



**BAZI FOSFAZENLERİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİ VE DNA ETKİLEŞİMLERİ**

Berivan TÖRE

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2023

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.

Berivan TÖRE

28/07/2023

BAZI FOSFAZENLERİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ VE DNA ETKİLEŞİMLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Berivan TÖRE

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2023

ÖZET

Bu çalışma kapsamında sentetik olarak ilk defa üretilmiş olan spirosiklotrifosfazen bileşiklerinin antioksidan aktivitesinin tayini için bileşiklerin DPPH serbest radikalini süpürücü etkisi incelenmiştir. Bileşiklerin çeşitli patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin tespiti için mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile mayaların Minimal fungusidal konsantrasyon (MFK), minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri tayin edilmiştir. Bakterilerin ise minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimal inhibitör konsantrasyon değerleri tespit edilmiştir. Bileşiklerin plazmit DNA ile olan etkileşimleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri kullanılarak bileşiklerin, DNA üzerindeki bazı bölgelere bağlanma durumunu değerlendirilmiştir. DPPH metodu ile antioksidan aktivitesi tayini sonuçlarına göre en düşük IC₅₀ değerleri farklı konsantrasyonlar için 83,97±13,71 µM aralığındadır. Bileşiklerin belirtilen konsantrasyonlarda (5000-1000 µM) antioksidan aktivite miktarının çoktan aza doğru 1a, 2a ve 3a şeklinde olduğu tespit edilmiştir. 3a bileşiğinin antioksidan aktivitesinin diğer bileşiklere göre çok daha az olduğu görülmektedir. Bileşiklerin MİK ve MBK değerlerinin 2500-625 µM arasında değiştiği saptanmıştır. Bileşiklerin MFK değerleri de 2500-625 µM aralığında bulunurken, mayalarda MİK değerleri 625-312.5 µM aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin maya türlerine karşı antimikrobiyal etkisinin bakterilere oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bileşiklerin plazmid DNA'ya bağlandığı tespit edilmiştir. DNA enzim kesimi yöntemiyle belirlenen kesim bölgelerinde maddelerin DNA'ya bağlanmadığı belirlenmiştir. Bileşiklerin DNA ile etkileşimleri, bileşiklerin potansiyel antikanser madde olabileceği ihtimalini akla getirmekte olup ilerleyen çalışmalarda antikanser özelliğinin araştırılması önerilmektedir.

Bilim Kodu :20326
Anahtar Kelimeler : Fosfazen, DNA etkileşimi, antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite
Sayfa Adedi : 63
Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND DNA INTERACTIONS OF
SOME PHOSPHAZENES

(Master's thesis)

Berivan TÖRE

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2023

ABSTRACT

In this study, the scavenging effect of DPPH free radicals was investigated for the determination of the antioxidant activity of spirocyclotriphosphazene compounds, which were produced for the first time synthetically. Microdilution method was used to determine the antimicrobial activity of the were compounds on various pathogenic microorganisms. Minimal Fungicidal Concentration (MFC) and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values of yeast species determined. Minimal Bactericidal Concentration (MBC) and MIC values of bacteria were determined. The interactions of the compounds with plasmid DNA were investigated by agarose gel electrophoresis method. In addition, the binding status of the compounds to some regions on the DNA was evaluated using *Bam*HI and *Hind*III enzymes. According to the results of antioxidant activity determination by DPPH method, IC₅₀ values are in the range of 83.97±13.71 µM for different concentrations. It was determined that the amount of antioxidant activity of the compounds at the indicated concentrations (5000-1000 µM) was 1a, 2a and 3a from high to low. It is seen that the antioxidant activity of 3a compound is much less than other compounds. It has been determined that the MIC and MBC values of the compounds vary between 2500-625 µM. The MFC values of the compounds were also found to be in the range of 2500-625 µM while MIC values on yeasts are in the range of 625-312.5 µM. It was determined that the antimicrobial effect of the compounds on yeast species were higher than most of the bacteria species. It was determined that the compounds bind to plasmid DNA. The interactions of the compounds with DNA bring to mind the possibility that the compounds may be potential anticancer agents, and it is recommended to investigate their anticancer properties in future studies.

Science Code : 20326
Key Words : Phosphazene, DNA interaction, antioxidant activity, antimicrobial activity
Page Number : 63
Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca bana yol gösteren, kıymetli tecrübelerinden yararlandığım, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK'a, Tezimde kullandığım kimyasal bileşikleri sağlayan Ankara üniversitesi öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Aytuğ OKUMUŞ'a, Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Betül AYDIN'a ve Dr. Süheyla Pınar ÇELİK'e ve varlığını hep yanımda hissettiğim değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma 'N/N Donör Atomlu (2-Tiyofenilmetil) Spirosiklotrifosfazen Türevlerinin Sentezi: Stereojenik, Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi, Kanseri ve Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif Etkilerinin İki Boyutlu Hücre Kültürü ile Üç Boyutlu Tümör Modelinde Araştırılması' adlı 121Z238 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Fosfazenlerin Genel Özellikleri.....	5
2.2. Enfeksiyon Hastalıkları ve Enfeksiyona Sebep Olan Mikroorganizmalar	5
2.2.1. Bakteriler.....	6
2.2.2. Mayalar	8
2.2.3. Enfeksiyona sebep olan önemli patojenler.....	9
2.3. Antimikrobiyal Maddeler	18
2.3.1. Antimikrobiyal ilaçlar.....	18
2.3.2. Antifungal ilaçlar	22
2.3.3. Antimikrobiyal direnç.....	24
2.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stress	30
2.5. Antioksidanlar	30
2.6. DNA-ilâç Etkileşimleri	31
2.6.1. DNA yapısı ve genel özellikleri	31
2.6.2. DNA-ilâç etkileşim mekanizmaları	32

	Sayfa
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal	39
3.1.1. Kullanılan bileşikler.....	39
3.1.2. Mikroorganizmalar ve gelişme koşulları	39
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	41
3.1.4. Kullanılan sarf malzemeler, aletler ve cihazlar	41
3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	41
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	42
3.2.2. Bileşiklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....	43
3.2.3. Bileşiklerin DNA ile etkileşiminin belirlenmesi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	45
4.1. Antimikrobiyal Aktivite	45
4.2. Antioksidan Aktivite	48
4.3. Bileşiklerin DNA ile Etkileşimi	49
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	63

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. İnsan mikrobiyotasında bulunan bazı mikroorganizmalar	6
Çizelge 2.2. Çeşitli antibiyotiklerin organizmalarda oluşturduğu antibiyotik direnç mekanizmaları.....	26
Çizelge 2.3. Klinik olarak çoklu direnç geliştiren patojenler ve dirençli oldukları antibiyotikler.....	27
Çizelge 2.4. Antifungal ilaçların hedef bölgeleri ve oluşturulan direnç mekanizmaları. AMB, amfoterisin B; FCZ, flukonazol; ITZ, itrakonazol; VRC, vorikonazol; PSC, posakonazol; CPF, kaspofungin; ANF, anidulafungin; MCF, mikafungin; GS, b-(1,3)-D-glukan sentaz; TF, transkripsiyon faktörü	29
Çizelge 4.1. 1a, 2a, 3a bileşiklerinin MİK değerleri (2400-312,5 µM).....	47
Çizelge 4.2. Bileşiklerinin MBK ve MFK değerleri (2500- 525 µM).....	48
Çizelge 4.3. Bileşiklerin IC 50 değerine göre serbest radikalleri süpürücü etkisi (516 nm)	49

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Farklı bakteri şekilleri	7
Şekil 2.2. <i>S. cerevisiae</i> mayasının hücre duvarının yapısı.....	9
Şekil 2.3. Patojenik <i>E. coli</i> bakterisinin evrimine mobil genetik elementlerin katkısı	11
Şekil 2.4. <i>K. pneumoniae</i> virülansı için kapsülün bir dizi farklı işlevi	14
Şekil 2.5. Kinolonların patojen DNA'sının tamirini engelleyerek hücre ölümüne yol açması.....	20
Şekil 2.6. Beta laktamların PBP enzimine etki ederek peptidoglikan yapının oluşumunu engellemesi ve hücre ölümünün gerçekleşmesi.....	21
Şekil 2.7. Aminoglikozitlerin protein sentezine müdahale ederek hücre yapısı için önemli bir proteini yanlış kodlaması sonucu hücre ölümünün gerçekleşmesi.....	22
Şekil 2.8. Çeşitli antifungal ilaçların etkilediği bölgeler ve etki mekanizmaları	24
Şekil 2.9. DNA'nın çift sarmal yapısı	31
Şekil 2.10. DNA sarmalına kovalent bağlanan anti-kanser ilaçlarının yapıları.....	34
Şekil 2.11. DNA sarmalı içine kovalent bağlanan bir Cis-platinin üç boyutlu yapısının görünümü. Platin atomu beyaz bir küre olarak gösterilmiştir; NH ₃ ligandları mavi küreleri gösterir.	34
Şekil 2.12. (A) Çapraz köprülerin oluşumu ve sonuç olarak DNA replikasyonu ve transkripsiyonun inhibisyonu. (B) Alkillenmiş G bazlarının T nükleotidi ile eşleşmesi sonucu kalıcı mutasyon oluşumu. (C) Yanlış eşleşme sonucu DNA fragmentasyonu	35
Şekil 2.13. İlaçların kovalent olmayan etkileşimlerle DNA ile etkileşimi	36
Şekil 2.14. İnterkalatör ajanın DNA omurgasına istiflenmesi	37
Şekil 2.15. Soldaki resim; minör oluğa bağlanan bir ajan gösterimi. Sağdaki resim; interkalasyon ile bağlanan DNA bazlarına bağlanan bir ajan gösterimi.....	38
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan 1a, 2a ve 3a bileşiklerinin yapıları	40

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. C ve d’de sırasıyla gram pozitif ve gram negatif bakteriye ait hücre duvarı katmanlarının elektron mikroskopu görüntüsü. E ve f resimlerinde sırasıyla gram pozitif ve gram negatif bakterilerin taramalı elektron mikroskopu ile hücre görünümüleri.....	8
Resim 2.2. (a) Endospor oluşturmuş <i>B. subtilis</i> bakterisinin transmisyon elektron mikroskopu altında görüntüsü (b) <i>B. subtilis</i> bakterisinin floresan mikroskopu altındaki görüntüsü, yeşil floresanlı endospor proteini gösterimi.....	13
Resim 2.3. <i>C. Albicans</i> mayasının iplikçik şeklindeki görüntüsü.....	17
Resim 2.4. <i>C. krusei</i> hücre ve koloni morfolojisi (A) YPD sıvısı için kalkoflor beyazı ile boyalı (B) 37°C’de inkübe edilmiş RPMI ortamında hücre filamentasyonu (C)YPD ortamında büyütülmüş bir <i>C. krusei</i> kolonisi.....	18
Resim 4.1. En etkin bileşiklerden bazılarının patojenler üzerinde etkisi	46
Resim 4.2. Sol 5 (1-5) 1a bileşiği ile plazmid DNA etkileşimi, orta 5 hat (6-10) 2a bileşiğinin DNA etkileşimleri, sağ 5 hat (11-15) 3a bileşiğinin DNA etkileşimlerini; hat 1,6,11: 625 µM, hat 2,7,12: 312,5 µM , hat 3,8,13: 156,25 µM, hat 4,9,14: 78,125 µM, hat 5,10,15: 39,512 µM; Form I (kovalent olarak kapalı dairesel-süpersarmal), Form II (açık halkasal form) ve Form III (doğrusal DNA).....	49
Resim 4.3. Çalışmada kullanılan bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA’nın BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile kesimi. (P): Bileşiklerle muamele edilmemiş plazmit DNA; (P/H): HindIII ile kesilmiş plazmit DNA; (P/B): BamHI ile kesilmiş plazmit DNA	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat derece
μM	Mikromolar
V	Volt
mm	Milimetre
μm	Mikrometre
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

A	Adenin
AMB	Amfoterisin B
AMR	Antimikrobiyal direnç
ANF	Anidulafungin
Cis-platin	Cis-dichlorodiammineplatinum (II)
CPF	Kaspofungin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asiti
DPPH	2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FCZ	Flukonazol
G	Guanin
GS	b-(1,3)-D-glukan sentaz
HO ₂	Hidroperoksil
IFI	İnvaziv mantar enfeksiyonları
ITZ	İtrakonazol
KF	Kistik fibroz

Kısaltmalar**Açıklamalar**

MBK	Minimal bakterisidal konsantrasyon
MCF	Mikafungin
MDR	Çoklu ilaca direnci
MFK	Minimal fungisidal konsantrasyon
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyon
MRSA	Metisiline karşı çoklu dirence sahip <i>S. aureus</i>
NO₂)	Nitrik oksit ve nitrojen dioksit
PAI	Patojenite adaları
PBP	Penisiline bağlanan proteinlerle
PDR	Pan-drug rezistans
PSC	Posakonazol
R	Direnç plazmitleri
RNA	Ribonükleik asit
RNT	Reaktif nitrojen türleri
RO	Alkoksil
RO₂•	Peroksil
ROS	Reaktif oksijen türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
S	Sitozin
T	Timin
TAE	Tris asetik asit EDTA
TF	Transkripsiyon faktörü
Tn	Transpozonlar
VRC	Vorikonazol
XDR	Aşırı derecede ilaca dirençli

1. GİRİŞ

Fosfazenler, fosfor ve azot atomları ($-P=N-$) aracılığıyla sırayla birbirine bağlanabilen ve lineer, siklik veya polimerik yapılarda bulunabilen bileşiklerdir (Gleria ve De Jaeger, 2001). Fosfazenler içerdikleri azot fosfat bağı ile dikkat çekerken aynı zamanda en büyük inorganik molekül sınıfını oluşturmaktadır (Chaplin ve diğerleri 2005). Fosfazenler düz zincir halinde veya halkasal yapıda olabilmektedir. Halkalı yapıda olan fosfazenlerin başına siklo eki gelmektedir. Öte yandan fosfazenlerin polimerleşme seviyesi ise tri, tetra, penta ön ekleri ile gösterilmektedir (Allcock, 1972). Bu çalışmada kullanılan siklotrifosfazenler halkasal yapıya sahiptir ve tri polimerleşme seviyesini belirtmektedir. Çeşitli siklotrifosfazen bileşikleriyle yapılmış çalışmalar bulunmasına rağmen, bu çalışma için ilk defa sentezlenmiş kumarin içeren siklotrifosfazen bileşiklerinin biyolojik aktivitesini belirleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Kumarin içeren farklı siklotrifosfazenler bileşikleriyle ilgili literatürde kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Son yirmi yıl boyunca, fosfazenin fosfor atomlarındaki nükleofilik süstitüsyon reaksiyonları, biyomedikal materyaller, antikanser ve antimikrobiyal ajanlar, sıvı kristaller ve organik ışık yayan diyotlar ve floresans sensörü gibi materyallerin üretiminde kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında ilk kez üretilen bileşiklerin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi, antimikrobiyal, antioksidan madde özelliklerinin ve DNA etkileşimlerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Bu çağın en önemli sağlık sorunlarının başında antibiyotik direncinin ve kanser oranının giderek artması gelmektedir. Enfeksiyon hastalıkları tarih boyunca belirli hastalıklarda veya epidemik boyutlarda sürekli olarak kendini göstermiştir. Antibiyotiğin keşfinden sonra, enfeksiyonel hastalıklardan kaynaklı ölümler ve vücutta oluşabilecek kalıcı hasarlar minimum seviyeye inmiştir. Enfeksiyona sebep olan patojenler bu antibiyotiklere karşı kendi savunma mekanizmalarını oluşturmakta ve antibiyotik tedavisinden kurtulan patojenlerin antibiyotik direnci geliştirdiği görülmektedir. Bu nedenle çağın en büyük sağlık sorunlarından biri olan antibiyotik direnci, enfeksiyonel hastalıklar ile savaşmada bizi geriye götürmekte ve yeni antimikrobiyal maddelere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Ayrıca günümüz koşullarında doğa kirliliği ve şehirleşmenin getirdiği artan temas oranı enfeksiyon hastalıklarına sebep olan patojenlere maruz kalma olasılığımızı arttırmaktadır. Günümüzde artan enfeksiyon hastalıkları ve buna bağlı olarak artan antibiyotik direncinden kaynaklı, direnç oluşturmayacak yeni antimikrobiyal maddelere olan ihtiyaç artmaktadır. Özellikle hastane ortamlarında oluşan enfeksiyonların zaten hasta olan bireylerde ölümcül etkilere yol

açabileceği ve antibiyotik direncinin sürekli olarak artması göz önüne alındığında, bu riskleri en aza indirmek adına yeni antimikrobiyal madde arayışı önem arz etmektedir. Bu çalışmada kullanılan siklotrifosfazen türevleri ile ilgili herhangi bir antimikrobiyal aktivite çalışması bulunmamaktadır.

Çağımızın diğer bir sorunu olan kanser hastalığı ise dünyada en çok ölüme sebep olan hastalıklar arasında 2. sırada gelmektedir. Sağlıklı bir bireyde, bir hücrenin vücut tarafından bölünmesinin kontrolünü sağlayan çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Hücrede kontrol mekanizmalarına etki eden değişiklikler meydana geldiğinde hücre, bölünme kontrolünü yitirir. Bu noktada hücreler diğer hücre alanlarını da işgal ederek kitlesel bir şekilde büyüme göstermeye başlar. Kansere karşı geliştirilen en bilinen tedavi yöntemleri kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler ile kanserli bölgenin alınmasıdır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar kanser hücrelerini hedef alarak seçici toksisite göstermektedir. Öte yandan bu tedavi yöntemi hastada istenmeyen birçok yan etkiye ve sağlıklı hücrelerin zarar görmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kanser yönelik sağlıklı hücrelere zararın minimuma indirildiği ilaçlara olan rağbet artmaktadır. Üzerinde çalışılan önemli antikanser sınıfı ilaçların bazıları direkt Deoksiribonükleik asiti (DNA) hedef almaktadır. DNA ile etkileşime giren ajanların DNA'ya bağlanma, DNA'yı kesme, çapraz bağlama, alkilleme, topoizomeras inhibitörü gibi fonksiyonları bulunmaktadır (Nussbaumer ve diğerleri, 2011). Bu nedenle ilk kez bu çalışmada sentezlenen bileşiklerin plazmid DNA ile etkileşimleri belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında siklotrifosfazen bileşiklerinin çeşitli en bilinen patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi, antioksidan aktivitesi ve plazmit DNA ile olan etkileşimi incelenmiştir. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarında sentezlenmiş olan fosfazen bileşiklerinin, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterococcus hirae* ATCC 9790 , *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* RSKK 96029, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 bakterileri ile *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida tropicalis* NRRL Y-12968 mayaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite gösteren bileşiklerin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK), minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimal fungusidal konsantrasyon (MFK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir. Bileşikleri antioksidan aktivitesinin belirlenebilmesi için DPPH serbest radikalini süpürücü

etkisi araştırılmıştır. Bileşik-plazmit DNA etkileşimlerinin incelenmesi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Etkileşimin olduğu bölgenin belirlenmesi için DNA, *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile 5'-G/GATCC-3' ve 5'- A/AGCTT-3' bölgelerinden kesilmiştir. Yapılan bu çalışmadan elde edilen verilerin önemli sağlık sorunlarından olan çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için kullanılabilecek potansiyel antimikrobiyal madde olup olmayacağı araştırılmıştır. Ayrıca DNA ile etkileşimlerine bakılarak kanser hücreleri üzerinde etkili olma potansiyeli araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fosfazenlerin Genel Özellikleri

İlk fosfazen bileşiği, Liebig ve Wöhler tarafından, 1834 yılında sentezlenmiştir. Bu birleşik amonyumklorür ve fosforpentaklorür arasındaki reaksiyon sonucunda, elde edilen heksaklorosiklotrifosfazendir. Fosfazenlerin yapılarında tekrarlayan $-P=N-$ birimleri bulunmaktadır. Birçok farklı oligomer ve polimer içerebilen bir yapıya sahiptirler. Düz zincirli ve halkalı bileşiklerdir. Siklofosfazenler hem organik hem de $P=N$ zinciri bulundurmalarından dolayı anorganiktirler. Fosfazenlerin en ilgi çekici özelliği içerdikleri fosfor grubundan dolayı farklı birleşiklerle bağ kurup, farklı özellikler kazanabilmesidir. Bu sayede birçok değişik alanda kullanıma açıktır (Gleria ve De Jaeger 2005). Fosfazenler, yanmaz fiberler, yüksek performanslı elastomerler, yangın geciktiriciler olarak kullanılmaktadır (Walker, 1972). Ayrıca biyolojik uyumlu materyaller, biyolojik aktiviteye sahip olan anti bakteriyel ve anti karsinogenik maddeler olarak birçok farklı alanda da kullanılabilmektedir (Van Der Huizen, 1984).

Siklotrifosfazenler, siklofosfazen sınıfının bir üyesidir ve genellikle heksaklorosiklotrifosfazen $N_3 P_3 Cl_6$ 'nın (1) reaktif Cl atomlarının farklı mono, di, tri ve tetrafonksiyonel ve organometalik reaktiflerle nükleofilik yer değiştirmesi ile hazırlanırlar. Bu çalışmada Kullanılan siklotrifofazenler, kumarin grubu içermektedir. Kumarinler, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, anti-kanserojen, anti-HIV ve antikoagülan özelliklere sahiptir. Kumarinler, gıda bileşenlerinde, antioksidanlarda ve flüoresan sensörlerde önemli rol oynayan bileşiklerin alan grubudur. Bir dizi kumarol türevi ve bunların metal kompleksleri sentezlenmiş ve antifungal, böcek öldürücü, antibakteriyel, antialerjik, antikoagülan ve farmakolojik özellikleri açısından test edilmiştir. Son on yılda kumarin türevleri bir antikanser ajanı olarak araştırılmıştır (Şenkuytu ve diğerleri, 2017).

2.2. Enfeksiyon Hastalıkları ve Enfeksiyona Sebep Olan Mikroorganizmalar

İnsan vücudunda çok çeşitli mikroorganizmalar bulunmaktadır. Deri, memeli bezleri, plasenta, seminal sıvı, rahim, yumurtalıklar, akciğerler, konjonktiva (gözde bulunan bir zar), gastrointestinal sistem gibi birçok farklı bölgede bulunan, konağa zarar vermeden yaşayan mikroorganizma topluluğuna mikrobiyota denir. Mikrobiyota bakteri, arke, protist, mantar

ve virüslerden meydana gelmektedir (Çizelge 2.1). Normal mikrobiyotanın bir parçası olan mikroorganizmaların üremesi, bağışıklık sistemi tarafından sürekli olarak kontrol altında tutulmaktadır. Mikrobiyotada bulunan mikroorganizmalar, bağışıklık hücrelerinin sürekli uyarılarak, aktif üretilmesini sağlamaktadır. Bu mikroorganizmalar aynı zamanda normal mikrobiyota florasını işgal etmek isteyen yabancı patojenlerle savaşarak, bağışıklık sistemine destek olmaktadır. Dolayısıyla insan vücudu farklı mikroorganizmalar ile sürekli temas halindedir. Patojenlerin kontrolsüz bir biçimde çoğalarak neden olduğu hastalıklara enfeksiyon hastalıkları adı verilir. Enfeksiyon vücuttaki mikroorganizma dengesinin bozularak bir veya daha fazla mikroorganizmanın çoğalması ve baskın hale gelmesi sonucu oluşmaktadır. Bu durumda patojenler homeostatik dengeyi bozarak veya bazı toksinler salarak hastalığa sebep olmaktadır. Bağışıklığın güçlü olduğu bireylerde bu durum çabucak atlatılabilirken, bağışıklığın zayıf olduğu bireylerde patojenler enfeksiyon hastalıklarına sebep olmaktadır. Mikrobiyatayı oluşturan patojenlere örnek olarak burun membranında bulunan *S. aureus* ve üst solunum yolunda bulunan *Streptococcus pneumoniae* verilebilir. Mikroorganizmanın patojenisitesi bulunduğu konuma göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin, bağırsaklarda normal mikrobiyotanın bir parçası olan *E. coli*, midede çoğalmaya başlarsa şiddetli ishale neden olabilmektedir (Terry, 2018).

