
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

SCHİFF BAZI İÇEREN SÜLFONAT BİLEŞİĞİNİN TEORİK ÇALIŞMASI VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

Ceren AF

YÜKSEK LİSANS TEZİ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARALIK 2025

ETİK BEYAN

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

- 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 çalışmasında 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.

Ceren AF
25/12/2025

SCHİFF BAZI İÇEREN SÜLFONAT BİLEŞİĞİNİN TEORİK ÇALIŞMASI VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ceren AF

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2025

ÖZET

Tıbbi araştırma ve tedavilerdeki gelişmelere rağmen, bulaşıcı hastalıklar dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaya devam etmektedir. Sülfonatlar, kolay hazırlanma süreci ve iyi reaksiyon hızları nedeniyle yaygın kullanılan gruplardır. İçeriğinde sülfat grubu olan moleküllerin hücre içi aktivasyonunun yüksek olduğu görülmektedir. Schiff bazlarının antifungal, antibakteriyel, antiparazit gibi etkili biyolojik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada; yeni sentezlenmiş ve moleküler yapısı FTIR ve NMR (^{1}H ve ^{13}C) spektroskopik metodları ile karakterize edilmiş Schiff bazı içeren sülfonat bileşiğinin (((1E,1'E)-(1,4-fenilenbis(azanililiden))bis(metaniliden))bis(4,1-fenilen)bis(4-bromobenzensülfonat)) (Bileşik I) moleküler modelleme çalışması Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (DFT) yöntemi ile yapılmış ve *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri Alamar mavisi ilaveli mikrodilüsyon broth tekniği ile test edilmiştir. DFT çalışması için Gaussisan 09 paket yazılımı kullanılmış ve hesaplamalar DFT/B3LYP/6-311G(d,p) düzeyde gerçekleştirilmiştir. Bileşik I'in yapısal parametreleri, bağ uzunlukları, bağ açıları, dihedral açıları belirlenmiş, teorik IR ve NMR spektrumları hesaplanmış ve spektral veriler elde edilmiştir. Yeni sentezlenmiş Schiff bazı içeren sülfonat bileşiğinin insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olan, seçilmiş yedi bakteri ve bir layşmanya izolatına karşı antimikrobiyal aktivitesi, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri kullanılarak belirlenmiştir. Bileşik I, çalışılan tüm bakteri türleri ve Leishmania infantum paraziti üzerinde farklı seviyelerde antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bileşiğin en etkili antibakteriyel aktiviteyi Shigella flexneri üzerinde gösterdiği, en az etkiyi ise Staphylococcus aureus ve Enterobacter cloacea bakterileri üzerinde gösterdiği belirlenmiştir. Sentezlenen bileşiğin ilaç adayı olarak dikkate alınabilmesi için, deneysel hayvan modelleri üzerinde *in vivo* kontrol çalışmaları yapılmalı ve insan hücreleri üzerinde toksik etkileri test edilmelidir. Bu çalışma, yeni ve alternatif kimyasalların tanınırlığı ve yapısal özelliklerinin ortaya konulması açısından önemlidir. *İn vitro* antimikrobiyal aktivite sonuçları ile bir arada değerlendirildiğinde; dirençli patojenlerin tedavisi için toksik etkisi düşük, yan etkileri oldukça az olan yeni ilaçların geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalara katkısı olacaktır.

Bilim Kodu	:	20203
Anahtar Kelimeler	:	Schiff bazı içeren sülfonat bileşiği, DFT, antimikrobiyal aktivite, antibakteriyel aktivite, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), alamar mavisi, L.infantum
Sayfa Adedi	:	58
Danışman	:	Prof. Dr. Nevin SÜLEYMANOĞLU

THEORETICAL STUDY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SULFONATE COMPOUND CONTAINING SCHIFF BASE

(M. Sc. Thesis)

Ceren AF

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2025

ABSTRACT

Despite advances in medical research and treatments, infectious diseases remain among the leading causes of death worldwide. Sulfonates are widely used groups due to their easy preparation process and good reaction speeds. Molecules containing a sulfate group have been shown to have high intracellular activation. Schiff bases are known to possess effective biological properties such as antifungal, antibacterial, and antiparasitic effects. Therefore, in this study, the molecular modeling study of the newly synthesized sulfonate compound containing Schiff base ((1E,1'E)-(1,4-phenylenebis (azanylylidene)) bis(methanylylidene)) bis(4,1-phenylene) bis(4-bromo benzene sulfonate) (Compound I), whose molecular structure was characterized by FTIR and NMR (^{1}H and ^{13}C) spectroscopic methods, was performed using the Density Functional Theory (DFT) method, and its *in vitro* antimicrobial activities were tested using the microdilution broth technique with the addition of Alamar blue. Therefore, in this study; The molecular modeling study of the newly synthesized sulfonate compound containing Schiff base, ((1E,1'E)-(1,4-phenylenebis (azanylylidene)) bis(methanylylidene)) bis(4,1-phenylene) bis(4-bromo benzene sulfonate) (Compound I), whose molecular structure was characterized by FTIR and NMR (^{1}H and ^{13}C) spectroscopic methods, was carried out by the Density Functional Theory (DFT) method, and its *in vitro* antimicrobial activities were tested by the microdilution broth method added Alamar blue. DFT study was carried out at DFT/B3LYP/6-311G(d,p) level using Gaussisan 09 package software. The structural parameters of compound I, bond lengths, bond angles, and dihedral angles, were determined, theoretical IR and NMR spectra were calculated, and spectral data were obtained. The antimicrobial activities of the newly synthesized sulfonate compound containing Schiff base against seven different selected bacteria and one parasitic *leishmania* isolate causing various infections in humans were determined using minimum inhibitory concentration (MIC) values. The compound I showed different levels of antibacterial activity. The compound was found to have antimicrobial properties on all bacterial species and *Leishmania infantum* parasite, albeit at different concentrations. It was determined that the compound I showed the most effective antibacterial activity on *Shigella flexneri* and the least effect on *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacea* bacteria. In order for the synthesized compound to be considered as a drug candidate, *in vivo* control studies should be conducted on experimental animal models and its toxic effects on human cells should be tested. This study is important in terms of identifying new and alternative chemicals and revealing their structural properties. When evaluated together with *in vitro* antimicrobial activity results, it will contribute to studies aimed at developing new drugs with low toxicity and minimal side effects for the treatment of resistant pathogens.

Science Code	:	20203
Key Words	:	Sulfonate compound containing schiff base, DFT, antimicrobial activity, antibacterial activity, minimum inhibitory concentration (MIC), alamar blue, L.infantum
Page Number	:	58
Supervisor	:	Prof. Dr. Nevin SÜLEYMANOĞLU

TEŞEKKÜR

Yaptığım bu çalışmada bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren kıymetli hocam Prof. Dr. Nevin SÜLEYMANOĞLU'na "Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler ABD" teşekkürlerimi sunarım. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları gerçekleştirilebilmem için laboratuar olanaklarını sağlayan ve tez çalışmam sürecinde verdikleri emeklerden dolayı Prof. Dr. Şahin DİREKEL'e "Malatya Turgut Özal Üniversitesi, Tıp Fakültesi" minnetlerimi sunarım. Tezimde kullandığım yeni Schiff bazı içeren sülfonat bileşiğini sentezleyen Prof. Dr. Yasemin ÜNVER'e "Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü" teşekkürlerimi sunarım. Malatya Turgut Özal Üniversitesi, Tıp Fakültesi'nde araştırma görevlisi olarak çalışan arkadaşım Hatice KÖSE'ye antimikrobiyal aktivite çalışması ve sonrasında yaptığı desteklerinden dolayı minnetlerimi sunarım. DFT hesaplamaları, TÜBİTAK Ulakbim Yüksek Başarımlı ve Grid hesaplama merkezinden destek alınarak ve Truba kaynakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasındaki katkıları için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Beni hayatta hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve her zaman güvenen canım annem Semra ÇARDAK ve canım babam Erhan ÇARDAK'a, beni her konuda destekleyen kardeşim Utku ÇARDAK'a, bu çalışma sürecimde fazlaca fedakârlıkta bulunarak her zaman desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Serhan AF'a ve biricik oğlum Eymen AF'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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. GENEL BİLGİLER 9

2.1. Schiff Bazları 9

2.1.1. Schiff bazlarının oluşum mekanizması 10

2.2. Sülfonatlar 11

2.3. Moleküler Modelleme 11

2.3.1. Hartree-Fock yöntemi 12

2.3.2. Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (DFT) 13

2.3.3. Becke, 3 parametreli, Lee-Yang-Parr (B3LYP) karma yoğunluk fonksiyoneli teorisi 13

2.3.4. Temel setler 14

2.4. Gaussian 09 ve Gauss View 5.0.8 Yazılımları 15

2.5. Antimikrobiyal Aktivite Belirleme Yöntemleri 15

2.5.1. Dilüsyon yöntemi 15

2.5.2. Difüzyon yöntemi 17

2.5.3. Besiyeri 19

2.5.4. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 20

Sayfa

3. MATERYAL VE METOD 21
3.1. Schiff Bazı İçeren Sülfonat Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu 21
3.2. Moleküler Modelleme 22
3.2.1. Geometri optimizasyonu 22
3.2.2. Spektral analiz 22
3.3. *İn Vitro* Antimikrobiyal Aktivite 23
3.3.1. Test edilen parazit ve bakteriler 23
3.3.2. Besiyerlerinin hazırlanması 24
3.3.3. Bileşik I için stok çözeltisinin hazırlanması 26
3.3.4. Alamar mavisinin hazırlanması 27
3.3.5. Antibakteriyel aktivite 27
3.3.6. *İn vitro* layşmanyasidal aktivite 28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 31
4.1. Teorik Hesaplamalar 31
4.1.1. Geometri optimizasyonu 31
4.1.2. IR ve NMR hesaplamaları 35
4.1.3. HOMO ve LUMO moleküler orbitalleri ve moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) hesaplamaları 37
4.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları 38
4.2.1. Antibakteriyel aktivite sonuçları 38
4.2.2. Antilayşmanyal aktivite sonuçları 39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 45
KAYNAKLAR 47
EKLER 55
ÖZGEÇMİŞ 58

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.1. Bileşik I için DFT/B3LYP//6-311G(d,p) metoduyla elde edilen bağ uzunlukları 32

Çizelge 4.2. Bileşik I için DFT/B3LYP//6-311G(d,p) metoduyla elde edilen bağ açıları 33

Çizelge 4.3. Bileşik I için DFT/B3LYP//6-311G(d,p) metoduyla elde edilen torsiyon açıları 34

Çizelge 4.4. Bileşik I için bazı deneysel ve DFT/B3LYP/6-311G(d,p) metodu kullanılarak elde edilen ölçeklendirilmiş titreşim frekansları 36

Çizelge 4.5. Bileşik I' in deneysel ve hesaplanan ^{1}H- and ^{13}C-NMR verileri (ppm) 36

Çizelge 4.6. Bileşik I'in bakterilere karşı elde edilen MİK değerleri 38

Çizelge 4.7. L. infantum promastigotlarına karşı bileşiklerin LK değerleri 40

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 1.1. a) Piridin b) quinazolinon c) benzimidazolün molekül yapıları 4

Şekil 2.1. Schiff bazları oluşum mekanizması 9

Şekil 2.2. Schiff bazları oluşum basamakları 10

Şekil 2.3. Sülfonat iyonu 11

Şekil 3.1. Schiff bazı içeren sülfonat bileşiğinin (Bileşik I) sentez tepkimesi 21

Şekil 4.1. Bileşik I için DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle optimize edilmiş moleküler yapı 32

Şekil 4.2. Bileşik I'in DFT/6-311G(d,p) yöntemiyle elde edilen HOMO ve LUMO moleküler orbitalleri 37

Şekil 4.3. Bileşik I'in DFT/6-311G(d,p) yöntemiyle elde edilen MEP haritası 38

Şekil E.1. Bileşik I'in FTIR spektrumu 56

Şekil E.2. Bileşik I'in ^{1}H-NMR spektrumu 56

Şekil E.3. Bileşik I'in ^{13}C-NMR spektrumu 57

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. Üretilen bakteri izolatları 23

Resim 3.2. Vorteksleme işlemi 26

Resim 3.3. Pipetasyon işlemi 28

Resim 4.1. Bileşik I'in antibakteriyel aktivite sonuçları. Dilüsyon konsantrasyonu; 10 000 µg/ml - 19 µg/ml. N.K.: Negatif Kontrol; P.K.: Pozitif Kontrol 39

Resim 4.2. Leishmania infantum'un mikroskop görüntüsü 40

Resim 4.3. Bileşik I'in layşmanyasidal aktivite sonuçları. Dilüsyon konsantrasyonu; 10 000 µg/ml - 19 µg/ml. N.K.: Negatif Kontrol; P.K.: Pozitif Kontrol 40

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklamalar**
P	Elektron olasılık yoğunluğu

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
DFT	Yoğunluk fonksiyoneli teorisi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
HF	Hartree-Fock
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyonu

1. GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıklarına bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi farklı mikroorganizmalar neden olmaktadır. Vücutta çeşitli mikroorganizmaların kolonize olması, bulaşıcı hastalıklara yol açmaktadır. Bazı bakterilerin yol açtığı bu enfeksiyonlar menenjit, zatürre, tüberküloz vb. gibi ciddi hastalıklara neden olabilir. Bakteriyel bir enfeksiyon bir dizi antibiyotikle tedavi edilebilir (Smruti Ranjan Singh, 2014). Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde uzun yıllardan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakterisidal veya bakteriyostatik etkili antibiyotiklerin bilinçsiz ve aşırı kullanımı direnç gelişimine ve dirençli patojenlerin yayılmasına neden olmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonlar yılda yaklaşık 20 milyon hastanın ölmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, dirençli patojenlerle mücadele için yeni ilaç geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bakterilere karşı etkili çeşitli yeni ajanlar sentezlenmiş ve farklı bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (Jiang Q ve diğerleri, 2019).

Vücudumuz bakterilerin üreyebilmesi için gereken sıcaklık, nem ve besinlere sahip bir ortamdır. Bakterilerin büyük bölümü direkt olarak dokulara zarar vererek hastalık yaparken, bazıları toksinleri aracılığıyla hastalık meydana getirirler (Özkuyumcu, 2010).

Gram pozitif bakteri olan stafilokoklar, hastane kökenli enfeksiyon etkenleri içinde başlarda yer almaktadır (Tekin ve diğerleri, 2016). Metisiline direnç gösteren *Staphylococcus aureus* (MRSA) bakterilerinde 1980'li yılların başından itibaren çoklu antibiyotik direnci oluşmuştur. Böylelikle MRSA neredeyse dünyanın tamamında başlıca hastane enfeksiyonu salgınlarına neden olan çok riskli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Stafilokok grubundaki bakteriler insanlar ve hayvanlarda farklı enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Stafilokokus aerus* (*S.aereus*) vücudumuzda çeşitli enfeksiyonlara (follikülit, fronkülit, ritter hastalığı, impetigo, tonsilit vb.) ayrıca operasyon sonrası yaranın enfekte olmasına neden olmaktadır (Yüksekdağ ve Baltacı, 2013).

Pseudomonas aureginosa bakterisinin farklı sistemler (sindirim, solunum, üriner) ile kemik ve eklem rahatsızlıklarında hastanede bulaşan enfeksiyonların %10'unda rolü olduğu görülmüştür. Bunun yanında ağır yanıklılar, kistik fibrozlular ayrıca kanserliler için yaşamı önemli derece tehlikeye sokan riskli durumlar meydana getirebilirler.

Acinetobacter baumannii solunum aletleri bağlantılı zatürre ve bakteriyeminin yer aldığı genel enfeksiyonlarda etiyolojik etkeni olup, salgınlar ortaya çıkarabilmektedir (Akyar, 2010).

Shigella genellikle gelişmekte olan ülkelerde sıklıkla görülen gastroenterit etkeni bakteriler arasında yer almaktadır. Şigelloza hastalığına neden olan türler ülkeden ülkeye değişiklik sergileyebilir. Türkiye'de en çok *Shigella sonnei*, ikinci sırada ise *Shigella flexneri* en sık saptanan türlerdir. Genetik yatkınlıklarından dolayı antibiyotiklere hızlı bir şekilde direnç geliştirebildikleri için Shigella türlerinin antibiyotiklere karşı dirençlilik durumu değişkenlik göstermektedir. *S. flexneri'*nin antibiyotik direncinin diğer türlerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Altuntaş, 2018).

Ayrıca, *Shigella* gelişmekte olan ülkeler arasında kanlı ishal ile hastaneye başvuran çocukların dışkısında en sık görülen patojenler arasındadır. Hastalık oluşabilmesi için az sayıda (10^1-10^2) mikroorganizmanın vücuda girmesi yeterli olmaktadır. Belirtileri 12 ile 48 saat içerisinde değişen inkübasyon evresinin ardından iştahsızlık, mide bulantısı, ateş yüksekliği, kusma, kramp şeklinde karın ağrısı ve ishal ortaya çıkmaktadır (Ashkenazi, 2004).

Salmonella typhi, sistemik bir enfeksiyon hastalığı olan tifoya neden olur ve sadece insanlarda görülen bir hastalıktır (Parry, 2002). Hastalık semptomları mental konfüzyon, dirençli ateş, baş ve karın ağrısı, splenomegali, relatif bradikardi, lökopeni, bakteriyemi ve rozeol olarak adlandırılan deri döküntüleridir. Sıklıkla gıda ve suyla bulaşan bazı ülkelerde endemik olarak ortaya çıkan, ayrıca tedavi edilmezse çeşitli komplikasyonlarla ölümle sonuçlanan bir hastalıktır (Willke, 2008).

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *Yersinia* cinsinin, insanlarda en sık hastalığa neden olan 3 patojen türü vardır: *Y. Pseudotuberculosis*, *Y. pestis* ve *Y. enterocolitica* (*YE*). *Y. pestis* veba hastalığına neden olurken *Y. pseudotuberculosis* genellikle gastroenterit ve mezenterik adenit etkeni olarak ortaya çıkar. *YE*, insanlarda hafif bir ishal, akut apandisit ya da crohn hastalığına benzer seviyede ağır seyredebilen enterokolite ve sepsise kadar giden farklı klinik tablolar oluşturabilmektedir. Veba gibi dünya genelinde epidemiler yapmadığı ve genellikle ölüme neden olmadığı için ilk zamanlar önemsenmemiş; fakat toplu yaşam alanlarında salgınlar yapması ve tüm dünyada oldukça farklı klinik tablolar oluşturması ile

önem kazanmıştır (Abdel-Haq, 2000).

