNA interactions of ferrocenyldiaminocyclotriphosphazenes. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 188(12), 1723-1742.
8. Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A. and Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687-704.
9. Okumuş, A., Elmas, G., Binici, A., Aydın, B., Açık, L., Kılıç, Z. and Hökelek, T. (2022). Phosphorus-nitrogen compounds. Part 62. Preparation of tetraaminobis (4-fluorobenzyl) spiro (N/N) cyclotriphosphazenes: Chemical, structural characterizations, antimicrobial, antioxidant and DNA-binding activity studies. *Inorganica Chimica Acta*, 538, 121001.

10. Qader, I. N. Q., Obalı, İ., Uçan, H. İ., Uysal, A., Obalı, A. Y. and Kul, M. (2022). Ortho-hydroxy bioactive schiff base compounds: Design, comprehensive characterization, photophysical properties and elucidation of antimicrobial and mutagenic potentials. *Bioorganic Chemistry*, 119, 105507.
11. Bilkay, M., Kara, H. E. S. (2024). Synthesis of novel phenylalanine-coated copper nanoclusters for fluorescent probes to determine the interactions of cancer drugs with DNA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 249, 116365.
12. Hasanzadeh, M., Shadjou, N. (2016). Pharmacogenomic study using bio-and nanobioelectrochemistry: Drug–DNA interaction. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 1002-1017.
13. Kadagathur, M., Patra, S., Devabattula, G., George, J., Phanindranath, R., Shaikh, A. S., Sigalapalli, D. K., Godugu, C., Nagesh, N. and Tangellamudi, N. D. (2022). Design, synthesis of DNA-interactive 4-thiazolidinone-based indolo-/pyrroloazepinone conjugates as potential cytotoxic and topoisomerase I inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 238, 114465.
14. Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 88, 102925.
15. Akbaş, H., Okumuş, A., Karadağ, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Yasemin Koç, L., Açık, L., Aydın, B. and Türk, M. (2016). Phosphorus–nitrogen compounds: part 32. structural and thermal characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and in vitro DNA binding of the phosphazanium salts. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123, 1627-1641.
16. Palchaudhuri, R., Hergenrother, P. J. (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 497-503.
17. Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L. and Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*, 85(5), 2265-2289.
18. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J. and Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66.
19. Muhammad, N., Hanif, M., Yang, P. (2024). Beyond cisplatin: New frontiers in metallodrugs for hard-to-treat triple negative breast cancer. *Coordination Chemistry Reviews*, 499, 215507.
20. Mutlu, G., Okumuş, A., Elmas, G., Kılıç, Z., Güzel, R., Sabah, B. N., Açık, L., Mergen, H. and Hökelek, T. (2022). Phosphorus–nitrogen compounds. Part 65. Novel diansa-spiro-cyclotetraphosphazenes: synthesis, characterization, bioactivity and electrochemical properties, and dye-sensitized solar cell fabrication studies. *New Journal of Chemistry*, 46(38), 18384-18401.

21. Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Çoşut, B., Sabah, B. N., Açık, L., Çerçi, N. A. and Hökelek, T. (2023). Phosphorus–nitrogen compounds: part 68. Synthesis, characterization, stereogenism, photophysical and bioactivity studies of novel unsymmetrical dispiro (N/N) cyclotriphosphazenes with carbazolyl and 4-chlorobenzyl pendant arms. *New Journal of Chemistry*, 47(4), 1900-1915.
22. Chaplin, A. B., Harrison, J. A., Dyson, P. J. (2005). Revisiting the electronic structure of phosphazenes. *Inorg Chem*, 44(23), 8407-17.
23. Gleria, M., De Jaeger, R. (2001). Aspects of phosphazene research. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers*, 11, 1-45.
24. Tekdemir, P. (2015). *Tetramerik fosfazenle 4-florobenzil diaminlerin reaksiyonlarının incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 36-45.
25. Karadağ, A., Akbaş, H. (2018). Phosphazene-based ionic liquids. *Recent Advances in Ionic Liquids*, 2, 15-22.
26. Shaw, R. A., Fitzsimmons, B., Smith, B. C. (1962). The Phosphazenes (Phosphonitrilic Compounds). *Chemical Reviews*, 62(3), 247-281.
27. Allcock, H. R. (2006). Recent developments in polyphosphazene materials science. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 10(5-6), 231-240.
28. Siwy, M., Sęk, D., Kaczmarczyk, B., Jaroszewicz, I., Nasulewicz, A., Pelczyńska, M., Nevozhay, D. and Opolski, A. (2006). Synthesis and in vitro antileukemic activity of some new 1, 3-(oxytetraethylenoxy) cyclotriphosphazene derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(2), 806-810.
29. Allcock, H. R., Pucher, S. R., Fitzpatrick, R. J. and Rashid, K. (1992). Antibacterial activity and mutagenicity studies of water-soluble phosphazene high polymers. *Biomaterials*, 13(12), 857-862.
30. Allcock, H. R., Crane, C. A., Morrissey, C. T. and Olshavsky, M. A. (1999). A New Route to the Phosphazene Polymerization Precursors, Cl<sub>3</sub>P NSiMe<sub>3</sub> and (NPCl<sub>2</sub>)<sub>3</sub>. *Inorganic Chemistry*, 38(2), 280-283.
31. Jin, G.-W., Rejinold, N. S., Choy, J.-H. (2022). Polyphosphazene-based biomaterials for biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15993.
32. Snegur, L. V. (2022). Modern trends in bio-organometallic ferrocene chemistry. *Inorganics*, 10(12), 226.
33. Uzunalioglu, N., Asmafiliz, N., Kılıç, Z. and Hökelek, T. (2022). Phosphorus-nitrogen compounds: Part 61. The novel sodium complexes of monoferrocenylspirocyclotriphosphaza-crown ethers. *Inorganica Chimica Acta*, 539, 121035.

34. Bastrakov, M., Starosotnikov, A. (2022). Recent Progress in the Synthesis of Drugs and Bioactive Molecules Incorporating Nitro (het) arene Core. *Pharmaceuticals*, 15(6), 705.
35. Noriega, S., Cardoso-Ortiz, J., López-Luna, A., Cuevas-Flores, M. D. R. and Flores De La Torre, J. A. (2022). The diverse biological activity of recently synthesized nitro compounds. *Pharmaceuticals*, 15(6), 717.
36. Patel, O. P., Jesumoroti, O. J., Legoabe, L. J. and Beteck, R. M. (2021). Metronidazole-conjugates: A comprehensive review of recent developments towards synthesis and medicinal perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 210, 112994.
37. Ogunrinola, G. A., Oyewale, J. O., Oshamika, O. O. and Olasehinde, G. I. (2020). The human microbiome and its impacts on health. *International Journal of Microbiology*, 2020(1), 8045646.
38. Kamel, M., Aleya, S., Alsubih, M. and Aleya, L. (2024). Microbiome Dynamics: A Paradigm Shift in Combatting Infectious Diseases. *Journal of Personalized Medicine*, 14(2), 217.
39. McFarland, L. V. (2000). Normal flora: diversity and functions. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(4), 193-207.
40. Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 8, 1-11.
41. Whiteside, S. A., Razvi, H., Dave, S., Reid, G. and Burton, J. P. (2015). The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nature Reviews Urology*, 12(2), 81-90.
42. Rogers, K. (2011). *Bacteria and viruses*. (First Edition). London: Britannica Educational Publishing, 3-9.
43. Cooper, G. M., Hausman, R. E., Sakızlı, M. ve Atabey, N. (2019). *Hücre: moleküler yaklaşım* (7. Baskı). İzmir: İzmir Tıp Kitabevi, 55-66.
44. Bender, M., Buckley, Sattley,, Stahl. (2019). *Brock biology of microorganisms* (Fifteenth Edition). New York: Pearson, 96-102.
45. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. and Zinkernagel, R. M. (2002). *Tibbi mikrobiyoloji: anlamak, öğrenmek, başvurmak için*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri Limited, 78-93.
46. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2010). *Medical microbiology* (6<sup>th</sup> Edition). New York: Elsevier Health Sciences,
47. Doron, S., Gorbach, S. L. (2008). Bacterial infections: overview. *International Encyclopedia of Public Health*, 273, 122-136.
48. Madigan, M. T., Clark, D. P., Stahl, D. and Martinko, J. M. (2012). *Brock biology of microorganisms* (13th edition). New York: Benjamin Cummings, 85-93.

49. Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111-118.
50. Paray, A. A., Singh, M., Mir, M. and Kaur, A. (2023). Gram staining: a brief review. *International Journal of Research and Review*, 10, 336-341.
51. Boyanova, L. (2018). Direct Gram staining and its various benefits in the diagnosis of bacterial infections. *Postgraduate Medicine*, 130(1), 105-110.
52. World Health Organization (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance* (First Edition). New York: World Health Organization, 45-66.
53. Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J. and Trevijano-Contador, N. (2020). The fungal cell wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus species. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2993.
54. Gow, N. A., Hube, B. (2012). Importance of the Candida albicans cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology*, 15(4), 406-412.
55. Gow, N. A., Lenardon, M. D. (2023). Architecture of the dynamic fungal cell wall. *Nature Reviews Microbiology*, 21(4), 248-259.
56. Forastiero, A., Garcia-Gil, V., Rivero-Menendez, O., Garcia-Rubio, R., Monteiro, M., Alastruey-Izquierdo, A., Jordan, R., Agorio, I. and Mellado, E. (2015). Rapid development of Candida krusei echinocandin resistance during caspofungin therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(11), 6975-6982.
57. Turner, S. A., Butler, G. (2014). The Candida pathogenic species complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(9), a019778.
58. Saran, B., Karahan, Z. C. (2010). Antimikrobiyal ajanlara genel bakış. *Turk Urol Sem*, 1, 216-20.
59. Abushaheen, M. A., Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C. and Vellappally, S. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971.
60. Molinari, G. (2014). Impact of microbial natural products on antibacterial drug discovery. In *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance* (First Edition). New York: Wiley, 45-66.
61. Erdem Büyükkiraz, M., Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 1573-1596.
62. Okumuş, A., Tanrikulu, G. İ., Zülfikaroğlu, A., Elmas, G., Kılıç, Z., Hökelek, T., Açıık, L. and Nurjanah, D. (2024). Phosphorus-Nitrogen compounds part 74: Syntheses of (p-dimethylamino)benzyl-spiro-(N/N)-cyclotriphosphazenes: Structural characterizations, bioactivity studies, DFT calculations and reactivity parameters. *Journal of Chemical Research*, 48(5), 321-330.

63. Begum, S., Begum, T., Rahman, N. and Khan, R. A. (2021). A review on antibiotic resistance and way of combating antimicrobial resistance. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 087-097.
64. Chaffey, N., Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2003). *Molecular biology of the cell*. (4th edn.). New York: Oxford University Press, 10-200.
65. Van Daele, R., Spriet, I., Wauters, J., Maertens, J., Mercier, T., Van Hecke, S. and Brüggemann, R. (2019). Antifungal drugs: what brings the future? *Medical mycology*, 57(Supplement\_3), 328-343.
66. Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A. and Blair, J. M. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280-295.
67. Brinkac, L., Voorhies, A., Gomez, A. and Nelson, K. E. (2017). The threat of antimicrobial resistance on the human microbiome. *Microbial Ecology*, 74(4), 1001-1008.
68. Kayış, U. (2019). Antimikrobiyal direnç mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi*, 5(1), 1-12.
69. Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.
70. Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A. and Kumar, S. H. (2021). Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antibiotics*, 10(5), 593.
71. Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 71-109.
72. Kontoyiannis, D. P., Lewis, R. E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *The Lancet*, 359(9312), 1135-1144.
73. Vitiello, A., Ferrara, F., Boccellino, M., Ponzio, A., Cimmino, C., Comberiati, E., Zovi, A., Clemente, S. and Sabbatucci, M. (2023). Antifungal drug resistance: an emergent health threat. *Biomedicines*, 11(4), 1063.
74. Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A. G. (2020). *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms*, 8(2), 154.
75. Patra, S., Raney, M., Pareek, A. and Kaur, R. (2022). Epigenetic regulation of antifungal drug resistance. *Journal of Fungi*, 8(8), 875.
76. Kaur, J., Nobile, C. J. (2023). Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 71, 102237.
77. Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382-398.

78. Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 122-136.
79. Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märklbauer, E. and Granum, P. E. (2021). The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2), 98.
80. Akinsemolu, A. A., Onyeaka, H., Odion, S. and Adebajo, I. (2024). Exploring *Bacillus subtilis*: Ecology, biotechnological applications, and future prospects. *Journal of Basic Microbiology*, 85, e202300614.
81. Mielich-Süss, B., Lopez, D. (2015). Molecular mechanisms involved in *B. subtilis* biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 17(3), 555-565.
82. de Boer Sietske, A., Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 1-4.
83. Cheung, G. Y., Bae, J. S., Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569.
84. Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J.-P. and Molle, V. (2021). *Staphylococcus aureus* toxins: an update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins*, 13(10), 677.
85. Kwiecinski, J. M., Horswill, A. R. (2020). *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Current opinion in microbiology*, 53, 51-60.
86. Canalejo, E., Ballesteros, R., Cabezudo, J., García-Arata, M. and Moreno, J. (2008). Bacteraemic spondylodiscitis caused by *Enterococcus hirae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 613-615.
87. Fernández-Hidalgo, N., Escolà-Vergé, L., Pericàs, J. M. (2020). *Enterococcus faecalis* endocarditis: what's next? *Future Microbiology*, 15(5), 349-364.
88. Boeder, A., Spiller, F., Carlstrom, M. and Izídio, G. (2024). *Enterococcus faecalis*: implications for host health. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 40(6), 190-190.
89. Van Tyne, D., Martin, M. J., Gilmore, M. S. (2013). Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, 5(5), 895-911.
90. Brayer, S., Linn, A., Holt, S., Ellery, K., Mitchell, S. and Williams, J. (2019). *Enterococcus hirae* bacteremia in an infant: case report and review of the literature. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 8(6), 571-573.
91. Herrero-Fresno, A., Olsen, J. E. (2018). *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host—A mini-review. *Food Microbiology*, 71, 98-110.
92. Coburn, B., Grassl, G. A., Finlay, B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112-118.

93. Galán, J. E. (2021). Salmonella Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 716-725.
94. Gart, E. V., Suchodolski, J. S., Welsh Jr, T. H., Alaniz, R. C., Randel, R. D. and Lawhon, S. D. (2016). Salmonella typhimurium and multidirectional communication in the gut. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1827.
95. Helms, M., Ethelberg, S., Mølbak, K. and Group, D. S. (2005). International Salmonella typhimurium DT104 infections, 1992–2001. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 859.
96. Pakbin, B., Brück, W. M., Rossen, J. W. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic Escherichia coli: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9922.
97. Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C., Naas, T., Carattoli, A. and Martínez-Medina, M. (2016). Escherichia coli: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437-463.
98. Thi, M. T. T., Wibowo, D., Rehm, B. H. (2020). Pseudomonas aeruginosa biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671.
99. Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., McClean, S. (2021). Pseudomonas aeruginosa: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128
100. Behzadi, P., Baráth, Z., Gajdács, M. (2021). It's not easy being green: a narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. *Antibiotics*, 10(1), 42.
101. Yadav, J., Kumari, R. M., Verma, V. and Nimesh, S. (2021). Recent development in therapeutic strategies targeting Pseudomonas aeruginosa biofilms—a review. *Materials Today: Proceedings*, 46, 2359-2373.
102. Laupland, K. B., Edwards, F., Harris, P. N. (2024). Proteus species bloodstream infections: Comparative epidemiology of three species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 109(2), 116286.
103. Drzewiecka, D. (2016). Significance and roles of Proteus spp. bacteria in natural environments. *Microbial Ecology*, 72, 741-758.
104. Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L. and Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278.
105. Ahmady, L., Gothwal, M., Mukkoli, M. M. and Bari, V. K. (2024). Antifungal drug resistance in Candida: a special emphasis on amphotericin B. *APMIS*, 132(5), 291-316.
106. Mayer, F. L., Wilson, D., Hube, B. (2013). Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.

107. Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I. and Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 79.
108. Malinovská, Z., Čonková, E., Váczi, P. (2023). Biofilm formation in medically important *Candida* species. *Journal of Fungi*, 9(10), 955.
109. Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., Chaves, G. M. (2017). An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1927.
110. García-Rodas, R., González-Camacho, F., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M. and Zaragoza, O. (2011). The interaction between *Candida krusei* and murine macrophages results in multiple outcomes, including intracellular survival and escape from killing. *Infection and Immunity*, 79(6), 2136-2144.
111. Gómez-Gaviria, M., Mora-Montes, H. M. (2020). Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen. *Infection and Drug Resistance*, 1673-1689.
112. Zaric, B. L., Macvanin, M. T., Isenovic, E. R. (2023). Free radicals: relationship to human diseases and potential therapeutic applications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 154, 106346.
113. Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175.
114. AYDIN, B. (2022). Antioxidant properties of some macroalgae harvested from the Iskenderun Bay Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 31(2), 46-66.
115. Kiri, S., Ryba, T. (2024). Cancer, metastasis, and the epigenome. *Molecular Cancer*, 23(1), 154.
116. Bhatt, A. P., Redinbo, M. R., Bultman, S. J. (2017). The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(4), 326-344.
117. Abhisheka, B., Biswas, S. K., Purkayastha, B. (2023). A comprehensive review on breast cancer detection, classification and segmentation using deep learning. *Archives of Computational Methods in Engineering*, 30(8), 5023-5052.
118. Wang, J.-J., Lei, K.-F., Han, F. (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 22(12).
119. Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. (2018). *Genetik kavramlar*. İstanbul: Palme Yayıncılık, 88-93.
120. Gharonpour, A., Simiyari, D., Yousefzadeh, A., Badragheh, F. and Rahmati, M. (2023). Autophagy modulation in breast cancer utilizing nanomaterials and nanoparticles. *Frontiers in Oncology*, 13, 1150492.

121. Dhillon, A., Singh, A., Bhalla, V. K. (2023). A systematic review on biomarker identification for cancer diagnosis and prognosis in multi-omics: from computational needs to machine learning and deep learning. *Archives of Computational Methods in Engineering*, 30(2), 917-949.
122. Obeagu, E. I., Obeagu, G. U. (2024). Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine*, 103(3), e36905.
123. Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E. and Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 84, 106535.
124. Chang-Qing, Y., Jie, L., Shi-Qi, Z., Kun, Z., Zi-Qian, G., Ran, X., Hui-Meng, L., Ren-Bin, Z., Gang, Z. and Da-Chuan, Y. (2020). Recent treatment progress of triple negative breast cancer. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 151, 40-53.
125. Aleksić, M. M., Kapetanović, V. (2014). An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA--Drug interactions. *Acta Chimica Slovenica*, 61(3), 122-136.
126. Yılmaz, B. (2021). Spektroskopik teknikler kullanılarak furosemid ile DNA etkileşimlerinin incelenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 10(2), 325-331.
127. Ramotowska, S., Ciesielska, A., Makowski, M. (2021). What can electrochemical methods offer in determining DNA–drug interactions?. *Molecules*, 26(11), 3478.
128. Elmas, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Çam, M., Açıık, L. and Hökelek, T. (2018). Phosphorus-nitrogen compounds. Part 40. The syntheses of (4-fluorobenzyl) pendant armed cyclotetraphosphazene derivatives: Spectroscopic, crystallographic and stereogenic properties, DNA interactions and antimicrobial activities. *Inorganica Chimica Acta*, 476, 110-122.
129. Caymaz, B. (2019). *İmidazo(1,2-a)piridin türevlerinin sentezi, karakterizasyonu ve DNA etkileşimlerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, 35-37.
130. Ramazanoğlu, N. (2020). *N/O donör atomlu siklotetrafosfazen türevlerinin biyolojik aktiviteleri*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 79-80.
131. Tanrıkulu, G. İ., Özgür, M. Y., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Aydın, B. and Açıık, L. (2019). Phosphorus-Nitrogen compounds part 47: The conventional and microwave-assisted syntheses of dispirocyclotriphosphazene derivatives with (4-fluoro/4-nitrobenzyl) pendant arms: Structural and stereogenic properties and DNA interactions. *Inorganica Chimica Acta*, 490, 179-189.
132. Tabassum, S., Asim, A., Arjmand, F., Afzal, M. and Bagchi, V. (2012). Synthesis and characterization of copper (II) and zinc (II)-based potential chemotherapeutic compounds: their biological evaluation viz. DNA binding profile, cleavage and antimicrobial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 308-316.