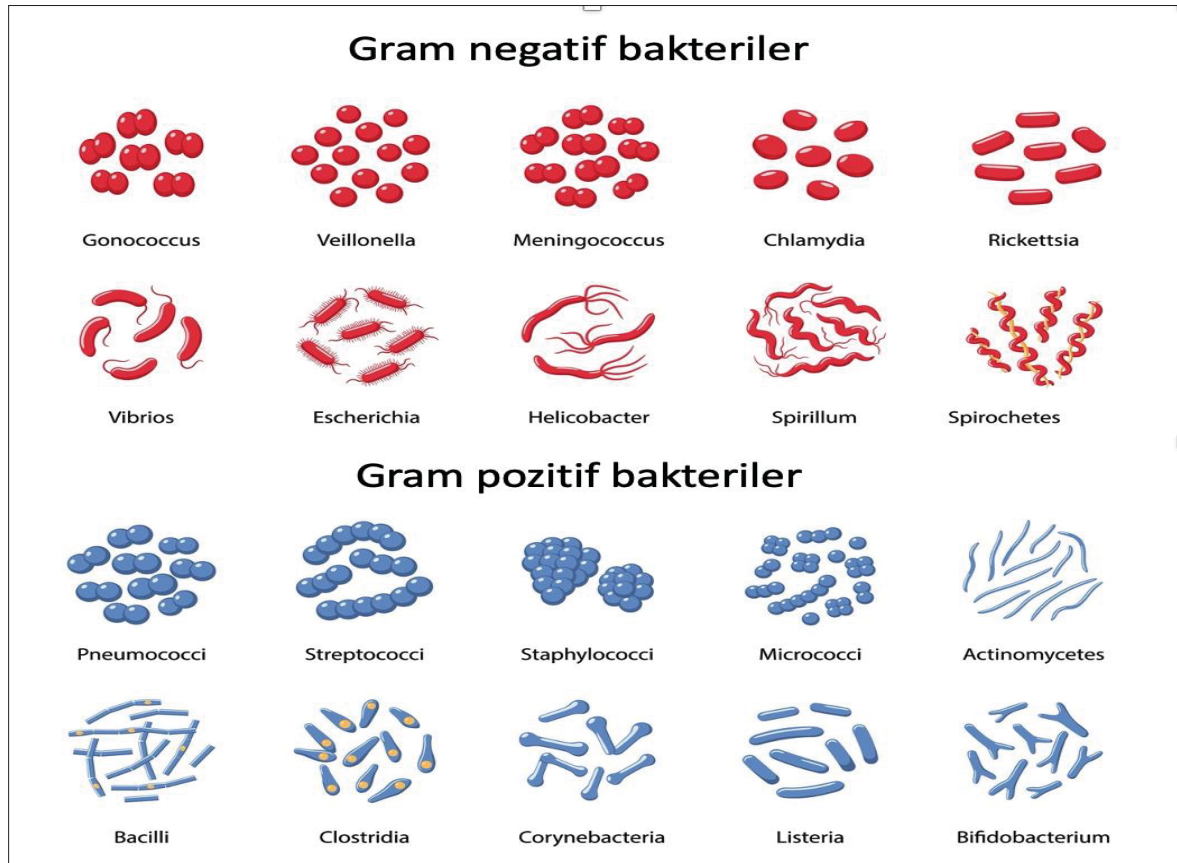
Çizelge 2.1. İnsan mikrobiyotasında bulunan bazı mikroorganizmalar (Levinson, 2004/2008)

Anatomik yerleşim	Mikrobiyota türleri
Burun	<i>S. aureus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>S. epidermidis</i> , çeşitli streptokoklar
Ağız	Viridans streptokoklar, <i>Eikenella corrodens</i> , çeşitli streptokoklar
Deri	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , çeşitli streptokoklar, anaeroplalar, <i>P. aeruginosa</i> , mayalar (örneğin; <i>C. albicans</i>)
Kolon	<i>E. coli</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>E. faecalis</i> , çeşitli aerobik gram negatif çomaklar, <i>Clostridium</i>
Üretra	<i>S. epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> , çeşitli gram negatif çomaklar (örn. <i>E. coli</i>), çeşitli streptokoklar

2.2.1. Bakteriler

Bakteriler birçok farklı habitatta bulunabilen tek hücreli prokaryot canlılardır. Genetik materyal ve organeller sitoplazmada bulunmaktadır. Dolayısıyla protein ifadesi, solunum

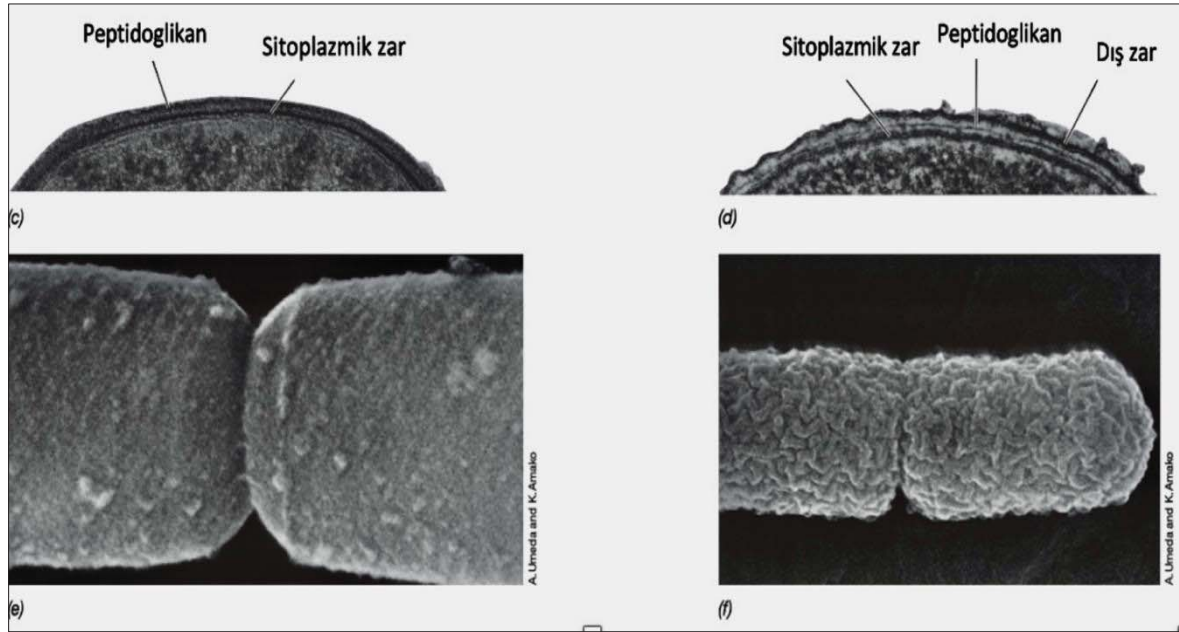
gibi metabolik aktiviteler sitoplazmada gerçekleşmektedir. Bakteriler şekillerine göre, kok, çubuk, spiral, tomurcuklanarak uzayan, spiroket ve filamentöz yapı olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2.1). Bakteriler hücre duvarının yapısına göre ise gram negatif ve gram pozitif olarak sınıflandırılırlar (Resim 2.1) (Madigan ve diğerleri, 2012). Bakteriler genellikle iki eşit hücreye bölünerek çoğalırlar; bu işleme ikili fizyon denir. Beslenme için çoğu bakteri, doğada ölü veya canlı organizmalardan elde edilebilen organik kimyasallar kullanır. Bazı bakteriler fotosentez yaparak kendi besinlerini üretebilir, bazıları ise inorganik maddelerden besin elde edebilir. Birçok bakteri, kamçı adı verilen hareketli uzantıları kullanarak bir sıvı ortamda yüzerek hareket edebilmektedir (Tortora ve diğerleri, 2018)



Şekil 2.1. Farklı bakteri şekilleri (Adobe stock, bilinmiyor)

Bakterilerin sitoplazmik konsantrasyonu yüksek olduğundan hücrenin yüzeyine yapılan ozmotik basınç yüksektir. Yüksek basınç hücrenin lizis olmasına sebep olmaktadır. Bakterilerin hücre yüzeyleri hücrenin şeklini korumak için hücre duvarı ile kaplıdır. Bakteride gram negatif ve gram pozitif olmak üzere iki tip hücre duvarı bulunur. Gram pozitif hücre duvarı tek tip molekülden oluşan kalın bir tabakadır. Gram negatif hücre duvarı ise birçok farklı katmandan ve farklı moleküllerden meydana gelir (Resim 2.1). Her iki tip

bakteride de peptidoglikan tabakası bulunur. Bu tabakada glikan kısmındaki N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin şekerleri β -1,4 bağları ile bağlanmıştır. Bu bağlar X ekseninde polisakkarit omurgayı oluştururken, Y ekseninde ise N-asetilglukozaminlere, L-alanin, D-glutamik asit, diaminopimelik asit, D-alanin gibi amino asitler bağlanmaktadır. Peptidoglikanı oluşturan bu birime glikan tetrapeptit adı verilir. Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan yapısına gömülü teikoik asitler bulunur. Bu asitler bazı metal iyonlarının geçişine yardımcı olmaktadır. Teikoik asitlerin peptidoglikan yerine hücre zarına gömülü haline ise lipoteikoik asit denir. Gram negatif bakteri yapısında ise ince bir peptidoglikan yapısına ek dış zar bulunmaktadır. Dış zar protein içeren fosfolipid yapısına ek olarak farklı polisakkarit ve lipid yapıları içermektedir. Bu nedenle dış zar lipopolisakkarit tabakası olarak adlandırılmaktadır (Madigan ve diğerleri, 2019).

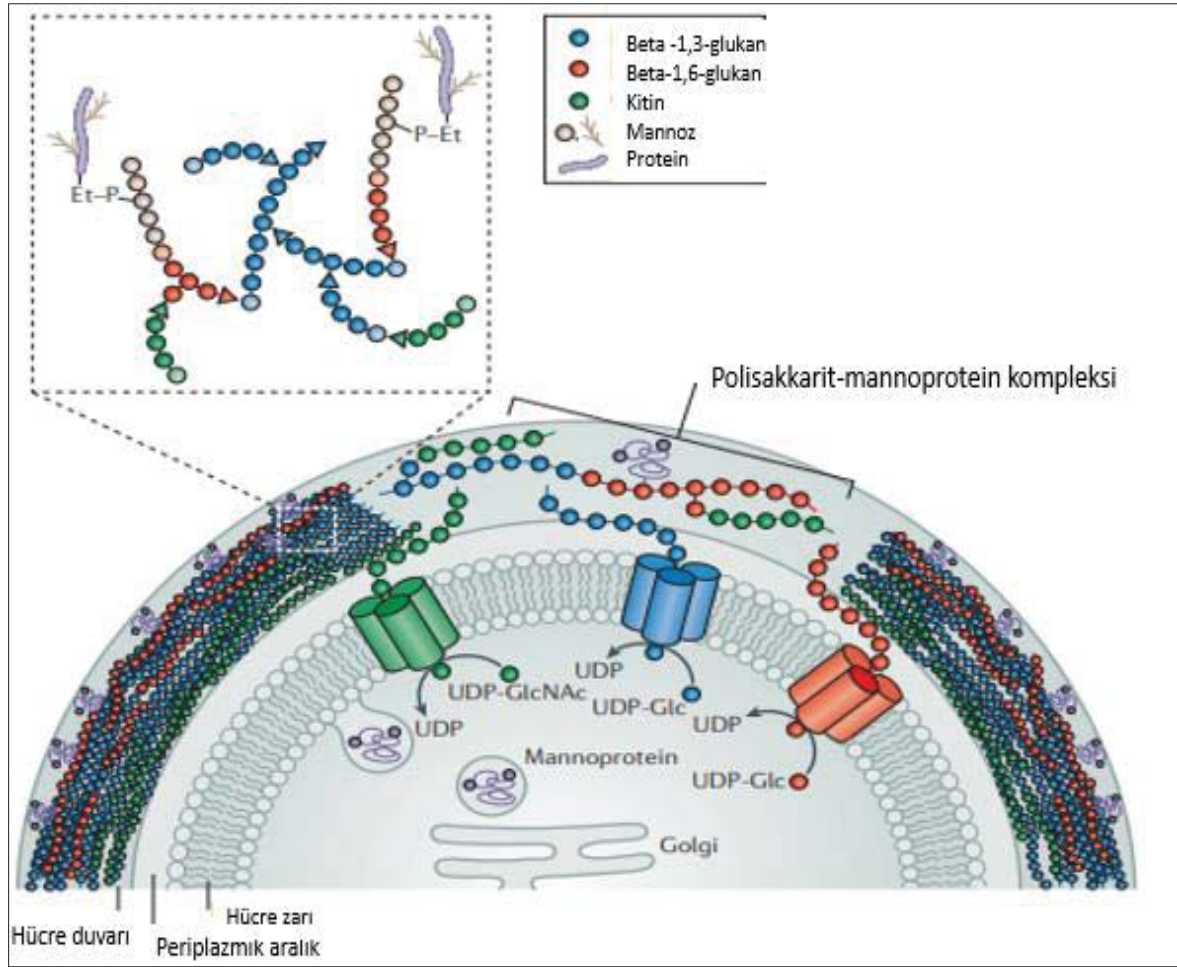


Resim 2.1. C ve d’de sırasıyla gram pozitif ve gram negatif bakteriye ait hücre duvarı katmanlarının elektron mikroskopu görüntüsü. E ve f resimlerinde sırasıyla gram pozitif ve gram negatif bakterilerin taramalı elektron mikroskopu ile hücre görünümü (Madigan ve diğerleri, 2012)

2.2.2. Mayalar

Mayalar tek hücreli ökaryotlardır. Funguslar içerisinde yer alır. Mayaların hücre duvarının yaklaşık %90’ını polisakkaritler oluşturmaktadır. Bu polisakkarit yapıları kitin, mannan, galaktozan ve kitozandan oluşmaktadır. Polisakkaritlerden geriye kalan kısımlarını ise lipid, protein, polifosfat ve inorganik iyonlar oluşturmaktadır. Hücre duvarının içeriği

organizmaya göre değişkenlik göstermektedir. Aşağıdaki şekilde *Saccharomyces cerevisiae* mayasının hücre duvarı yapısı gösterilmektedir (Şekil 2.2). Maya hücre duvarının iç katmanı polisakkaritler β -1,3-glukan, β -1,6-glukan ve kitinden, dış katmanı ise mannoproteinlerden oluşmaktadır. Mayaları hedef alan ilaçlar geliştirilirken hücre duvarının bütünlüğünü bozmaya yönelik kimyasallar geliştirilmektedir (Cabib ve Arroyo, 2013).



Şekil 2.2. *S. cerevisiae* mayasının hücre duvarının yapısı (Cabib ve Arroyo, 2013)

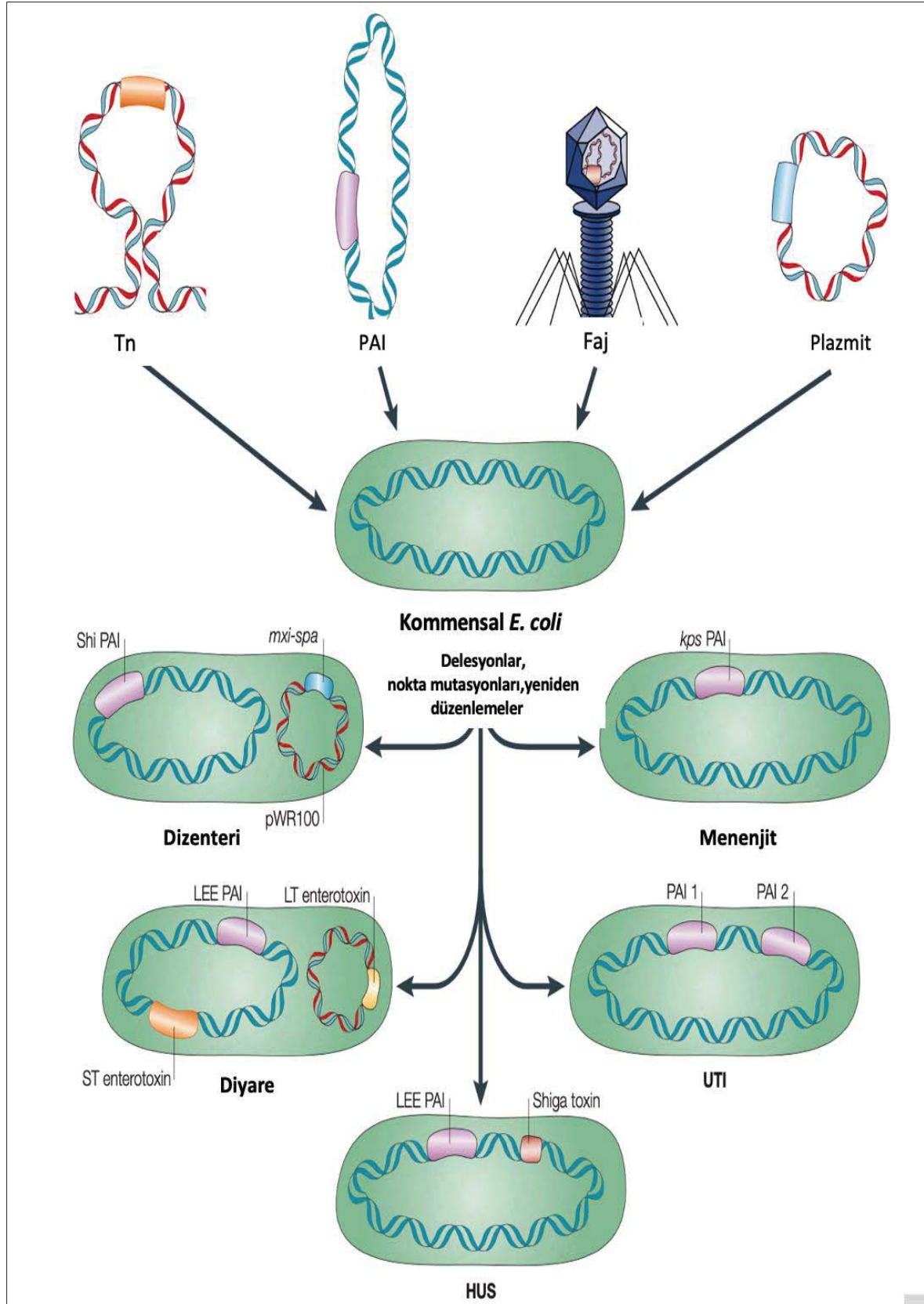
2.2.3. Enfeksiyona sebep olan önemli patojenler

KontROLSÜZ bir şekilde çoğalarak enfeksiyona sebep olan mikroorganizmalara patojen denir. Tespit edilen ilk patojenlerden birisi *Vibrio cholera* bakterisidir. Bu bakteri 1854 yılında Filippo Pacini tarafından tespit edilmiştir. *Giardia lamblia* adlı bakteri ise 1600 lü yıllarda Leeuwenhoeck tarafından tespit edilmiştir. Bu bakterilerin patojenik olduğu çok sonraları hastalıkla ilişkilendirilerek anlaşılmıştır. O zamandan beri *E. coli*, *Helicobacter pylori* gibi

birçok patojen tespit edilmiş olup, bu bakterilere karşı çeşitli ilaçlar geliştirilmiştir (Terry, 2018).

Escherichia coli

E. coli gram negatif, çubuk biçimli fakültatif aneorobik solunum yapan bir bakteridir. Bu bakteri insan mikrobiyotasında kommensal yaşayan mikroorganizmalardan bir tanesidir. *E. coli* doğumdan birkaç saat sonra bebeğin gastrointestinal sisteminde koloni oluşturmaya başlar ve burada baskın hale gelir. Mikrobiyotada bulunan *E. coli* bakterisinin bazı istisnai durumlar dışında herhangi bir patojenik etkisi bulunmamaktadır. Bu istisnai durumlara örnek olarak kişilerde bağışıklık sistemin zayıflaması veya peritonit olma durumları verilebilir. Bu bakterinin çeşitli viral faktörlere maruz kalması ile oluşan mutant hali patojenik etkiye sahip olabilmektedir. Sadece en etkili virülans faktörlerinin kombinasyonları patojenik etkiye sahip *E. coli* bakterilerine neden olabilmektedir. Patojenik *E. coli* üç genel klinik sendroma neden olabilir: enterik/ishal hastalığı, idrar yolu enfeksiyonları ve sepsis/menenjit. Bağırsak patojenleri arasında iyi tanımlanmış altı kategori vardır. Bu kategoriler, enterotoksijenik *E. coli*, enteropatojenik *E. coli*, enterohemorajik *E. coli*, enteroagregatif *E. coli*, enteroinvaziv *E. coli* ve yaygın olarak yapışan *E. coli*'dir. En sık görülen enfeksiyonlar üropatojenik *E. coli*'nin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarıdır. Virülans faktörleri olan transpozonlar (Tn), plazmitler, bakteriyofaj ve patojenite adaları (PAI'ler), patojenik *E. coli* bakterisinin oluşumuna neden olmaktadır. *E. coli*'nin genetik metaryalinde meydana gelen eklemeler, silmeler ve diğer genetik değişiklikler, ishale dizanteriye, hemolitik üremik sendromuna, idrar yolu enfeksiyonlarına ve menenjitte neden olabilen patojenik *E. coli* formlarına yol açabilir (Şekil 2.3) (Kaber ve diğerleri, 2004).