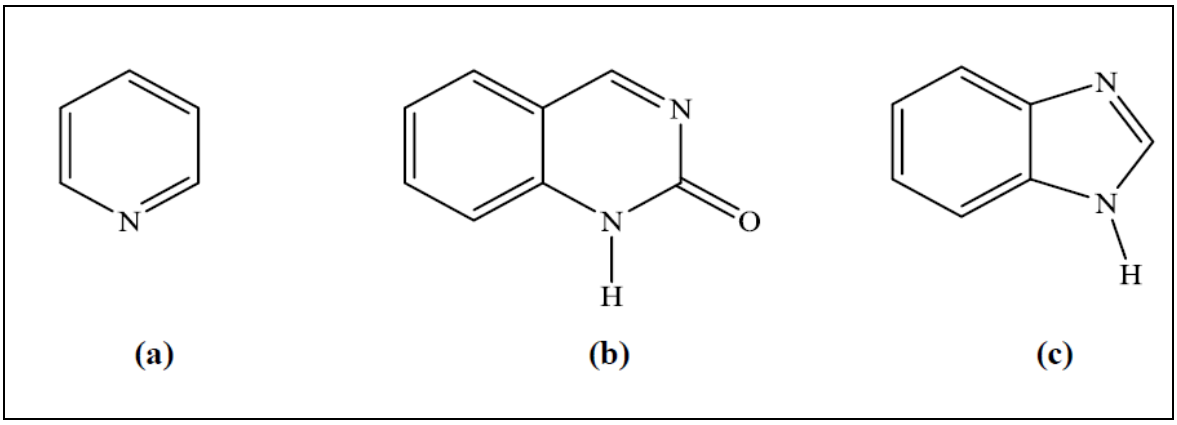
Enterobacter cloacae, *Enterobacteriaceae* familyasında bulunan Gram negatif bir basildir. Gastrointestinal sistemin normal flora üyeleri arasında yer alır ve doğada da yaygın olarak görülmektedir (Nyenje, 2013).

Enterobacter cloacae ayrıca yoğun bakım üniteleri gibi alanlarda bulunan önemli nozokomiyal (hastane enfeksiyonu) bir patojen bakteridir. Kateter kaynaklı üriner sistem enfeksiyonları ile alt solunum yolu enfeksiyonunu da içeren farklı enfeksiyonlara neden olur (Mokracka, 2011).

Schiff bazları; antidepresan, analjezik, antiparazit, antifungal, antikanser, antibakteriyel, antikonvülsan ve antienflamatuar gibi biyolojik özelliklere sahiptir (Unver ve Bektas, 2018). Antimikrobiyal aktivitelerinin yanısıra sinerjik etkiler ve bitki büyüme düzenleyici özellikleri olduğu da ortaya konulmuştur (Jiang ve diğerleri, 2003). Enzimlerin karbonil ve azot grubu içeren substratlar ile etkileşimini içeren farklı türlerde enzimatik etkileşimlerde de Schiff bazları önemli ara maddeler olarak görev almaktadırlar (Yazıcı ve Karabağ, 1998).

Biyolojik sistemler için çok önemli olan Schiff bazlarının kullanımı günden güne artmaktadır. Schiff bazı içeren aromatik aminler kemoterapide, oksijen taşıma işleminde kullanılmak üzere kimyasal tepkimelerin bazılarında, antistatik eleman olarak kullanılarak polimerlerin teknolojisi ve yapılarında bulunan bazı grupların içerdiği çeşitli özellikler nedeniyle boyarmadde sanayisinde de kullanım alanı bulduğu görülmektedir (Serin ve Gök, 1988).

Schiff bazları metal grubundan geçiş metalleriyle karmaşık yapılar meydana getirebilirler. Yeni oluşan bu metal karmaşık yapıların antikanser aktiviteleri yüksektir (Tabassum ve diğerleri, 2013). Doğal halde bulunan fenilpropandan üretilen, metokillenmiş sinnamaldehitlerden oluşan Schiff bazları ile kalay metal karmaşık yapıları antioksidan aktivite göstermektedirler. Bu özelliklere sahip Schiff bazları yapısal olarak benzimidazol, quinazolinon, piridin, furaldehit, benzilditiyo karbazit gibi heterosiklik yapıda halkaları içerirler (Kumar ve Ramesh, 2004).



Şekil 1.1. a) Piridin b) quinazolinon c) benzimidazolün moleküllerine ait yapılar

Schiff bazlarını içeren Glisin-Salisaldehit Ag(I) birleşik yapıları, cucumber mosaic virüsü üzerinde antiviral aktivite etkiye sahip olduğu görülmektedir (Kumar ve Ramesh, 2004).

Aminoasit grubundaki Schiff bazları, indol-3-karboksiliden-DL-valin, 3-karboksiliden-DL-alanin ve 3-karboksiliden-DL-glisinde antibakteriyel etkinlikleri test edilmiş olup genel olarak etkiledikleri ama 3-karboksiliden-DL-valin'in diğerlerine göre etki oranının fazlalığı görülmüştür. Bu sonuç, bileşiklerin içinde bulunan karboksil grubunun varlığı ile ilişkilendirilmiştir (Sharma ve Dubey, 2002).

Schiff bazlarının antibakteriyel ile antiviral aktivite çalışmalarını incelemek üzere yapılan bir çalışmada, bileşiklerin Herpes simplex virusünün (tip 2), Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin karşısında herhangi bir aktivite göstermedikleri buna karşın, insan hastalık etkeni olan poliovirüsün (tip 1) ve *Cryptococcus neoformans*'ın karşısında aktif etki gösterdiği ortaya çıkmıştır (Fioravanti ve diğerleri, 1996).

Sülfonat grupları, biyolojik ve endüstriyel etkinlikleri açısından oldukça dikkat çekmektedir. Sülfonat grubu içeren bileşiklerin antibakteriyal, antifungal, antioksidan ve antikanser gibi biyolojik etkileri test edilmiştir. Ayrıca, sülfonatlar elektro kaplama, kâğıt ve yangın söndürücü gibi endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır (Guo ve diğerleri, 2019; Tokalı ve diğerleri, 2021).

Guo ve çalışma arkadaşları (Guo ve diğerleri, 2019), tarımsal üretimde ciddi kayıplara yol açan bakteriyel ve viral patojenlere karşı yeni bileşikler geliştirmeyi amaçlamıştır. Bu kapsamda, Xanthomonas oryzae pv. oryzae (Xoo), Ralstonia solanacearum (Rs),

Xanthomonas axonopodis pv. citri (Xac) ve Tütün Mozaik Virüsü (TMV) gibi bitki hastalıklarına neden olan mikroorganizmalara karşı etkili olabilecek, tiyofen sülfonat birimi içeren kalkon türevleri tasarlanıp sentezlenmiştir. Yapılan biyolojik testler sonucunda, sentezlenen bazı bileşiklerin özellikle TMV ve Xac patojenlerine karşı belirgin antibakteriyel ve iyileştirici özellik gösterdiği ortaya konmuştur.

Hormonla ilişkili meme kanseri, prostat kanseri, endometriyal kanser ve endometriozis gibi hastalıkların tedavisinde, steroid sülfataz (STS) enziminin baskılanması önemli bir strateji olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla çok sayıda steroidal ve steroidal olmayan inhibitör geliştirilmiştir. Literatürde bilinen en etkili steroidal STS inhibitörlerinden biri Estron 3-O-sülfamat olmasına rağmen, östrojenik yan etkileri nedeniyle klinik kullanımı sınırlıdır. Bu sorunu aşmak için sülfonat fonksiyonel grubu içeren çeşitli arilamid türevleri sentezlenmiş ve değerlendirilmiştir. İncelenen bileşikler arasında bazı yapıların STS enzimi üzerinde diğerlerine kıyasla daha yüksek inhibisyon kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (El-Gamal ve diğerleri, 2016).

Şenkardeş ve arkadaşları, aril sülfonat içeren hidrazon türevlerinin antikanser potansiyelini araştırmak üzere MCF-7 (meme kanseri), PC-3 (androjen bağımsız prostat kanseri) ve A549 (küçük hücre dışı akciğer kanseri) hücreleri üzerinde çalışmalar yürütmüştür. Sentezlenen bileşiklerin bir kısmının, kanser hücrelerinde rol oynayan çeşitli enzimler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle MCF-7 için en yüksek etkinliği sergileyen bileşikler dikkat çekici bulunmuştur (Şenkardeş ve diğerleri, 2022).

Tokalı ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise sesamol ve türevlerinin biyolojik özellikleri ile sülfonat esterlerin farmakolojik etkileri bir araya getirilerek, sesamol bazlı sülfonat esterleri sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin karbonik anhidraz izoenzimleri (hCAI ve hCAII) üzerindeki inhibitör aktiviteleri incelenmiş ve bazı türevlerin her iki izoenzime karşı da anlamlı düzeyde inhibisyon gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bu yapıların farklı enzim sistemlerinde de potansiyel inhibitör olabileceği literatüre kazandırılmıştır (Tokalı ve diğerleri, 2021).

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* ve *Proteus mirabilis* bakterileri üstünde yapılan bir çalışmada ninhidrin ve glisin türevi Schiff bazı metal (Co(II),

Ni(II), Zn(II)) karmaşık yapılarının etkilerinin yüksek olduğu ortaya konulmuştur (Rao ve Reddy 1990).

Layşmanyaz; kum sineklerinin ısırığı ile bulaşan, layşmanya parazitlerinin neden olduğu bir hastalıktır. Oldukça ciddi sağlık problemleri ortaya çıkaran bu hastalık, klinik ve epidemiyolojik açıdan farlılık göstermektedir (Cattand ve diğerleri, 2006; Süleymanoğlu ve diğerleri, 2018). Layşmanyaz hastalığı klinik açıdan incelendiğinde üç farklı forma sahiptir: Bunlar Visseral Layşmanyaz (VL, Kala-Azar), Kutanöz Layşmanyaz (KL, Şark Çıbanı) ile Mukokutanöz Layşmanyaz'dır (MKL) (Herwaldt, 1999).

Akdeniz yöresinde, layşmanyanın üç türü bulunmaktadır. *Leishmania major* (*L.major*) ve *Leishmania tropica* (*L.tropica*) KL, *Leishmania infantum* (*L.infantum*) VL hastalığına neden olmaktadır. Bunun yanında nadiren olsa da *L.infantumun* da KL hastalığının ortaya çıkmasına neden olduğu belirlenmiştir (Belazzoug, 1992).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 6 önemli tropikal hastalıklardan biri olarak belirlediği layşmanyaz, dünya genelinde 98 ülkede endemik olarak tespit edilen bir hastalıktır. Bu tropikal hastalık nedeniyle dünyada 400 milyona yakın kişi risk altındadır. Tahminlere göre her sene VL için 500 bin, KL için ise 1,5 milyon yeni vaka ortaya çıkmaktadır (Erhan ve diğerleri, 2008).

Layşmanyaz geleneksel tedavi yöntemleri; antimon türevi olan Sodyum stibogluconate (Pentostam®) ve megluminantimoniattır (Glucantime®). Fakat araştırmacıların yaptığı çalışmalara göre layşmanya parazitlerinin mevcut ilaçlar için direnç geliştirdiği belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, Amfoterisin B'nin ve lipit formları ile enjeksiyon formları bulunan paromomisin ve ağızdan alınan miltefosine benzer geliştirilen tedaviler mevcuttur. Hastalığın önlenmesi için kullanabileceğimiz etkin bir aşı şimdiye kadar bulunamamıştır. Günümüzde kullanılan bu ilaçlar toksisite göstermesi ve parazitin bu preparatlara karşı artma eğiliminde olan direnç tablosu sebebiyle, daha yeni ilaçlara duyulan ihtiyaç gittikçe artmaktadır.

Layşmanyaların promastigot formlarının canlılığını ve üremesini tespit etmek amacıyla kullanılan yöntemlerden biri de kolorimetrik metodlardır. Alamar mavisinin kullanımının basit ve maliyetinin az olması bunun yanında çevre dostu ve kolay aktarılabilmesi gibi

birden fazla avantajının olması nedeniyle, *L.major* promastigot suşları üzerinde ilaç taramalarına yönelik araştırmalarda kullanılabilir olan kolorimetrik gösterge olarak yararlanılmaktadır (Süleymanoğlu ve diğerleri, 2017).

Alamar Mavisi Boyama Testi, metabolik aktivitenin saptanmasıyla çalışan bir florometrik/kolorimetrik üreme göstergesi olarak kullanılmaktadır (W. Seesom, 2013). Uzun bekleme sürelerinde bile hücrelere toksik etkisi olmayan Alamar Mavisi, üreme ortamının kimyasal indirgenmesine yanıt olarak bakteriyel canlılık varlığında renk değiştiren bir oksidasyon azaltma göstergesidir (Mikus J ve diğerleri 2000).

Bu çalışmada; FTIR ve NMR spektroskopik teknikleri ile moleküler yapısı ortaya konmuş yeni Schiff bazı içeren sülfonat bileşiğinin, ((1E,1'E)-(1,4-fenilenbis(azanililiden))bis(metaniliden))bis(4,1-fenilen)bis(4-bromobenzensülfonat) (Bileşik I), için moleküler modelleme ve antimikrobiyal aktivite çalışması yapılmıştır. Moleküler modelleme çalışması, Gaussian 09 (Frisch ve diğerleri, 2009) ve GaussView 5 (Dennington ve diğerleri, 2009) yazılım programları kullanılarak, DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bileşiğin *in vitro* antibakteriyel ve antiparaziter etkinlikleri Alamar mavisi ekli mikrodilüsyon sıvı besiyer tekniği (Microdilution broth assay) kullanılarak test edilmiştir. Standart yedi bakteri ve bir layşmanya promastigotu için, Schiff bazı içeren sülfonat bileşiğinin antimikrobiyal aktiviteleri minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ile belirlenmiştir. Yeni Schiff bazı içeren sülfonat bileşiğinin optimize moleküler yapısı, IR ve NMR spektrumları elde edilmiş ve bulunan değerler deneysel olanlarla karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada yeni sentezlenen bileşiğin antimikrobiyal aktiviteleri ilk kez ortaya konulmuştur.

Schiff bazı içeren sülfonat bileşiğinin, seçilmiş bakteriler ve layşmanya izolatlarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi; patojen mikroorganizmaların kullanılan antimikrobiyal ilaçlara direnç kazanması, aynı zamanda toksik ve yan etkilerinin oluşturduğu sağlık problemleri nedeniyle, yeni ilaçların oluşturulmasında kullanılabilecek maddelerin araştırılması ve geliştirilmesi açısından oldukça değerlidir.

2. GENEL BİLGİLER

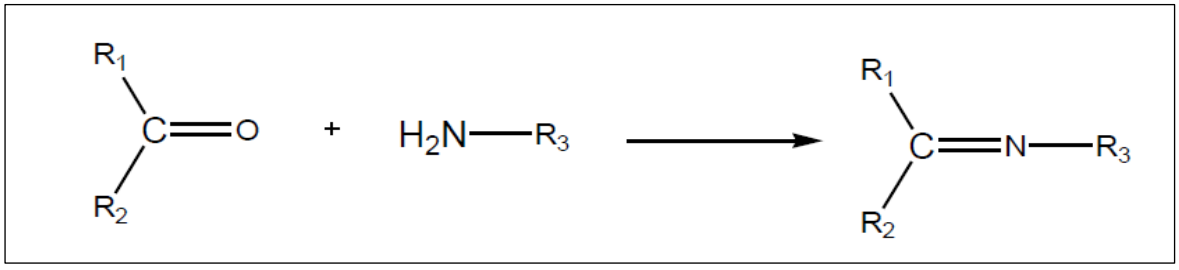
2.1. Schiff Bazları

Schiff bazlarını 1869 yılında Alman bilim insanı Hugo Schiff sentezlemiştir. Schiff bazları olarak adlandırılan yapı primer amin ve aktif karbonil grubunun kondenzasyonunda oluşan azometin grubu da içeren bileşiklerdir (Orgel, 1960; Schiff, 1864).

Genel ifadesi RCH=NR' şeklinde gösterilen yapı primer aminlerin aldehit ve ketonlarla oluşturduğu kondenzasyon ürünüdür (Ermiş ve diğerleri, 2005). Bu formülde ifade edilen R ve R' aril ve/veya alkil sübstitüentleri olarak gösterilir.

Schiff bazları, kimyanın birçok alanında, sıklıkla organik kimyada kullanılan bileşiklerdir. Bu nedenle, Schiff bazlarıyla ilgili çok fazla araştırma yapılmış olup ayrıca bazı biyolojik sistemler için de yararlanılmıştır (Chen ve Martel, 1987).

Schiff bazlarının başlangıçta kullanımı ligand olarak Pfeiffer aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Schiff bazları aynı zamanda azot donör ligandı için de kullanılmaktadır. Koordinasyon bileşiği oluşturulurken ligandlar arasında metal iyonuna tek ya da daha fazla elektron çifti vermektedir. Schiff bazlarının fazlaca kararlı 4 ya da 6 halkalı yapılar oluşması için iki durumun gerçekleşmesi gerekir. Bunlardan ilki yer değiştirebilen hidrojen atomunu içeren ikinci bir fonksiyonel yapının olması ve azometin grubuna olabilecek en yakın mesafede bulunması gerekir (Patai ve diğerleri, 1970).



Şekil 2.1. Schiff bazları oluşum mekanizması

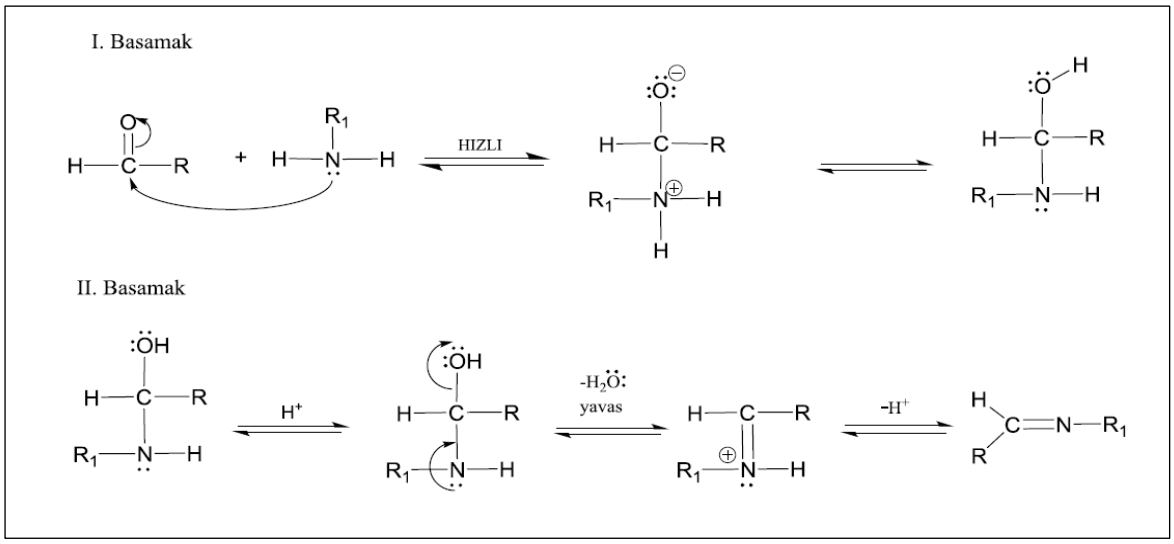
2.1.1. Schiff bazlarının oluşum mekanizması

Aldehitler ile ketonlar primer aminlerle (RNH2) kimyasal reaksiyona girdiklerinde Schiff bazları ya da iminler (RCH=NR ya da R2C=NR) şeklindeki azot-karbon çift bağına sahip bileşikleri meydana getirirler (Wade, 1999).