133. Fu, D., Calvo, J. A., Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(2), 104-120.
134. Sirajuddin, M., Ali, S., Badshah, A. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1-19.
135. Venugopal, S., Sharma, V., Mehra, A., Singh, I. and Singh, G. (2022). DNA intercalators as anticancer agents. *Chemical Biology & Drug Design*, 100(4), 580-598.
136. Goftar, M. K., Kor, N. M., Kor, Z. M. (2014). DNA intercalators and using them as anticancer drugs. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(3), 811-822.
137. Rescifina, A., Zagni, C., Varrica, M. G., Pistarà, V. and Corsaro, A. (2014). Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 95-115.
138. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.
139. Munteanu, I. G., Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
140. Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
141. Moharram, H., Youssef, M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42.
142. Idris, S., Jan, F., Waheed, M., Alam, A., Ibrahim, M., AlAsmari, A. F., Alasmari, F., Bo, L. and Khan, M. (2024). Multifaceted bioactivity of thiosemicarbazide derivatives: Synthesis, characterization, and DFT investigations on inhibition of  $\alpha$ -amylase, hydroxyl radical scavenging, and iron chelating activities with molecular docking insights. *Journal of Molecular Structure*, 1304, 137669.
143. Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
144. Maron, D. M., Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173-215.
145. Uysal, A. (2006). *Bazı bitki gelişim düzenleyicilerin Salmonella/mikrozom test sisteminde mutajenik etkilerinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 85-96.
146. Sezginer, H., Dane, F. (2016). Toksik maddelerin genotoksik analiz yöntemleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*(1), 50-55.

147. Adan, A., Kiraz, Y., Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213-1221.
148. Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., Sivas, H. (2017). Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables. In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (First Edition). New York: Elsevier, 271-297.
149. Tokur, O., Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksiste testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
150. Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M. and Morelli, I. (2001). Antioxidant principles from bauhinia t arapotensis. *Journal of Natural Products*, 64(7), 892-895.
151. Dinis, T. C., Madeira, V. M., Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161-169.
152. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (First Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 5-50.
153. Binici, A., Elmas, G., Okumuş, A., Erden Tayhan, S., Hökelek, T., Şeker, B. N., Açık, L. and Kılıç, Z. (2023). Phosphorus–nitrogen compounds. Part 58. Syntheses, structural characterizations and biological activities of 4-fluorobenzyl-spiro (N/O) cyclotriphosphazene derivatives. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(1), 298-318.
154. Elmas, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Çelik, S. P. and Açık, L. (2017). The spectroscopic and thermal properties, antimicrobial activities and DNA interactions of 4-(Fluorobenzyl) Spiro (N/O) cyclotriphosphazanium salts. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 4(3), 993-1016.
155. Dean, B., Brooks, T., Hodson-Walker, G. and Hutson, D. (1985). Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 153(1-2), 57-77.
156. Silva, P. P., Guerra, W., Silveira, J. N., Ferreira, A. M. d. C., Bortolotto, T., Fischer, F. L., Terenzi, H., Neves, A. and Pereira-Maia, E. C. (2011). Two new ternary complexes of copper (II) with tetracycline or doxycycline and 1, 10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. *Inorganic Chemistry*, 50(14), 6414-6424.
157. Yadav, V. K., Pokharia, S., Nath, M. (2024). Organotin (2-amino-4-fluorobenzoates): Synthesis, characterization, DFT studies, DNA interaction and cleavage studies. *Inorganic Chemistry Communications*, 159, 111712.
158. Berberoğlu, İ., Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Zeyrek, C. T., Açık, L., Koyunoğlu, D., Türk, M. and Hökelek, T. (2022). Phosphorus-nitrogen compounds: part 57—Syntheses of tetrachloro-and tetraaminobenzylspiro (N/N) cyclotriphosphazenes: chemical, structural characterizations, bioactivity and molecular docking studies. *Research on Chemical Intermediates*, 48(7), 3189-3219.