Şekil 2.3. Patojenik *E. coli* bakterisinin evrimine mobil genetik elementlerin katkısı (Kaber ve diğerleri, 2004)

Bacillus cereus

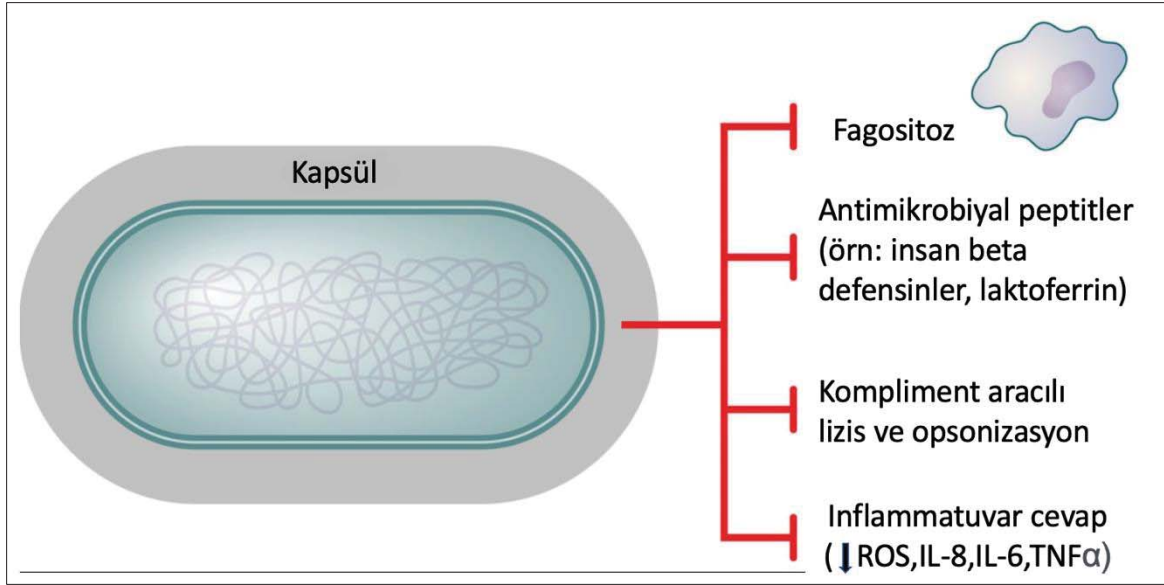
B. cereus, Gram-pozitif aerobik veya fakültatif anaerobik, hareketli, spor oluşturan, çubuk şeklinde bir bakteridir. *B. cereus* esas olarak gıda zehirlenmesi ile ilişkilendirilirken, ciddi ve potansiyel olarak ölümcül gastrointestinal sistem dışı enfeksiyonlara neden olduğu giderek daha fazla bildirilmektedir. Oküler enfeksiyonlarda endoftalmi, panoftalmi ve keratit *B. cereus* bakterisinin oluşturduğu en yaygın şiddetli enfeksiyon türleridir. Acil cerrahi ve antimikrobiyal ajan tedavisi ile bile, gözün bütünüyle alınması ve körlük sıklıkla görülen durumlardandır. *B. cereus*, beta-laktamaz üretir ve bu nedenle beta-laktam antibiyotiklerine dirençlidir. Bu bakteri genellikle vankomisin, klindamisin, kloramfenikol, gentamisin ve eritromisin ile tedaviye duyarlıdır (Bottone, 2010).

Bacillus subtilis

B. subtilis gram pozitif, spor oluşturan aerobik bir bakteridir. Genel olarak toprakta ve bitki üzerinde bulunmaktadır. Endosporlar bakterinin hayatta kalmasını sağlar ve organizmanın aşırı sıcaklık, kuruma veya besin tükenmesi gibi birçok elverişsiz büyüme koşullarına dayanmasını sağlar. Bu nedenle endosporlar, bir bakteriyel yaşam döngüsünün uyku aşaması olarak düşünülebilir:

Vejetatif hücre → endospor → vejetatif hücre

Endosporlar rüzgâr, su veya hayvan bağırsağı yoluyla kolayca dağılır ve bu nedenle endospor oluşturan bakteriler doğada yaygın olarak bulunur. Elektron mikroskopunda görüldüğü gibi *B. subtilis* endosporun yapısı vejetatif hücrenin yapısından belirgin şekilde farklıdır (Resim 2.2). Endospor, vejetatif hücrede bulunmayan birçok katman içerir. En dıştaki tabaka, ince bir protein örtüsü olan ekzosporyumdur. İçeri doğru hareket edildiğinde, spora özgü protein katmanlarından oluşan spor kılıfı vardır (Resim 2.4b). Spor katmanının altında çapraz bağlı, gevşek peptidoglikan yapıdan oluşan korteks bulunur. Korteksin içinde çekirdek duvarı, sitoplazmik membran, sitoplazma, nükleoid, ribozomlar ve diğer hücresel metaryalleri içeren çekirdek bulunur (Madigan ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.4. *K. pneumoniae* virülansı için kapsülün bir dizi farklı işlevi (Paczosa ve Meccas, 2016)

Salmonella typhimurium

S. typhimurium, gram negatif, aneorob, fakültatif bir bakteridir. Bağırsak mukozal epitelinde inflamasyona neden olarak gastroenterite yol açmaktadır (Patel ve McCormick, 2014). *S. typhimurium* birçok gıda türünde görülebilirken, en sıklıkla hazır gıdalarda bulunmakta olup gıda zehirlenmelerinin ana sebeplerinden biri olarak görülmektedir *S. typhimurium* bakterisi kümes hayvanları çiftliklerinde, kuşlarda ve nihayetinde yumurtalarda koloni oluşturarak çoğalmaktadır (Alakomi ve Saarela, 2009). *S. typhimurium* bakterisinin geliştirdiği antimikrobiyal direnç (AMR) günden güne artmaktadır. 2020 yılına kadar, 2600'den fazla serotip tanımlanmıştır (Sun ve diğerleri, 2020).

Staphylococcus aureus

S. aureus, yuvarlak (kok), gram pozitif bir bakteridir. Bu patojen hem toplum bazında hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır. *S. aureus* insanlarda en sık görülen patojenlerden biridir. *S. aureus* bakterisinin insanlarda doğal yaşam alanı deri ve nazofarenkstir. Akciğer enfeksiyonları (örn. pnömoni ve ampiyem), gastroenterit, toksik şok sendromu ve idrar yolu enfeksiyonları bakteriyemi, menenjit, enfektif endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit, septik artrit, protez cihaz enfeksiyonları gibi birçok farklı hastalığa yol açmaktadır. *S. aureus* birçok farklı antibiyotiğe karşı direnç

geliştirdiğinden dolayı tedavisi gün geçtikçe güçleşmektedir. *S. aureus*, cilt üzerinde enfeksiyon oluşturmamaktadır. Bu bakteri kan ve iç organlarda enfeksiyon oluşturduğunda ciddi hastalıklara yol açmaktadır *S. aureus* toplumda ve hastanelerde yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan önemli bir patojen olmaya devam etmektedir. Hastane hastalarında başlıca enfeksiyon bölgeleri cerrahi yaralar ve kalıcı tıbbi cihazlardır. Ek olarak, enterotoksinlerle kontamine olmuş yiyeceklerin yenilmesinden sonra besin zehirlenmesi meydana gelebilir (Foster, 2002)

S. aureus bakterisinin oluşturduğu hastalıklar hücre yüzeyi ile ilişkili proteinler ve hücre dışı protein toksinlerinden kaynaklanır. 1940'ların sonlarında ve antibiyotik çağından günümüze kadar penisilinin piyasaya sürülmesinden bu yana, *S. aureus* her yeni ilaç türüne dirençli hale gelerek hızla uyum sağlamıştır. Bu nedenle nozokomiyal enfeksiyonların önemli bir oranı artık metisiline dirençli *S. aureus* patojeninden kaynaklanmaktadır. MRSA terimi metisiline karşı çoklu dirence sahip *S. aureus* anlamına gelmektedir (Foster, 2002).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa Gram negatif, çubuk şeklinde bir bakteridir. Biyofilm yapısına sahiptir. *P. aeruginosa*'nın optimum büyüme sıcaklığı 25°C ila 37°C arasındadır. 42°C'de büyüme yeteneği olduğundan diğer *Pseudomonas* türlerinden kolaylıkla ayrıştırılabilir. Bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda çeşitli hastalıklara neden olur. Bağışıklık sistemi baskılanmış veya zayıflamış hastalarda, kistik fibroz (KF) hastalığından muzdarip kişilerde ve ciddi yanık durumlarında enfeksiyonlara neden olur. *P. aeruginosa* türleri farklı renklerde pigmentler üretmektedir. Bu bakteri Piyosiyanin (mavi-yeşil), piyorubin (kırmızı-kahverengi), piyoverdin (sarı-yeşil ve floresan) pigmentlerinden birini veya daha fazlasını üretebilmektedir. Bu bakteri antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiştir. Kendinden geliştirdiği direnç mekanizmaları ve sonradan kazandığı antibiyotik direnç genleri ile antibiyotiğe verdiği yanıt giderek azalmaktadır (Wu ve diğerleri, 2015).

Enterococcus hirae

E. hirae gram pozitif bir kok bakteridir. Bu bakteri belirli koşullarda biyofilm üretebilmektedir. *E. hirae* bakterisine ait çok az sayıda yetişkin vakası mevcuttur. Şimdiye kadar açıklanan vakaların tümüyle ciddi vakalardır. *E. hirae*, kalp kapakçığı, idrar yolu, katı

organ enfeksiyonları, safra yolları, disk enfeksiyonları ve bakteriyemi ile ilişkilendirilmektedir. Hastaların bağışıklık sistemi yeterli olsa bile hastalar enfeksiyon geliştirmektedir. Hastaların çoğunda septik şokla bağlantılı olarak ciddi sistemik hastalıklar görülmektedir (Samuel ve diğerleri, 2019).

Enterococcus faecalis

E. faecalis, gram pozitif, fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Sağlıklı bir bireyin mikrobiyotasında bulunan *E. faecalis*, genellikle zararsız olup konağın direnci düşüncü patojenik hale gelen bir mikroorganizmadır. Bu nedenle hastane enfeksiyonlarının önde gelen nedenlerindendir. Adaptasyon yeteneği gelişmiş olan bu bakteri, konak bağışıklığına etkisiz hale getirebilmek için bir dizi yöntem geliştirmiştir. Bu türün neden olduğu enfeksiyonlar antibiyotik tedavisinden sonra bile devam eder (Neng Kao ve diğerleri, 2019).

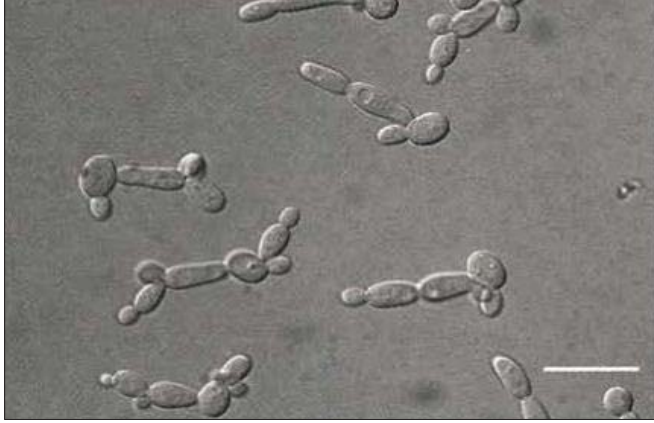
Proteus vulgaris

P. vulgaris, gram negatif, çubuk şeklinde, sporsuz, hareketli ve kapsülsüz bir bakteridir. İnsanlarda kolon mikrobiotasında bulunmaktadır. *P. vulgaris*, toksik lipopolisakkarit içerdiğinden dolayı fareye verildiğinde 48 saat içerisinde farenin ölümüne neden olmaktadır. İnsanda ise bu patojen böbrek taşı, yeni doğan sepsisi, tetanoz, idrar yolu enfeksiyonu ve çeşitli hastane enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (Uslu ve diğerleri, 2011).

Candida albicans

C. albicans güçlü bir biyofilm yapısına sahiptir. *C. albicans* oral, gastrointestinal ve vajinal kandidiyazise neden olan, insanlarda en yaygın görülen mantar patojenlerindendir. Bağışıklık sistemi zayıflayan bireylerde *C. albicans* tarafından enfekte olma olasılığı artmaktadır. Bu nedenle HIV+ hastalarının %50' sinde ve AIDS hastalarının %90'ında oral kandidiyaz gözlenir. Ayrıca hastane kaynaklı enfeksiyonlar içerisinde en yaygın görülen 3. veya 4. enfeksiyondur. *C. albicans* patojenisitesi birçok farklı virülans faktörün etkisiyle gelişmektedir. Bu faktörlerden bazıları ise konak dokularına ve tıbbi cihazlara tutunma, biyofilm oluşturma ve hidrolitik enzim salınımıdır. Bağışıklığı baskılanmış veya doğurganlık yaşlarındaki kadınların çoğunda pamukçuk gibi yüzeysel mukozal kandidiyaz

görülür. Patojenik *C. albicans* oluşumunda en iyi bilinen mekanizma invazyona yol açan hif oluşumudur (Resim 2.3) (Moyes ve Naglik, 2011).



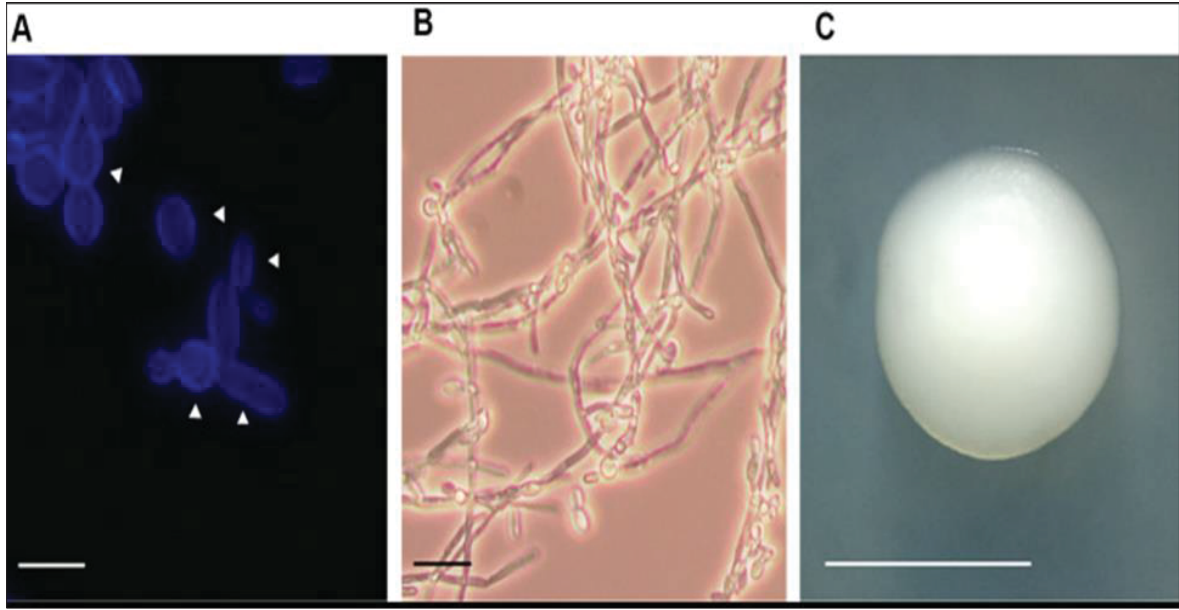
Resim 2.3. *C. Albicans* mayasının iplikçik şeklindeki görüntüsü (Sudbery ve diğerleri, 2014)

Candida tropicalis

C. tropicalis biyofilm yapısına sahiptir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında hayatta kalma yeteneği bu bakteriyi daha da dirençli kılmaktadır. *C. tropicalis*, epitelyal ve endotelyal hücrelere yüksek oranda yapışıkır. Hem fenotipik hem de moleküler yöntemler ile kolaylıkla teşhis edilebilmektedir. *C. Tropicalis* azol türevleri, amfoterisin B ve ekinokandinler gibi antifungal ilaçlara karşı direnç geliştirmiştir (Zuza Alves ve diğerleri, 2017).

Candida krusei

C. krusei biyofilm yapısı oluşturabilmektedir. *C. krusei* oval şekle sahiptir (Resim. 2.4). *C. krusei* maksimum 43–45 °C sıcaklıkta büyür. Oda sıcaklığında hif yapısı oluşturduğu gözlemlenmektedir. Mayalar içerisinde sadece *C. krusei* vitaminsiz ortamda büyüebilmektedir. Hastane ortamındaki zayıf hasta gruplarında ortaya çıkan fungemi, endoftalmi, artrit ve endokardit gibi bir dizi belirti ile ilişkilidir. HIV hastalarında, immün yetersizliği olan kişilerde sıkça görülen bu patojen, mantar ilacı olan triazol flukonazolün çokça kullanımı nedeniyle bu ilaca karşı direnç geliştirmiştir (Gaviria ve Montes, 2020)



Resim 2.4. *C. krusei* hücre ve koloni morfolojisi (A) YPD sıvısı için kalkoflor beyazı ile boyalı (B) 37°C'de inkübe edilmiş RPMI ortamında hücre filamentasyonu (C)YPD ortamında büyütülmüş bir *C. krusei* kolonisi (Gaviria ve Montes, 2020)

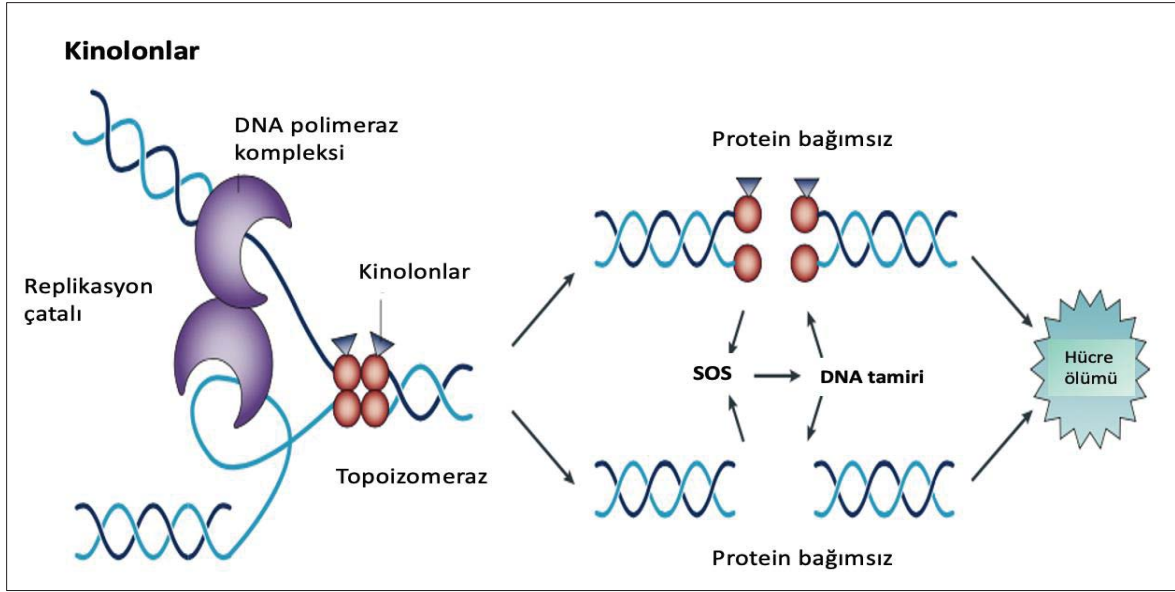
2.3. Antimikrobiyal Maddeler

2.3.1. Antimikrobiyal ilaçlar

Patojendeki farklı yapılar hedef alınarak hücre ölümünü sağlayan ilaçlara antimikrobiyal ilaç denir. 1929'da penisilinin keşfinden bu yana, daha etkili antimikrobiyaller geliştirmek için ilaç-hedef etkileşimleri ve ilaç molekülü modifikasyonu ile ilgili birçok farklı çalışma yürütülmektedir. Bu çalışmalar, enfeksiyon hastalıklarına karşı tedaviyi büyük ölçüde geliştirmektedir. Bununla birlikte, ilaç ve bakteri arasındaki fiziksel etkileşim bakteride biyokimyasal, moleküler ve ultrastrüktürel düzeylerde değişiklikleri içeren karmaşık bir süreçtir. Artan antibiyotik direnci ile bu mekanizmaların anlaşılması ve yeni ilaçların geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır. Antibiyotiklerin patojenler üzerindeki etkisi üç farklı şekilde gerçekleşir. Birinci mekanizmada, antibiyotiğin etken maddesi patojenin nükleik asitlerini hedef alır ve parçalar. İkinci mekanizmada ise patojenin hücre duvarı sentezlenmesi önlenir. Bu nedenle hücre bütünlüğü sağlanamaz. Üçüncü mekanizma ise protein sentezinin engellenmesidir. Patojenin metabolik aktivitesini sürdürebilmesi için gerekli proteinlerin sentezlenememesi sonucu hücre ölümü gerçekleşir (Kohanski ve diğerleri, 2010).

Kinolonlar tarafından DNA replikasyonunun inhibisyonu

Kinolonlar, ilk dönemlerde nalidisik asitten türetilmiştir ve idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi için 1960 yıllarında kullanılmıştır. Fakat nalidisik asitten üretilen kinolonlar toksisiteye sebep olduklarından daha sonraları siprofloksasin, levofloksasin ve gemifloksasin cins kinolon antibiyotikleri üretilmiştir. Kinolon türleri kimyasal yapıları ve patojeni yok etme mekanizmaları açısından farklılık göstermektedir. Bu antibiyotikler patojendeki topoizomeraz II ve topoizomeraz IV moleküllerini hedef alır. Bu enzimlerin görevi DNA replikasyonu sırasında DNA'nın birbirine dolanarak oluşturduğu düğümleri çözmektir. Bu sayede replikasyonun başarılı bir şekilde bitmesini sağlar. Burada Topoizomeraz enzimleri, ilk olarak DNA zincirlerini kırar, üstte kalan sarmalı bu aralıktan alta taşır ve kestiği yeri tekrar tamir ederek DNA'nın birbirine dolanma sayısını azaltırlar. Dolayısıyla bu işlemi gerçekleştirmek için DNA'yı kestiği sırada kinolonlar topoizomerazlara yapışarak DNA'yı tekrar birleştirmesini önlerler (Şekil 2.5). Bu nedenle DNA hasarlı olarak kalır ve çoğalmaz. Hedef topoizomeraz türünün belirlenmesi gram pozitif veya negatif olmasına göre farklılık göstermektedir. Gram pozitif bakterilerde kinolonların ilk hedefi topoizomeraz IV iken, gram negatif bakterilerde ilk hedef topoizomeraz II olmaktadır. Patojen DNA kırılmasından sonra DNA'nın tamiri için SOS cevabı oluşur ve tamirden sorumlu proteinler kırılma bölgesine gelerek kırılan DNA'yı tamir etmeye çalışır. Tamir olması durumunda, DNA polimerazdan veya homolog rekombinasyondan kaynaklı hata, direnç genlerinin bölge entegre olması sebebiyle yüksek miktarda dirençli patojenler oluşabilmektedir. Bu nedenle SOS cevabının önlenmesi antibiyotiğin verimini arttırmakta ve dirençli bakterilerin oluşumunu önlemektedir. Bağışıklık sistemi zayıflayan bireylerde *C. albicans* tarafından enfekte olma olasılığı artmaktadır.



Şekil 2.5. Kinolonların patojen DNA'sının tamirini engelleyerek hücre ölümüne yol açması (Kohanski ve diğerleri, 2010).