Schiff bazlarının oluşum mekanizması iki basamaklı bir işlemdir. Birinci basamak, nükleofilik aminin kısmi pozitif yükü taşıyan karbonil karbonuna katılmasıyla gerçekleşir. İkinci basamakta, azot bir proton kaybederken oksijene bir proton bağlanır ve ardından suyun uzaklaştırılmasıyla Schiff bazı sentezi gerçekleştirilir (Kirk ve Othmer, 1954; Karaer, 1997).

Uygun reaksiyon koşulları oluşturulduğunda, farklı çözücüler kullanılarak Schiff bazları elde edilmektedir. Çoğunlukla oda sıcaklığında ve geri soğutucuyla gerçekleştirilen Schiff bazı sentezlerinde, çözücü madde olarak etanolün seçilmesi yüksek verimli ürünler elde edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca reaksiyon gerçekleşirken $MgSO_4$ gibi su tutan maddelerin eklenmesi Schiff bazının oluşumunu kolaylaştırır (Cozzi, 2004).

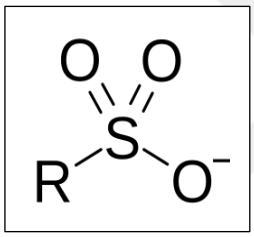
Amonyak aracılığıyla elde edilmiş olan Schiff bazlarının dayanıklılığı yoktur. Ayrıca bu Schiff bazları bekletildiğinde polimerleşebilir. Amonyakla oluşturmak yerine birincil aminler tercih edilerek oluşan bileşiklerin dayanıklılığı daha fazladır (Özbülbül, 2006).



Şekil 2.2. Schiff bazları oluşum basamakları

2.2. Sülfonatlar

Organosülfür bileşikleri içerisinde yer alan sülfonatlar, sülfonik asitlerden türeyen tuzlar, anyonlar ya da ester yapılar olarak tanımlanır. Bu bileşikler R–S(=O)$_2$–O yapısına sahiptir ve –S(=O)$_2$–O fonksiyonel grubunu içerirler. Burada R grubu genellikle bir organil ya da, bir amino grubu veya bir halojen atomu olabilir. Kimyasal açıdan sülfonatlar, sülfonik asitlerin deprotonlanmış yani eşlenik baz formlarıdır. Genel olarak sülfonatlar sulu ortamlarda kararlı, oksitleyici özelliği olmayan ve renksiz maddelerdir. Pek çok endüstriyel ve biyolojik açıdan önemli molekül bu fonksiyonel grubu barındırır. Özellikle temizlik ürünlerinde kullanılan deterjan ve yüzey aktif maddelerin büyük bir bölümü sülfonat temelli yapılardan oluşur; bunlara alkilbenzen sülfonatlar, alfa-olefin sülfonatlar ve parafin sülfonatlar örnek olarak verilebilir (Holmberg, 2019).



Şekil 2.3. Sülfonat iyonu

2.3. Moleküler Modelleme

Moleküler modelleme, farklı hesaplama teknikleri kullanılarak, dijital ortamda moleküler özelliklerin ve hareketlerin ortaya çıkarılmasıdır (Dirlik, 2013; Gözütok, 2009; Kaya, 2013). Bir molekülün yapısı ve kimyası laboratuvar ortamında çeşitli yöntemlerle belirlenebilir, fakat matematiksel olarak molekülü ortaya koyabilmek birçok açıdan oldukça faydalıdır ve molekülün geniş uygulama alanı bulması sağlanabililir. İlaç biliminde yeni maddelerin oluşturulmasında hesaplama metodunun kullanımı yaygındır. İlaçların sentezlenme işleminden daha önce gerçekleştirilen Molekül Modelleme uygulamalarıyla ilaçların yapılarıyla ilgili önbilgiye ulaşılabilir, ilaç için istenilen nitelikler belirlenirlebilir, maliyet ve süre kaybı engellenerek istenen niteliklere uygun özellikli sentezler oluşturulabilir. Bu yöntem kullanılarak; deneysel veri sonuçları, deneyden önce moleküllere ait model oluşturulabilir, deneysel hesaplamaların eksik olduğu ya da olmadığı zamanlarda molekül yapısının analizi yapılabilir, moleküllerin geometrisi, IR, UV ve NMR spektrumları, geçiş

halleri ve enerjileri, dipol momentleri, kimyasal reaktiviteleri, konformasyonları ve termodinamik özellikleri hesap edilebilir.

Bilgisayarlı matematiksel metodlarda, moleküllerin yapısını ve spektroskopik özelliklerini incelemek için, moleküler mekanik ve elektronik yapı teoremi olarak iki temel hesaplama yöntemi kullanılır (Kurt, 2003). Elektronik sistem metodları, kuantum mekaniksel kanunlara göre çalışır. Elektronik sistem yarı deneysel ve ab-initio metod olmak üzere iki başlık altında ele alınabilir. Ab-initio yönteminde çoğunlukla, Hartree-Fock AlanTeorisi (SCF) ve Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT) yaklaşımları kullanılmaktadır (Kubaşık, 2020).

Moleküler mekanik ve yarı ampirik metotlardan farklı olarak, ab initio kuantum mekaniksel tekniğinde, deneysel veriler ve ampirik parametreler kullanılmaz. Ab initio matematiksel işlemlerinde, kullanılan fonksiyonun veya denklemin çözümünde bazı yaklaşıklıklardan faydalanılır ayrıca yaklaşıklıkların türüne bağlı olarak ab initio tekniklerinin kendi içinde de çeşitleri vardır. En çok yararlanılan ab initio teknikleri Hartree-Fock Öz Uyumlu Alan Teorisi (HF-SCF) ile Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT) dir. Hartree-Fock (HF) yaklaşıklığında merkezi alan yaklaşımından dolayı, enerjinin gerçek değeri her zaman büyük veya büyük eşit bulunur. Yoğunluk fonksiyonel teorisinin HF teorisine göre en belirgin farkı, elektron yoğunluk bilgisini işlemlere katmasıdır (Kecel, 2009; Bıçak, 2014).

2.3.1. Hartree-Fock yöntemi

Hartree-Fock (HF) metodu, çoklu elektron içeren atomlar ile iyonlara ait özelliklerin büyük bir kısmını hassasiyetle açıklayabilir. 1928 yılında Hartree tarafından ortaya konulan bu yaklaşımdaki temel, zamandan bağımsız parçacık modeli olarak belirlenmiştir. Bu yöntemde, elektronların birbirini itmesi hesaplara dahil edilmez, elektronların her biri çekirdeğin çekici alanı ve geriye kalan elektronların itme etkileşmelerinin ortalaması olan aktif bir potansiyelde hareket eder. Dolayısıyla, birden fazla elektrondan oluşan sistem içindeki elektronlardan her biri, kendine ait dalga fonksiyonuyla temsil edilir. Hartree, bu yaklaşım ile bireysel elektron dalga fonksiyonlarına ait denklemleri oluşturmuş ve denklemlerin çözümü için özgün bir tekrarlama prosesi önermiştir.

HF tekniği atomsal dalga fonksiyonları ile enerjilerinin ortaya konulmasında öncü adım olarak değerlendirilebilir. HF tekniği, sadece atomlarla sınırlandırılmayıp bir molekül ya da

katıdaki elektronlara benzer değişik sistemler üzerine de uygulanabilmektedir (Leach, 2001).

2.3.2. Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (DFT)

Yoğunluk fonksiyonel metodu, Kohn ve Hohenberg tarafından oluşturulan iki ana matematiksel teoremden, ayrıca 1960'lı yıllarda Kohn ve Sham'ın öngördüğü eşitlikler kümesinden oluşmaktadır (Sholl ve Steckel, 2011).

DFT yöntemi, birden fazla cisimden oluşan sistemler için Schrödinger denkleminin yaklaşık bir çözümünü sunar. Walter Kohn, 1964 yılında P. Hohenberg ile yaptıkları bir projede, birden fazla cisimli dalga fonksiyonunun, varyasyonel bir yaklaşım içinde, ana değişken biçiminde kullanılmasının, problemi zorlaştırdığını belirterek, konum ve zamanın bir fonksiyonu olan elektron yoğunluğunu, ana değişken olarak belirlemiş ve 1998 yılı Nobel kimya ödülünü almıştır (Ertaş, 2006).

DFT, dalga fonksiyonu yerine ρ(x,y,z) biçiminde gösterilen elektron olasılık yoğunluğunu temel almaktadır (Lewars, 2003). DFT yönteminde yararlanılan fonksiyonel, Kohn-Sham denklemleri aracılığıyla elektronik enerjiyi aşağıdaki gibi tanımlamaktadır (Dorsett, 2000).

$$E = E_T + E_V + E_J + E_{XC} \tag{2.1}$$

Burada; E_T, elektron hareketinden ortaya çıkan kinetik enerjiyi, E_V, çekirdek-elektron ve çekirdek-çekirdek etkileşmelerini içeren potansiyel enerjiyi, E_J, elektron-elektron itme ve E_{XC} elektron korelasyon enerjisini temsil etmektedir. Elektron yoğunluğu fonksiyonunda; çekirdek-çekirdek itmesi dışında geriye kalan bütün terimler alınır. Eşitlikteki ilk üç ifadenin toplam değeri elektron dağılımının klasik enerjisi olarak tanımlanır.

2.3.3. Becke, 3 parametreli, Lee-Yang-Parr (B3LYP) karma yoğunluk fonksiyoneli teorisi

Dalga mekaniğini esas kabul eden HF tekniği kinetik enerjinin hesaplanması için uygundur, ancak korelasyon enerjilerinin hesaplanamaması nedeniyle değiş tokuş enerjilerinin hesap edilmesinde pratik değildir. DFT modeli ile kinetik enerjiye yönelik veriler elde

edilememekte, fakat, korelasyon enerji terimlerine uyumlu olarak hesap edilebilmekte, değiş tokuş ve korelasyon enerjilerinin hesaplanmasıyla nispeten yararlı sonuçlara ulaşılmaktadır. Enerji ifadesinin tamamının oluşturulması için katkısız HF ya da DFT modellerinden farklı olarak, iki modelin herbirinin enerji terimlerinin, toplam enerji ifadesinin içinde gösterilmesiyle karma modeller oluşturulmuştur. Geliştirilen bu karma modellerle enerjinin toplamı, bağ uzunluğu, iyonizasyon enerjsi gibi birden fazla büyüklüğün katkısız modellere nazaran doğruluk oranı yüksek olarak hesaplanabilmektedir.

Literatürde; H28, TF27 (kinetik enerji fonsiyoneli); F30, D30 (değiş tokuş enerji fonksiyoneli), LYP, VWN (korelasyon enerji fonksiyonelleri) gibi fonksiyoneller sıklıkla görülmektedir (Kurt, 2003).

Bir karma modelde bütün enerji ifadeleri birleştirilerek yeni bir enerji ifadesine ulaşılır. BLYP ve B3LYP Becke tarafından önerilen karma modellerdir. YP, Yang ve Parr' ın gradyent kısaltılmış korelasyon fonksiyonu, BLYP metodu ise Becke'nin gradyent kısaltılmış değiş-tokuş fonksiyonu ve Lee'nin birleşmesi sonucu oluşur. Bu modeller arasında en iyi sonucu veren, Becke karma tekniği ve LYP korelasyon enerjisini içeren, üç parametreli B3LYP'dir (Becke, 1993; Yılmaz, 2011).

2.3.4. Temel setler

Elektronik yapıların hesaplanması için kullanılan tekniklerinin çoğunda, bir baz seti, modelin moleküler orbitallerini (MO) tanımlamak için kullanılmaktadır. Orbitallerin matematiksel gösterimi, temel set biçiminde adlandırılmaktadır. Moleküler orbitallerden her biri, temel baz olarak adlandırılan atomik orbital ifadelerinin doğrusal toplamı şeklinde (LCAO: Atomik Orbitallerin Lineer Kombinasyonu) gösterilir. Bu setler orbitallerin hangi şekilde olduğuyla ilişkili olarak Gaussian-tip fonksiyonların lineer kombinasyonları değiştirilerek kullanılmaktadır. Baz setleri, orbitallerin en temel durumlarını gösteren küçük ölçekli baz setleri ve orbitalleri ayrıntılı olarak açıklayan genişletilmiş baz setleri olarak iki temel başlıkta incelenmektedir. Genişletilmiş baz setleri; polarizasyon fonksiyonunu (Polarised Basis Sets) dahil eden 6-31G(d) ve 6-31G(d,p) gibi baz setlerini ve difüzyon fonksiyonunu dahil eden baz setleri (Diffuse Basis Sets) 6-31+G ve 6-31++G gibi farklı baz setlerini kapsamaktadır (Başköse, 2011).

2.4. Gaussian 09 ve Gauss View 5.0.8 Yazılımları

Bu çalışmada, molekül modelleme hesaplamaları Gaussian 09 paket yazılım programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gaussian 09 paket programı moleküler mekanik, yarı-deneysel ve ab initio tekniklerini içeren çok yönlü bir yazılımdır. Gaussian 09 paket yazılımı kullanılarak, molekül ve atomların geometrik optimizasyonları, dipol momentleri, titreşim frekansları ve kuvvet sabitleri hesaplanabilir. Ayrıca, Raman, IR ve NMR spektrumları, maddenin termokimyasal nitelikleri, moleküler orbitalleri, atom yükleri, çok kutuplu momentleri, elektron ilgisi ve iyonlaşma enerjileri, elektrostatik potansiyeli ile elektron konsantrasyonu vb. çok çeşitli özellikleri atom ve molekül özellikleri hesaplanabilmektedir. Yapılan hesaplamalar gaz durumunda, çözelti içinde ya da maddenin kristal yapısı dikkate alınarak gerçekleştirilebilmektedir (Frish ve diğerleri, 2009).

Gauss View yazılımı, Gaussian paket programlarında kullanabilecek giriş dosyalarının hazırlık işlemi ve Gaussian çıktılarının görsel hale getirilmesi için tasarlanmış bir grafik ara yüzüdür. Gauss view yazılımı moleküllerin görselleştirilmesini ve daha karışık olan hesaplamalarda da giriş dosyalarının kolayca hazırlanmasını sağlamaktadır. Gaussian paket programıyla gerçekleştirilen hesaplamaların sonuçları grafik şeklinde görülebilir, optimize edilmiş moleküllerin yapılarını, moleküler orbitalleri, elektrostatik potansiyel yüzeyleri, atomik yükleri, IR, Raman, NMR, VCD spektrumlarını, titreşim frekanslarını kullanarak standart moddaki animasyonlar oluşturulabilir (Foresman ve Frisch, 1996).

2.5. Antimikrobiyal Aktivite Belirleme Yöntemleri

Hastalıkların nedeni olarak gösterilen mikroorganizmaların antibiyotiklerin karşısında duyarlılıkları baz alınarak infeksiyon etken maddesinin hassas olduğu en efektif antimikrobiyal ajan seçilerek tedavi gerçekleşmektedir. Mikroorganizmaların antimikrobiyal duyarlılığını belirlemek için dilüsyon ve difüzyon olarak iki farklı teknik kullanılmaktadır (Murray ve diğerleri, 2009).

2.5.1. Dilüsyon yöntemi

Antimikrobiyal maddenin bir mikroorganizmanın üremesini azaltması ya da tamamen etkisiz hale getirmesi için olması gereken minimum konsantrasyonu bulmak amacıyla

uygulanan ve kantitatif veriler elde edilen bir yöntemdir. Bu veriler için; inokulumun yoğunluğu, inkübasyonun süresi ve sıcaklığı, besiyerin ve antimikrobiyal maddenin stabilite durumları sonucu etkileyen faktörler arasındadır (Rios ve diğerleri, 1988).

Sıvı besiyer içinde antimikrobiyal etkinliği test edilecek maddenin hızlıca sulandırılması gerçekleştirilir ve duyarlılığı tespit edilecek mikroorganizmanın sabit sayıda mikroorganizmaya sahip süspansiyonundan eşit miktarda eklenmesiyle devam ettirilir. Sulandırma işlemi 35-37 ºC'de yapılır ve maddenin üremesi için 16-20 saat bekletilir (Murray ve diğerleri, 2009).

Üreme olayının gerçekleşip gerçekleşmediği bulanıklık analiziyle tespit edilmektedir. Üreme etkinliğinin gerçekleşmediği belirlenen en düşük konsantrasyon, minimum inhibisyon konsantrasyonu yani MİK kısaltmasıyla ifade edilmektedir (Burt, 2004).

Tüp dilüsyon yöntemi

Tüp dilüsyon tekniğinin birbirlerine yakın prensipleri içeren makrodilüsyon ve mikrodilüsyon olarak tanımlanan iki çeşidi vardır. Makrodilüsyon tekniği ile kıyaslandığında, mikrodilüsyon yönteminde daha düşük hacimlerde sıvı ortamlarında çalışıldığı için daha ekonomik olduğu söylenebilir. Makrodilüsyon yönteminde steril tüpler kullanılırken, mikrodilüsyon yönteminde 96 kuyucuklu steril mikroplaklar kullanılmaktadır (Mann ve Markham, 1998).

Test edilecek maddeler ve antibiyotikler öncelikle özel çözücüler içerisinde hazırlanıp daha sonra kullanımı gerçekleşecek sıvı besiyerlerinde yarı yarıya azalacak şekilde sulandırımları gerçekleştirilir. Mikroorganizmaların standart inokülumu ($1x10^8$ CFU/ml) hazırlanıp, antimikrobiyal maddenin çeşitli varyasyonlarında sulandırımlarını içeren her bir tüpün içine eşit miktarda eklenir.

Ayrıca antimikrobiyalin kontrol için mikroorganizma eklenmeyen sadece madde bulunan negatif kontrol tüpü eklenir. Bakteri ya da parazit üremesinin kontrolü için antimikrobiyal madde içermeyen, besiyeri ve mikroorganizma içeren Pozitif kontrol tüpü eklenir. Besiyerlerin 35-37 ºC'de bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra bakterinin üremesini gösteren bulanıklığı incelenir. Bakterinin üremesini önleyen gözle görülebilir bir bulanıklığı

olmayan en düşük madde konsantrasyonu (MİK) değeri olarak belirlenir (Demirpek ve Dizer, 2010). Üreme aktifliğinin ölçülmesinde, en fazla optik konsantrasyon değeri (OD) ve canlı mikroorganizmanın sayılması yöntemi kullanılır (Mann ve Markham, 1988).