159. Tanrikulu, G. İ., Zülfikaroğlu, A., Elmas, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Açık, L. and Nurjanah, D. (2024). Phosphorus-Nitrogen compounds part 74. Syntheses of (p-dimethylamino) benzyl-spiro-(N/N)-cyclotriphosphazenes: Structural characterizations, bioactivity studies, DFT calculations and reactivity parameters. *Inorganica Chimica Acta*, 569, 122129.
160. Mutlu, G., Elmas, G., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koc, L. Y., Türk, M., Açık, L., Aydın, B. and Dal, H. (2015). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 31. Syntheses, structural and stereogenic properties, in vitro cytotoxic and antimicrobial activities, and DNA interactions of bicyclotetraphosphazenes containing bulky side group. *Inorganica Chimica Acta*, 436, 69-81.
161. Elmas, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Gönder, L. Y., Açık, L. and Hökelek, T. (2016). The syntheses and structural characterizations, antimicrobial activity and in vitro DNA binding of 4-fluorobenzylspiro (N/O) cyclotriphosphazenes and their phosphazanium salts. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 3(3), 25-46.
162. Kuzey, N. G., Özgür, M., Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Açık, L., Aydın, B. and Hökelek, T. (2020). Mono- and dispirocyclotriphosphazenes containing 4-bromobenzyl pendant arm (s): Synthesis, spectroscopy, crystallography and biological activity studies. *Journal of Molecular Structure*, 1220, 128658.
163. Öztürk, E., Okumuş, A., Kılıç, Z., Kılıç, A., Kayalak, H., Açık, L., Çerçi, N. A., Türk, M. and Hökelek, T. (2019). Phosphorus-nitrogen compounds. Part 44. The syntheses of N, N-spiro bridged cyclotriphosphazene derivatives with (4-fluorobenzyl) pendant arms: Structural and stereogenic properties, DNA interactions, antimicrobial and cytotoxic activities. *Inorganica Chimica Acta*, 486, 172-184.
164. Okumuş, A., Akbaş, H., Kılıç, Z., Yasemin Koç, L., Açık, L., Aydın, B., Türk, M., Hökelek, T. and Dal, H. (2016). Phosphorus–nitrogen compounds part 33: in vitro cytotoxic and antimicrobial activities, DNA interactions, syntheses, and structural investigations of new mono (4-nitrobenzyl) spirocyclotriphosphazenes. *Research on Chemical Intermediates*, 42, 4221-4251.
165. Levison, M. E., Levison, J. H. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infectious Disease Clinics*, 23(4), 791-815.
166. Bernatová, S., Samek, O., Pilát, Z., Šerý, M., Ježek, J., Ják, P., Šiler, M., Krzyžánek, V., Zemánek, P. and Holá, V. (2013). Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using Raman spectroscopy. *Molecules*, 18(11), 13188-13199.
167. Peechakara, B. V., Gupta, M. (2024). *Ampicillin/sulbactam*. In *StatPearls*. Treasure Island: StatPearls Publishing, 120.
168. Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Çoşut, B., Kılıç, Z., Sabah, B. N., Açık, L., Mergen, H. and Hökelek, T. (2023). Phosphorus-nitrogen compounds: Part 69—Unsymmetrical dispiro (N/N) cyclotriphosphazenes containing different pendant arms: syntheses, characterization, stereogenism, photophysical and bioactivity studies. *Research on Chemical Intermediates*, 49(5), 2071-2098.

169. Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
170. Sharma, O. P., Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.
171. Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
172. Morozowich, N. L., Nichol, J. L., Allcock, H. R. (2012). Investigation of apatite mineralization on antioxidant polyphosphazenes for bone tissue engineering. *Chemistry of Materials*, 24(17), 3500-3509.
173. Morozowich, N. L., Nichol, J. L., Mondschein, R. J. and Allcock, H. R. (2012). Design and examination of an antioxidant-containing polyphosphazene scaffold for tissue engineering. *Polymer Chemistry*, 3(3), 778-786.
174. Choy W.N. (2001). Genetic toxicology and cancer risk assessment. *Marcel Dekker*, 3, 29-187.
175. Mortelmans, K., Rupa, D. S. (2004). Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Advances in Applied Microbiology*, 56(3), 379-397.
176. Zeiger, E. (1998). Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28(2), 85-95.
177. Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A., Norppa, H., Shuker, D. E. and Tice, R. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111-172.
178. Zeiger, E., Haseman, J. K., Shelby, M. D., Margolin, B. H., Tennant, R. W. and Holden, H. (1990). Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16(S18), 1-14.
179. Demirel, S., Zamani, A. G. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3), 123-127.
180. Olaharski, A. J., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonshebbatt, M. E., Guzman, P., Mohar, A. and Eastmond, D. A. (2006). Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 27(2), 337-343.
181. Kaplan, A., Çalışkan, E., Çapan, İ., Tekin, S., Hassan, M. N., Qaoud, M. T., Koran, K., Sandal, S. and Görgülü, A. O. (2024). Development of tripeptide-cyclotriphosphazene derivatives: In vitro cytotoxicity, genotoxicity studies and molecular docking analysis within ovarian and prostate cancer cell line receptors. *Polyhedron*, 264, 117261.