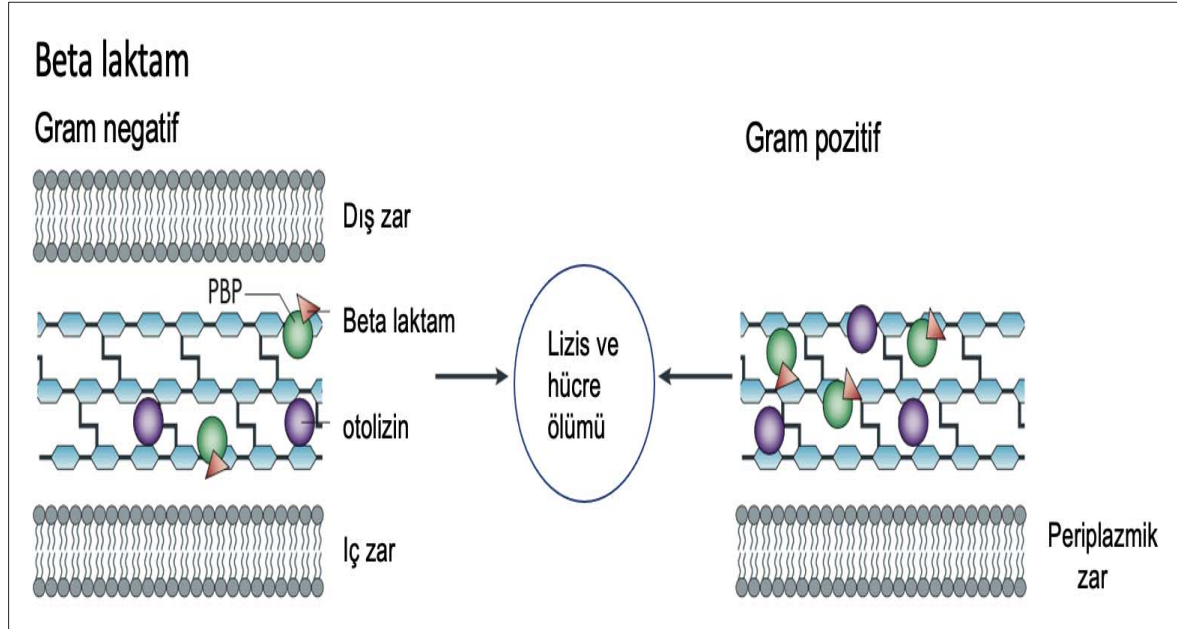
Rifamisin tarafından Ribonükleik asit (RNA) sentezi inhibisyonu

Yarı sentetik bakteri karşıtı rifamisin bir antibiyotiktir. Rifamisin gram pozitif bir bakteri olan *Mycobacterium mediterranei* bakterisinden üretilmektedir. Bu antibiyotik mikobakterilere karşı kullanılan antibiyotiklerdendir. Patojende antibiyotik direncini engellemek için başka ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır. Rifamisin DNA'ya bağlanmış, aktif RNA polimerazın beta alt birimine etki ederek RNA sentezini engellemektedir (Kohanski ve diğerleri, 2010).

Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu

Bakteri hücre duvarı peptidoglikan polimerinden oluşmaktadır. Bu yapı hücrenin ortamdaki osmotik basınç farkından kaynaklı lize olmasını engellemektedir. Peptidoglikan yapısının korunması transglikozilaz ve penisiline bağlanan proteinlerle (PBP; transpeptidaz) sağlanmaktadır. Bu moleküller sırasıyla mevcut peptidoglikan moleküllerinin glikan zincirlerini uzatmak ve peptidoglikan birimlerinin bitişik peptit zincirlerini çapraz bağlamak için disakkarit pentapeptitleri eklemektedir. Glikopeptidler ve β -laktamlar hücre duvarı sentezine etki eden antibiyotiklerdendir. Hücre duvarı sentezine etki ederek inhibe eden ilaçlar hücre şeklini bozar ve hücre stres cevabını uyarır ve son olarak hücre lize olur. Örneğin beta laktamlar PBP enziminin aktif bölgesine etki ederek peptidoglikan birimlerinin

çapraz bağlarla birbirlerine bağlanmasını engellemektedir (Şekil 2.6). Bu nedenle peptidoglikan yapısı oluşmamaktadır. Sonrasında hücre SOS cevabı oluşturularak lize olmaktadır (Kohanski ve diğerleri, 2010).

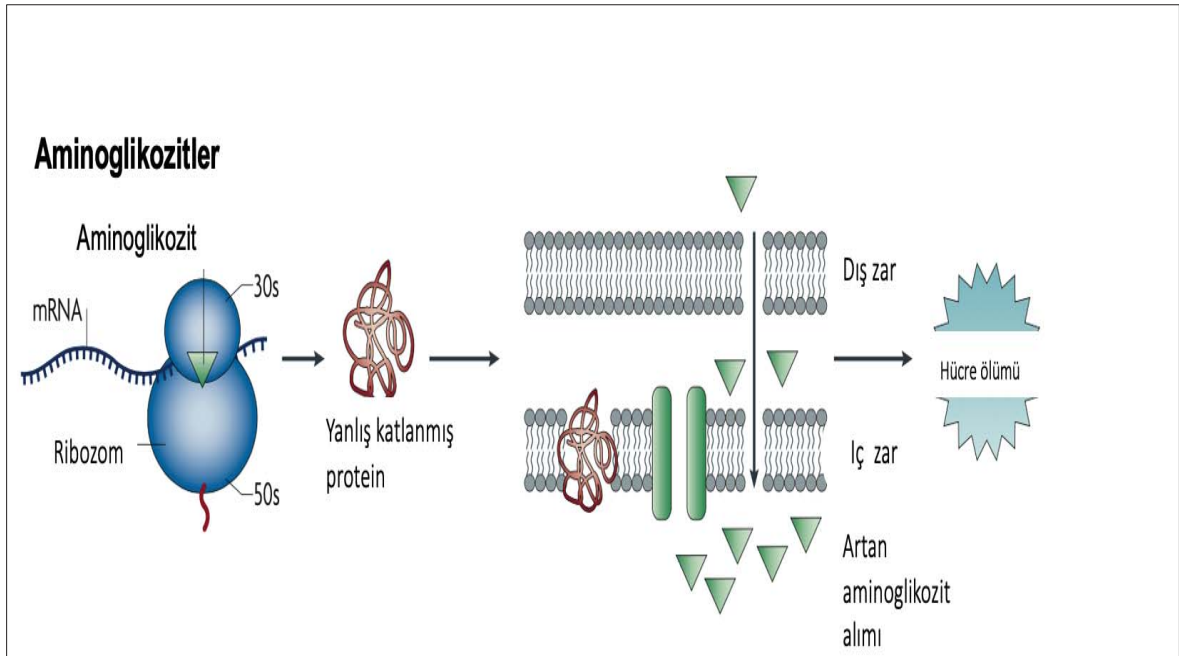


Şekil 2.6. Beta laktamların PBP enzimine etki ederek peptidoglikan yapının oluşumunu engellemesi ve hücre ölümünün gerçekleşmesi (Kohanski ve diğerleri, 2010).

Protein sentezinin engellenmesi

Protein sentezi 3 aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar sırasıyla başlama, uzama ve sonlanma olarak adlandırılır. Aşamalar sırasında ribozom ve çeşitli proteinler kullanılmaktadır. Prokaryotik hücrelerde ribozom 50S ve 30S olmak üzere iki farklı birimden meydana gelmektedir. Protein sentezini engelleyen proteinler iki sınıfa ayrılmaktadır; 50S ve 30 S inhibitörleri. 50S ribozom inhibitörleri arasında amfenikoller (örneğin kloramfenikol), makrolidler (örneğin eritromisin), linkozamidler (örneğin klindamisin), oksazolidinonlar (örneğin linezolid) ve streptograminler (örneğin dalfopristin-kinupristin) bulunur. 50S ribozom inhibitörleri, ya protein translasyonunun başlatılmasını (oksazolidinonlar gibi) önleyerek ya da yeni oluşan peptit zincirini uzatan peptidiltransferaz enziminin reaksiyonunu inhibe etmeye hizmet etmek için peptidil tRNA'ların translokasyonunu fiziksel olarak bloke ederek çalışır (Şekil 2.7) (Kohanski ve diğerleri, 2010).

30S inhibitörlerine örnek olarak tetrasiklin ve eminosilitollar verilebilir. Tetrasiklinler, aminoasil tRNA'ların ribozoma erişimini bloke ederek çalışır. Aminosiklitol sınıfı, 30S ribozom alt biriminin 16S rRNA bileşenine bağlanan spektinomisin ve aminoglikozit (örneğin, streptomisin, kanamisin ve gentamisin) antibiyotiklerini içermektedir. Spektinomisin, uzama faktörü katalizli translokasyonu inhibe ederek peptidil tRNA'nın ribozoma bağlanmasının stabilitesine müdahale eder, ancak protein yanlış translasyonuna neden olmaz. Aksine, aminoglikozidler ve 16S rRNA arasındaki etkileşim, ribozomda bir mRNA kodonu ile onun aynı kökenli yüklü aminoasil tRNA'sı arasında oluşan kompleksin konformasyonunda bir değişikliğe neden olabilir. Bu, tRNA yanlış eşleşmesini teşvik eder ve bu da protein yanlış çevirisine neden olabilir (Kohanski ve diğerleri, 2010).



Şekil 2.7. Aminoglikozitlerin protein sentezine müdahale ederek hücresel yapı için önemli bir proteini yanlış kodlaması sonucu hücre ölümünün gerçekleşmesi (Kohanski ve diğerleri, 2010)

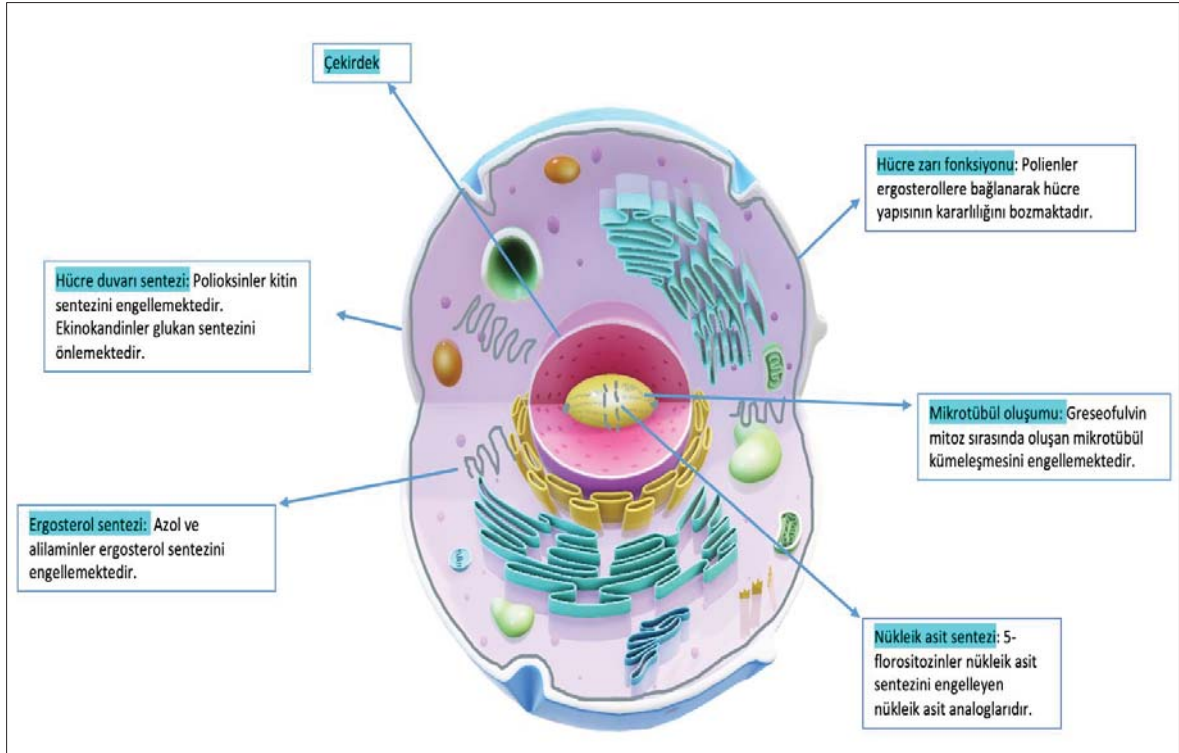
2.3.2. Antifungal ilaçlar

İnvaziv mantar enfeksiyonları (IFI), insanlarda morbidite ve mortalite üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Birçok mantar türü, ölüm oranları %50'yi aşan enfeksiyonlara neden olur ve IFI her yıl yaklaşık bir buçuk milyon ölümden sorumludur. Özellikle *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* ve *Pneumocystis* cinsleri mantara bağlı ölümlere katkıda bulunur. Hatta mevcut antifungal ilaçlara rağmen bu sayının hala arttığı görülmektedir. Mantar

enfeksiyonlarından kaynaklı bazı hastalıklar fungemi, menenjit, pnömoni, şiddetli, kronik durumlar örneğin, kronik pulmoner aspergilloz, alerjik bronkopulmoner aspergilloz ve astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi kompleks kronik solunum rahatsızlıklarıdır. Bu patojenler ayrıca oral ve vajinal enfeksiyonlar gibi tekrarlayan enfeksiyonlara neden olur (Roca ve diğerleri, 2015)

IFI'lar sağlıklı insanlarda yaygın olmadığından, artan prevalans, muhtemelen bu tür enfeksiyonlara duyarlı, bağışıklığı baskılanmış konak gruplarının artmasından kaynaklanmaktadır. Modern sağlık hizmetimiz yaşamı sona erdiren hastalıkları öncelikli olarak tedavi etmektedir. Bu tip ağır hastaların tedavisinde genellikle hastanın bağışıklık sistemini baskıladığı ilaçlar kullanılmaktadır. Bu nedenle hastalar en ufak enfeksiyonel hastalığa karşı dirençsiz hale gelmektedir. Kanser gibi yaşamı tehdit eden hastalıkların tedavisinde solid organ, kan veya ilik transplantasyonları yapılmakta, immünosupresif ilaçlar uygulanmakta, kanserler agresif kemoterapi ile tedavi edilmekte, karmaşık cerrahi işlemler uygulanmakta ve daha fazla hasta altta yatan komorbiditelerle yaşamaktadır. Öte yandan insan immün yetmezlik virüsü de hala dünya çapında önemli bir immünosupresyon nedenidir. Dolayısıyla bu tip bağışıklığı baskılanmış hastalarda antifungal ilaçların kullanılması hayati önem arz etmektedir (Daele ve diğerleri, 2019).

Mevcut antifungal ilaçlar polienler, azoller, ekinokandinler ve flusitozin olmak üzere 4 sınıfa ayrılmaktadır. Bu sınıflar, mantar hücresinin farklı kısımlarını hedefler. İlk olarak, polien sınıfı, mantar hücre zarının ana parçası olan ergosterol ile etkileşime giren heptaen içerir. Hayvan hücre zarında bulunan kolesterol funguslarda yerini ergosterole bırakır. Ergosterol fungus hücre zarı için önemli bir yere sahiptir. AMB, *Candida* cinslerine ve *Aspergillus fumigatus* ve *A. flavus*'a karşı oldukça fungisidaldir. İkinci, birinci ve ikinci nesil triazoller, lanosterol demetilasyon adımıyla ergosterol biyosentezini bozar. Genel olarak, triazoller mayalara karşı fungistatik etki gösterirken, *Aspergillus* türleri için fungisidaldir. Ekinokandinler, mantar hücre duvarında bulunan β -d-glukanların sentezini bloke eder. Ekinokandinler sırasıyla *Candida* ve *Aspergillus* cinslerine karşı fungisidal ve fungistatiktir. Son olarak, pirimidin analogu flusitozin (5-FC), protein ve DNA biyosentezini etkileyerek mantarın çekirdek seviyesinde etkileşir (Şekil 2.8). Antifungal ajanların aşırı kullanımı, fırsatçı patojen direncini artırır. Dünya Sağlık Örgütü, bu tür antimikrobiyal direnci, 2019 yılının baskın tehditlerinden biri olarak tanımlamıştır (Houšť ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.8. Çeşitli antifungal ilaçların etkilediği bölgeler ve etki mekanizmaları (Madigan ve diğerleri, 2012)

2.3.3. Antimikrobiyal direnç

Antimikrobiyal direnç, bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler zamanla değiştiğinde ve artık ilaçlara yanıt vermediğinde ortaya çıkar. Bu durum enfeksiyonların tedavi edilmesini zorlaştırır, hastalığın yayılma, ciddi hastalık ve ölüm riskini artırır. Sonuç olarak, ilaçlar etkisiz hale gelir ve enfeksiyonlar vücutta kalarak başkalarına yayılma riskini artırır (Tortora ve diğerleri, 2018).

Antibakteriyel direnç

Antibakteriyel direnç, bakterilerin maruz kaldıkları kimyasallara karşı savunma mekanizması geliştirerek, yeni genleri bünyesine alması ve evrilmesi ile oluşturduğu hayatta kalma mekanizmasıdır. Bakteriyel direnç, sağlık alanında tıbbi zorlukları da beraberinde getirmektedir. Direnç sebep olan genler ve birçok ilaca karşı direnç geliştirmiş patojenlerin sayısı giderek artmaktadır. Hastalık yapma oranı yüksek, en iyi bilinen direnç taşıyıcıları arasında Gram-pozitif organizmalardan *Enterococcus* cinsi ve *S. aureus* yer almaktadır. Bu bakteriler yeni üretilen ilaçlara cevap verirken bazı Gram-negatif bakteriler, özellikle

Acinetobacter cinsinin ve *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* türleri mevcut antibiyotiklerin çoğunluğuna veya tümüne karşı direnç geliştirmiştir (Theuretzbacher, 2013).

Antibiyotik direnç geni bakteri kromozomu üzerinde genetik olarak kodlanabilir ya da bakteri yatay olarak iletilen direnç plazmitleriyle (R) ilaca direnç genleri sahip olabilmektedir. R plazmidleri üzerindeki bulunan genler tarafından kodlanan enzimler, ilacı modifiye etme ve etkisiz hale getirme, ilacın alımını önleme, antibiyotiği aktif olarak hücre dışına pompalama olmak üzere üç farklı mekanizma ile ilacı etkisiz hale getirmektedir (Madigan ve diğerleri, 2012). Enzimler tarafından yıkım veya inaktivasyon, ilk olarak penisilinler ve sefalosporinler gibi doğal ürünler olan antibiyotikleri etkiler. Florokinolonlar gibi sentetik, kimyasal antibiyotik gruplarının etkilenme sıklığı çok daha düşüktür. Penisilin ve sefalosporin antibiyotikleri ve ayrıca karbapenemler, β -laktamaz enzimlerinin hedefi olan β -laktam halkası adlı bir yapıyı paylaşmaktadırlar. Bu enzimlerin β -laktam halkası üzerinde etkili olduğu bilinen yaklaşık 200 varyasyonu bilinmektedir. Bu antibiyotiklere dirençli bakterilerin en iyi bilineni, hemen hemen tüm antibiyotiklere dirençli olan ve yaygın olarak bilinen patojen MRSA'dır. Hastane hastalarında MRSA ile invaziv enfeksiyonların ölüm oranı %20'ye kadar çıkabilmektedir. Ayrıca, *S. aureus* endişe duyulan tek bakteri değildir; *S. pneumoniae* gibi diğer önemli patojenler de β -laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir. *S. Aureus*, enterik bakteriler gibi birçok mikroorganizmanın antibiyotik direnç mekanizmaları Çizelge 2.2'de ayrıca açıklanmaktadır. (Tortora ve diğerleri, 2018).

Bazı antibiyotiklerin geniş patojenlere hitap etmesi, R plazmitlerinin yayılması için elverişli koşullar sağlamaktadır. Direnç genlerinin her yerde bulunması, tek bir antibiyotiğin etkili bir antimikrobiyal ajan olarak uzun süreli kullanımını sınırlar. Klasik bir örnek, *Neisseria gonorrhoeae* bakterisinde çoklu ilaç direncinin gelişmesidir. Aşırı antibiyotik kullanımı da direnci hızlandırır. Antibiyotikler, klinik olarak enfeksiyon tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, büyümeyi teşvik edici ve hastalık önleyici maddeler olarak çiftlik hayvanı yemlerine takviye olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, florokinolon siprofloksasin gibi geniş spektrumlu antibiyotikler hem enfeksiyon tedavisinde hemde kümes hayvanlarına katkı yemi olarak kullanılmaktadır. Hastalık tedavisinde kullanılan antibiyotik miktarı azalsada, birçok hasta kendilerini daha iyi hissederek hissetmez antibiyotik almayı bırakmaktadır. Antibiyotik direnci, ilaçlar sadece duyarlı patojenlerin tedavisi için

kullanılırsa ve dirençli mutantlar çoğalmadan önce patojeni yok etmek için yeterince yüksek dozlarda ve yeterli süre boyunca verilirse en aza indirilebilir (Madigan ve diğerleri, 2012).

Çizelge 2.2. Çeşitli antibiyotiklerin organizmalarda oluşturduğu antibiyotik direnç mekanizmaları (Madigan ve diğerleri, 2012)

<i>Direnç mekanizması</i>	<i>Antibiyotik</i>	<i>Direncin genetik temeli</i>	<i>Mekanizmanın bulunduğu organizma tipi</i>
İlaç alımının azalması	Penisilin	Kromozomal	Gram negatif bakteri
Hedef bölgenin değiştirilmesi. Örneğin; RNA polimeraz, rifamisin; DNA giraz, kinolon; Ribozom, eritromisin ve streptomisin	Eritromisin Rifamisin Streptomisin Norfloksasin	Kromozomal	<i>S. aureus</i> Enterik bakteri Enterik bakteri Enterik bakteri <i>S. aureus</i>
Antibiyotiğin inaktivasyonu Örneğin; beta laktamlar; metilaz, asetilaz, fosforilaz gibi enzimlerde yapılan değişiklikler	Penisilin Aminoglikozidler Kloramfenikoller	Plazmit ve kromozomal Plazmit ve kromozomal Plazmit	<i>S. aureus</i> Enterik bakteri <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>S. aureus</i> Enterik bakteri
Dirençli biyokimyasal yolağın gelişimi	Sulfonamidler	Kromozomal	Enterik bakteri <i>S. aureus</i>
Dışarı akış: ilacın hücre dışına pompalanması	Tetrasiklinler Kloramfenikoller Eritromisinler	Plazmid Kromozomal Kromozomal	Enterik bakteri <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Staphylococcus</i>

Dünya sağlık örgütünün 2020 yılında yayınladığı son rapora göre, antibiyotik direnci genel olarak bakteri türüne ve coğrafik konuma göre değişkenlik göstermektedir. *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerinin üçüncü kuşak sefalosporinlere ve karbapenemlere olan direncinde, *Acinetobacter* cinsinin karbapenemlere direncinde ve *E. faecium* bakterisinin vankomisin antibiyotiğine karşı direncindeki artış endişe verici boyutlara ulaşmıştır. Antimikrobiyal direnç yüzdelerinde batıdan doğuya doğru gram negatifler için yükseliş belirginken (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* cinsi), gram-pozitif bakteriler artış daha az belirgindir (*S. Aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecium*) (Dünya Sağlık Örgütü, 2020).

Sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonlardan esas olarak sorumlu olan bakteriler, sağlık hizmeti ortamlarının dışında bile çoğu zaman çoklu ilaca karşı dirence eğilimlidir. Çoklu ilaç direnci çok yaygın olduğundan ve terim çeşitli şekillerde tanımlanabildiğinden, Avrupa

Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi ve ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, çeşitli antimikrobiyallerin derecelendirilmesini kolaylaştırmak için standartlaştırılmış uluslararası terminoloji yayınladı. Bu sistem kullanılarak çoklu ilaca dirençli (MDR), üç veya daha fazla antimikrobiyal kategoride en az bir ajana karşı duyarlılık kazanmış olarak tanımlanır; aşırı derecede ilaca dirençli (XDR), iki veya daha az antimikrobiyal kategoride en az bir ajana karşı duyarlılık olmaması olarak tanımlanır (yani, bakteri izolatları yalnızca bir veya iki kategoriye duyarlı kalır); ve pan-drug rezistans (PDR), tüm antimikrobiyal kategorilerdeki tüm ajanlara karşı duyarlılık olmaması olarak tanımlanır. *S. aureus* suşları arasındaki MRSA oranına ilişkin bilgiler yaygın olarak bulunduğundan, belki de epidemiyolojik olarak en iyi belgelenmiş patojen *S. aureus* bakterisidir. Öte yandan enterokoklar, enterobakteriler, *P. aeruginosa*, *Acinobacter* bakterileri antibiyotik direncinin en sık görüldüğü patojenler arasındadır (Çizelge 2.3) (Theuretzbacher, 2013).