Agar dilüsyon

Agar dilüsyon metodu tüp dilüsyon yöntemiyle uyumludur. Tüp dilüsyon tekniğinden farkı, agar dilüsyon tekniğinde sulandırılmış antibiyotiklerin besiyerinin içerisine eklenmesidir. Bu şekilde, her bir plağa ilave edilen antibiyotiğin çeşitli konsantrasyonlarının etkisi belirlenmiş olur. Bu yöntem için besiyer olarak Mueller-Hinton agar besiyeri tavsiye edilmektedir.

Bakterinin yoğunluğu McFarland 0,5 bulanıklığı olacak şekilde ayarlanır ($1x10^8$ CFU/ml). Hazırlanan bakteri süspansiyonundan elle veya özellikli inokülatörler vasıtasıyla 1-2 ml inkülasyon işlemi yapılır. Bu işlemde agarın yüzeyindeki bakterinin ortalama sayısal değeri 10^4 CFU/ml olarak ortaya çıkar. İnokulasyon işlemi yapılan bu plakların 35 ^oC'de 16-20 saat bekletilmesi gerekir. İnkübasyondan sonra bulunan MİK seviyesi üremenin durduğu en az antibiyotik konsantrasyon değeri olarak belirlenir (Demirpek ve Dizer, 2010).

2.5.2. Difüzyon yöntemi

Basit bir yöntem olan difüzyon yönteminde, test sonuçlarını etkileyebilecek faktörleri en aza indirebilmek için; Besiyerler katkısız biçimde hazır hale getirilmeli, çalışmada kullanılacak agarın tipi, yoğunluğu ile petri kabındaki kalınlık seviyesi aynı olacak şekilde ayarlanmalı, standart olarak hazırlanan izolatlar ile diğer izolatların sıvı besiyerdeki süspansiyonunun yoğunluğu standart hale gelmeli, diskler mikroorganizmanın yayılmasından sonra 15 dakika içinde yerleştirilmeli ve besiyeri beklemeden inkübe edilmelidir (Ötük, 1992).

Disk difüzyon yöntemi

Disk difüzyon yönteminin çalışma prensibi, belli konsantrasyonlara sahip antibiyotik emdirilmiş disklerin katı halde bulunan besiyeri yüzeyine konulduktan sonra antibiyotiğin yayılması, difüze olması olayıdır (Parekh ve Chanda, 2007).

Laboratuvarlarda, genellikle antibiyotik duyarlılığını saptamak için sıklıkla kullanılan, ucuz ve uygulaması basit olan disk difüzyon yöntemi Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, kâğıt disklere emdirilen antibiyotiğin duyarlılığı ölçülmeye çalışılan mikroorganizmanın inoküle edildiği besiyere yayılmasını temel alır. Böylelikle belli oranda antibiyotik emdirilen kâğıt diskler, çalışılan mikroorganizmanın yoğun olarak ekili bulunduğu katı besiyere yerleştirilir. Disklerdeki antibiyotik süre geçtikçe agar yüzeyine yayılırken aynı zamanda inokulasyon olan mikroorganizmanın da üremesi başlar. İnkübasyon işleminden belli bir zaman geçtikten sonra antibiyotiğin inhibitör konsantrasyonlarının oluştuğu disklerin çevresinde üreme görülmemektedir. Testi yapılan mikroorganizma kullandığımız antibiyotiğe ne kadar fazla duyarlıysa, diskin etrafında meydana gelen inhibisyon bölgesi o kadar büyük olacaktır. Oluşan inhibisyon zonunun çapı mm olarak ölçülüp, standart zon değerleriyle kıyaslanarak değerlendirme işlemi yapılır.

Böylelikle testi yapılan mikroorganizmanın kullandığımız antibiyotik ajanına karşı duyarlılığı belirlenmiş olur.

Bu teknikle incelenecek mikroorganizma tryticase soy buyyonda yaklaşık 2 saat kadar 37°C de bekletilir. Bakterinin üremesiyle birlikte McFarland 0,5 ($1x10^8$ CFU/ml)'e olacak şekilde ayarlama yapılır böylelikle standart bir yoğunluk oluşmuş olur. Oluşturulan bakteri süspansiyonundan steril bir eküvyona emdirilen bakterinin Mueller/Hinton agar besiyerinin yüzey kısmına değdirilerek yayılması sağlanır. Daha sonra çeşitli antibiyotikler emdirilmiş diskler steril pens aracılığıyla besiyerin yüzeyine yerleştirilip hafifçe bastırılır. Yöntem esnasında, inhibisyon zonları arasındaki çakışmayı önlemek için disklerin her birinin arasında en az 22 mm ve petrinin kenar kısmından ise 14 mm uzaklık olacak şekilde ayarlanmalıdır. Bu işlemlerin ardından besiyerler 18-24 saat sürede 35-37 °C de inkübe edilir ve böylelikle oluşmuş olan inhibisyon bölgeleri cetvel yardımıyla belirlenerek kayıt altına alınır (Demirpek ve Dizer, 2010).

E-test yöntemi

Bugünün şartlarında, agar bazlı besiyerilerinde difüzyon tekniğiyle MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerinin elde edilmesine olanak sağlayan çeşitli teknikler de vardır. Epsilon test (E-test) tekniği bu testlerden birisidir. MİK mikroorganizmanın üremesini önleyen minimum ilaç konsantrasyonu şeklinde adlandırılır.

E-test tekniği uygulanırken test edilecek olan bakteri 0,5 McFarland yoğunluğuna ayarlanarak Mueller-Hinton agarın yüzey kısmına seçilmiş yüksek antibiyotik konsantrasyonlarından düşük konsantrasyonlara doğru azalan oranlarda E-test şeritlerine konulmaktadır. Bu plaklar 18-24 saat kadar 35-37 °C de inkübasyon işlemine sokularak MİK değeri tespit edilir. Test sonunda ulaşılan MİK verisi, şeridin etrafında meydana gelen elips biçimindeki inhibisyonun şeridin üzerindeki ölçekle kesiştiği noktanın okunmasıyla tespit edilir (Demirpek ve Dizer, 2010).

2.5.3. Besiyeri

Genel olarak mikroorganizmaların üreyebilmesi için gerekli uygun şartları içeren ortama besiyeri denilmektedir. Besiyerinin içinde, mikroorganizmanın üremesini sağlayacak organik ve inorganik maddeler, su ve gelişme faktörleri bulunmaktadır. Mikroorganizmaların gelişimleri birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle laboratuvarda üretilebilmeleri için değişik miktarlarda, değişik maddelerle çeşitli ortamların hazırlanması gerekir. Kullanım amacı ve kullanım yeri dikkate alındığında besiyerleri katı ya da sıvı olarak hazırlanabilir. Genellikle, içerisinde agar bulunan besiyerleri katı haldeyken, sıvı şekilde agar bulunmayan besiyerilerine ise buyyon ya da broth denilmektedir (Özçelik ve diğerleri, 2011).

Kanlı agar besiyeri, mikroorganizmaların birçoğunun üremesi ve hemoliz tepkimelerinin saptanması için kullanılan agarlı bir besiyeridir. Besiyerinin içinde bulunan besinin içerik yönünden zengin olması çok fazla türde mikroorganizmanın üremesine olanak sağlamaktadır. Besiyerin pH değerinin 7,4 olması ise bakteri hemolizinin anlaşılır olmasını sağlar. Hemoliz tepkimesi için en uygun kanlardan biri taze defibrine edilmiş koyun kanıdır (Halkman ve Sağdaş, 2005).

Eosin Methylene Blue (EMB) Agar besiyeri, *in vitro* standart şartlar altında mikrobiyolojik testlerde Enterobacteriaceae familyasının hastalık yapan türleri ile koliform bakterilerin üretilmesinde kullanılan temel katı bir besiyeridir. EMB agar besiyeri laktoz ve sakkaroz yapıdaki karbonhidratların pozitif olmadığı Salmonella ve Shigella'nın ayırt edilmesinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Aynı zamanda *E.coli*'nin belirlenmesinde ve bununla birlikte koliform grubu bakterilerin de sayılarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bir gün (24 saatlik) 35-37 °C deki inkübasyon işleminden sonra bakteri türlerine göre amber,

yeşilimsi metalik röfle, mor, pembe, menekşe renklerinde koloniler oluşabilir (Halkman ve Sağdaş, 2005).

Mueller Hinton Broth sıvı besiyeri ise bakterilerin antibiyotik ve sulfonamitlere karşı duyarlılıklarının *in vitro* olarak belirlenmesi ve MİK değerinin elde edilmesi için kullanılmaktadır (Halkman ve Sağdaş, 2005).

Alamar mavisi olarak bilinen rezasurin maddesi bakteri üremesinin olduğu durumlarda kimyasal redüksiyona bağlı olarak sıvı besiyerin rengi koyu maviden röfleli pembeye doğru dönüştüren oksüdoredüksiyon indikatörüdür (Seesom ve diğerleri, 2013).

2.5.4. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)

Antimikrobiyal aktivite testlerinde, mikrobiyal gelişmenin tamamını bitiren veya mikrobiyal gelişmeyi önleyen en düşük konsantrasyona MİK değeri denilmektedir. Antimikrobiyal yapıda olan bileşiğin seyreltilip sıvı ya da katı besiyerine belirli oranlarda ilave edilmesiyle oluşan besi ortamları kullanılarak MİK değeri belirlenmektedir. Antimikrobiyal özelliklere sahip bir maddede bulunacak olan MİK değeri; inkübe edilme sıcaklığına, inokulum miktarına, mikroorganizmanın analiz şartlarına göre değişmektedir (Courvalin ve diğerleri, 2010).

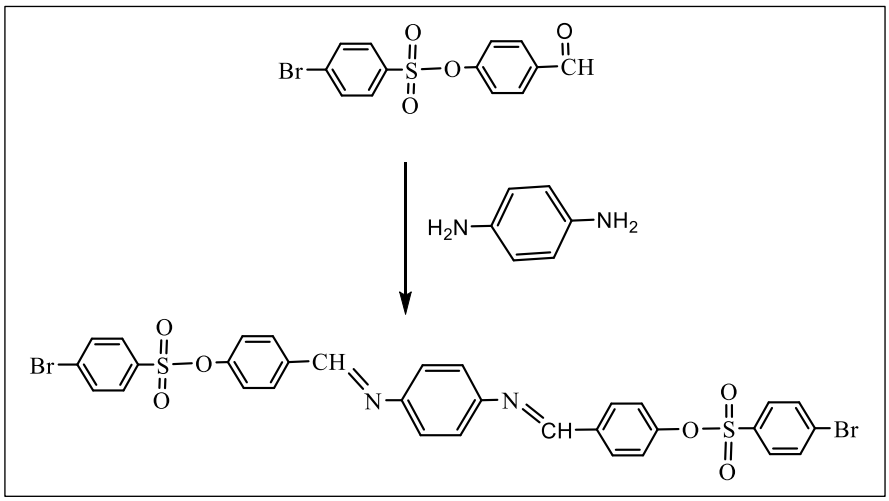
3. MATERYAL VE METOD

3.1. Schiff Bazı İçeren Sülfonat Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Çalışmada, yeni sentezlenmiş Schiff bazı içeren sülfonat bileşiği, (((1E,1'E)-(1,4-fenilenbis(azanililiden))bis(metaniliden))bis(4,1-fenilen)bis(4-bromobenzensülfonat)) (Bileşik I) için DFT ve ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bileşik I için sentez tepkimesi Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Sentezlenen bileşiğin FTIR spektrumu, Perkin Elmer FT-IR 1600 FT-IR (4000-400 cm^{-1}) spektrofotometre cihazında, ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR spektrumları Bruker marka 400 MHz'lik NMR cihazında DMSO-d_6 çözücüsünde kaydedilmiştir. Sentez ve yapı aydınlatılmasında kullanılan çözücü ve kimyasal maddeler Fluka, Merck ve Aldrich firmalarından sağlanmış, çözücülerin tümü uygun saflaştırma ve kurutma işlemlerinden geçirilmiştir.

((1E,1'E)-(1,4-fenilenbis(azanililiden))bis(metaniliden))bis(4,1-fenilen)bis(4 bromobenzensülfonat) sentezi:

4-formilfenil 4-bromobenzensülfonat ve benzen-1,4-diamin, 160-170 ^{o}C'deki balona yerleştirilmiş ve yağ banyosunda karıştırılarak 2 saat ısıtılmıştır. Reaksiyonun optimum koşulları TLC ile belirlenmiştir. Reaksiyon kapatılmış ve balonun içeriği soğutulmuştur. Katı madde DMSO-sudan (1:3) saflaştırılmıştır.



Şekil 3.1. Schiff bazı içeren sülfonat bileşiği (Bileşik I) için sentez tepkimesi

3.2. Moleküler Modelleme

Bileşik I'in moleküler modelleme çalışması, Gaussian 09 yazılım programı kullanılarak; Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (DFT), (DFT/B3LYP) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalarda, bileşiğin yapısal parametreleri ve IR, NMR spektral verileri elde edilmiştir. Grafik ara yüzeyleri GaussView 5 yazılımı ile oluşturulmuştur.

3.2.1. Geometri optimizasyonu

Bileşik I'in moleküler yapısı 6-311G(d,p) temel seti kullanılarak DFT/B3LYP metodu ile (Peng ve diğerleri, 1996; Stephens ve diğerleri, 1994) optimize edilmiş; bağ uzunlukları, bağ açıları ve dihedral açıları bulunmuştur.

3.2.2. Spektral analiz

Bileşik I'in IR hesaplamaları gaz fazında gerçekleştirilmiştir. DFT/B3LYP/6-311G(d,p) metoduyla hesaplanan anharmonik IR titreşim frekans değerleri, 6-311G(d,p) temel seti için, 0,9679 katsayısı ile çarpılarak ölçeklendirilmiştir (Süleymanoğlu ve diğerleri, 2017).

^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR kimyasal kayma hesaplamalarında, öncelikle bileşik I, DMSO çözücü içinde B3LYP/6-311G(d,p) seviyede optimize edilmiş ve elde edilen optimize yapı kullanılarak GIAO (Gauge-independent atomic orbital) standart yaklaşımı için,^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR kimyasal kayma değerleri hesaplanmıştır (Ditchfield, 1972; Wolinski ve diğerleri,1990). GIAO/B3LYP/6-311G(d,p) düzeyde hesaplanan ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR kimyasal kayma değerleri, TMS ölçeğinde ve 6-311G(d,p) baz seti için sırasıyla, 31.8821 ve 182.4656 ppm değerlerinden çıkarılarak ölçeklendirilmiştir (Süleymanoğlu ve diğerleri, 2019).

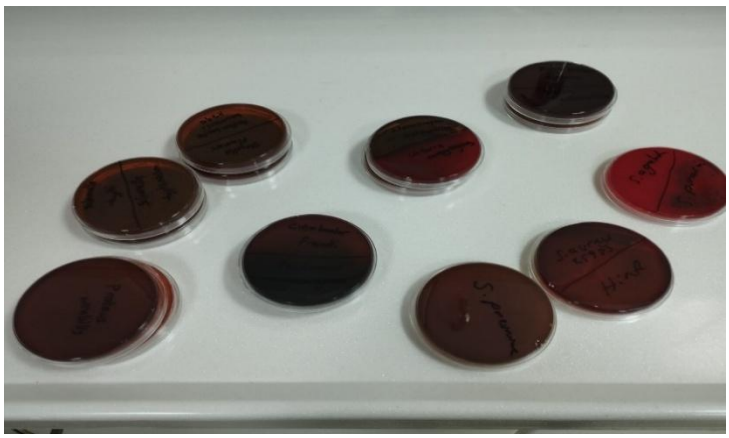
3.3. *İn Vitro* Antimikrobiyal Aktivite

3.3.1. Test edilen parazit ve bakteriler

Sentezlenen bileşik, seçilen yedi farklı standart bakteri izolatına karşı *in vitro* olarak test edilmiş; Gram pozitif bir, Gram negatif dört ve nonfermenter Gram negatif iki bakteri izolatı için çalışma gerçekleştirilmiştir.

Standart bakteri izolatlarının hazırlanması

Bileşiğin antibakteriyel aktivitesi i*n vitro* olarak seçilen yedi farklı standart bakteri izolatına karşı test edilmiştir. Çalışmada, Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRAS) ATCC 43300, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 ve *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 standart izolatları kullanılmıştır. Standart bakteri izolatları Amerikan Tip Kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. Derin dondurucuda -80 °C'de saklanan standart bakteri izolatları Kanlı Agar besiyeri (Merck) ve Eosin Metilen Mavisi (EMB, Merck) Agar besiyerine pasajlanarak canlandırılmış ve üreyen bakterilerin kontaminasyon açısından saflık kontrolleri yapılmıştır. Üreyen kolonilerden, bakteriler için 2 ml Mueller-Hinton Broth (MHB, Merck) besiyeri içeren steril tüplere alınmış ve 37 °C'deki inkübatörde bir gece bekletilerek inkübe edilmiştir. Standart bakteri izolatlarının süspansiyonlarının hazırlanmasında MHB'de McFarland 0,5 standartları ($1,5x10^8$ cfu/mL) kullanılmıştır.



Resim 3.1. Üretilen bakteri izolatları

Layşmanya promastigotlarının hazırlanması

Çalışmada aksenik standart *Leishmania infantum* izolatları kullanılmıştır. Parazitin üretilmesi için kullanılan suşlar, 50 ml'lik falkon tüplerin içerisinde %10 Fetal Bovin Serum, %1 Penisilin, Streptomisin (100 000 birim penisilin ve 10 mg streptomisin) ile fluconazole (2 mg/ml) maddeleri ilave edilmiş RPMI-1640 besiyeri içinde 27 °C'de inkübasyon gerçekleşmiştir. Sistemik olarak ekim işlemi sağlanarak kültürün devamlılığı gerçekleştirilmiştir.

Besiyerine ekim işlemi gerçekleştikten hemen hemen 72 saat sonra gözlenmiş ve oluşan promastigotlar, çoğaldıkları besiyerin içinden 20 ml alınmış ve steril falkon tüplere aktarılmıştır, ardından 10 dakika 1000 g'de santrifüj edilmiştir. Sonrasında tüplerdeki süpernatantın atılmasıyla çökeltideki promastigotların üstüne 10 ml steril Phosphate-buffered saline (PBS) eklenerek homojen bir yapı oluşması için düşük hızda vortekslenmiştir. Hazırlanmış olan çözelti 10 dakika 1000 g'de tekrar santrifüjlenmiştir. Süpernatant yine çıkarılarak işlem üç kere tekrarlanmış ve promastigotların yıkanması sağlanmıştır. Layşmanya promastigotlarının hemositometre (thoma lamı) aracılığıyla sayımı yapılmıştır. En son konsantrasyonu $1x10^6$ hücre/ml olacak biçimde RPMI-1640 besiyeri kullanılarak ayarlanmıştır.