182. Koran, K., Çalışkan, E., Öztürk, D. A., Çapan, İ., Tekin, S., Sandal, S. and Görgülü, A. O. (2023). The first peptide derivatives of dioxybiphenyl-bridged spiro cyclotriphosphazenes: In vitro cytotoxicity activities and DNA damage studies. *Bioorganic Chemistry*, 132, 106338.
183. Beytur, A., Tekin, Ç., Çalışkan, E., Tekin, S., Koran, K., Görgülü, A. O. and Sandal, S. (2022). Hexa-substituted cyclotriphosphazene derivatives containing hetero-ring chalcones: Synthesis, in vitro cytotoxic activity and their DNA damage determination. *Bioorganic Chemistry*, 127, 105997.
184. Wolfe, R. E., Ellis, D. H., Leahy, H. F., Vinegar, A., & Sharma, S. (1997). *Acute oral toxicity evaluation and genotoxicity testing of hexakis(2,2,2-trifluoroethoxy)cyclotriphosphazene, a replacement candidate for ozone depleting substances (AL/OE-TR-1997-0054)*. Armstrong Laboratory, Occupational and Environmental Health Directorate, Toxicology Division, Human Health Systems Center, Air Force Materiel Command, Wright-Patterson AFB, Ohio.
185. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning* (First Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 45-66.
186. Brandt, K., Kruszynski, R., Bartczak, T. J. and Porwolik-Czomperlik, I. (2001). AIDS-related lymphoma screen results and molecular structure determination of a new crown ether bearing aziridinylcyclophosphazene, potentially capable of ion-regulated DNA cleavage action. *Inorganica Chimica Acta*, 322(1-2), 138-144.
187. Akbaş, H., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Süzen, Y., Koç, L. Y., Açık, L. and Çelik, Z. B. (2013). Phosphorus–nitrogen compounds part 27. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing secondary amino and pendant (4-fluorobenzyl) spiro groups. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 294-307.
188. İşcan, Ö., Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Kilic, Z., Acik, L., Özbeden, P. and Hökelek, T. (2020). Synthesis and spectroscopic properties of (N/O) mono-anddispirocyclotriphosphazene derivatives with benzyl pendant arms: study of biological activity? *Turkish Journal of Chemistry*, 44(1), 15-30.
189. Başterzi, N. S., Koçak, S. B., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Çelik, Ö., Türk, M., Koç, L. Y., Açık, L. and Aydın, B. (2015). Syntheses, structural characterization and biological activities of spiro-ansa-spiro-cyclotriphosphazenes. *New Journal of Chemistry*, 39(11), 8825-8839.
190. Jun, Y. J., Kim, J. I., Jun, M. J. and Sohn, Y. S. (2005). Selective tumor targeting by enhanced permeability and retention effect. Synthesis and antitumor activity of polyphosphazene–platinum (II) conjugates. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(8), 1593-1601.
191. Tümer, Y., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Yola, M. L., Solak, A. O., Öner, Y. and Dündar, D. (2013). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 28. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing vanillinato and pendant ferrocenyl groups. *Journal of Molecular Structure*, 1049, 112-124.

192. İşcan, Ö., Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Zeyrek, C. T., Kılıç, Z., Açık, L., Aydın, B., Türk, M. and Hökelek, T. (2022). Phosphorus–nitrogen compounds: part 53—synthesis, characterization, cytotoxic and antimicrobial activity, DNA interaction and molecular docking studies of new mono-and dispirocyclotriphosphazenes with pendant arm (s). *Molecular Diversity*, 26(2), 1077-1100.
193. Bozkurt, B., Elmas, G., Yakut, M., Okumuş, A., Çerçi, N. A., Zeyrek, C. T., Kılıç, Z., Açık, L. and Hökelek, T. (2022). Phosphorus-nitrogen compounds part 59. The syntheses of tetrachloro and tetraamino-2-pyridylmethylspiro (N/N) ethylenediaminocyclotriphosphazenes: Structural characterization, bioactivity, and molecular docking studies. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 69(2), 310-331.
194. Tümer, Y., Koç, L. Y., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Soltanzade, H., Açık, L., Yola, M. L. and Solak, A. O. (2015). Phosphorus–nitrogen compounds: part 30. syntheses and structural investigations, antimicrobial and cytotoxic activities and DNA interactions of vanillinato-substituted NN or NO spirocyclic monoferrocenyl cyclotriphosphazenes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20, 165-178.



*Gazili olmak ayrıcalıktır...*