Çizelge 2.3. Klinik olarak çoklu direnç geliştiren patojenler ve dirençli oldukları antibiyotikler (Theuretzbacher, 2013).

Bakteri	Dirençli olduğu antibiyotik
<i>S. aureus</i>	Beta laktam antibiyotikleri (yeni çoklu dirence karşı üretilen sefalosporin dışında), makrolidler ve florokinolonlar
Enterokok cinsi	- Amfisilin, amino glikozitler - Amfisilin, aminoglikozitler, glikopeptitler
Enterobakteriler (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>)	- Sefalosporin, florokinolonlar, aminoglikozitler - Sefalosporin, florokinolonlar, aminoglikozitler, karbapenemler
<i>P. aeruginosa</i>	- Piperasilin/tazobaktam, seftazidim, siprofloksasin, aminoglikozitler - Piperasilin/tazobaktam, seftazidim, siprofloksasin, aminoglikozitler, karbapenemler
Acinetobakter	Seftazidim, aminoglikozitler, florokinolonlar, karbapenemler

Uygun antibiyotik uygulaması, mevcut ilaçların klinik yararlılığını uzatabilir ancak antimikrobiyal ilaç direncine uzun vadeli çözüm, yeni keşifler veya tasarımlarla sürekli yeni ilaçların geliştirilmesini gerektirir. Mevcut antimikrobiyal bileşiklerin yeni analoglarının geliştirilmesi, genellikle yeni ilaçların keşfedilmesinden daha uygun maliyetlidir ve analoglar aslında ana maddeden daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olabilir. Örneğin penisilin antibiyotiğinin N-açil grubunun yer değiştirme reaksiyonları ile birçok farklı

analog üretilmiştir. Aynı şekilde bu yöntem kullanılarak beta laktam, vankomisin, tetrasiklin antibiyotiklerinin analogları üretilmektedir (Madigan ve diğerleri, 2019).

Yeni antimikrobiyal bileşiklerin tanımlanması, mevcut ilaçların analoglarına göre daha zordur çünkü yeni antimikrobiyal bileşiklerin direnç mekanizmalarından kaçınması için metabolizmada benzersiz bölgelerde çalışması veya yapısal olarak mevcut ilaçlardan farklı olması gerekir. Bilgisayar tabanlı yöntemler, sanal bir ortamda moleküler bağlanma denemelerine imkân sağlayarak molekülün bağlanma verimliliğini en üst düzeye çıkararak yeni bileşik tasarımını hızlandırır. Antibiyotik direnci ile baş etmenin başka bir yöntemi ise patojende daha önce hedef alınmamış bölgelerin hedef alınması ile sağlanabilmektedir. Buna örnek olarak platensimisin verilebilir. Platensimisin bakteri lipid biyosentezini hedef alan ilk antibiyotiktir. Plantenmisin özellikle sitafilakok, enterokok gibi gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Antibiyotiğin belirli bir patojende etkili olabilmesi için ilk olarak hedef organizmanın lipid biyosentezinde görev alan enzimin dizisinin bilinmesi gerekmektedir. Bu sayede bu enzimin mRNA'sına bağlanması için antisense RNA üretilmektedir. Dolayısıyla lipid üretimi azalan organizma, antibiyotiğe karşı savunmasız hale gelmektedir. Bu antibiyotik *S. aureus* suşları üzerinde etkili olmuştur. Bu yöntemle düşük konsantrasyonda hedefe yönelik ilaçlar üretilmektedir. Antibiyotiğe direnç mekanizmasını inhibe edecek ilaçlarla birlikte kullanılan antibiyotiklerde, direnç mekanizması inhibe edildiğinden antibiyotik normal işlevine devam edebilmektedir. Örneğim beta laktam antibiyotiği ve beta laktamaz inhibitörleri içeren Augmentin ilacı direnci inhibe ettiğinden etkili olabilmektedir (Madigan ve diğerleri, 2012).

Antifungal direnç

Antifungal direnç bireyin antifungal ilaç tedavisine, ilacın kişide etki göstermemesine bağlı olarak istenen tedavi yanıtını vermemesidir. Dört ana antifungal ilaç sınıfı polienler, azoller, alilaminler ve ekinokandinlerdir. Bu ilaçlara üç farklı tipte direnç gelişmektedir. Birincisi primer (yapısal) dirençtir. Primer dirence sahip bireyler daha önce hiçbir ilaç almamış olmalarına rağmen antifungal tedaviye cevap vermemektedir. İkincisi sekonder (kazanılmış) dirençtir. Sekonder dirence sahip bireyler ilacı aldıktan sonra ilaca direnç kazanmaktadır. Üçüncü tip direnç ise klinik dirençtir. Bu tip direnç fungal enfeksiyonun giderek ilerlemesi ve tekrarlamasından kaynaklanmaktadır. Funguslarda meydana gelen mutasyonlar ilacın

genotip ve fenotip değişikliğe uğramasına bu nedenle önceden etkili olan ilaçların etkisini yitirmesine sebep olmaktadır (Kantoyiannis ve Lewis, 2002).

Mayaların antifungal direnç mekanizmaları ve bu mekanizmalara sebep olan genetik değişiklikler mevcuttur. Örneğin, azol alımında *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* genlerinde oluşan değişiklikler ilacın dışa atılmasına sebep olan direnç mekanizmasını aktifleştirmekte bu nedenle *Candida* türünde azol direnci oluşmaktadır (Çizelge 2.4) (Alcazar-Fuoli ve Mellado, 2014).

Çizelge 2.4. Antifungal ilaçların hedef bölgeleri ve oluşturulan direnç mekanizmaları. AMB, amfoterisin B; FCZ, flukonazol; ITZ, itrakonazol; VRC, vorikonazol; PSC, posakonazol; CPF, kaspofungin; ANF, anidulafungin; MCF, mikafungin; GS, b-(1,3)-D-glukan sentaz; TF, transkripsiyon faktörü (Alcazar-Fuoli ve Mellado, 2014)

Antifungal ilaç	Hücresel hedef ve alınan aksiyon	Direnç mekanizması	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. krusei</i>
Polienler Amb	Ergosterole bağlanma	Ergosterol azlığı veya yokluğu	+	+	+	-	-
		Azole bağlı çapraz direnç	+	+	+	-	-
Azoller FCZ ITC VRC PSC	14alfa-lanosterol dimetilazın inhibisyonu	İlacın dışa atımından görevli taşıyıcıların artmasına bağlı olarak artması	CDR1 CDR2 MDR1	- - -	CDR1 CDR2 SNQ2	CDR1 CDR2 MDR1	ABC1p ABC2
		Transkripsiyon faktöründe mutasyon	TAC1 MRR1	-	PDR1	-	-
		Mutasyonlardan kaynaklı Erg11p'ye bağlanma eğilimliliğinde azalma	+	+	-	+	-
		ERG11 ifadesinde artma	TF UPC2	-	-	-	-
		Ergosterol biyosentez yolağında oluşan değişiklikler (ERG3)	+	+	+	+	-
Ekinokandinler CPF ANF MCF	Beta-13 glukan sentazın inhibisyonu(FKS 1 ve/veya FKS2)	ECH'nin FK1 FK2 beta-1,3 glukan sentaz için affinitesinde değişim	F641P S645F S645Y S645P	S645P F641L	FK1 D632E/Y FK2 P667T F625Y/S S663P F659V/S W1375L S629P S633P R631S S666G/F	-	F655C

2.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stress

Serbest radikaller, dış yörüngede eşleşmemiş bir elektrona sahip moleküller olarak tanımlanır. Genellikle kararsız ve çok reaktiftirler. Serbest oksijen radikallere örnek olarak süperoksit, hidroksil, peroksildir ($RO_2\bullet$), alkoksil ($RO\bullet$) ve hidroperoksil ($HO_2\bullet$) radikalleri örnek verilebilir. Azot oksit ve azot dioksit ($\bullet NO_2$) ise azot içeren radikal örneğidir. Oksijen ve azot serbest radikalleri hidrojen peroksit, hipokloröz asit ($HOCl$), hipobromöz asit ($HOBr$) ve peroksinitrit ($ONOO$) gibi diğer radikal olmayan reaktif türlere dönüştürülebilir ve aynı zamandan bu türler yeni radikal reaksiyonları başlatabilmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) hem serbest radikalleri hem de radikal olmayan reaktif türleri içermektedir. Radikallerin vücutta birikmesi sonucu lipid, nükleik asitler, proteinler zarar görmektedir. Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, solunum hastalıkları, romatoid artirit gibi hastalıklar meydana gelmektedir (Fang ve diğerleri, 2002).

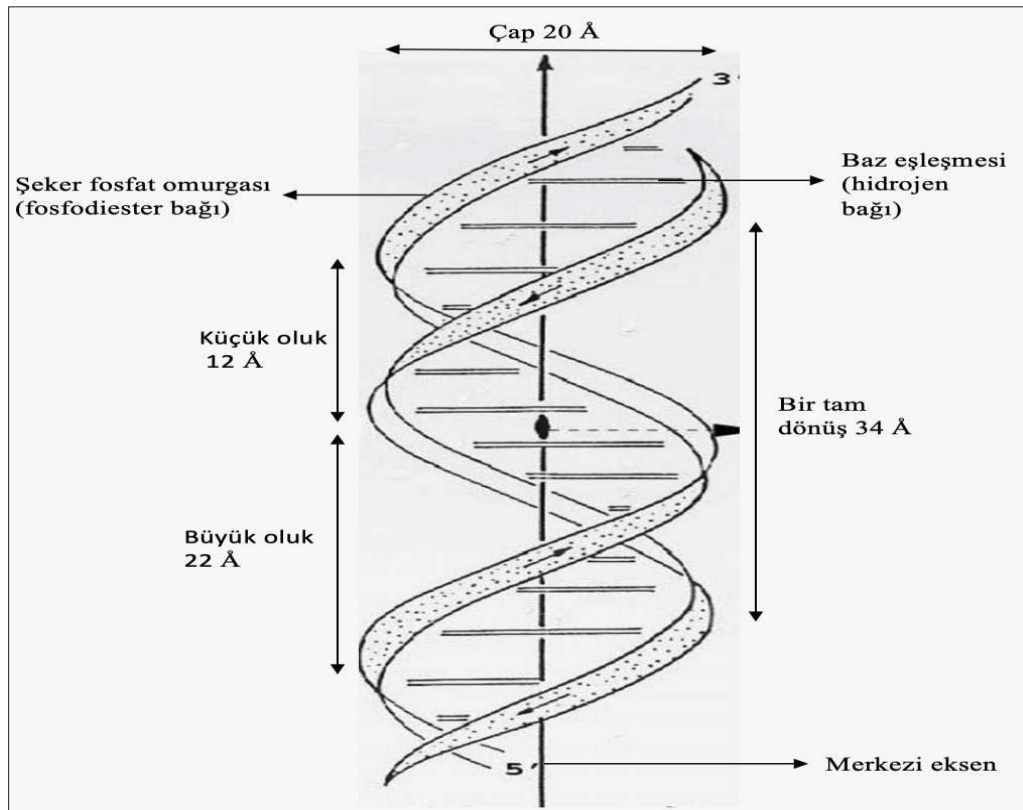
2.5. Antioksidanlar

Serbest radikaller (örn. süperoksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalleri) ve diğer reaktif türler (örn. hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hipokloröz asit) vücutta öncelikle aerobik metabolizmanın bir sonucu olarak üretilir. Bu radikaller hücrelerde DNA mutasyonlarına, mitokondri hasarlarına sebep olmaktadır. Mitokondriye zarar veren radikaller ise hücrenel yaşlanmaya sebep olmaktadır. Bu durum kansere ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olmaktadır. Vücutta zamanla biriken radikallerle tepkimeye giren antioksidanlar radikalleri nötrleştirerek radikallerin vücuda zarar vermesini engellemektedir. Bu sayede antioksidantlar kişiyi çeşitli kanser ve nörodejeneratif hastalıklardan korumaktadır (Pisoschi ve Pop, 2017). Antioksidanlar (örn. glutatyon, arginin, sitrülün, taurin, kreatin, selenyum, çinko, E vitamini, C vitamini, A vitamini ve çay polifenolleri) ve antioksidan enzimler (örn. süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidazlar) serbest radikalleri temizlemede önemli rol oynamaktadır (Fang ve diğerleri, 2002).

2.6. DNA-ilaç Etkileşimleri

2.6.1. DNA yapısı ve genel özellikleri

DNA bir organizmanın metabolik faaliyetlerini gerçekleştirmesi ve gelişmesi için genetik bilgi taşıyan moleküldür. DNA, çift sarmal yapıya sahiptir. Bu yapı dairesel bir merdiveni andıran iki bağlantılı meydana gelmektedir. Her iplikçik, alternatif şeker (deoksiriboz) ve fosfat gruplarından oluşan bir omurgaya sahiptir. Adenin (A), sitozin (S), guanin (G) veya timin (T), şekerle bağlanır, şeker ise fosfat grubuna bağlanmaktadır. Her bir baz-şeker-fosfat grubuna nükleotid denir. Nükleotitler bir araya gelerek DNA'nın bir iplikçliğini oluşturur. İki iplikçik, bazlar arasındaki kimyasal bağlarla bağlanır (Şekil 2.8). Nükleotitler arasındaki bağlar hidrojen bağlarıdır. Timin ile adenin ikili hidrojen bağı ile bağlanırken ve guanin ile sitozin üçlü sitozin bağı ile bağlanmaktadır. Timin ve sitozin tek halkasal yapıya sahiptir ve pirimidin grubu olarak adlandırılır. Guanin ve adenin ise iki halkasal yapı içerir ve pürin grubu olarak adlandırılır. Bazların DNA omurgası boyunca dizilişi, bir protein veya RNA molekülü yapmak için gereken bilgiyi içermektedir (Travers ve Muskhelishvili 2015).



Şekil 2.9. DNA'nın çift sarmal yapısı (Ghosh ve Bansal, 2003)

2.6.2. DNA-ilaç etkileşim mekanizmaları

DNA, ilaç tedavisinde piyasada bulunan ve geliştirilen birçok ilacın ana hedeflerinden bir tanesidir. DNA, hücrenin metabolik aktivitesi için gen ifadesinde ve genetik materyalin çoğalan hücrelere replikasyon yoluyla aktarılmasında görev aldığından tedavide etkili olabilecek bir hedef olarak görülmektedir. DNA'ya bağlanacak küçük ligand moleküllerinin, gen ifadesine ve DNA replikasyonuna istenilen şekilde etki etmesi için ilaçlar geliştirilir. Bu moleküller, DNA fonksiyonunu değiştirmesi veya inhibe etmesi ile ilaç görevi görür. İlaç-DNA etkileşiminin belirlenmesi, yeni ilaçların tasarımı için önemli bir adımdır. Bu etkileşimin belirlenmesi için kullanılan basit yöntemler çalışma verimini arttırmaktadır. DNA-ilaç etkileşim mekanizmasının anlaşılması durumunda DNA'yı hedef alan ilaçların üretilmesi ve bu ilaçların laboratuvar koşullarında test edilmesi kolaylaşmaktadır (Sirajuddin ve diğerleri, 2013).

Antikanser ilaçlar DNA ile üç farklı şekilde etkileşime girmektedir. İlk mekanizma transkripsiyon faktörleri ve polimerazların aktivitesinin kontrol edilmesiyle gerçekleşir. İlaç etken maddeleri DNA'ya bağlı proteinlerle etkileşime girerek gen ifadesini kontrol etmektedir. İkinci olarak DNA çift sarmalına RNA bağlanarak üçlü sarmal yapı oluşabilir ya da DNA tek sarmalına RNA hibridizasyonu yoluyla transkripsiyonel aktiviteye müdahale edilebilir. Üçüncü olarak küçük aromatik ligand moleküllerinin DNA çift sarmal yapılarına bağlanması yoluyla gerçekleşir. Küçük moleküllerin ise DNA'ya bağlanmasının kovalent ve kovalent olmayan olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır (Sirajuddin ve diğerleri, 2013).

Kovalent bağlanma ile ajanlar DNA'ya güçlü kovalent bağıyla bağlandığından DNA'da geri dönülmez yapısal değişiklikler meydana gelir ve bu durum hücre ölümü ile sonuçlanır. DNA'ya kovalent bağlanmanın üç şekli mümkündür. Bunlar, azotlu bazların değiştirilmesi, iplikler arası ve sarmal içi çapraz bağlanma ve azotlu bazların alkilasyonu olarak sınıflandırılabilir. Öte yandan kovalent olmayan etkileşimlerde DNA yapısında geri döndürülebilir üçüncül yapı değişiklikleri söz konusudur. Kovalent olmayan bağlanmalar, oluk bağlanma, interkalasyon, elektrostatik etkileşimler olmak üzere üç ayrı başlık altında incelenmektedir (Aleksić ve Kapetanović, 2014).

İnterkalasyon, çift nükleik asit sarmalındaki baz çiftleri arasında kayan uzamsal olarak düz sistemleri içeren, DNA ile kovalent olmayan bir etkileşim türüdür. Bu şekilde etkileşime

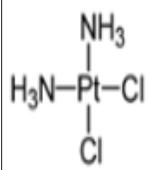
giren bileşikler genellikle yaklaşık 0,2-0,4 nm kalınlığında düz aromatik veya heteroaromatik halka yapılarına sahiptir. İnterkalasyonda üçüncül DNA yapısında değişiklik meydana gelmektedir (Ramotowska ve diğerleri 2021). Oluk bağlama, interkalasyonun aksine, DNA'da büyük konformasyonel değişiklikleri indüklemeyi ve ligand-makromoleküler bağlanma için standart kilit ve anahtar modellerine benzer olarak kabul edilebilir. Oluk bağlayıcılar genellikle DNA'nın küçük oluğuna bağlanan hilal şeklindeki moleküllerdir. Moleküller arası etkileşimlerle stabilize edilirler ve tipik olarak birleştiricilerden daha büyük birleşme sabitlerine sahiptirler (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007).

Kovalent bağlanma

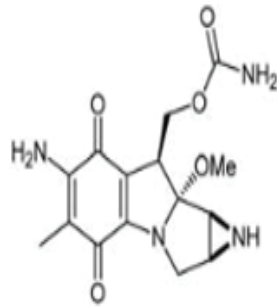
İlaç-DNA arasındaki kovalent bağlanma geri döndürülemez şekilde kurulur ve her zaman DNA işlemlerinin engellenmesine ve ardından hücre ölümüne neden olur. Kovalent bağlanma güçlü bir şekilde bağlandığından geri döndürülemez bir şekilde DNA aktivitesini inhibe eder. Öte yandan kovalent bağlı, hacimli eklentiler DNA omurgasının bozulmasına neden olabilir ve bu durum hem gen ifadesini hem de DNA replikasyonunu etkilemektedir.

Cis-platin [cis-diammindikloroplatin (II)] DNA'ya kovalent bağ ile bağlanan bir antikanser ilaçtır. Ayrıca DNA bazlarındaki azotlarla, kloro grupları aracılığıyla zincir içi/sarmallar arası çapraz bağ oluşturur (Şekil 2.10). Kovalent bağlayıcılar, kanser tedavisinde DNA'ya bir alkil grubu (C_nH_{2n+1}) bağlamak için kullanıldıklarından, eklenti oluşumu nedeniyle alkilendirici olarak da adlandırılırlar (Sirajuddin ve diğerleri, 2013). Cis-platine ek olarak, klinik uygulamada uygulama bulan diğer iki antitümör antibiyotik ise Mitomycin C ve Anthramycin'dir. Mitomycin C, guanin bazı ile sadece indirgenmiş durumda, yani indirgeyici aktivasyondan sonra kovalent olarak etkileşime girer. Aktive edilmiş antibiyotik, guanin bazlarını bitişik DNA şeritlerinde çapraz bağlar, böylece tek sarmal oluşumunu önler. Anthramycin, DNA molekülünün küçük oluğunda bulunan N2 guanin nitrojenine kovalent olarak bağlanır (Şekil 2.9) (Aleksić ve Kapetanović, 2014).

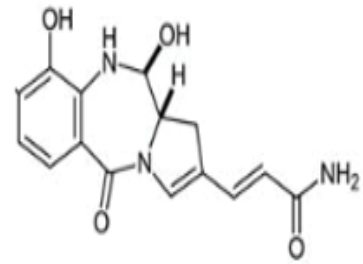
DNA'ya kovalent bağlanan ilaçlar



Cisplatin

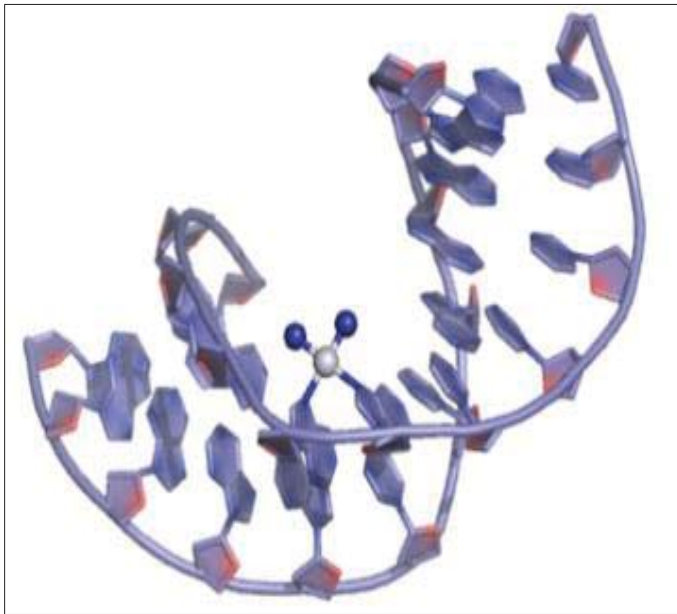


Mitomycin C



Anthramycin

Şekil 2.10. DNA sarmalına kovalent bağlanan anti-kanser ilaçlarının yapıları (Aleksić ve Kapetanović, 2014)

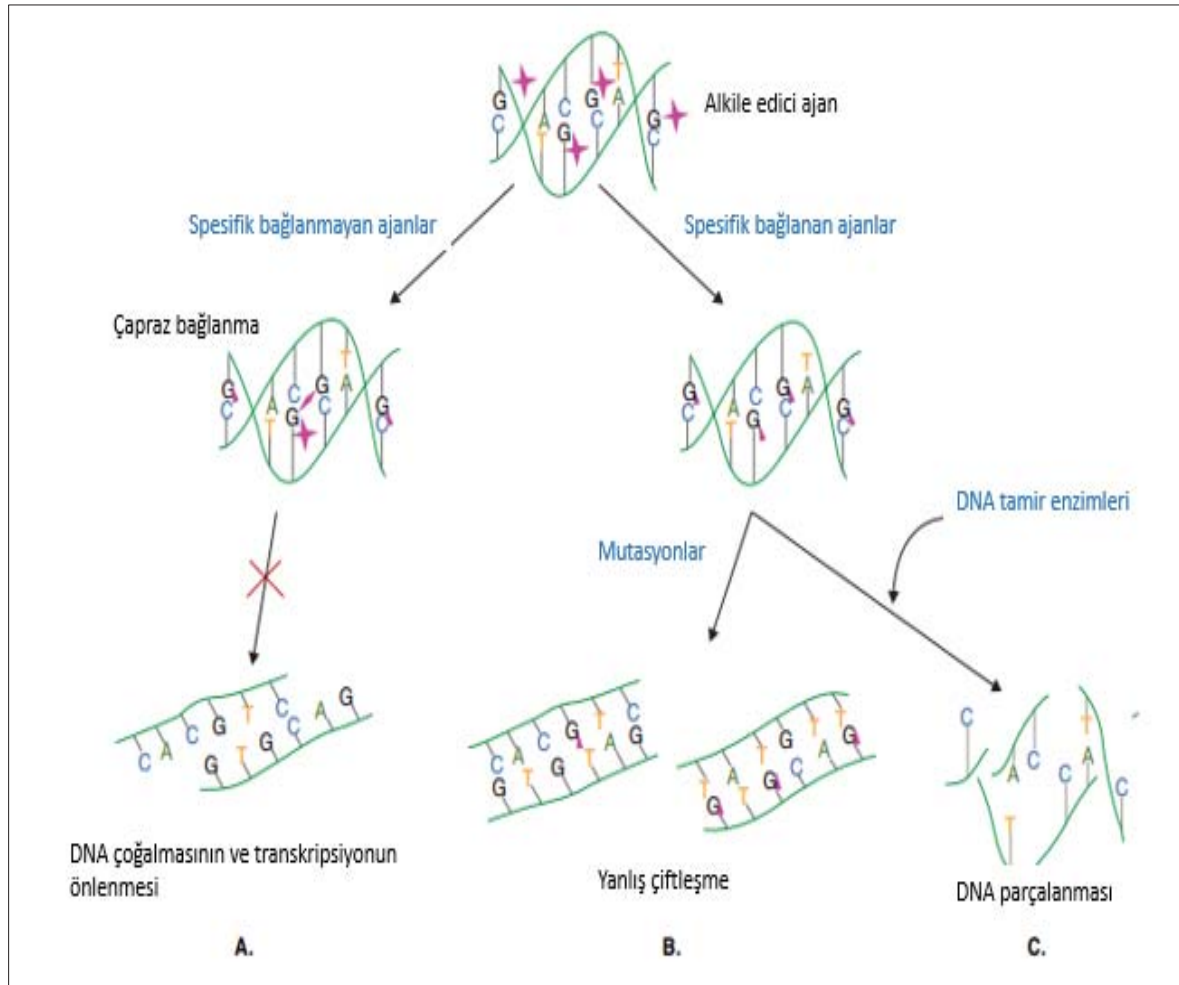


Şekil 2.11. DNA sarmalı içine kovalent bağlanan bir Cis-platinin üç boyutlu yapısının görünümü. Platin atomu beyaz bir küre olarak gösterilmiştir; NH3 ligandları mavi küreleri gösterir (Hasanzadeh ve Shadjou, 2016).