3.3.2. Besiyerlerinin hazırlanması

Kanlı agar besiyeri hazırlanması

Üretici firma önerilerine göre dehidre toz besiyeri 37 g/L konsantrasyonda gerçekleşecek biçimde hassas terazi ile tartılmış, distile su ilave edilerek 1 L'ye tamamlanarak çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121 ºC'de 15 dakika durdurularak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri otoklavın içinden çıkartıp 45-50 ºC'ye kadar soğuttuktan sonra pH ları kontrol edilmiştir (6,8±0,2). Üstüne kan bankasından alınan, serolojik testleri negatif olan kullanım süresi bitmiş %5 oranında (50 ml) insan kanı eklenerek, iyice karıştırılmıştır. Steril petri kaplarına besiyer kalınlığı 4 mm olacak biçimde yaklaşık olarak 20'şer mL dökülmüş ve soğuyarak katılaşan besiyer +4 ºC'de buzdolabına konularak kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

Eosin Methylene Blue (EMB) agar besiyeri hazırlanması

Üretici firma önerilerine göre, dehidre toz besiyeri 37 g/L konsantrasyonda hazırlamak için hassas terazi ile tartılmış ve üstüne distile su ilave edilerek 1 L'ye tamamlanarak çözülmesi sağlanmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121 ºC'de 15 dakika bekletilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri otoklavın içinden çıkartıp 45-50 ºC'ye kadar soğuttuktan sonra pH ları ölçülmüştür (6,8±0,2). Steril petri kaplarına besiyer kalınlığı 4 mm olacak biçimde yaklaşık olarak 20'şer mL ilave edilmiştir. Soğuyarak katılaşan besiyer +4 ºC'de buzdolabına konularak testte kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

Mueller Hinton Broth (MHB) besiyeri hazırlanması

Üretici firma önerilerine göre dehidre toz besiyerinden 21 g/L konsantrasyonda olacak biçimde hassas terazi ile tartılmış, üstüne distile su ilave edilerek 1 L'ye tamamlanıp erimesi sağlanmıştır. Hazırladığımız besiyeri otoklavın içinde 121 ºC'de 15 dakika bekletilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri otoklavın içinden çıkartıp 45-50 ºC'ye kadar soğuttuktan sonra pH'ları kontrol edilmiştir (7,4±0,2). Besiyeri +4 ºC'de buzdolabına konularak işlem uygulanıncaya kadar saklanmıştır.

NNN besiyeri hazırlanması

Besiyerinin hazırlanması için; 500 ml'lik balon içerisinde 90 ml bidistile su, 0,6 gr NaCl ve 1,4 gr Bacto agar karıştırılıp-ısıtılıp agarın hepsinin çözünme işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan besiyer otoklavda 121 ºC'de 15 dakika bekletilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri otoklavın içinden çıkartılıp, 45-50 ºC'ye kadar soğutulmuş, içerisine 10 ml aseptik biçimde hazırlanan defibrine tavşan kanı ilave edilmiştir. Kapakları vida şeklinde olan tüplerin içine 4'er ml aseptik koşullarda eklendikten sonra, 30° eğik pozisyonda agarın donması beklenmiş, sonrasında 4 °C'ye getirilen besiyerlerine 0,2 ml penisilin G ve streptomisin sülfat ilave edilmiştir. Besiyerleri kullanılmadan önce buzdolabından alınmış ve en alt bölümlerinde biriken az miktarda yoğunlaşma sıvısının üstüne 1 ml %10 FCS içerikli RPMI-1640 besiyeri ilave edilmiştir. Böylelikle sıvı fazı da hazırlanmış olan besiyerler ekim amacıyla kullanılmıştır.

RPMI-1640 sıvı besiyeri hazırlanması

450 ml ticari RPMI-1640 besiyerinin üstüne 50 ml FCS, 5 ml penisilin-streptomisin, 5 ml gentamisin ilave edilerek karıştırılmış ve kullanılacağı zamana kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.3.3. Bileşik I için stok çözeltisinin hazırlanması

Toz haldeki bileşik I'den, hassas terazide 18 mg tartılmış ve steril ependorf tüpün içine konulmuştur. Çalışılan mikroorganizmalar için inhibitör etki göstermeyecek biçimde (toplam hacimde %10'u aşmayacak biçimde) dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) ilave edilerek çözünme işlemi tamamlanana kadar vorteksleme yapılmış, üzerine 450 µl'ye tamamlanana kadar distile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Bileşiğin stok çözeltisi 40 mg/ml olacak şekilde hazır hale getirilmişve son aşamada, çözelti 0,45 mikrometre çaplı şırınga ucuyla membran filtreden geçirilip sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.2. Vorteksleme işlemi

3.3.4. Alamar mavisinin hazırlanması

Alamar Mavisi, antibakteriyel aktivitenin tespiti için indikatör boya olarak kullanılmıştır. Alamar Mavi Boya stok çözeltisi (20 mg Resazurin çözeltisi, 100 mL steril su içinde çözüldü) 0,45 çaplı membran filtreden süzülerek sterilize edilmiştir.

3.3.5. Antibakteriyel aktivite

Antibakteriyel aktivite testleri için, bileşiğin minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) bulunması amacıyla tabanı düz şekilde olan 96 kuyucuklu steril mikropleytlerden yararlanılmıştır. Birinci aşama için, -80 °C'de derin dondurucuda saklanan yedi standart bakteri izolatları çözdürülerek Kanlı Agar (Merck) ve Eozin Meliten Blue (EMB, Merck) Agar besiyerlerine pasajlama işlemi yapılarak canlandırma tamamlanmıştır.

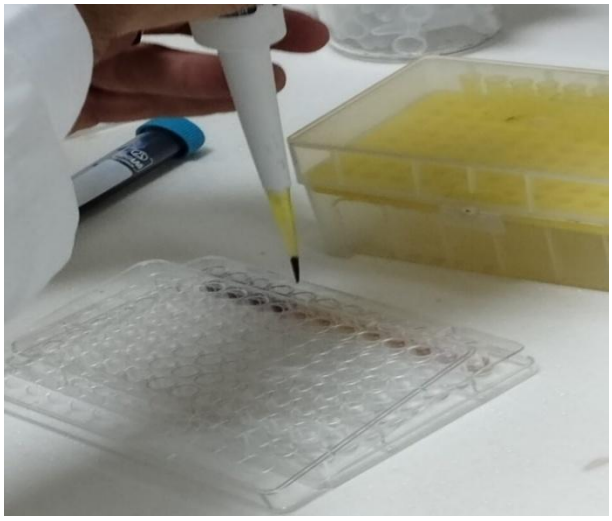
Steril bir tüpün içerisine 2 ml serum fizyolojik eklenmiş, üzerine McFarland 0,5 bulanıklığına eşdeğer olacak şekilde canlandırılan bakteri izolatları eklenmiştir. Sentezlenen bileşiğin antibakteriyel aktiviteleri Alamar mavisi eklenmiş mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Aktivite testi, düz tabanlı 96 kuyucuklu steril mikroplakalar kullanılarak yapılmıştır. Antibakteriyel aktivite testi için tüm kuyucuklar 100 µl Mueller Hinton Broth (MHB) sıvı besiyeri ile doldurulmuştur. Bileşik daha önce tarif edildiği gibi (İskeleli, N.O, Er M) seyreltmeleri 10 000 µg/mL ile 19 µg/mL arasında gerçekleştirilmiştir. Bunun üzerine kuyucuklara 100 µL standart bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Ek olarak, mikroplakaların son iki kuyucuğuna negatif (Bileşik I ve MHB) ve pozitif kontrol (bakteri ve MHB) eklenmiş ve 37 °C'ye ayarlanmış bir inkübatörde inkübe edilmiştir. 20 saatlik inkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 20 µL alamar mavisi boyası ilave edilmiş ve 4 saat daha inkübe edilmiştir. Mikroplaklar renk değişimi açısından 24 ve 48 saat sonra görsel olarak değerlendirilmiştir. Her bir bileşik için antibakteriyel aktivite testi iki kez tekrarlanmış, kontrol ilacı olarak Amikasin kullanılmıştır.

Testin değerlendirilmesi şu şekilde yapılmıştır: İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki karışımın pembe renge dönüşmesi pozitif bakteriyel üreme şeklinde değerlendirilirken, mavi rengin aynı olarak durması bakterilerin üremelerinin gerçekleşmediği biçiminde değerlendirilmiştir. MİK değeri ise mavi renkten pembeye dönüşümü gerçekleşmeyen en yüksek dilüsyon seviyesi şeklinde tespit edilmiştir.

3.3.6. *İn vitro* layşmanyasidal aktivite

Çalışmamızda aksenik standart *L.infantum* suşu kullanılmıştır. Parazitin çoğaltılması için bulunan suş, 50 ml'lik falkon tüplerin içine %10 Fetal Bovin Serum (FBS F4135 Sigma-Aldrich USA), %1 Penisilin (P3032 Sigma-Aldrich USA), Streptomisin (S9137 Sigma-Aldrich USA) (100 000 birim penisilin ve 10 mg streptomisin) ilefluconazole (2 mg/ml) maddeleri ilave edilmiş ve RPMI-1640 (R8758 SigmaAldrich USA) besiyerin içinde 27°C'de inkübe edilmesi sağlanmıştır. Belirli sürelerde ekim yapılarak kültürün devamlılığının sağlanması amaçlanmıştır.

Layşmanyasidal aktivite çalışmasında, bileşiğin toplam miktarının %10'unu aşmayacak biçimde Dimetilsülfoksit (DMSO)/H_2O (%10) içinde çözdürülerek son konsantrasyon değeri 40 mg/ml şeklinde hazırlanmıştır. Çözeltinin homojenize işlemi tamamlandıktan sonra 0,45 µm por çaplı membran filtreden geçirilip sterilizasyonu yapılmıştır. İlk olarak steril 96'lık mikroplağın bütün kuyucuklarına 100 µl RPMI-1640 besiyeri (FBS eklenerek) ilave edilmiş, sonrasında ilk kuyucuklara bileşikten 100 µl eklenip otomatik pipetle tamamen karışması gerçekleştirilmiştir. Birinci kuyucuktan 100 µl çekilerek ikinci kuyucuğa eklenmiş ve 1/2 oranında bileşiğin dilüe olması sağlanmıştır. Yapılan işlem 10 kuyucuğa kadar tekrarlanmış ve 10. kuyucukta tamamen karıştırılıp daha sonrasında 100 µl karışım dışarı dökülmüştür. Böylelikle dilüsyon oranlarının 10 000-19 µg/mL aralığında olması sağlanmıştır.



Resim 3.3. Pipetasyon işlemi

Seri dilüsyon işleminden sonra, parazitin yoğunluk değeri belirlenmiş olan *L. İnfantum* suşlarından kuyucuklara 100 µl ilave edilmiştir. Negatif kontrolde kullanılmak üzere stok çözelti bileşiğinden 100 µl 11. kuyucuk için ve pozitif kontrolde kullanılmak üzere 100 µl promastigot 12. kuyucuk için ilave edilmiş, mikroplaklar 27 ºC'de etüvün içinde 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. 20 saat sonra bütün kuyucuklara 20 µl alamar mavisi (0,1 mg/ml) ilave edilerek 27 ºC'de 4 saat daha inkübe edilmiştir. 24, 48 ve 72 saat sonra kontroller yapılmış ve değerler kaydedilmiştir. Amfoterisin B, kontrol ilacı olarak seçilmiştir. Testler iki kez yinelenmiştir. Çalışmalarda, pozitif kontrol kuyucuğu için rengin maviden pembeye dönüşmesi, negatif kontrol kuyucuğundaysa hiçbir renk değişikliğinin olmaması gerekmektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

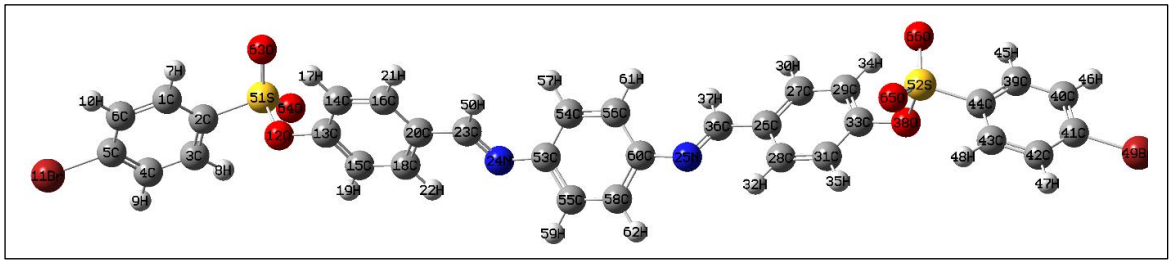
4.1. Teorik Hesaplamalar

4.1.1. Geometri optimizasyonu

Hesaplamalar Gaussian 09 yazılımı kullanılarak DFT/B3LYP/6-311G(d,p) metodu ile yapılmış ve bileşik I'in moleküler yapısı GaussView 5 programı ile görselleştirilmiştir. Geometri optimizasyonu gaz fazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen moleküler yapı Şekil 4.1'de, yapısal parametreler ise Çizelge 4.1-4.3'de verilmektedir. Bileşik I'için elde edilen bağ uzunlukları Çizelge 4.1'de, bağ açıları Çizelge 4.2'de ve torsiyon açıları Çizelge 4.3'de verilmektedir.

Bileşik I, beş benzen halkasına sahiptir. Molekülün beş benzen halkası arasındaki dihedral açılar analiz edilmiştir (Bz1: C1-C6; Bz2: C13, C14, C16, C20, C18, C15; Bz3: C53, C54, C56, C60, C58, C55; Bz4: C26, C27, C29, C33, C31, C28; Bz5: C44, C39, C40, C41, C42, C43). Benzen halkaları arasındaki dihedral açılar Bz1/Bz2= 25,16, Bz1/Bz3= 51,32, Bz1/Bz4= 88,45, Bz1/Bz5=85,19, Bz2/Bz3=40,48, Bz2/Bz4=80,90, Bz2/Bz5=88.46 olarak hesaplanmıştır. Bz3/Bz4=40.48, Bz3/Bz5=51.32 ve Bz4/Bz5=25.16o. Bz1/Bz4 ve Bz2/Bz5 benzen halkaları arasındaki dihedral açılar incelendiğinde birbirine yaklaşık olarak dik olduğu görülmektedir.

Bileşik I'in yapısındaki C=N/S=O/S–O/Br–C bağ uzunlukları sırasıyla 1,276/1,453/1,673/ 1,911 Å olarak bulunmuştur. Bu bağ uzunlukları literatürde 1,276; 1,4228/1,4238; 1,6095 ve 1,909/1,899 olarak verilmektedir. Literatürde (X-ışını) verilen değerler katı faz içindir. Literatürde, benzer bileşikler için verilen değerler, hesaplanan (gaz fazı) değerlerle uyum içerisindedir.



Şekil 4.1. Bileşik I için DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle optimize edilmiş moleküler yapı.

Bu çalışma, gelecekte ilaç geliştirme araştırmalarında antimikrobiyal etki gösteren bileşiklerin belirlenmesi ve yapısal niteliklerinin bilinmesi bakımından oldukça önemlidir.

Çizelge 4.1. Bileşik I için DFT/B3LYP//6-311G(d,p) metoduyla elde edilen bağ uzunlukları.

Bağ Uzunlukları (Å)	Bileşik I	Bağ Uzunlukları (Å)	Bileşik I
C1–C2	1,395	C28–C31	1,395
C1–C6	1,353	C28–H32	1,100
C1–H7	1,100	C29–C33	1,395
C2–C3	1,395	C29–H34	1,100
C2–S51	1,730	C31–C33	1,395
C3–C4	1,395	C31–H35	1,100
C3–H8	1,100	C33–O38	1,430
C4–C5	1,395	C36–C37	1,070
C4–9H	1,100	O38–S52	1,640
C5–C6	1,395	C39–C40	1,395
C5–Br11	1,910	C39–C44	1,395
C6–H10	1,100	C39–H45	1,100
O12–C13	1,430	C40–C41	1,395
O12–51S	1,580	C40–H46	1,100
C13–C14	1,395	C41–C42	1,395
C13–C15	1,395	C41–Br49	1,910
C14–C16	1,395	C42–C43	1,395
C14–H17	1,100	C42–H47	1,100
C15–C18	1,395	C43–C44	1,395
C15–H19	1,100	C43–H48	1,100
C16–C20	1,395	C44–S52	1,750
C16–H21	1,100	S51–O63	1,480
C18–C20	1,395	S51–O64	1,670
C18–H22	1,100	S52–O65	1,480
C20–C23	1,540	S52–O66	1,480
C23–N24	1,230	C53–C54	1,395
C23–H50	1,070	C53–C55	1,395
N24–C53	1,470	C54–C56	1,395
N25–C36	1,260	C54–H57	1,100
N25–C60	1,480	C55–C58	1,395
C26–C27	1,395	C55–H59	1,100
C26–C28	1,395	C56–C60	1,395
C26–C36	1,530	C56–H61	1,100
C27–C29	1,395	C58–C60	1,395
C27–H30	1,100	C58–H62	1,100

Çizelge 4.2. Bileşik I için DFT/B3LYP//6-311G(d,p) metoduyla elde edilen bağ açıları.

Bağ Açıları (°)	Bileşik	Bağ Açıları (°)	Bileşik
C2–C1–C6	123,06	C33–C31–H35	119,98
C2–C1–H7	120,00	C29–C33–C31	119,99
C6–C1–H7	116,95	C29–C33–O38	120,01
C1–C2–C3	118,01	C31–C33–O38	119,99
C1–C2–S51	90,26	N25–C36–C26	136,44
C3–C2–S51	151,73	N25–C36–H37	111,78
C2–C3–C4	119,99	C26–C36–H37	111,78
C2–C3–H8	120,01	C33–O38–S52	142,90
C4–C3–H8	119,99	C40–C39–C44	120,00
C3–C4–C5	119,99	C40–C39–H45	120.00
C3–C4–H9	119,98	C44–C39–H45	120,00
C5–C4–H9	120,02	C39–C40–C41	120,01
C4–C5–C6	120,00	C39–C40–H46	119,98
C4–C5–Br11	120,01	C41–C40–H46	120,01
C6–C5–Br11	119,98	C40–C41–C42	119,99
C1–C6–C5	118,94	C40–C41–Br49	120,01
C1–C6–H10	121,07	C42–C41–Br49	119,99
C5–C6–H10	119,99	C41–C42–C43	119,99
C13–O12–S51	131,72	C41–C42–H47	119,98
O12–C13–C14	120,01	C43–C42–H47	120,02
O12–C13–C15	119,99	C42–C43–C44	120,00
C14–C13–C15	120,00	C42–C43–H48	120,01
C13–C14–C16	120,00	C44–C43–H48	119,98
C13–C14–H17	120,00	Br49–C44–C43	120,00
C16–C14–H17	120,00	C39–C44–S52	98,22
C13–C15–C18	120,00	C43–C44–S52	130,35
C13–C15–H19	119,98	C2–S51–O12	89,21
C18–C15–H19	120,01	C2–S51–O63	116,70
C14–C16–C20	120,01	C2–S51–O64	116,70
C14–C16–H21	119,98	O12–S51–O63	116,70
C20–C16–H21	120,01	O12–S51–O64	116,70
C15–C18–C20	119,99	O63–S51–O64	101,74
C15–C18–H22	120,02	O38–S52–C44	98,66
C20–C18–H22	119,98	O38–S52–O65	113,38
C16–C20–C18	119,99	O38–S52–O66	113,38
C16–C20–C23	120,01	C44–S52–O65	113,38
C18–C20–C23	119,99	C44–S52–O66	113,38
C20–C23–N24	116,68	O65–S52–O66	104,97
C20–C23–H50	121,66	N24–C53–C54	120,01
N24–C23–H50	121,66	N24–C53–C55	119,99
C23–N24–C53	109,06	C54–C53–C55	120,00
C36–N25–C60	109,26	C53–C54–C56	120,00
C27–C26–C28	120,00	C53–C54–H57	120,00
C27–C26–36	120,01	C56–C54–H57	120,00
C28–C26–C36	119,99	C53–C55–C58	120,00
C26–C27–C29	120,00	C53–C55–H59	120,00
C26–C27–H30	120,00	C58–C55–H59	120,01
C29–C27–H30	120,00	C54–C56–C60	120,00
C26–C28–C31	120,00	C54–C56–H61	119,98
C26–C28–H32	119,98	C60–C56–H61	120,01
C31–C28–H32	120,01	C55–C58–C60	119,99
C27–C29–C33	120,01	C55–C58–H62	120,02
C27–C29–H34	119,98	C60–C58–H62	119,98
C33–C29–H34	120,01	N25–C60–C56	139,88

Çizelge 4.2. (devam) Bileşik I için DFT/B3LYP//6-311G(d,p) metoduyla elde edilen bağ açıları.

Bağ Açıları (°)	Bileşik	Bağ Açıları (°)	Bileşik
C28–C31–C33	119,99	N25–C60–C58	92,71
C28–C31–H35	120,02	C56–C60–C58	119,99

Çizelge 4.3. Bileşik I için DFT/B3LYP//6-311G(d,p) metoduyla elde edilen torsiyon açıları.

Torsiyon Açıları (°)	Bileşik I	Torsiyon Açıları (°)	Bileşik I
C6–C1–C2–C3	0,04	C27–C26–C36–N25	-162,71
C6–C1–C2–S51	-179,93	C27–C26–C36–H37	17,29
H7–C1–C2–C3	-179,97	C28–C26–C36–N25	17,26
H7–C1–C2–S51	0,06	C28–C26–C36–H37	-162,74
C2–C1–C6–C5	0,01	C26–C27–C29–C33	0,03
C2–C1–C6–H10	179,99	C26–C27–C29–H34	179,95
H7–C1–C6–C5	-179,98	H30–C27–C29–C33	-179,97
H7–C1–C6–H10	-0,00	H30–C27–C29–H34	-0,05
C1–C2–C3–C4	-0,06	C26–C28–C31–C33	0,01
C1–C2–C3–H8	179,96	C26–C28–C31–H35	-179,96
S51–C2–C3–C4	179,87	H32–C28–C31–C33	-180,00
S51–C2–C3–H8	-0,11	H32–C28–C31–H35	0,03
C1–C2–S51–O12	179,99	C27–C29–C33–C31	-0,06
C1–C2–S51–O63	60,25	C27–C29–C33–O38	179,96
C1–C2–S51–O64	-60,27	H34–C29–C33–C31	-179,98
C3–C2–S51–O12	0,0517	H34–C29–C33–O38	0,04
C3–C2–S51–O63	-119,69	C28–C31–C33–C29	0,03
C3–C2–S51–O64	119,79	C28–C31–C33–O38	-179,98
C2–C3–C4–C5	0,03	H35–C31–C33–C29	-180,00
C2–C3–C4–H9	-180,00	H35–C31–C33–O38	-0,02
H8–C3–C4–C5	-179,98	C29–C33–O38–S52	171,54
H8–C3–C4–H9	-0,02	C31–C33–O38–S52	-8,44
C3–C4–C5–C6	0,01	C33–O38–S52–C44	-164,70
C3–C4–C5–Br11	-180,00	C33–O38–S52–O65	75,09
H9–C4–C5–C6	-179,96	C33–O38–S52–O66	-44,48
H9–C4–C5–Br11	0,03	C44–C39–C40–C41	0,03
C4–C5–C6–C1	-0,04	C44–C39–C40–H46	179,95
C4–C5–C6–H10	179,99	H45–C39–C40–C41	-179,97
Br11–C5–C6–C1	179,98	H45–C39–C40–H46	-0,05
Br11–C5–C6–H10	0,00	C40–C39–C44–C43	0,02
S51–O12–C13–C14	178,78	C40–C39–C44–S52	147,02
S51–O12–C13–C15	-1,25	H45–C39–C44–C43	-179,98
C13–O12–S51–C2	-179,80	H45–C39–C44–S52	-32,98
C13–O12–S51–O63	-60,06	C39–C40–C41–C42	-0,06
C13–O12–S51–O64	60,46	C39–C40–C41–Br49	179,96
O12–C13–C14–C16	179,99	H46–C40–C41–C42	-179,98
O12–C13–C14–H17	-0,01	H46–C40–C41–Br49	0,04
C15–C13–C14–C16	0,02	C40–C41–C42–C43	0,03
C15–C13–C14–H17	-179,98	C40–C41–C42–H47	-180,00
O12–C13–C15–C18	179,99	Br49–C41–C42–C43	-179,98
O12–C13–C15–H19	0,00	Br49–C41–C42–H47	-0,02
C14–C13–C15–C18	-0,04	C41–C42–C43–C44	0,01
C14–C13–C15–H19	179,98	C41–C42–C43–H48	-180,00
C13–C14–C16–C20	0,03	H47–C42–C43–C44	-179,96
C13–C14–C16–H21	179,95	H47–C42–C43–H48	0,03
H17–C14–C16–C20	-179,97	C42–C43–C44–C39	-0,04

Çizelge 4.3. (devam) Bileşik I için DFT/B3LYP//6-311G(d,p) metoduyla elde edilen torsiyon açıları.

Torsiyon Açıları (°)	Bileşik I	Torsiyon Açıları (°)	Bileşik I
H17–C14–C16–H21	-0,05	C42–C43–C44–S52	-135,03
C13–C15–C18–C20	0,01	H48–C43–C44–C39	179,98
C13–C15–C18–H22	-179,96	H48–C43–C44–S52	44,99
H19–C15–C18–C20	-180,00	C39–C44–S52–O38	-180,00
H19–C15–C18–H22	0,03	C39–C44–S52–O65	-59,79
C14–C16–C20–C18	-0,06	C39–C44–S52–O66	-59,79
C14–C16–C20–C23	179,96	C43–C44–S52–O38	-38,23
H21–C16–C20–C18	-179,98	C43–C44–S52–O65	81,98
H21–C16–C20–C23	0,04	C43–C44–S52–O66	-158,45
C15–C18–C20–C16	0,03	N24–C53–C54–C56	179,99
C15–C18–C20–C23	-179,98	N24–C53–C54–H57	-0,01
H22–C18–C20–C16	-180,00	C55–C53–C54–C56	0,02
H22–C18–C20–C23	-0,02	C55–C53–C54–H57	-179,98
C16–C20–C23–N24	-174,60	N24–C53–C55–C58	179,99
C16–C20–C23–H50	5,40	N24–C53–C55–H59	0,00
C18–C20–C23–N24	5,42	C54–C53–C55–C58	-0,04
C18–C20–C23–H50	-174,58	C54–C53–C55–H59	179,98
C20–C23–N24–C53	180,00	C53–C54–C56–C60	0,03
H50–C23–N24–C53	0,00	C53–C54–C56–H61	179,95
C23–N24–C53–C54	-23,18	H57–C54–C56–C60	-179,97
C23–N24–C53–C55	156,79	H57–C54–C56–H61	-0,05
C60–N25–C36–C26	-178,58	C53–C55–C58–C60	0,01
C60–N25–C36–H37	1,42	C53–C55–C58–H62	-179,96
C36–N25–C60–C56	-33,62	H59–C55–C58–C60	-180,00
C36–N25–C60–C58	-180,00	H59–C55–C58–H62	0,03
C28–C26–C27–C29	0,02	C54–C56–C60–N25	-140,37
C28–C26–C27–H30	-179,98	C54–C56–C60–C58	-0,06
C36–C26–C27–C29	179,99	H61–C56–C60–N25	39,71
C36–C26–C27–H30	-0,01	H61–C56–C60–C58	-179,98
C27–C26–C28–C31	-0,04	C55–C58–C60–N25	155,70
C27–C26–C28–H32	179,98	C55–C58–C60–C56	0,03
C36–C26–C28–C31	179,99	H62–C58–C60–N25	-24,32
C36–C26–C28–H32	0,00	H62–C58–C60–C56	-180,00

4.1.2. IR ve NMR hesaplamaları

Bileşik I'in IR ve NMR spektral verileri DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle elde edildi. Ölçeklendirilmiş veriler deneysel verilerle birlikte Çizelge 4.4 ve 4.5'te verilmektedir. Çizelge 4.4'ten görüleceği gibi; bileşiğin moleküler yapısını doğrulayan N=**C–H**, **N=C**–H ve S=O bantları, FTIR spektrumunda sırasıyla 3093 cm^{-1}, 1619 ve 1373 cm^{-1} olarak gözlenmektedir. Bu bantlar sırasıyla, 2910 ve 2910 cm^{-1}, 1636 ve 1629 cm^{-1} ve 1295 ve 1295 cm^{-1} olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerden, teorik sonuçlarının deneysel spektral verilerle uyum içinde olduğu görülmektedir. Dolayısıyla DFT yönteminin ve seçilen temel setin hesaplamalar için uygun olduğu ve molekül için elde edilen yapısal parametrelerin moleküler yapıyı iyi bir şekilde ortaya koyduğu söylenebilir.

Çizelge 4.4. Bileşik I için bazı deneysel ve DFT/B3LYP/6-311G(d,p) metodu kullanılarak elde edilen ölçeklendirilmiş titreşim frekansları.

Seçilen titreşim frekansları	Bileşik I		
	Deneysel IR (cm^{-1})	Hesaplanan (Ölçeklendirilmiş)	
		Frekans	I_{IR} (km/mol)
ν(C–H)arom	3093	3112-3067	1,33-18,76
ν(N=C–H)	3093	2910, 2910	26,34; 64,04
ν(N=C–H)	1619	1636, 1629	15,66; 215,95
ν(C=C)arom.	1596, 1574	1587-1539	139,26-7,64
ν(O=S=O)	1373	1295, 1295	73,45; 110,06

* ν; gerilme.

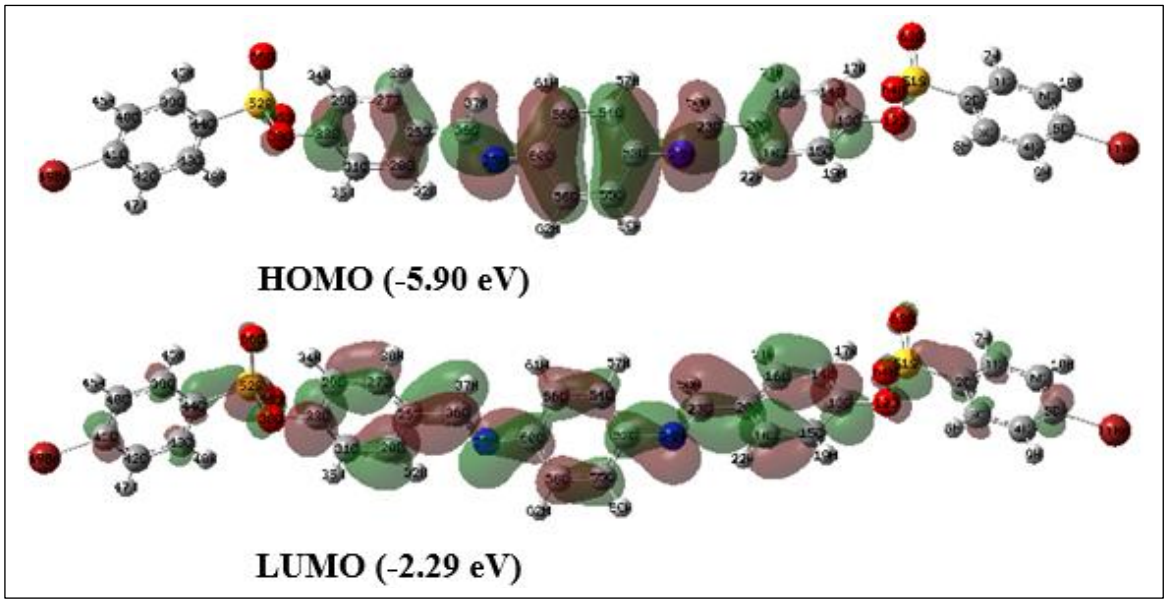
Çizelge 4.5'te verildiği gibi; ^{13}C-NMR spektrumunda bileşik I'in N=CH sinyalleri 159,21 ppm'de gözlenmiş ve 162,07 ve 162,18 ppm olarak hesaplanmıştır. ^{1}H-NMR spektrumunda N=C–H protonları 8,68 ppm'de gözlenmiş, bu sinyaller DFT yöntemiyle 8,57 ve 8,57 ppm olarak bulunmuştur. Ayrıca, benzen halkaları için gözlenen ve hesaplanan NMR verileri birbiriyle oldukça uyumludur. Dolayısıyla DFT yönteminin ve seçilen temel setin bileşiğin yapısal ve spektral verilerini ortaya koymak için oldukça uygun olduğu ifade edilebilir.

Çizelge 4.5. Bileşik I' in deneysel ve hesaplanan ^{1}H- and ^{13}C-NMR verileri (ppm).

Atom	Bileşik I	
	Deneysel	Hesaplanan (DMSO da)
($C_{5;41}$–Br)	135,78	154,61; 154,61
(N= $C_{23;36}$H)	159,21	162,07; 162,18
($C_{1;2;3;4;6}$H)$_{arom.}$	129,97;130,72; 133,54	133,20;142,31; 132,54;137,29;137,67
($C_{39;40;42;43;44}$)$_{arom}$	129,97; 130,72;133,54	133,06;137,50; 137,40; 132,80; 142,20
($C_{13;14;15;16;18;20}$)$_{arom.}$	122,50;130,85;133,75;151,18	156,28;130,09;129,76;138,68;131,41;140,75
($C_{26;27;28;29;31;33}$)$_{arom}$	122,50; 130,85; 133,75; 151,18	140,49; 138,66; 131,42; 129,58; 130,01; 156,33
($C_{53;54;55;56;58;60}$)$_{arom}$	123,37; 149,53	155,60; 121,48; 131,09; 121,50; 131,01; 155,73
(N= $CH_{50;37}$)	8,68	8,57; 8,57
($CH_{7;8;9;10}$)$_{arom}$.	7,24; 7,82	7,99; 7,96; 7,80; 7,80
($CH_{45;46;47;48}$)$_{arom}$.	7,24; 7,82	7,99; 7,77; 7,78; 7,98
($CH_{17;19;21;22}$)$_{arom}$.	7,91; 7,98	7,61; 7,61; 7,86; 8,61
$CH_{30;32;34;35}$)$_{arom}$.	7,91; 7,98	7,87; 8,62; 7,63; 7,60
$CH_{57;59;61;62}$)$_{arom}$.	7,36	7,41; 7,61; 7,40; 7,62

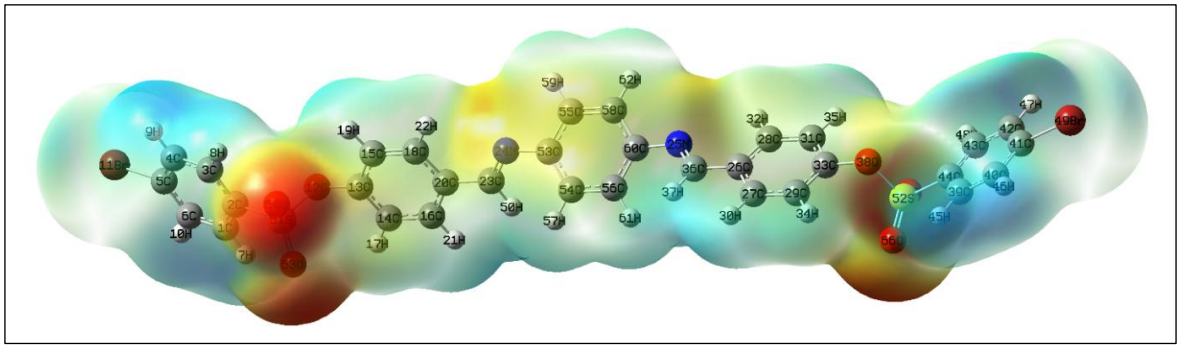
4.1.3. HOMO ve LUMO moleküler orbitalleri ve moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) hesaplamaları

Şekil 4.2'de verilen, bileşiğin moleküler orbitalleri HOMO (en yüksek dolu moleküler orbital) ve LUMO (en düşük boş moleküler orbital), DFT/B3LYP/6-311G(d, p) yöntemi kullanılarak elde edildi. Bileşik için E_{HOMO} ve E_{LUMO} enerjileri -5,90 ve -2,29 eV olarak hesaplandı. E_{HOMO} ve E_{LUMO} enerjileri arasındaki fark 3,61 eV'dir. Şekil 4.2'den görülebileceği gibi; HOMO, sülfonat grubu (SO3) üzerinde, LUMO, bromin atomunun bağlı olduğu fenil halkası üzerinde lokalizedir.



Şekil 4.2. Bileşik I'in DFT/6-311G(d,p) yöntemiyle elde edilen HOMO ve LUMO moleküler orbitalleri.

Bileşik I için moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) haritası, DFT/B3LYP/6-311G(d, p) seviyesinde hesaplanmış ve Şekil 4.3'de sunulmuştur. MEP haritasındaki renk kodu (Şekil 4.3), -4.572×10–2 – 4.572×10–2 a.u. aralığındadır. Kırmızı renk en negatif bölgedir ve bileşik için O atomları üzerindedir. Mavi renk ise en pozitif bölgedir ve NH protonu üzerindedir (H12). Bu nedenle MEP haritası bileşiğin kimyasal olarak aktif bölgelerini gösterir.