Alkilleyici ajanlar

DNA alkilleyici ajanlar, kanser hücrelerinde DNA hasarı oluşturarak kanser hücrelerini öldürür. Alkilleyici ajanlar, DNA'daki guanin bazı ile tepkimeye girmektedir. Bu ilaçlar, DNA'ya kovalent bağlanan metil veya diğer alkil gruplarını ekler. Bu nedenle baz

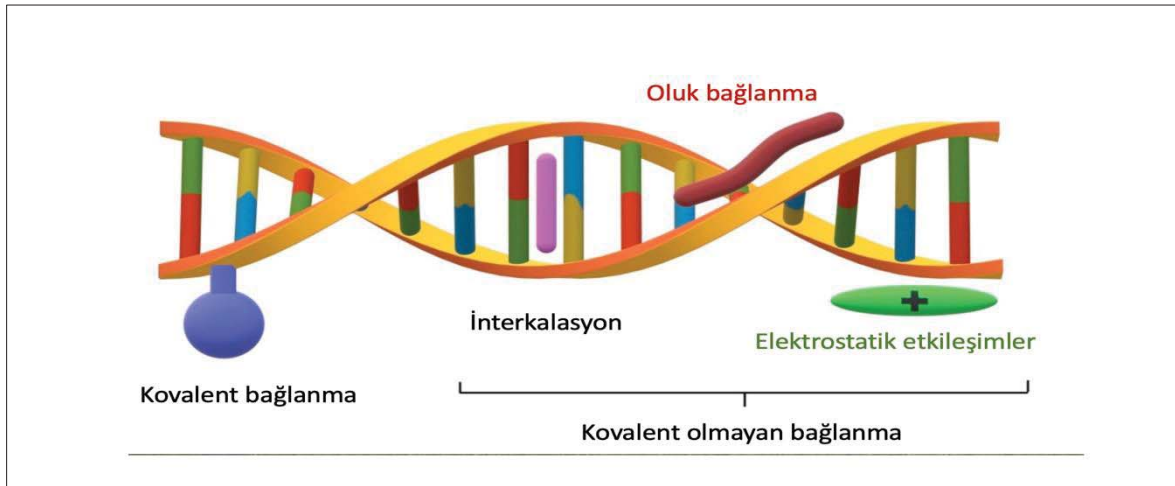
eşleşmesinde hata meydana gelir ve bu durum DNA'nın yanlış kodlanmasına neden olur. Alkile edici ajanlar üç farklı mekanizmayla etkileşime girebilir. İlk mekanizmada DNA bazlarına alkil grupları eklenerek, DNA'nın tamir enzimleri tarafından parçalanması gerçekleşir. İkinci mekanizmada, alkileyici ajanlar iki farklı bölgeden bulunan bazların birbirine bağlanması ile çapraz bağ oluşturur. DNA ve RNA sentezi için kalıp olarak kullanılamayan DNA replikasyon ve transkripsiyonun engellenmesi nedeniyle hücre ölümüne sebep olur. Alkile edici ajanların üçüncü etki mekanizmasında, alkillemeyen dolayı bazlar yanlış eşleşerek mutasyona sebep olur. Bu durum hücrenin apoptoza gitmesine neden olabilir. Alkile edici ilaçlar, uzun zamandır kanser ilacı olarak kullanılmaktadır. Metilleyici maddelere örnek olarak fotemustin, nimustin, lomustin ve karmustin verilebilir (Şekil 2.11) (Sirajuddin ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.12. (A) Çapraz köprülerin oluşumu ve sonuç olarak DNA replikasyonu ve transkripsiyonun inhibisyonu. (B) Alkilenmiş G bazlarının T nükleotidi ile eşleşmesi sonucu kalıcı mutasyon oluşumu. (C) Yanlış eşleşme sonucu DNA fragmentasyonu (Ralhan ve Kaur, 2007).

Kovalent olmayan bağlanma

DNA ile kovalent olmayan bağlarla etkileşen ajanlar, DNA oluklarına bağlananlar ve DNA interkalatörleri olarak iki sınıfta değerlendirilir. Kovalent olmayan bağlanma modu tersine çevrilebilir ve Kovalent olmayan bağlanmada ilaç metabolizması ve toksik yan etkileri daha azdır. Bu nedenlerden ötürü kovalent bağlanmaya göre daha çok tercih edilir. Kovalent bağlanmayan ajanlar, kovalent bağlanan ve diğer DNA hasarı üreten ajanlardan daha az sitotoksik etkiye sahiptir. Her ne kadar kovalent olmayan bileşik-DNA etkileşimlerinin etki ettiği sinyal yolları tam olarak belirlenmemiş olsa da bu ajanların sebep olduğu en önemli etkiler arasında DNA konformasyonel ve ilgili yapısal bozulmalar, topoizomerazlar gibi normal DNA protein etkileşimlerine müdahale ve ayrıca mitokondriyal DNA ve fonksiyon üzerindeki etkiler yer alır. Kovalent olmayan DNA etkileşimli ajanlar, DNA'nın konformasyonunda, burulma geriliminde değişime, DNA-protein arasındaki etkileşimlerde hasara ve hatta DNA sarmalında kırılmalara neden olabilir. Bu durumlar gen ifadesine doğrudan etki edebilir. Kovalent olmayan İlaç-DNA bağlanması, interkalasyon, oluk bağlama ve dış bağlama olmak üzere üç tipe ayrılır (Şekil 2.12) (Sirajuddin ve diğerleri, 2013).



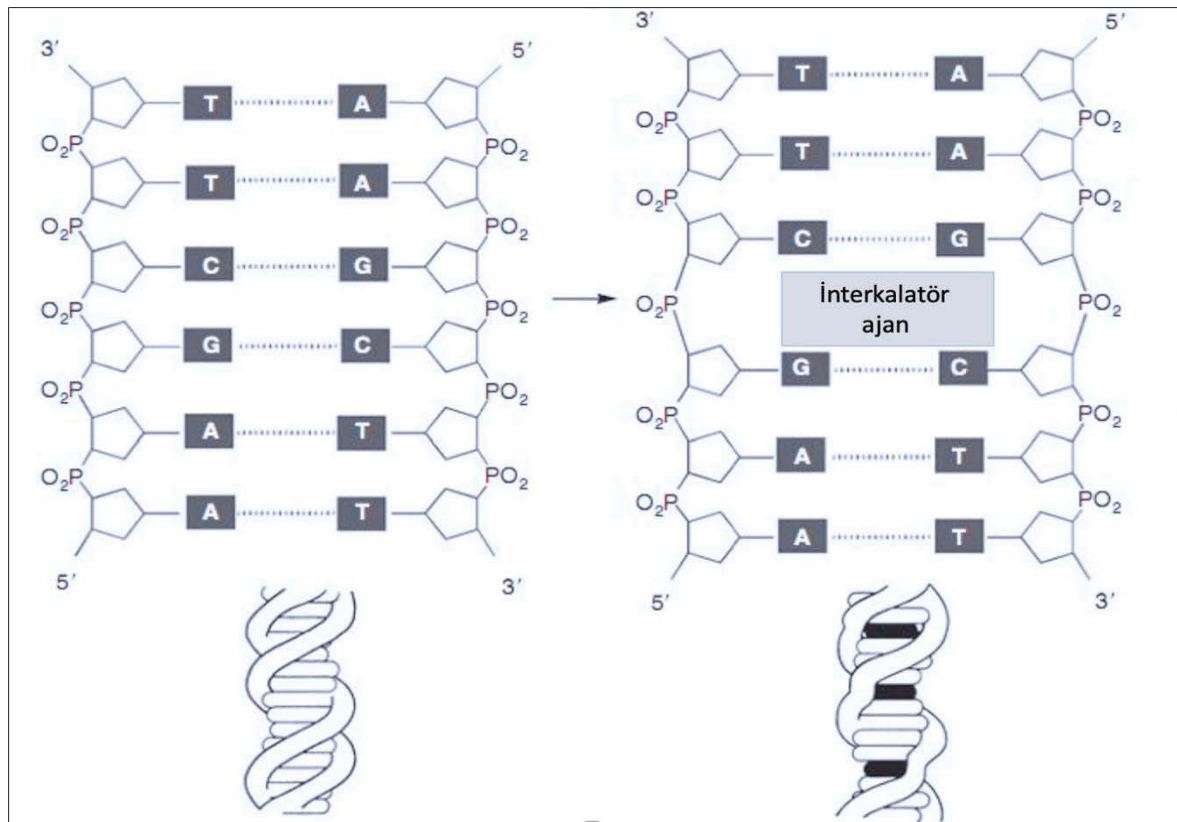
Şekil 2.13. İlaçların kovalent olmayan etkileşimlerle DNA ile etkileşimi (Ramotowska ve diğerleri 2021)

İnterkalasyon

İnterkalatörler, kovalent bağlar oluşturmadan ve DNA bazları arasındaki hidrojen bağlarını kırmadan DNA omurgasına dik olarak istiflenen moleküllerdir (Şekil 2.13). DNA-

interkalatör kompleksinin stabilitesini sürdüren yegâne kuvvetler van der Waals bağları, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimlerdir. DNA interkalatörler kemoterapötik tedavide hızla büyüyen kanser hücrelerinde DNA replikasyonunu inhibe etmek için kullanılmaktadır. Yapısal değişiklikler, DNA'da interkalatörler tarafından indüklenir. İnterkalasyon, DNA çift sarmalını stabilize eder, uzatır, sertleştirir ve çözer. Bu yapısal modifikasyonlar, sıklıkla transkripsiyon ve replikasyonun inhibisyonuna ve interkalatörleri güçlü mutajenler yapan DNA tamir mekanizmaları ile fonksiyonel değişikliklere yol açabilir (Sirajuddin ve diğerleri, 2013)

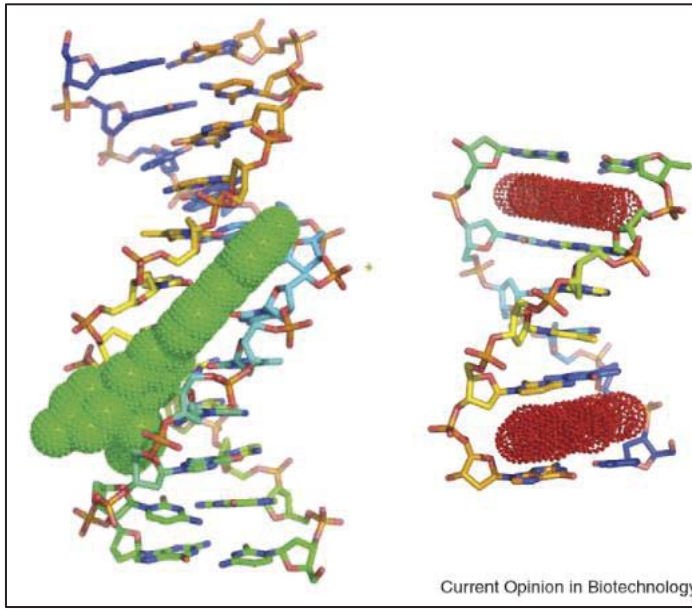
İnterkalasyon sonucunda söz konusu sistemler sarmal eksene dik olarak konumlandırılır. Oluşan eklenti, yassı aromatik sistemlerin DNA azotlu bazları ile etkileşimleri ile stabilize edilir. Genellikle baz dizisi özgüllüğü sergilemezler, ancak bunun yerine tercihen GC (guanin-sitozin) baz çiftlerinin baskın olduğu bölgelerde bulunurlar. İnterkalasyon işleminden sonra, birincil ve ikincil DNA yapıları değişmeden kalır fakat üçüncül yapıda değişiklik meydana gelebilir (Ramotowska ve diğerleri 2021).



Şekil 2.14. İnterkalatör ajanın DNA omurgasına istiflenmesi (Goftar ve diğerleri (2014))

Oluk bağlama

Bazı küçük bileşikler, van der Waals etkileşimi ve hidrojen bağı ile DNA'nın küçük oluğuna bağlanır. Küçük oluk bağlayıcı ilaçlar benzen veya pirol gibi birkaç aromatik halkaya sahiptir. Oluk bağlayıcı ilaçlar, oluğun eğrisine göre dar kavislere sahiptir. Ek olarak, bu ilaçlar bazlara, tipik olarak adenin N3'üne ve timinin O2'sine hidrojen bağları oluşturabilir. Oluk bağlama molekülleri genellikle adenin-timin (AT) açısından zengin dizilere özgüdür. Hidrofobik ve/veya hidrojen bağı genellikle bu bağlanma işleminin önemli bileşenleridir ve stabilizasyon sağlar. Oluk bağlanma, DNA'da büyük konformasyonel değişikliklere neden olmamaktadır (Şekil 2.14). Oluk bağlayıcılar transkripsiyon faktörlerine bağlanarak gen ifadesinin inhibisyonuna sebep olur. Oluk bağlayıcıların antikanser ve antibakteriyel etkisinin olduğu bilinmektedir (Sirajuddin ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.15. Soldaki resim; minör oluğa bağlanan bir ajan gösterimi. Sağdaki resim; interkalasyon ile bağlanan DNA bazlarına bağlanan bir ajan gösterimi (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007)

Dış bağlanma

Dış bağlanma elektrostatik etkileşimlerden meydana gelir. Bazı ligandlar ayrıca DNA fosfat omurgası ile spesifik olmayan, dış kenar istifleme etkileşimleri oluşturma yeteneğine sahiptir. 2+ pozitif yük olan Ru (II) gibi bazı metal kompleksleri DNA ile dış bağlanma yoluyla etkileşime girer (Sirajuddin ve diğerleri, 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

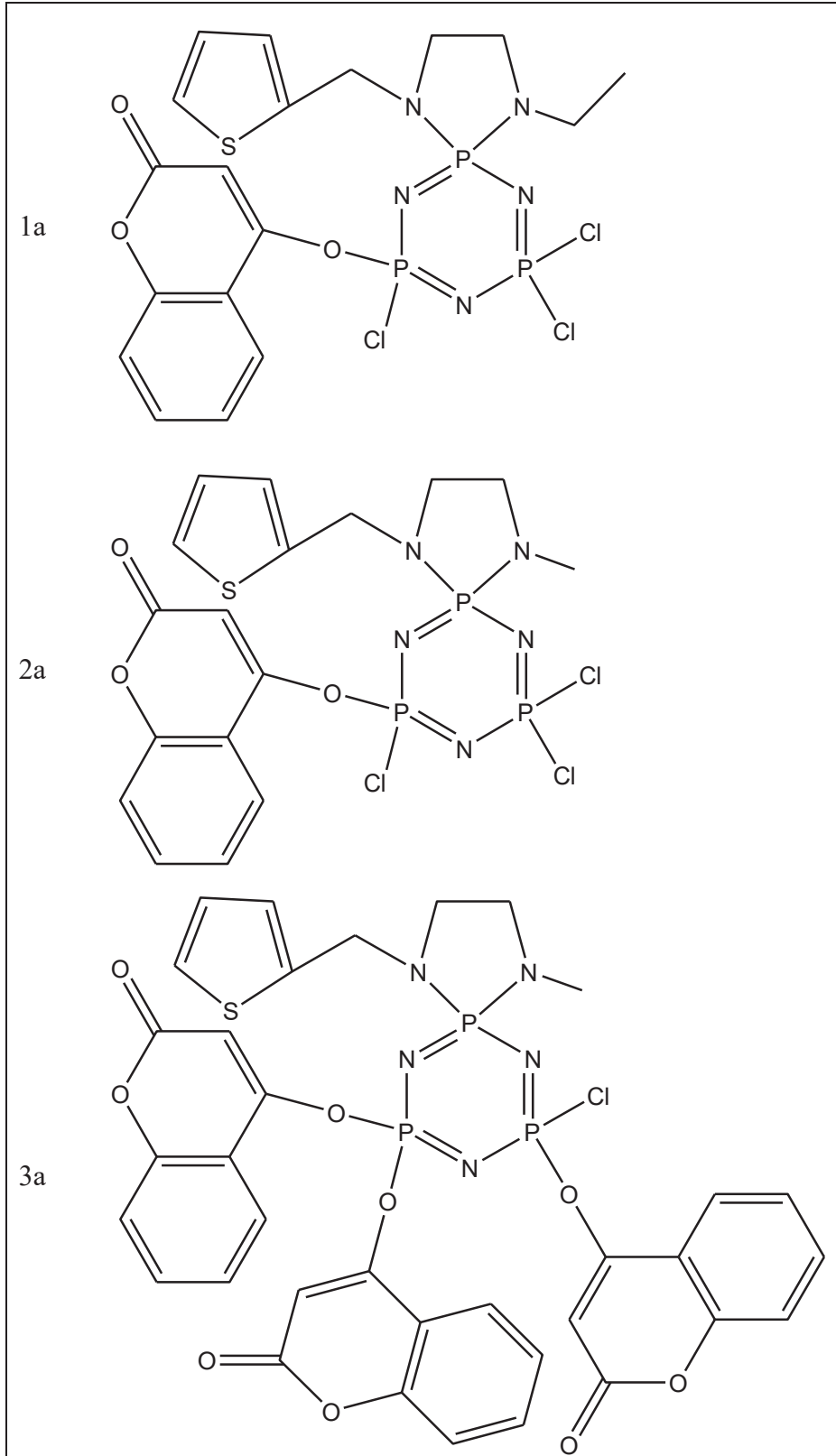
3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bileşikler

Çalışmada kullanılan tetramerik fosfazen bileşikleri Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde Doç. Dr. Aytuğ OKUMUŞ tarafından sentezlenmiş olup bileşiklerin molekül yapıları Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Bu bileşiklerin tam isimleri şu şekildedir: (Kumarin-4-hidroksi)-trikloro-(N-etil-N’-2-tiyofenilmetil)-etan-1,2-diamino-(N/N) spirosiklotrifosfazen (1a), (Kumarin-4-hidroksi)-trikloro-(N-metil-N’-2-tiyofenilmetil)-etan-1,2-diamino-(N/N) spirosiklotrifosfazen (2a), Kloro-tri(kumarin-4-hidroksi)- (N-metil-N’-2-tiyofenilmetil)-etan-1,2-diamino-(N/N) spirosiklotrifosfazen (3a). Bileşikler çalışmaya alınmadan önce DMSO içerisinde çözülmüş ve 0,2 µm por çaplı enjektör ucu filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

3.1.2. Mikroorganizmalar ve gelişme koşulları

Çalışmada kullanılan 8 bakteri ve 3 maya suşu Gazi üniversitesi fen fakültesi moleküler biyoloji laboratuvarında bulunan kültürlerden elde edilmiştir. Bu çalışmada *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* bakterileri kullanılmıştır. Bu bakteriler stoktan alınarak 37 °C’de 24 saat boyunca nutrient agar içerisinde inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* maya suşları ise 30 °C’de 48 saat boyunca sabouroud dekstroz agar içerisinde inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan 1a, 2a ve 3a bileşiklerinin yapıları

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Nutrient agar (Merck), Sabouraud dekstroz agar (Merck), Sabouraud dekstroz broth (Merck), NaCl (Merck), 1,4- dioksan (Sigma), 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma), Tris (Merck), asetik asit (Merck), etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Merck), agaroz (Applichem), etidyum bromür (Sigma), etanol (Merck), süktroz (Sigma), bromfenol mavisi (Merck), ksilen siyanol (Merck).

3.1.4. Kullanılan sarf malzemeler, aletler ve cihazlar

Spektrofotometre küveti (LP Italiana), petri kapları (90x15 mm) (LP Italiana), mikropipet uçları (LP Italiana), mikrosantrifüj tüpleri (LP Italiana), mezür, erlen, beher gibi çeşitli cam malzemeler, etüv, şırınga ucu filtre (0,45 µm) (Sartorius), halka uçlu öze, otoklav (Tomy SX-500), 10 cc şırınga, 96 kuyucuklu mikrolaka, çeşitli hacimlerde mikropipetler, pamuk, derin dondurucu (-30 ve -80°C) (Sanyo), kit saklama dolabı (+4°C) (Sanyo), spektrofotometre (Shimadzu), jel görüntüleme cihazı (Biometra), güç kaynağı, yatay elektroforez sistemi, pH metre (Mettler Toledo), hassas terazi, lateks ve nitril eldiven, mikrodalga fırın (Vestel), steril kabin, soğutmalı santrifüj (Sigma), drigalski spatülü.

3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Besiyerleri: Besiyerleri ürün üzerinde belirtilen miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika boyunca otoklav kullanılarak steril edilmiştir. Halen sıvı halde bulunan besi yerleri 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petri kaplarına 20'şer ml paylaştırılmıştır. Besiyerleri katılaştıktan sonra etüve alınır. Steril olan besi yerleri çalışmada kullanılmıştır.

Serum fizyolojik: İzotonik NaCl çözeltisi %0,9 oranında hazırlanarak 121 °C 1,5 atm altında 15 dk otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

TAE (tris asetik asit EDTA) tamponu (50X): 57,1 ml glasiyal asetik asit, 242 g Tris base ve 100 ml 0,5 M EDTA (pH:8) distile su içerisinde çözülüp hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.