Şekil 4.3. Bileşik I'in DFT/6-311G(d,p) yöntemiyle elde edilen MEP haritası.

4.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

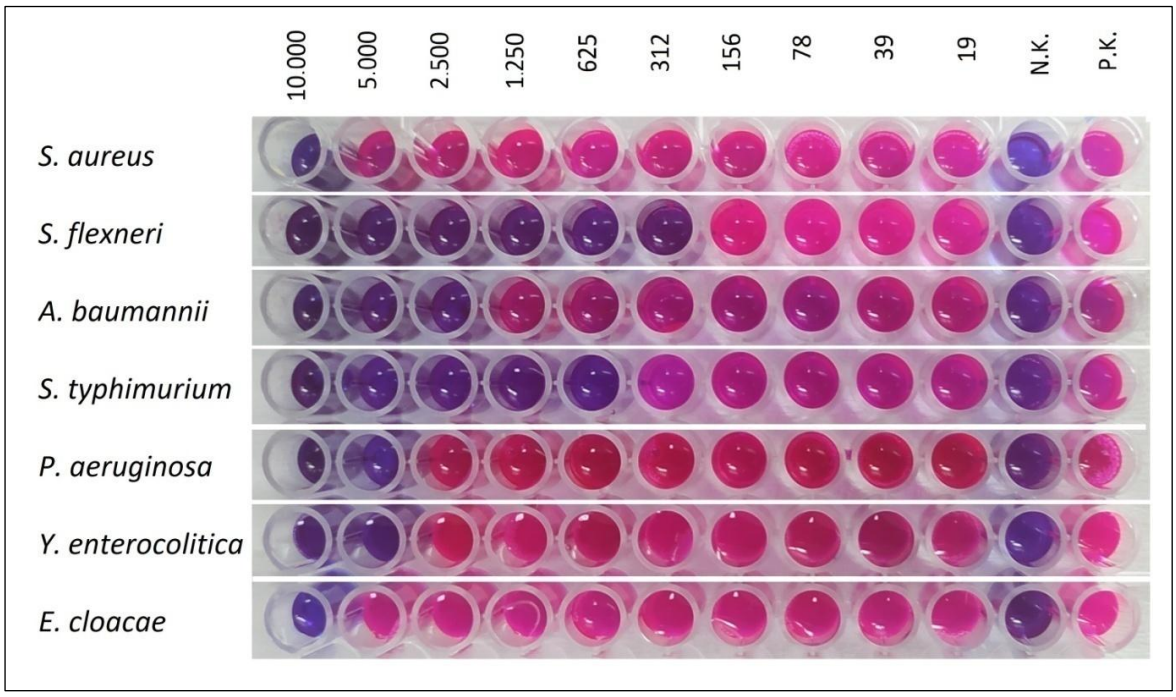
4.2.1. Antibakteriyel aktivite sonuçları

Sentezlenen bileşiğin antibakteriyel aktivitesi Gram pozitif izolata (*S. aureus*), Gram negatif izolatlara (*S. flexneri*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica, E.cloacae*) ve Gram negatif nonfermenter izolatlara (*P. aeruginosa, A.baumannii*) karşı test edilmiştir. Kuyucuklardaki alamar mavisinin (indikatör boya) renginin pembeye dönmesi bakteri üremesinin devam ettiği şeklinde yorumlanmıştır. Canlı hücre varlığı olmadığında renk değişikliği oluşmamaktadır. Testte maviden pembeye değişmeyen son kuyucuk MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Kuyucuklardaki örneklerden değerlendirme sonrasında kanlı agar besiyerine ekilerek ertesi gün kontrol edilmiş, standart bakteri izolatlarının standart Amikasin antibiyotiğine karşı MİK yorumlama kriterleri CLSI'ye (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) göre yapılmıştır. Bileşiğin MİK değerleri Çizelge 4.6 ve Resim 4.1'de verilmektedir.

Çizelge 4.6. Bileşik I'in bakterilere karşı elde edilen MİK değerleri.

Bakteri / Bileşik	*Staphylococcus arueus* (MRSA)	*Shigella flexneri*	*Acinetobacter baumannii*	*Salmonella typhimurium*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Yersinia enterocolitica*	*Enterobacter cloacae*
MİK (µg/ml)	10 000	312	2 500	625	5 000	5 000	10 000

Bakterilere karşı test edilen bileşiğin tüm bakterilerin üzerinde antibakteriyel aktivitesinin olduğu belirlenmiştir. Bileşiğin MİK değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Bileşik incelenen bakteri izolatlarına karşı en etkili antibakteriyel aktiviteyi *S. flexneri*'ye karşı sergilemiştir (MİK: 312 µg/ml). MRSA ve *E. cloacae* ise bileşikten en az etkilenen iki bakteri olmuştur (MİK: 10 000 µg/ml). Diğer bakterilere karşı farklı MİK değerleri tespit edilmiştir. Test sonuçlarına göre; Bileşik I'in antibakteriyel aktivite açısından oldukça etkili olduğu ve yeni bir ilaç adayı olması yönünde gelecek araştırmalara devam edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bileşik I'in ilaç adayı olarak değerlendirilebilmesi için *in vivo* deney hayvan modellerinde kontrol çalışmalarının yapılması gerekmektedir.



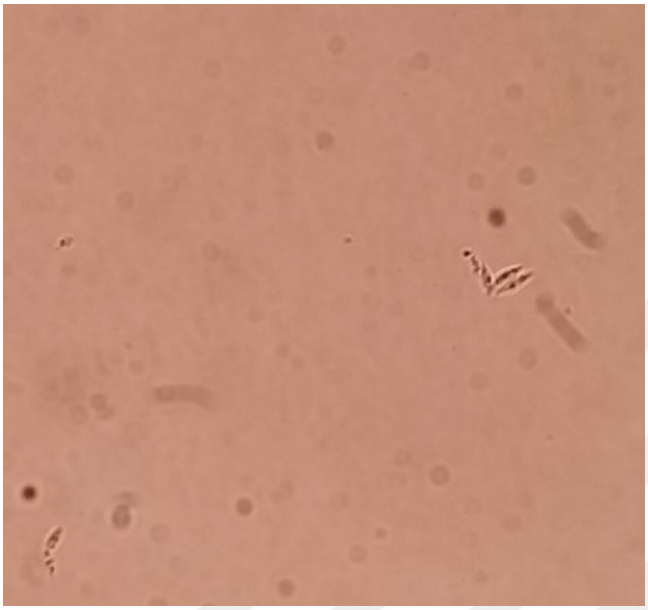
Resim 4.1. Bileşik I'in antibakteriyel aktivite sonuçları. Dilüsyon konsantrasyonu; 10 000 µg/ml - 19 µg/ml. N.K.: Negatif Kontrol; P.K.: Pozitif Kontrol

4.2.2. Antilayşmanyal aktivite sonuçları

Bileşiklerin *L. infantum* suşlarına karşı *in vitro* antiparaziter aktiviteleri, Alamar mavisi ilave edilmiş sıvı mikrodilüsyon tekniği ile test edilmiş ve layşmanyasidal değerleri tespit edilmiştir.

Layşmanyasidal aktivitenin yorumlanmasında; negatif kontrol için, alamar mavisinin renk değişimine uğramaması, pozitif kontrol için ilave edilen promastigotlarda hiçbir inhibasyona

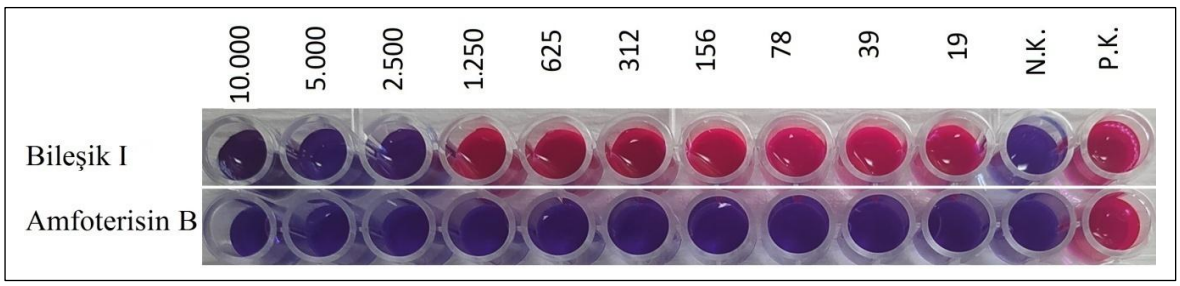
uğratıcı madde ilavesi olmadığından canlılığın sürmesi beklenir. Negatif ve pozitif kontrollerin çalışması halinde maddelerin yorumlanması yapılabilmektedir. Sonuç olarak kuyucuklarda mavi rengin pembeye dönüşmemesi canlılığın olmadığını, pembeye dönüşmesi ise canlılığın sürdüğünü göstermektedir.



Resim 4.2. Leishmania infantum'un mikroskop görüntüsü

Çizelge 4.7. *L. infantum* promastigotlarına karşı bileşiklerin LK değerleri

	Bileşik	Layşmanyasidal konsantrasyon (LK) (µg/mL)
1	Bileşik I	2500
2	Amfoterisin B	<19



Resim 4.3. Bileşik I'in layşmanyasidal aktivite sonuçları. Dilüsyon konsantrasyonu; 10 000 µg/ml - 19 µg/ml. N.K.: Negatif Kontrol; P.K.: Pozitif Kontrol

Testlerde elde edilen layşmanyasidal değerleri Çizelge 4.7 ve Resim 4.3'de verilmektedir. Elde edilen verilere göre bileşiğin layşmanyaya karşı etkili olduğu belirlenmiştir

(LC: 2500 µg/mL). Amfoterisin B'nin ise *L. infantum*'a karşı çalışılan en düşük konsantrasyonda (MİK:19 µg/mL) dahi etkili olduğu tespit edilmiştir.

Antiparaziter aktivite çalışmasında; bileşik *L.infantum* promastigotlarına karşı ilk defa test edilmiş ve *in vitro* layşmanyasidal aktivite, alamar mavisi ilave edilmiş sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiş, antiparaziter etkinlik sonuçları, bileşik I için bulunan LK değerleri ile Amfoterisin B için bulunan LK değerleri kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Ünsalan ve arkadaşları 1,2,4-Triazol-3-tiyon yapısına sahip Schiff bazlarının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmak amacıyla dokuz yeni madde sentezlemiş ve antimikrobiyal aktiviteleri diğer bir bileşikle karşılaştırılmıştır. Çalışmada bileşik yapılardan 5e, 5f, 5h ve 5i'ye ait olduğu tespit edilen spektrumlarda imin grubuna ait bantlar 338-374 nm aralığında gözlenmiştir. Schiff bazlarının antimikrobiyal aktivitesi açısından bileşik (5-(p-aminofenil)-4-fenil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon)'e üstünlük gösteremediği saptanmıştır (Ünsalan ve diğerleri, 2009).

Yılmaz ve arkadaşları, yeni sentezledikleri Schiff bazı bileşiklerinin, aktif olarak kullanılabilecek antikanser bir ilaç adayı olarak değerlendirilebileceğini düşünerek bir çalışma yapmışlardır. Yapılmış olan antibakteriyel aktivite testlerinde disk difüzyon analizi yapılmış olup, zon bölgeleri gram negatif bakteri için (E.coli) sırayla 18, 12 ve 6 mm olarak gram pozitif bakteri (B. subtilis) için ise sırayla 17, 10 ve 9 mm olarak ölçmüşlerdir. Metallerin olduğu durumlarda floresans sensörü gibi çalışan bu yapılar ayrıca antibakteriyel etki gösterdikleri için tedavi esnasında negatif immünden faydalanmaya uğraşan bakteriler için direnç oluşturabileceklerdir. Bu özelliklerin tamamı değerlendirildiğinde Schiff bazlarının antibakteriyel ve metal tutuculuğunun olmasının yanında antikanser belirteç olarak da tasarlanmaları ilk sırada ilaç sanayi olmak üzere çeşitli alanlarda da çalışmalara kılavuz olabileceğini değerlendirmişlerdir (Yılmaz ve diğerleri, 2021).

Karipçin ve arkadaşları, kitosan Schiff bazı yapıları ve onlara ait Cu(II), Zn(II) ve Cd(II) kompleks maddelerini sentezleyip karakter özelliklerini de bazı spektroskopik ve fiziksel teknikler aracılığıyla ortaya koymuşlardır. Çalışmada, bileşiklerin bazı bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkinlikleri araştırılmıştır. Çalışmalarında 29 bileşiğe ait etki mekanizması agar disk difüzyon tekniğiyle tespit edilmiştir. Araştırılan bakterilerden biri olan E.coli'nin bileşiklerden herhangi birine karşı duyarlı bulunmadığını tespit etmişlerdir.

Bununla birlikte bileşiklerin S. Aereus bakterisinin üstünde daha kayda değer sonuçları olmuştur. Araştırma sonuçlarına göre daha üst biyolojik aktivite araştırmalarının farklı çalışmalarla desteklenerek yapılmasının gerekli olduğunu vurgulamışlardır (Karipçin ve diğerleri, 2018).

Koç ve arkadaşları, gittikçe artış gösteren antibiyotik direnci nedeniyle alternatif tedavi tekniklerini araştırmışlardır. Çalışmada, Schiff bazlarının içerisinde SB1'in *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* üzerinde, SB2'nin ise *K. Pneumoniae* üzerinde antimikrobiyal olarak etkili olduğunu belirlemişlerdir. Antimikrobiyal etkinliği belirlenen SB3'ün ise, test bakterileri üstünde hiçbir etki göstermediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca SB1 ve SB2'nin 10 mg/ml doz için inhibitör etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir (Koç ve diğerleri, 2019).

Kalem ve arkadaşları ayrıcalıklı ligand şeklinde değerlendirilen Schiff bazlarının üzerinde çalışmışlardır. Yakın gelecekte yapılan araştırmaların imin içeren komplekslerin mikroorganizmaların üstünde daha etkili olduklarını değerlendirmişlerdir. Böylelikle schiff bazları içeren bileşiklerin etki mekanizmalarına ait analizlerin üzerinde daha fazla çalışma yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (Kalem ve diğerleri, 2021).

Direkel ve arkadaşları, alamar mavisi eklenmiş sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle, *L. infantum* promastigotları için daha önce sentezlenmiş [Schiff ve Mannich (morpholine) baz içeren] sekiz farklı bileşiğin antileishmanial aktivitelerini belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Araştırmada Schiff bazlı bileşikler (a-d) test edildiği görülmüştür. Sentezlenen bileşikleri 20 000-39 µg/mL konsantrasyon aralığına sahip olacak biçimde hazırlamışlardır. *L. infantum* suşları kuyucukları içine eklenip 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. *L. infantum* promastigotlarının üremesi 24. 48. ve 72. saatlerde değerlendirilerek araştırmada; b, c ve d bileşiklerinin (MİK değeri 156 µg/mL, 78 µg/mL ve 156 µg/mL) *L. infantum* promastigotları için etkisinin yüksek olduğunu ve bileşik f'ninse (MİK >20 000 µg/mL) etkisi en az bileşik olduğunu bulmuşlardır. Nihai olarak bu bileşiklerin leishmaniasisin hastalığının tedavisinde potansiyel ilaç adayları olabileceği değerlendirilmiştir. *İn vitro* antileishmanial etkiyi gösteren bu maddelerin *in vivo* deney hayvan modelleri ile *ex vivo* Leishmania amastigot makrofaj kültürlerinde de daha ileri modeller ile çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Direkel ve diğerleri, 2020).

Süleymanoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, morfolinli 1,2,4-triazole türevlerinin antileishmanial aktivitelerinin alamar mavisi ilave edilmiş olarak mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirmişlerdir, bileşiklerden herbirinin antiparaziter aktivitesinin bulunduğunu, fakat maddelerden biri için anlamlı şekilde daha etkili bulunduğunu belirtmişlerdir (Süleymanoğlu ve diğerleri, 2018).

Schiff bazı türevlerinin sahip olduğu önemli biyolojik özellikleri nedeniyle antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kendilerine fazlaca yer bulmaktadırlar. Bu potansiyellerinden dolayı tez çalışmamızda; yeni sentezlenmiş Schiff bazı içeren sülfonat bileşiğinin antimikrobiyal aktiviteleri, seçilmiş yedi bakteri ve bir parazit izolatlarına karşı test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve DFT çalışmasının sonuçları birlikte değerlendirilerek sunulmuştur. Bileşik I'in yeni sentezlenmiş olması ve seçilen parazit ve bakteri izolatları için ilk defa test edilmesi nedeniyle bu çalışma gelecek araştırmalara önemli bir katkı sağlayabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda; yeni sentezlenmiş, yapısı IR ve NMR spektroskopik teknikleri ile doğrulanmış Schiff bazı içeren sülfonat bileşiği, ((1E,1'E)-(1,4-fenilenbis(azanililiden))bis(metaniliden))bis(4,1-fenilen)bis(4-bromobenzensülfonat) (Bileşik I) için, moleküler modelleme ve *in vitro* antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılmıştır. DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemi kullanılarak bileşiğin moleküler yapısı optimize edilmiş, IR ve NMR verileri hesaplanmıştır. Bileşiğin yapısal parametreleri ve IR titreşim frekans değerleri gaz fazında, deneysel verilerle kıyaslanabilir olması için NMR hesaplamaları ise DMSO çözücüde optimize edilmiş moleküler yapı üzerinden bulunmuştur. Geometri optimizasyonu ile bulunan yapısal parametreler, literatürde benzer yapılar için verilen değerler ile karşılaştırılmış; bağ uzunlukları, bağ açıları ve dihedral açıların uyumlu oldukları görülmüştür.

Antimikrobiyal aktivite test sonuçlarına göre; Bileşik I'in, *Staphylococcus aureus* (Metisilin Dirençli) ATCC 43300, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 ve *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ve *Leishmania infantum* izolatlarına karşı çalışılan konsantrasyonlarda, farklı düzeylerde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bileşik I, *Shigella flexneri* ve *S. typhimurium* izolatları için dikkate alınabilecek seviyede antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Bileşik I, *Shigella flexneri* izolatı için etkili antibakteriyel etkinlik göstermiştir (MİK değeri: 312 µg/ml). Test sonuçlarına göre; bileşiğin antibakteriyel aktivite açısından oldukça etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma antimikrobiyal aktivite sonuçlarıyla beraber yorumlandığında, bazı toksik ve yan etkiler sebebiyle yapılan, alternatif ilaç tasarlama ile geliştirme araştırmalarında dikkate alınabilecek bileşikler için fikir sunması açısından katkı sağlaması beklenmektedir.