TAE tamponu (1X): 50X TAE tamponundan 20 ml alınıp üzeri 1 litreye ulaşıncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

DPPH çözeltisi: %0,004 oranında DPPH etanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Jel yükleme tamponu: %0,025 bromfenol mavisi, %40 sukroz ve %0,25 ksilen siyanol karıştırılarak elde edilmiştir.

Etidyum bromür: Derişimi 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanarak koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Agaroz jel: %1 oranında agaroz 1X TAE içerisinde hafifçe çözdürölüp daha sonra mikrodalga fırında tamamı eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Jel biraz soğuduktan sonra jel tabağına dökölerek polimerleşmeye bırakılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Mikrodilüsyon yöntemi

Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesini hesaplamak için bileşiklerin MBK, MFK ve MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Mikroorganizma üremesinin olmadığı en düşük konsantrasyon mayalar için MFK, bakteriler için MBK değeri olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyondan sonra mikroorganizmaların üremesinin yavaşladığı ilk konsantrasyon MİK değeri olarak değerlendirilmiştir.

İlk olarak 96 kuyusu bulunan mikropalakaların her bir kuyucuğına 100 µl besiyeri koyulmuştur. Bakteri eklenecek kuyucuklarda mueller hinton broth, maya eklenen kuyularda ise sabouraud dekstrozo broth kullanılmıştır. Konsantrasyonu 5000 µM olan bileşikten 100 µl alınıp ilk kuyucuğına eklenmiş ve pipetleme yöntemi ile 8 seyreltme işlemi yapılmıştır. Daha sonra bulanıklığı MacFarland 0,5 olarak ayarlanan mikroorganizmalar 1/10 oranında seyreltilmiş ve her kuyucuğına 5 µl olacak şekilde eklenmiştir. Son olarak mikropalaka inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında MİK, MBK ve MFK değerlerinin belirlenmesi için, mikropalakada bulunan her kuyucuktan 10 µl alınıp uygun besiyerlerine ekilmiştir. Bakteri için nutrient agar, mayalar için sabouraud dekstrozo agar kullanılmıştır. Ekim sonrasında petri kapları inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon

sonrasında bakteri ve mayaların üremeleri göz önünde bulundurularak MİK, MBK ve MFK değerleri belirlenmiştir.

3.2.2. Bileşiklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Bileşiklerin DPPH serbest radikalini süpürücü etkisine bakılmıştır. 5000 μ M başlangıç konsantrasyon ile seyreltilme yapılarak 2500, 1250, 625, 312,5, 156,25 μ M konsantrasyonlu 1 ml bileşik çözeltileri elde edilmiştir. Bu çözeltilerin üzerine 1 ml 0,004% DPPH çözeltisi eklenmiş ve 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu çözeltilerine bileşik yerine çözücü eklenmiştir ve inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra çözelti örneklerinin 517 nm dalga boyundaki absorbansları spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Antioksidan özelliği bulunan bileşiklerin radikal halde bulunan mor renkli 1,1-difenil-2-pikril hidrazil molekülü ile tepkimesinden renksiz 1,1-difenil-2-pikril hidrazin molekülü elde edilmektedir. Dolayısıyla mor renkli kontrol grubunun absorbans değeri, bileşik çözeltilerinin absorbansından daha yüksektir. Çözelti rengindeki bu değişim spektrofotometre tarafından tespit edilerek bileşiklerin antioksidan özelliği ölçümlenmektedir.

3.2.3. Bileşiklerin DNA ile etkileşiminin belirlenmesi

1a, 2a ve 3a kodlu spirosiklotrifosfazen bileşiklerinin plazmid DNA ile etkileşiminin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Maddelerin stok çözeltileri dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür ve 1 saat içerisinde kullanılmıştır. 625, 312,5, 156,2 ve 78,125 μ M konsantrasyonlardaki bileşikler plazmid DNA ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra madde-plazmid DNA karışımı agaroz jele yüklenmiştir ve yürütme sonra sonuçlar incelenmiştir. Kontrol olarak bileşik ile etkileşime girmemiş plazmid DNA'sı (PBR) jeldeki ilk kuyuya yüklenmiştir. Agaroz 1% (w/v), TAE tamponu içinde kaynatılıp çözüldükten sonra jel tabağına dökülmüştür. Jel polimerleşip katılaştıktan sonra inkübasyon sonrası ilaç-DNA karışımı ile yükleme tamponu karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklenerek ve TAE tamponu içerisinde 3 saat boyunca 60V'da, doğru akımda yürütülmüştür. Elektroforez sonunda jel etidyum bromür ile boyanmıştır. Son olarak jellerin görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra) jel görüntüleme cihazıyla ultraviyole ışık altında yapılmış ve görüntüler bilgisayar ortamında resim (JPEG) formatında kaydedilmiştir. DNA üzerindeki bu bölgelere bağlanma durumunu anlamak için DNA ile

bileşikler 24 saat inkübe edilmiş daha sonra da *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile 2 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir

*Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile restriksiyon endonükleaz reaksiyonu

*Bam*HI enzimi DNA üzerindeki 5'-G/GATCC-3' bölgesini tanır. *Hind*III enzimi ise 5'-A/AGCTT-3' bölgesini tanımaktadır. Enzimle muamele edilmiş madde-DNA karışımı 1 saat boyunca TAE tamponu içinde 70 V'de %1’lik agaroz jel içerisinde yürütülmüştür. Sonrasında jel etidyum bromür ile boyanmış, jellerin görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra) jel görüntüleme cihazında, ultraviyole ışık altında yapılmış ve görüntüler bilgisayara resim (JPEG) formatında kaydedilmiştir (1,2).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Antimikrobiyal Aktivite

Bileşiklerin çeşitli patojenler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin tespit edilmesi için mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ampisilin, kloramfenikol (bakteriler için), ketakonazol (mayalar için) kullanılmıştır. Bileşiklerin MBK değerlerinin 2500-625 µM arasında olduğu tespit edilmiştir. Bakteriler üzerindeki MİK değerlerinin de yine 2500-625 µM aralığında olduğu görülmektedir. Bileşiklerin MFK değerlerinin de 2500-625 µM aralığında olduğu görülmektedir. Mayalar üzerindeki MİK değerleri ise 625-312,5 aralığındadır. Bileşiklerin maya türlerine olan antimikrobiyal etkisinin bakterilere oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Bakteriler ve mayaların MİK değerlerinin 312,5-2500 µM arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). 1a bileşiğinin *C. tropicalis* mayasına karşı MİK değerinin 312,5 µM, *E. coli* ATCC 25922 *B. cereus* *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. hirae* bakterileri ve *C. albicans* ve *C. krusei* mayalarına karşı gösterdiği MİK değerlerinin 625 µM olduğu belirlenmiştir. 2a bileşiğinin, *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* bakterilerine ve *C. Albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* mayalarına karşı gösterdiği MİK değerlerinin 625 µM olduğu belirlenmiştir. Öte yandan 3a bileşiğinin, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. typhimurium*, *E. hirae*, *B. subtilis* bakterileri ve *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* mayalarına karşı gösterdiği MİK değerlerinin 625 µM olduğu belirlenmiştir.

Tüm bileşiklerin, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* bakterileri üzerindeki etkisi amfisilin ve kloramfenikol'den daha yüksektir. Tüm bileşiklerin *S. aureus*, *E. hirae* üzerindeki etkisi kloramfenikol'den daha yüksektir. 1a ve 2a bileşiklerinin *E. faecalis* üzerindeki etkisi amfisilinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yine tüm bileşiklerin *C. albicans* ve *C. tropicalis* mayaları üzerinde ise ketokonazol'den daha etkili olduğu belirlenmiştir. 2a ve 3a bileşiklerinin etkinliği 1a'dan farklı olarak *K. pneumonia* üzerinde kloramfenikol'den daha yüksektir. Ek olarak 3a bileşiği *E. coli* ATCC 25922 üzerinde amfisilin ve kloramfenikolden, *S. typhimurium* üzerinde ise sadece kloramfenikolden daha etkilidir. Bileşiklerin en etkili olduğu mayanın *C. tropicalis* olduğu tespit edilmiştir (Resim 4.1).

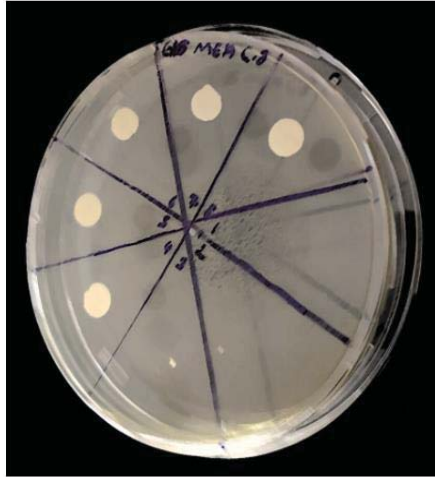
P. aeruginosa ATCC 27853, 1a



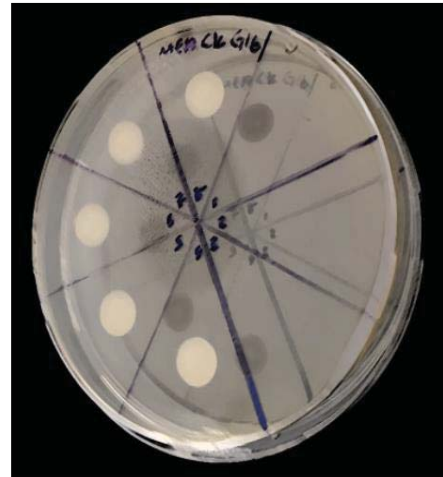
E. coli ATCC 35218, 1a



C. albicans ATCC 1023, 1a



C. krusei ATCC 6258, 2a



Resim 4.1. En etkin bileşiklerden bazılarının patojenler üzerinde etkisi. Son 1 konsantrasyonda etki görülmemiştir

Çizelge 4.1. 1a, 2a, 3a bileşiklerinin MİK değerleri (2100-312,5 µM)

Test Mikroorganizmalar	Maddeler			Pozitif kontroller		
	1a	2a	3a	Amfisilin	Kloramfenikol	Ketokonazol
<i>E. coli</i> ATCC 35218 G (-)	2500	2500	1250	2500	>2500	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922 G (-)	625	625	625	<19.5	1250	-
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711 G (+)	625	625	625	2500	1250	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 G (+)	2500	1250	625	19.5	78.1	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 G (+)	1250	1250	1250	<19.5	2500	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 G (+)	625	625	1250	312.5	625	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 G (-)	625	625	625	2500	2500	-
<i>K. pneumonia</i> ATCC 13883 G (-)	2500	1250	1250	1250	2500	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028 G (-)	2500	1250	625	<19.5	1250	-
<i>E. hirae</i> ATCC 9790 G (+)	625	1250	625	39.1	2500	-
<i>P. vulgaris</i> RSKK 96029 G (-)	1250	1250	1250	>2500	2500	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	625	625	625	-	-	1250
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	625	625	625	-	-	156.3
<i>C. tropicalis</i> Y-12968	312,5	625	625	-	-	1250

Bileşik 1a'nın, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* bakterileri üzerinde MBK değerinin 1250 µM olduğu, tüm mayalar üzerindeki MFK değerinin ise 625 µM olduğu belirlenmiştir. Bileşik 2a ve 3a'nın ise *E. coli* ATCC 25922 bakterisi için MBK değerinin 1250 µM, *P. aeruginosa* bakterisi içinse 625 µM olduğu belirlenmiştir. Yine bileşik 2a'nın *C. krusei* mayası üzerindeki MFK değerinin 625 µM, *C. tropicalis* mayası üzerindeki değerinin ise 1250 µM olduğu görülmektedir. Bileşik 3a'nın *C. albicans* maya üzerindeki MFK değerinin 1250 µM, *C. krusei* ve *C. tropicalis* mayaları içinse MFK değerinin ise 625 µM olduğu belirlenmiştir. Bileşikler pozitif kontroller ile karşılaştırıldığında 3 bileşiginde sadece *P. aeruginosa* üzerinde amfisilin ve kloramfenikolden daha etkili olduğu belirlenmiştir. Diğer bakteriler ve mayalarda pozitif kontrollerin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum da bileşiklerin antibiyotiklerden daha az etkili olduğunu göstermektedir. Bileşikler birbirleri ile karşılaştırıldığında ise 1a bileşiginin 2a ve 3a bileşiklerine göre MFK değerinin daha düşük yani daha etkili olduğu belirlenmiştir. *C.*

krusei mayası üzerinde ise 3 bileşiğinde aynı etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Genel olarak tüm bileşiklerin bakterilerden çok mayalar üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bileşiklerin bakteriler üzerindeki etkisi ise patojene göre değişkenlik göstermektedir (Şekil 4.2)

Çizelge 4.2. Bileşiklerinin MBK ve MFK değerleri (2500- 225 µM)

Mikroorganizmalar	Maddeler			Pozitif kontrol		
	1a	2a	3a	Amfisiilin	Kloramfenikol	Ketokonazol
<i>E. coli</i> ATCC 35218 G (-)	2500	2500	2500	2500	625	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922 G (-)	1250	1250	1250	<19.5	78.1	-
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711 G (+)	>2500	>2500	>2500	156.3	156.3	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 G (+)	>2500	>2500	>2500	<19.5	78.1	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 G (+)	2500	2500	2500	<19.5	156.3	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 G (+)	2500	2500	2500	<19.5	312.5	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 G (-)	1250	625	625	>2500	>2500	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 G (-)	2500	2500	2500	1250	625	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028 G (-)	2500	2500	2500	<19.5	156.3	-
<i>E. hirae</i> ATCC 9790 G (+)	2500	>2500	2500	19.5	156.3	-
<i>P. vulgaris</i> RSKK 96029 G (-)	1250	2500	2500	1250	1250	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	625	2500	1250	-	-	312.5
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	625	625	625	-	-	<19.5
<i>C. tropicalis</i> Y-12968	625	1250	625	-	-	78.1

4.2. Antioksidan Aktivite

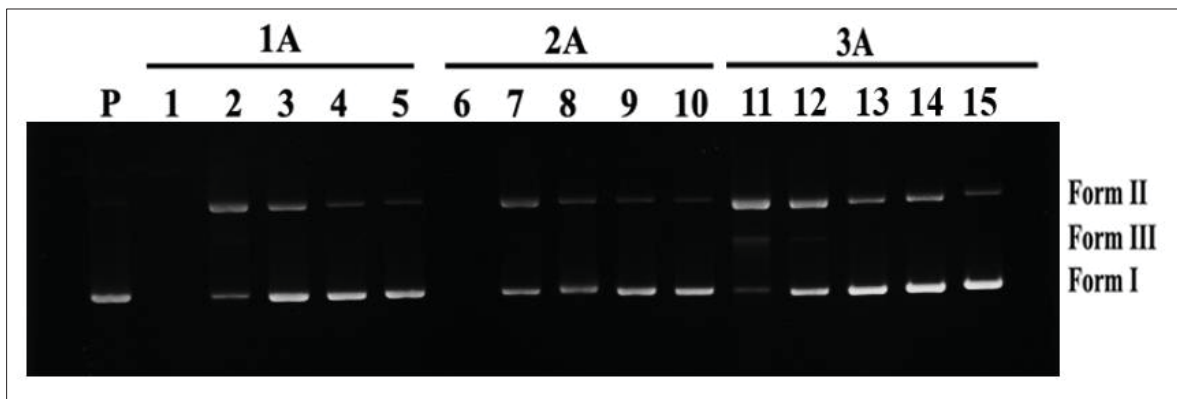
Antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için bileşiklerin DPPH serbest radikalini süpürücü etkisi incelenmiştir. Deney üç paralel olarak (aynı anda üç kez) yapılmıştır. Kontrol grubu ve 1000-5000 µM arasında değişen konsantrasyonlardaki bileşiklerin 517 nm’de ölçülen absorbans değerleri gösterilmiştir (Çizelge 4.3). IC50 değerine bakılarak radikali süpürücü etkinin en çok 1a maddesinde olduğu görülmektedir. Dolayısıyla 1a maddeinin 2a maddesinden, 2a maddesinin 3a maddesinden daha etkili olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.3. Bileşiklerin IC 50 değerine göre serbest radikalleri süpürücü etkisi (513 nm)

Madde	Kontrol (BHT)	IC50 (μ M)
1a	269.43 $\pm$ 18.85	83,97 $\pm$ 13,71
2a	269.43 $\pm$ 18.85	86,62 $\pm$ 23.43
3a	269.43 $\pm$ 18.85	1229 $\pm$ 46,04

4.3. Bileşiklerin DNA ile Etkileşimi

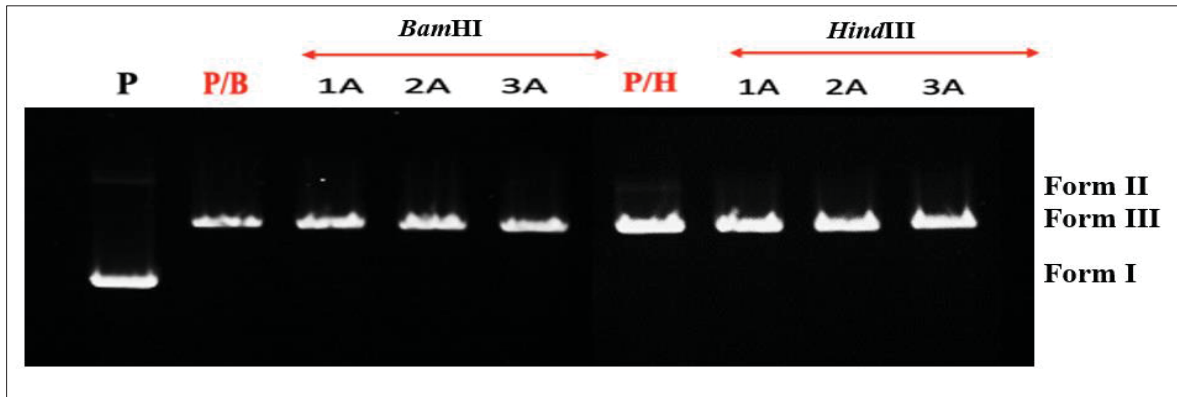
Plazmit DNA'nın azalan 1a, 2a ve 3a konsantrasyonları ile etkileşimine uygulanan elektrofotogramlar Resim 4.2'de gösterilmektedir. P, bir kontrol görevi görmesi için işlenmemiş plazmit DNA'yı temsil etmektedir. 1-5 satırları; hat 1,6,11: 625 uM, hat 2,7,12: 312,5 uM, hat 3,8,13: 156,25 uM, şerit 4,9,14: 78,125 uM, şerit 5,10,15: 39,612 uM konsantrasyonlarını göstermektedir. Romen rakamları I, II ve III, sırasıyla Form I (kovalent olarak kapalı dairesel- süpersarmal form), Form II (açık halkasal form) ve Form III (doğrusal DNA) plazmitlerini gösterir. P hattından sonraki 1-5 numaralı hatlar 1a maddesinin azalan konsantrasyonlarını, 6-10 numaralı hatlar 2a maddesinin azalan konsantrasyonlarını, 11-15 numaralı hatlar ise 3a maddesinin azalan konsantrasyonlarını göstermektedir. Her üç maddenin de DNA etkileşiminin olduğu ve kullanılan bileşiğin konsantrasyonu azaldıkça DNA etkileşiminde azaldığı görülmektedir. Bu durum yüksek konsantrasyonlarda Form I (süpersarmal yapı) yapının bant oluşturmaması ve Form III (lineer yapı) yapının bant oluşturması ile tespit edilmiştir.



Resim 4.2. Sol 5 (1-5) 1a bileşiği ile plazmid DNA etkileşimi, orta 5 hat (6-10) 2a bileşiğinin DNA etkileşimleri, sağ 5 hat (11-15) 3a bileşiğinin DNA etkileşimlerini; hat 1,6,11: 625 μ M, hat 2,7,12: 312,5 μ M, hat 3,8,13: 156,25 μ M, hat 4,9,14: 78,125 μ M, hat 5,10,15: 39,212 μ M; Form I (kovalent olarak kapalı dairesel-süpersarmal), Form II (açık halkasal form) ve Form III (doğrusal DNA)

Resim 4.2’de 3a maddesinin ilk iki konsantrasyonda (625 μ M ; 312,5 μ M) form III oluşumu görülmektedir. Bu durum maddenin DNA ile etkileşerek kesim etkisi yarattığını göstermektedir. Ayrıca 3a maddesinin konsantrasyon azaldıkça form I ve II’nin mobilitesini azalttığı görülmektedir. 1a ve 2a maddesinin hiçbir formun mobilitesinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığı görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça 1a ve 2a maddeleri DNA’nın kesilmediğini gösteren form I yapısında artış göstermektedir. Tüm maddeler için konsantrasyon azaldıkça madde-DNA etkileşiminin azaldığı, dolayısıyla konsantrasyon azaldıkça kesimin de azaldığı süpersarmal (form I) yapının artması ve form III yapının azalmasıyla veya hiç görülmemesi ile saptanmıştır.

Bileşiklerin DNA’ya bağlanma bölgesini değerlendirmek için belirli konsantrasyonlarla muamele edilmiş plazmit DNA’nın *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleazlar ile enzim kesimleri yapılmıştır (Resim 4.3). *Hind*III enzimi 5’-A/AGCTT-3’ bölgesini, *Bam*HI enzimi ise 5’-G/GATCC-3’ bölgesini tanımaktadır. 1a, 2a, 3a bileşikler ile etkileşime girmiş DNA’nın enzim kesimine bakıldığında her iki enziminde DNA’yı kestiği ve maddelerin DNA’ya A/A ve G/G nükleotitlerinden bağlanmadığı belirlenmiştir (Resim 4.3).



Resim 4.3. Çalışmada kullanılan bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA’nın *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleazları ile kesimi. (P): Bileşik ile muamele edilmemiş plazmit DNA; (P/H): *Hind*III ile kesilmiş plazmit DNA; (P/B): *Bam*HI ile kesilmiş plazmit DNA

5. TARTIŞMA

Bu çağın en önemli sağlık sorunlarının başında antibiyotik direncinin ve kanser oranının giderek artması gelmektedir. Enfeksiyon hastalıkları tarih boyunca belirli hastalıklarda veya epidemik boyutlarda sürekli olarak kendini göstermiştir. Antibiyotiğin keşfinden sonra, enfeksiyonel hastalıklardan kaynaklı ölümler ve vücutta oluşabilecek kalıcı hasarlar minimum seviyeye inmiştir. Enfeksiyona sebep olan patojenler bu antibiyotiklere karşı kendi savunma mekanizmalarını oluşturmakta ve antibiyotik tedavisinden kurtulan patojenlerin antibiyotik direnci geliştirdiği görülmektedir. Bu nedenle çağın en büyük sağlık sorunlarından biri olan antibiyotik direnci, enfeksiyonel hastalıklar ile savaşmada bizi geriye götürmekte ve yeni antimikrobiyal maddelere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Ayrıca günümüz koşullarında doğa kirliliği ve şehirleşmenin getirdiği artan temas oranı enfeksiyon hastalıklarına sebep olan patojenlere maruz kalma olasılığımızı hiç olmadığı kadar arttırmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal ilaçlara olan ihtiyaç ve arayışımız artmıştır. Daha önce birçok farklı fosfazen türevinin antimikrobiyal aktivitesinin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada ilk defa sentezlenmiş olan spirosiklotrifosfazen türevlerinin 11 patojen bakteri ve 3 patojen maya üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotikler ile sonuçlar karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Sonuçlara göre tüm bileşiklerin, *B. cereus*, *E. coli* *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* bakterileri üzerindeki etkisi kloramfenikolden ve amfisilinden daha yüksektir. Bileşiklerin en etkili olduğu maya *C. tropicalis* olarak gözlenmektedir. Bileşikler birbirleri ile karşılaştırıldığında 1a bileşiğinin 2a ve 3a bileşiklerine göre MFK değerinin daha düşük yani daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin bazı bakteriler ve mayalar üzerinde kullanılabilecek antimikrobiyal ajan olma potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışma bu bileşiklerle yapılan ilk antimikrobiyal aktivite çalışması olma özelliğindedir.

Çağımızın diğer bir sorunu olan kanser hastalığı ise dünyada en çok ölüme sebep olan hastalıklar arasında 2. sırada gelmektedir. Sağlıklı bir bireyde, bir hücrenin vücut tarafından bölünmesinin kontrolünü sağlayan çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmalarda meydana gelen aksaklıklar hücrenin kontrolsüz bir şekilde üremesine neden olmaktadır. Kanser en bilinen tedavi yöntemlerinden biri kemotepidir. Bu tedavide kullanılan kemoterapik ilaçlar kanser hücrelerinin yanında, sağlıklı hücrelerinde genetik metaryallerine zarar vererek hücre gen ifadesine etki etmektedir. Dolayısıyla burada asıl hedeflenen sadece

kanser hücrelerine toksik etki yaratacak, sağlıklı hücelere olan toksik etkisi en aza indirgenmiş ilaçlar üretmektir. Daha önceki çalışmalarda fosfazenlerin kanser hücrelerini önleme etkisi tespit edilmiş ve bu alandaki çalışmalara rağbet artmıştır. Bu çalışmada spirosiklotrifosfazenlerin plazmid DNA ile etkileşimine bakılarak kanser hücreleri üzerinde oluşturabileceği etki tespit edilmiştir. 1a ve 2a bileşiklerinin plazmid DNA ile etkileşiminde süpersarmal yapı tespit edilmiştir. Konsantrasyon azaldıkça bileşik-DNA etkileşimi azalmış olduğu form I yapısındaki artış ile tespit edilmiştir. Bu durum DNA madde etkileşimi dolayısıyla DNA konformasyonundaki değişikliği ve DNA ile madde etkileşiminin düşük olduğunu göstermektedir. 3a maddesinin plazmid DNA ile etkileşimine baktığımızda ise 3a maddesinin konsantrasyon azaldıkça lineer DNA oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Konsantrasyon azaldıkça 3. konsantrasyondan itibaren 3a maddesinin DNA'nın lineer formunu oluşturmadığı görülmektedir. Dolayısıyla maddelerin tümünün DNA ile etkileştiği, fakat 3a maddesinin 1a ve 2a bileşiklerinden daha etkili olduğu belirlenmiştir. 3a bileşiği, 1a ve 2a bileşiklerine göre daha fazla kumarin grubu içermektedir. Dolayısıyla sonuçlar bileşiğin büyüklüğünün artmasının plazmid DNA etkileşimde etkisi olabileceğini düşünülmektedir. 3a bileşiğinin daha büyük olması bileşiğin oluk bağlanma aracılığıyla etkileşime girmiş olma olasılığını güçlendirmektedir.

Bileşiklerle etkileşime girmiş DNA'nın enzimlerle kesilmiş haline baktığımızda ise bileşiklerin *Hind*III ve *Bam*HI enzimleri tarafından G/G VE A/A bölgelerinden kesildiğini yani bileşiklerin bu bölgelerden DNA'ya bağlanmadığını göstermektedir. Fosfazenlerin yapısında tekrarlayan fosfor, azot atomları ve bu bu atomların arasında ikili bağ bulunmaktadır ($-p=n-$). Fosfazenlerin halkasal, düz ve polimerik olmak üzere üç farklı yapısal formu bulunmaktadır. İşlevsel olarak fosfazenlerin birçok farklı biyolojik aktivitesi mevcuttur. Bu aktivitelere örnek olarak antikanser, antimikrobiyal, antitüberküloz ve antioksidan aktivitesi verilebilir (Chandrasekhar ve diğerleri, 2007). Fosfazenlerle yapılan biyolojik aktivite çalışmalarına bakıldığında, bileşiklerin antimikrobiyal ve antikanser ajan olma potansiyellerinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Fosfazenlerin sahip olduğu biyolojik aktivite fosfazenin temel yapısına bağlı olan yan gruplara göre farklılıklar göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan kumarin grubu içeren spirosiklotrifosfazen bileşikleri farklı miktarlarda antimikrobiyal aktivite göstermiş ve DNA ile etkileşime girmiştir. Çalışmalardan elde edilen veriler göz önüne alındığında bileşiklerin sahip olduğu biyolojik

aktiviteye yapılarında değişken grup olarak bulunan kumarin gruplarının sebep olduğu düşünülmektedir. Piyasada kumarin içeren ilaçlar Warfarin gibi kan pıhtı önleyici olarak kullanılır. Ayrıca İnsanlarda, *UGT1A8* geni tarafından kodlanan enzim, kumarinler dahil birçok substrat ile glukuronidaz aktivitesine sahiptir. 4-Hidroksikumarin, kumarin ailesinde ve antikoagülan ve anti-HIV aktiviteleri dahil olmak üzere biyolojik aktivitelere sahip doğal ürünlerde önemli bir bileşendir. Kumarin içeren siklotrifosfazenlerle ilgili bazı raporlar olmasına rağmen, 4-hidroksi-kumarinin siklotrifosfazen ile reaksiyonu hakkında çok çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada çalışılan bileşikler içerdikleri kumarin grupları sayesinde antioksidan, antimikrobiyal etki gösterdiği düşünülmektedir (Şenkuytu ve diğerleri, 2017). Bu tez çalışmasında kumarin içeren bileşikler ilk kez sentezlenmiş olup bu bileşiklere benzer bileşikler üzerinde yapılan pek çalışma bulunmamaktadır.

Antioksidanlar ortamdaki substratin oksidasyonunu geciktiren, oksidasyona karşı koruyan maddelerdir. Oksidantlar hücrelerde dna mutasyonlarına, mitokondri hasarlarına sebep olmaktadır. Mitokondriye zarar veren oksidantlar ise hücrel yaşlanmaya sebep olmaktadır. Bu durum kansere ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olmaktadır. Vücutta zamanla biriken radikallerle tepkimeye giren antioksidanlar bu maddeleri nötrleştirerek radikallerin vücuda zarar vermesini engellemektedir. Bu sayede antioksidantlar kişiyi çeşitli kanser ve nörodejeneratif hastalıklardan korumaktadır (Pisoschi ve diğerleri, 2017). Literatürde heksakis(2,5-di-tert-alkilhidroksifenoksi) siklo trifosfazatrien ve oktakis (3,5-di- tertalkil-4-hidroksifenoksi) siklotetrafosfazatetraen gibi bazı fosfazenlerin içerdiği farklı bileşikler dolayısıyla antioksidan özelliğinin olduğu tespit edilmiştir (Goins ve Li, 1992). Antioksidan özelliği bulunan fosfozenlerden bir diğeri ise organometalik veya inorganik metal tuzlarını içeren fosfazenlerdir. Yapılan DPPH testi ile de serbest radikallere bağlanıp bağlanmadığı belirlenmiştir. IC50 değerine bakılarak radikali süpürücü etkisinin sırasıyla çoktan aza doğru 1a ,2a, 3a şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin içerdiği kumarin grupları, kanser, diyabet, kardiyovasküler ve beyin hastalıkları riskini azaltmak gibi insan sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan heterosiklik moleküllerdir. Bu etkilerin antiinflamatuvar özellikler ve çeşitli enzimlerle etkileşim gibi diğer olası mekanizmaların yanı sıra antioksidan aktiviteleri nedeniyle radikal süpürücü etki ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Bubols ve diğerleri). Bu çalışmada kullanılan maddelerin tümü kumarin grubu içermektedir. 1a ve 2a bileşikleri 3a grubuna göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. 3a bileşiği daha fazla kumarin grubu içermesine rağmen, bileşiğin içerdiği kumarin grubu sayısının, antioksidant aktivitesini arttırmamıştır. Rehakova ve diğerleri (2008) çeşitli kumarin grubu içeren

bileşiklerin antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada molekülün büyüklüğü ile antioksidan aktivitesi arasında bir ilişki kurulamamıştır.

Öztürk ve diğerleri (2018) çalışmasında NN-spiro köprülü bisiklotrifosfazenleri $[N3P3Cl4(NCHMe2)]_2$, izopropilaminopentakolorosiklotrifosfazenin $(N3P3Cl5(NHCHMe2))$ NaH ile deprotonasyon reaksiyonundan hazırlanmıştır. Sentetik olarak üretilen İki bileşiğin (2d, 2h) DNA etkileşimleri, bazı patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi ve sitotoksik aktivitesi çalışılmıştır. 2d ve 2h antimikrobiyal duyarlılıkları on bir bakteri ve üç mantara karşı taranmıştır. İki bileşik, test edilen *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* ve *B. cereus* suşlarına karşı genel olarak önemli aktivitelere sahipken, *C. krusei* mantar suşuna karşı neredeyse ketokanozol kadar etkili oldukları bulunmuştur. *S. aureus*, *E. hirae*, *E. faecalis*, *C. tropicalis* ve *C. albicans* bu bileşiklere karşı direnç göstermiştir. iki bileşiğinde *E. coli* ve *B. cereus* üzerinde önemli antimikrobiyal etkisi tespit edilmiştir. Bileşikler *BamHI* ve *HindIII* enzimleri ile kesildiğinde bileşiklerin ikisinin de enzim sindirimini inhibe ederek, DNA'nın G/G ve A/A nükleotitlerine bağlandığı gözlemlenmiştir. Bileşiklerin DNA etkileşimi sonuçlarında ise 2h bileşiği DNA ile etkileşime geçerek çift sarmal kırığı oluşturmuş yoğun form III yapısı gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan spirosiklotrifosfazenlerde de antimikrobiyal etki belirlenmiş fakat farklı patojenler üzerinde etki göstermiştir. Öte yandan DNA etkileşimi ve enzim kesiminde de aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Tanrikulu ve diğerleri (2019) çalışmasında sentetik olarak üretilmiş bileşik Hekzaklorosiklotrifosfazen $N3P3Cl6$, iki eşmolar miktarda N-alkil-N'-mono (4-florobenzil)diaminler (1-3), $FC6H4CH2NH(CH2)_nNHR$ ve N-alkil-N'-mono(4-nitrobenzil)diaminler (4 ve 5), $NO2C6H4CH2NH(CH2)_nNHR1$ ile Cl yerdeğiştirme reaksiyonu vermesi ile üretilmiştir. Reaksiyon minör ürünler olarak mono(4-florobenzil) (la-3a) ve mono (4-) nitrobenzil) (4a ve 5a) spirosiklotrifosfazenler ve ana ürünler olarak trans-bis(4-florobenzil) (1b-3b) ve trans-bis(4-nitrobenzil) (4b ve 5b) spirosiklotrifosfazenleri vermiştir. Bu sayede çalışmada kullanılan bileşikler ilk kez sentetik olarak üretilmiştir. Plazmid DNA ile inkübe edilen bileşikler (1b, 1c, 3b-5b ve 6), süper sarmal yapıdaki plazmit DNA'nın bölünmesine sebep olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin tümü, form I ve form II DNA'nın hareketliliklerinde ve yoğunluklarında azalmaya neden olmuştur. Bileşikler (3b, 4b ve 5b), bileşiklerin en yüksek konsantrasyonlarında süper sarmal DNA'nın kaybolmasına neden olmuş, inkübasyonla birlikte yoğunluk ve hareketlilik azalmıştır. Bu bileşiklerin tümü

için lineer form III DNA gözlenmiştir. Bileşikler (6, 3b, 4b, 5b, 1b ve 1c), konsantrasyona bağlı bir şekilde önemli DNA parçalama aktivitesi göstermiştir. Bileşiklerin parçalanma aktivitelerini belirlemek için plazmid DNA ve bileşiklerin inkübe edilmiş karışımları *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve test edilen bileşiklerin tümü, spesifik G/G ve A/A nükleotitlerine bağlanan bileşiğin varlığını göstererek, enzim bölünmesini inhibe etmiştir. Sonuçlar, bileşiklerin plazmid DNA'ya bağlanmasının, en yüksek konsantrasyonlarda *BamHI* ve *HindIII* sindirimini önleyebildiğini göstermiştir. DNA bileşik etkileşimleri, fosfazen gruplarının P atomlarına bağlı değişken grupları ile DNA plazmidinin nükleotidleri arasındaki hidrojen bağları ile oluşmaktadır. Ayrıca bileşiklerin redoks aktif nitro grupları içermesinin, bileşiklerin DNA ile etkileşimlerini başlatabileceği ve bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesini artırabileceği düşünülmektedir. Dipol-dipol ve van der Waals etkileşimleri de bileşiklerin plazmid DNA'ya bağlanması için çok önemlidir. Bileşiklerin DNA'ya bağlanma, parçalama, kesme aktiviteleri bu tez çalışması sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tezi kapsamında yapılan araştırmalar sonuç elde edilen veriler ve öneriler aşağıda verilmiştir.

1. Bu tez çalışması kapsamında spiro siklotrifosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesi çeşitli patojen bakteri ve mayalar üzerinde incelenmiş ve MİK, MBK, MFK değerleri belirlenmiştir. Bu bileşiklerin, patojenleri 312,5-2500 μ M aralığında konsantrasyonlarda inhibe ettiği veya tamamen öldürdüğü tespit edilmiştir. Bileşiklerin mayalar üzerinde bakterilere kıyasen daha etkili olduğu belirlenmiştir. Belirli patojenler üzerinde pozitif kontrollere kıyasen daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren bileşiklerin daha ileri araştırmalarda aktivite mekanizmasının belirlenmesi önem taşımaktadır.
2. Bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin DNA ile etkileşimlerinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmış ve bileşiklerin hepsinin DNA ile etkileştiği ve kapalı halkasal DNA'yı parçalayarak form III yapının oluşmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bileşiklerle etkileşime girmiş DNA'nın *HindIII* ve *BamHI* enzimleri tarafından kesilmesi için oluşturulan karışımlar tekrar jelde yürütüldüğünde, DNA'nın bileşiklere G/G VE A/A bölgelerinden bağlanmadığı ve enzimlerin DNA'yı kestiği tespit edilmiştir.
3. Bileşiklerin antioksidan aktivitesine bakıldığında 1a bileşiğinin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sırayı 2a ve 3a bileşikleri sırasıyla izlemektedir. Başka çalışmalar ile karşılaştırıldığında 1a ve 2a bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri orta düzeydedir.
4. Bu tez kapsamında biyolojik aktivitenin belirlenen bileşiklerin içerdikleri kumarin, bileşiklerin antioksidan aktivitesini ve DNA etkileşimini arttırmış olabileceği düşünülmektedir. Daha etkili bileşiklerin sentezlenmesi durumunda bu bilgilerin dikkate alınması önerilmektedir.

Yapılan deneylerin sonuçları değerlendirildiğinde spiro siklotrifosfazen türevlerinin daha önce çalışılan birçok fosfazen türevlerinin aktiviteleri de göz önünde bulundurularak geliştirilmesi halinde iyi bir antimikrobiyal ve antioksidan ajan olma potansiyeli bulunduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alakomi, H.L. and Saarela, M. (2009). Salmonella importance and current status of detection and surveillance methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1(3), 142-152.
- Alcazar-Fuoli, L. and Mellado, E. (2014). Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *British Journal of Haematology*, 166, 471-484.
- Aleksić, M.M. and Kapetanović, V. (2014). An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA - drug interactions. *Acta chimica Slovenica*, 61(3), 555-73.
- Allcock, H. (1972). Recent advances in phosphazene (phosphonitrilic) chemistry. *Chemical Reviews* 1972, 72, 4, 315–356
- Bottone E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382–398.
- Brayer, S., Linn, A., Holt, S., Ellery, K., Mitchell, S., 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.
- Bubols, G. B., Vianna, D. da R., Medina-Remon, A., von Poser, G., Lamuela-Raventos, R. M., Eifler-Lima, V. L., Garcia, S. C. (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(3), 318–334.
- Cabib, E. and Arroyo, J. (2013). How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nature Reviews Microbiology*, 11(9), 648–655.
- Chaplin, A. B., Harrison, J. A. and Dyson, P. J. (2005). Revisiting the electronic structure of phosphazenes. *Inorganic Chemistry*, 44(23), 8407-8417.
- Drobniewski F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology reviews*, 6(4), 324–338.
- Fang, Y. Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879.
- Foster T. J., (2002). Molecular Medical Microbiology, *Staphylococcus aureus*, Academic Press, 839-888.
- Ghosh, A. and Bansal, M. (2003), A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallographica*, 59, 620-626
- Gleria, M. and De Jaeger, R. (2001). Aspects of phosphazene research. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers*, 11(1), 1-45.
- Gleria, M., De Jaeger, R. Majoral, JP. (ed). (2005). Polyphosphazenes: A Review. New Aspects in Phosphorus Chemistry V. *Topics in Current Chemistry*. Berlin, Hiedelberg: Springer, 250.

- Goftar, M. K., Kor, N.M. and Kor, Z. (2014). DNA intercalators and using them as anticancer drugs. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2, 812-822.
- Gómez-Gaviria, M. and Mora-Montes, H. M. (2020). Current Aspects in the Biology, Pathogeny and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1673–1689.
- Beak H., Cho Y., Lee C. and Shon Y.S. (2000). *Anti Cancer Drugs*, 15(5), 637-643.
- Hasanzadeh, M. and Shadjou, N. (2016). Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug-DNA interaction. *Materials Science and Engineering C, Materials for Biological Applications*, 61, 1002–1017.
- Houšť, J., Spížek, J. and Havlíček, V. (2020). Antifungal Drugs. *Metabolites*, 10(3), 106.
- İnternet: Set of gram-negative and gram-positive bacteria: *Cocci, Bacilli, Vibrio, Spirillum, Spirochetes, Escherichia, Clostridia, Corynebacterium*. Vector illustration in flat style over white background. (bilinmiyor). Adobe Stock. Web: https://stock.adobe.com/tr/Library/urn:aaid:sc:AP:803540b3-bf22-40c7-9db9-b2asset_id=341272dfd19f34c?6762 adresinden 12 Haziran 2023 tarihinde alınmıştır.
- İşcan, Ö., Cemaloglu, R., Asmafiliz, N., Kilic, Z., Acik, L., Özbeden, P. and Hökelek, T. (2020). Synthesis and spectroscopic properties of (N/O) mono-and dispirocyclotriphosphazene derivatives with benzyl pendant arms: study of biological activity. *Turkish Journal of Chemistry*, 44(1), 15.
- Kao, P. H. N. and Kline, K. A. (2019). Dr. Jekyll and Mr. Hide: How *Enterococcus faecalis* Subverts the Host Immune Response to Cause Infection. *Journal of Molecular Biology*, 431(16), 2932–2945.
- Kaper, J., Nataro, J. and Mobley (2004), H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123–140.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. and Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423–435.
- Labarre, J. F., Faucher, J. P., Levy, G., Sournies, F., Cros, S. and François, G. (1979). Antitumour activity of some cyclophosphazenes. *European Journal of Cancer*, 15(5), 637–643.
- Levinson, W. *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji* (çev. T. Özgünen). McGraw-Hil. (Eserin orijinali 2004'te yayımlandı), 26.
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z. and Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9(9), 1071–1081.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. and Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (Thirteenth Edition). London: Pearson, 84-756.
- Osumi M. (1998), The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation, *Micron*, 29(2-3), 207-233.

- Moyes D.L., Naglik J.R. (2011), "Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection", *Journal of Immunology Research*, 2011, 346307, 9.
- Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J. L. and Fleury-Souverein, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*. 85(5), 2265-2289.
- Okumuş, A., Akbaş, H., Kılıç, Z. (2016). Phosphorus–nitrogen compounds part 33: in vitro cytotoxic and antimicrobial activities, DNA interactions, syntheses, and structural investigations of new mono(4-nitrobenzyl)spirocyclotriposphazenes. *Research on Chemical Intermediates* 42, 4221–4251.
- Öztürk E., Okumuş A., Kılıç Z., Kılıç A., Kayalak H., Açık L., Çerçi N. A., Türk M., Hökelek T. (2019), Phosphorus-nitrogen compounds. Part 44. The syntheses of N,N-spiro bridged cyclotriposphazene derivatives with (4-fluorobenzyl) pendant arms: Structural and stereogenic properties, DNA interactions, antimicrobial and cytotoxic activities. *Inorganica Chimica Acta*, 486, 172-184.
- Paczosa, M. K. and Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661.
- Palchaudhuri, R. and 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.
- Patel, S. and McCormick, B. A. (2014). Mucosal Inflammatory Response to *Salmonella typhimurium* Infection. *Frontiers in Immunology*, 5, 311.
- Ralhan, R. and Kaur, J. (2007). Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 17(9), 1061-1075.
- Ramotowska, S., Ciesielska, A. and Makowski, M. (2021). What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA-Drug Interactions? *Molecules*, 26(11), 3478.
- Rehakova, Z., Koleckar, V., Cervenka, F., Jahodar, L., Saso, L., Opletal, L., Jun, D., Kuca, K. (2008). DPPH Radical Scavenging Activity of Several Naturally Occurring Coumarins and Their Synthesized Analogs Measured by the SIA Method. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 18(5), 413–418.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heuer, O. E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J., Rolain, J. M., Segovia, C., ... Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes and New Infections*, 6, 22–29.
- Samaranayake, Y. H. and Samaranayake, L. P. (1994). *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 41(5), 295–310.
- Sinden R. R. (2012). DNA Structure and Function. *Elsevier*, 398.

- 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.
- Sudbery, P., Gow, N., Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12(7), 317–324.
- Sun, H., Wan, Y., Du, P., Bai, L. (2020). The Epidemiology of Monophasic *Salmonella Typhimurium*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 87–97.
- Şenkuytu E., Eker Y., Çiftçi G.Y. (2017), 4-Hydroxycoumarin functionalized cyclotriphosphazenes: Synthesis, characterization and fluorescence properties. *Inorganica Chimica Acta*, 459, 45-50.
- Tanrıkulu G.İ., Özgür M.Y., Okumuş A., Kılıç Z., Hökelek T., Aydın B., Açık 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.
- Terry, E. (2018). *Microbiology Essentials and Applications and Microbes*. New Orleans: White Press Academics, 147, 184-197.
- Theuretzbacher U. (2013). Global antibacterial resistance: The never-ending story. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 1(2), 63–69.
- Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. (2018). *Microbiology an Introduction* (Thirteenth Edition). Boston; Pearson, 34.
- Travers, A. and Muskhelishvili, G. (2015), DNA structure and function. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 282: 2279-2295.
- Uslu, H., Şengül, G., ve Aktaş, O. (2011). *Proteus Vulgaris*'in Neden Olduğu Nadir Bir Kraniyal Osteomyelit Olgusu. *Balkan Medicinal Journal*, 28, 113-115.
- WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). Antimicrobial resistance surveillance in Europe. *WHO*. Copenhagen.
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S. (2015). *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition), Chapter 41, Academic Press, 753-767.
- 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.



Gazili olmak ayrıcalıktır