Antimikrobiyal aktivite çalışmasında bileşik I, önemli bir ilaç adayı olarak gelecek çalışmalarda da kullanılabilir. Elde edilen veriler *in vivo* çalışmalarla da desteklenerek, yeni ilaç geliştirmek için yapılan araştırmalara da önemli bir katkıda bulunulabilir. Bunun için; deney hayvan modelleri üzerinde *in vivo* kontrol ve toksitite testleri yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

Abdel-Haq, N.M., Asmar, B., Abuhammour, W. and Brown W. (2000). Yersinia enterocolitica infection in children. *The Pediatric Infect Disease Journal*, 19, 954.

Akıncı, A., Sünbül, A., Çaylar, M., Koçer, F. ve Uruş, S. (2022). Synthesis of aromatic schiff bases and Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes: İnvestigation of antimicrobial activities. *El-Cezerî Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(3), 1149-1170.

Akyar, I. (2010). Süper bakteriler için antibiyotik arayışı. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(2), 62-67.

Altuntaş, M., Yaşar Durmuş, S., Öz, N., Altay Akışoğlu, HÖ., Kaman, A., Aydın ve Teke T. (2018). Seftriakson dirençli Shigella flexneri'nin neden olduğu ensefalopatı olgusu. *Journal Pediatric Infect*, 12(3), 118-120.

Ashkenazi, S. (2004). Shigella infections in children: New insights. *Seminars in Pediatric Infectious Disease*, 15, 246-52.

Barnabas, M. J., Parambadath, S., Nagappan, S. and Ha, C. S. (2019). Sulfamerazine schiff-base complex intercalated layered double hydroxide: Synthesis, characterization, and antimicrobial activity. *Heliyon*, 5(4), e01521.

Başköse, Ü. C. (2011). *Rasajilin ve Tuzlarının Moleküler Yapıları ve Titreşimşel Spektrumlarının Teorik Olarak İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 16-20.

Becke, A. D. (1993). Density-functional therochemistry. III. the role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, 3(1), 18-25.

Becke, A. D. (1993). A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. *The Journal of Chemical Physics*, 98(2), 1372-1377.

Becke, A. D. (1998). Density-functional exchange-energy approximation with correcct asymptotic behavior. *Physical Review A,* 2(2), 48-60.

Belazzoug, S. (1992). Leishmaniasis in Mediterranean countries. *Veterinary Parasitology*, 44, 15-19.

Bıçak, B. (2014). *Met-Ser Dipeptidinin Titreşim Frekans ve Kiplerinin Konformasyon Analizi ve Ab-Initio DFT Yöntemleri ile İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 28-29.

Brien, J.O., Wilson, I., Orton, T. and Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267 (2000), 5421–5426.

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

Cattand, P., Desjeux, P., Guzman, M. G., Jannin, J., Kroeger, A., Medici, A., Musgrove, P., Nathan, M. B., Shaw, A. and Schofield, J. C. (2006). *Disease control priorities in developing countries*. (2. Baskı). Washington, DC: The World Bank, 344-364.

Chen, D. and Martell, A. E. (1987). Dioxygen affinities of synthetic cobalt schiff base complexes. *Inorganic Chemistry*, 26(7), 1026-1030.

Courvalin, P., Leclercq, R. and Rice, L. B. (2010). *Antibiogram*. (3. Baskı). Portland, Or.: ESKA Publisher/ASM Press, 220-225.

Cozzi, P. G. (2004). Metal–salen schiff base complexes in catalysis: Practical aspects. *Chemical Society Reviews*, 33(7), 410-421.

Da Silva, C. M., da Silva, D. L., Modolo, L. V., Alves, R. B., de Resende, M. A., Martins, C. V. and de Fátima, Â. (2011). Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 2(1), 1-8.

Demirpek, U. ve Dizer, U. (2010). Tuberculous meningitis: Evaluation and review of 32 cases. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(6), 16.

Demir Mülazımoğlu, A., Birol, Ö. ve Mercimek, B. (2010). Synthesis and antibacterial activity of schiff base derivatives. *International Journal of Drug Development and Research*, 2(1), 102-107.

Direkel, Ş., Ünver, Y. ve Akdemir, C. (2020). Antileishmanial activity of new synthesized Schiff and mannich (morpholine) base compounds. *Turkiye Parazitol Dergisi*, 44(4), 216-20.

Dirlik, O. (2013). *3-Bromofenil Boronik Asit Molekülünün Moleküler Yapı Parametreleri ve Titreşim Frekanslarına Çözücü Etkisinin Deneysel ve Teorik Olarak İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, 8-41.

Ditchfield, R. (1972). Molecular orbital theory of magnetic shielding and magnetic susceptibility. *The Journal of Chemical Physics*, 56(11), 5688-5691.

Dorsett, H.E. and White, A. (2000). Overview of molecular modeling and ab-initio molecular orbital methods suitable for use with energetic meterials. *DSTO Technical Report,* Australia, 15-20.

El-Gamal, M.I., Semreen, M.H., Foster, P.A. and Potter, B.V.L. (2016). Design, synthesis and biological evaluation of new arylamide derivatives possessing sulfonate or sulfamate moieties as steroid sulfatase enzyme inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Journal,* 24(12), 2762-2767.

Erhan, H., Emekdaş, G. ve Direkel, Ş. (2008). Mersin ili Mut ilçesindeki değişik yaş gruplarında Leishmania antikor düzeyleri. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 25.

Ermiş, E., Berber, H. ve Dal, H. (2005, 30 Eylül- 4 Ekim). *N-(2,2¢-metilenbis(metoksifenil)-salisilidin ve n- (2,2¢ - metilenbis (metoksifenil) - 2-hidroksi-1-naftalidin - metilamin bileşiklerinin sentezi ve fenol-imin keto-amin tautomerlerinin araştırılması*. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Aydın, 799.

Ertaş, M. (2006). *Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (YFT) ve Fen Uygulamaları*. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 4-9.

Fioravanti, R., Biava, M., Donnarumma, S., Porretta, G. C., Simonetti, N., Villa, A. and Pompei, R. (1996). Synthesis and microbiological evaluations of (N-heteroaryl) arylmethanamines and their Schiff bases. *Farmaco*, 51(10), 643-652.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H.B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A., Jr., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J. and Fox, D.J. (2009). *Gaussian 09 revision A.1.* (2. Baskı). Wallingford: Gaussian Inc, 15-42.

Foresman, J. B. and Frisch, A. E. (1996). *Exploring chemistry with electronic structure methods*. (2. Baskı). Pittsburgh USA : Gaussian Inc, 257-262.

Gözütok, A. (2009). *1,4-Diaminobütan Molekülünün Titreşim Spektrumlarının Teorik Olarak İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 17-23.

Guo, T., Xia, R., Chen, M., He, J., Su S., Liu, L., Li, X. and Xue, W. (2019). Biological activity evaluation and action mechanism of chalcone derivatives containing thiophene sulfonate. *RSC Advances*, 9, 24942-24950.

Herwaldt, B.L. (1999). Leishmaniasis. *Journal of The Lancet*, 354, 1191-1199.

Halkman, K. ve Sağdaş, Ö. (2005). *Merck mikrobiyoloji el kitabı*. (2. Baskı). Ankara: Başak Matbaacılık, 191.

Holmberg, K., (2019). Surfactants. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1(5), 56.

İskeleli, N. O., Alpaslan, Y. B., Direkel, Ş., Ertürk, A. G., Süleymanoğlu, N. ve Ustabaş, R. (2015). The new Schiff base 4-[(4-Hydroxy-3-fluoro-5-methoxy-benzylidene) amino]-1, 5-dimethyl-2-phenyl-1, 2-dihydro-pyrazol-3-one: Experimental, DFT calculational studies and in vitro antimicrobial activity. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy Journal,* 139, 356-366.

Jiang, J. J., Chang, T. C., Hsu, W. L., Hwang, J. M. and Hsu, L. Y. (2003). Synthesis and biological activity of sulfur-containing aryl-aldehyde Schiff bases. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51(11), 1307-1310.

Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y. and Yao, K. (2019). Quorum sensing: A prospective therapeutic target for bacterial diseases. *Biomed Resarch International*, 5(8), 86-90.

Kalem, E. ve Ağar, E. (2021). Schiff bazlarının biyolojik aktivitesi. *21. Yüzyılda Fen ve Teknik*, 8(16), 33-35.

Karaer, H. (1997). *Schiff Bazlarına Diazonyum Tuzlarının Kenetlenmesi ile Oluşan Bazı Azo-Azometin Boyarmaddelerinin Sentezi ve Yapılarının Spektroskopik Tekniklerle İncelenmesi*. Doktora Tezi, Ondokuz Mayız Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 6-13.

Karipçin, F., Yılmaz, A. ve Altınkaynak, C. (2018). *Kitosan Schiff Bazı Türevleri ve Kompleksleri: Sentezi, Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Özelliklerin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Nevşehir Hacı Bayram Veli Üniversitesi, Nevşehir, 88-91.

Kaya, M. F. (2013). *Bazı Pirolidin Türevlerinin Titreşim Spektroskopisi ile Deneysel ve Teorik Olarak İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 26.

Kecel, S. (2009). *Pro-Tyr, Glu-Asn ve Ala-Gln Dipeptidlerinin Konformasyon Analizi ve Ab-Initio DFT Yöntemleri ile Titreşim Frekans ve Kiplerinin İncelenmesi*. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 44-47.

Kirk, O. and Othmer, D. F. (1954). *Enciclopedy of chemical technology*. (4. Baskı). ABD: JhonWiley and Sons, 35-42.

Koç, E., Aras, A. ve Mutlu, N. (2019). *Yeni Sentezlenen Bazı Schıff Bazı Bileşiklerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri*. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kars, 13-19.

Kubaşık, P. (2020). *Urasil Türevlerinin DFT Çalışması ve Antiparaziter Aktiviteleri*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 12.

Kumar, K. N. and Ramesh, R. (2004). Synthesis, characterization, redox property and biological activity of Ru (II) carbonyl complexes containing O, N-donor ligands and heterocyclic bases. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60(12), 2913-2918.

Kurt, M., (2003). *Bazı Metal (II) Benzimidazol Bileşiklerin Yapılarının Kırmızı Altı Spektroskopisi Yöntemiyle Araştırılması ve 1,2-Bis(4-pyridyl)ethan Molekülünün Titreşim Spektrumunun Teorik Olarak İncelenmesi*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 51-58.

Lee, C., Yang W. and Parr, R.G. (1998). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, 15, 156-158.

Lewars, E. (2003). *Computational chemistry introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*. (4. Baskı). Switzerland: Springer Cham, 318.

Mann, C.M. and Markham, J.L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538– 544.

Mikus, J. and Steverding, D. A. (2000). Simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue. *Parasitol International*, 8(3), 265-9.

Mokracka, J., Koczura, R. and Pawlowski, K. (2011). Resistance patterns and integron cassette arrays of Enterobacter cloacae complex strains of human origin. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 737-743.

Murray, R. P., Baron, J. E., Jorgensen, J. H., Landry, L. M. and Pfaller, A. M. (2009). *Klinik mikrobiyoloji*. (Çev. Başustaoğlu, A., Kubar, A., Yıldıran, Ş. T., Tanyüksel, M.) Ankara: Atlas Kitapçılık, 78-83.

Murray, P., Baron, J. E., Jorgensen, J. H. and Landry, L. M. (2009). *Klinik mikrobiyoloji.* (Çev. Başustaoğlu, A.,). Ankara: Atlas Kitapçılık, 455-737.

Nyenje, ME., Green, E. and Ndip, RN. (2013). Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by Enterobacter cloacae strains isolated from food samples in South Africa. *Molecules*, 18(8), 82-93.

Orgel, L. E. (1960). *Introduction to transition-metal chemistry: Ligand-field theory*. (7.Baskı). London: Methuen ve Co Ltd., 128-132.

Ötük, G. (1992). Antibiyogramların değerlendirilmesi: Antibiyotikler. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 34, 11-17.

Özbülbül, A. (2006). *Oligofenol Esaslı Yeni Tip Oligomer Schiff Bazlarının Sentezi ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 3.

Özçelik, B., Kartal, M. ve Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49(4), 396-402.

Özkuyumcu, C. (2010). *Tıbbi mikrobiyoloji*. (Çev. Başustaoğlu, A.C., Yıldıran, Ş.T., Tanyüksel, M., Yapar, M.). Ankara: Atlas Kitapçılık, 78-85.

Parekh, J. and Chanda, S. (2007). In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 31(1), 53-58.

Parry, CM., Hien, TT., Dougan, G., White, NJ. and Farrar JJ. (2002) Typhoid fever. *The New England Journal of Medicine,* 347, 1770-1782.

Patai, S. (1970). *Carbon-nitrogen double bond*. (7. Baskı). New Jersey: John Wiley ve Sons Ltd., 105-120.

Peng, C., Ayala, P.Y., Schlegel, H.B. and Frisch, M.J. (1996). Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *Journal of Computational Chemistry*, 17(1), 49-56.

Rao, N.S. and Reddy, M.G. (1990). Studies on the synthesis, characterisation and antimicrobial activity of new Co(II), Ni(II) and Zn(II) complexes of Schiff base derived from ninhydrin and glycine. *Biology Metal*, 3(1), 19-23.

Reiss, A., Florea, S., Caproiu, T. and Stanica, N. (2009). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of some transition metals with the Schiff base N-(2-furanylmethylene)-3-aminodibenzofuran. *Turkish Journal of Chemistry*, 33(6), 775-783.

Rios, J.L., Recio, M.C. and Villar, A. (1988). Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23, 127–149.

Seesom, W., Jaratrungtawee, A., Suksamrarn, S., Mekseepralard, C., Ratananukul, P. and Sukhumsirichart, W. (2013). Antileptospiral activity of xanthones from Garcinia mangostana and synergy of gamma-mangostin with penicillin G. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 182.

Serin, S. ve Gök, Y. (1988). Hidroksi Schiff bazı metal komplekslerinin tekstil boyamacılığında kullanabilirliğinin incelenmesi. *T. Kimya D.C.*, 12(3), 325-331.

Sharma, P.K. and Dubey, S.N. (2002). Synthesis and structural studis of iron (II) complexes with N-salicylidene-and N-(2-hydroxy-1-naphthylidene) aminoacids. *Indian Journal of Chemistry*, 33A, 1113-1115.

Sholl, D. and Steckel, J. A. (2011). *Density functional theory: A practical introduction*. (2. Baskı). Canada: John Wiley and Sons, Inc., 58-62.

Smruti Ranjan Singh, and Krishnamurthy, N.B. (2014). Blessy baby mathew : A review on recent diseases caused by microbes. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 2(4), 106-115.

Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F. N. and Frisch, M. J. (1994). Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(45), 11623-11627.

Süleymanoğlu, N., Ünver, Y., Ustabaş, R., Direkel, Ş. ve Alpaslan, Y.B. (2017). Theoretical and antimicrobial activity study for ethyl{4-[3-(1H-imidazole-1-yl)propyl]-3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-1-yl}acetate. *Spectroscopy Letters*, 50(2), 96–101.

Süleymanoğlu, N., Ustabaş, R., Direkel, Ş., Alpaslan, Y. B. ve Ünver Y. (2018). 1, 2, 4-triazole derivatives with morpholine; DFT study and antileishmanial activity. *Canadian Journal of Physics*, 96, 719–723.

Süleymanoğlu, N., Ustabaş, R., Ünver, Y., Alpaslan, Y. B., Direkel, Ş. ve Karaman, Ü. (2019). 5-Phenyl thiophene amino phenol derivatives: Synthesis, spectroscopic characterization, computational study and antimicrobial activity. *Journal of Molecular Structure*, 1182, 36-46.

Süleymanoğlu, N., Ünver, Y., Ustabaş, R., Direkel, Ş. ve Alpaslan, G. (2017). Antileishmanial activity study and theoretical calculations for 4-amino-1,2,4-triazole derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1144, 80–86.

Süleymanoğlu, N., Ünver, Y., Ustabaş, R., Direkel, Ş. ve Alpaslan, Y. B. (2017). Theoretical and antimicrobial activity study for ethyl {4-[3-(1 H-imidazole-1-yl) propyl]-3-methyl-5-oxo-4, 5-dihydro-1 H-1, 2, 4-triazol-1-yl} acetate. *Spectroscopy Letters*, 50(2), 96-101.

Şenkardeş, S., Han, M.İ., Gürboğa, M., Bingöl Özakpinar Ö. ve Küçükgüzel, G.Ş. (2022). Synthesis and anticancer activity of novel hydrazone linkage-based aryl sulfonate derivatives as apoptosis inducers. *Medicinal Chemistry Research*, 31, 368-379.

Taşova, Y. (2012). Dirençli gram pozitif bakteri infeksiyonlarında güncel tedavi. *Yoğun Bakım Dergisi*, 10(3), 147-64.

Tekin, S. Z., Aksaray, S., Bozkurt, F., Albayrak, G. ve Taşcıoğlu, J. (2016). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok türlerinde vankomisin direncinin araştırılması. *Family Practice and Palliative Care*, 1(2), 43-47.

Tokalı, F.S., Demir, Y., Demircioğlu, İ.H., Türkeş, C., Kalay, E., Şendil, K. ve Beydemir, Ş. (2021). Synthesis, biological evaluation, and in silico study of novel library sulfonates containing quinazolin-4(3H)-one derivatives as potential aldose reductase inhibitors. *Drug Development Research*, 83, 586-604.

Unver, Y. ve Bektas, E. (2018). Synthesis and biological activity of new Schiff bases of Benzylideneamine bearing thiophene, 1, 2, 4-triazolone, 1, 3, 4-oxadiazole, morpholine moieties. *Letters in Drug Design and Discovery*, 15(7), 706-712.

Ünlüer, D., Ünver, Y., Bektaş, E., Direkel, Ş., Karaman, M. ve Karaman. S. (2020). Synthesis, biological activities and molecular docking studies of new Schiff bases derivatives. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (3), 681-694.

Ünsalan, S., Rollas. S. ve Kocabalkanlı, A. (2009). *1,2,4-Triazol-3-Tiyonlardan Elde Edilen Schiff Bazlarının Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Türkiye Cumhuriyeti Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 84.

Wade, L.G. (1999). *Organic chemistry*. (9. Baskı). USA: Pearson Education, 45-60.

Willke, TA. ve Özbakkaloğlu, B. (2008). *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. (3. Baskı). İstanbul: Nobel Kitabevi, 909-921.

Wolinski, K., Hinton, J. F. and Pulay, P. (1990). Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations. *Journal of The American Chemical Society*, 112(23), 8251-8260.

Yılmaz, B., Yeşildağ, P. ve Bayrakçı, M. (2021). Sensor properties of pyridine and quinoline based Schiff bases derivatives showing antibacterial and anticancer properties. *BEU Journal of Science*, 36(5), 1200-1269.

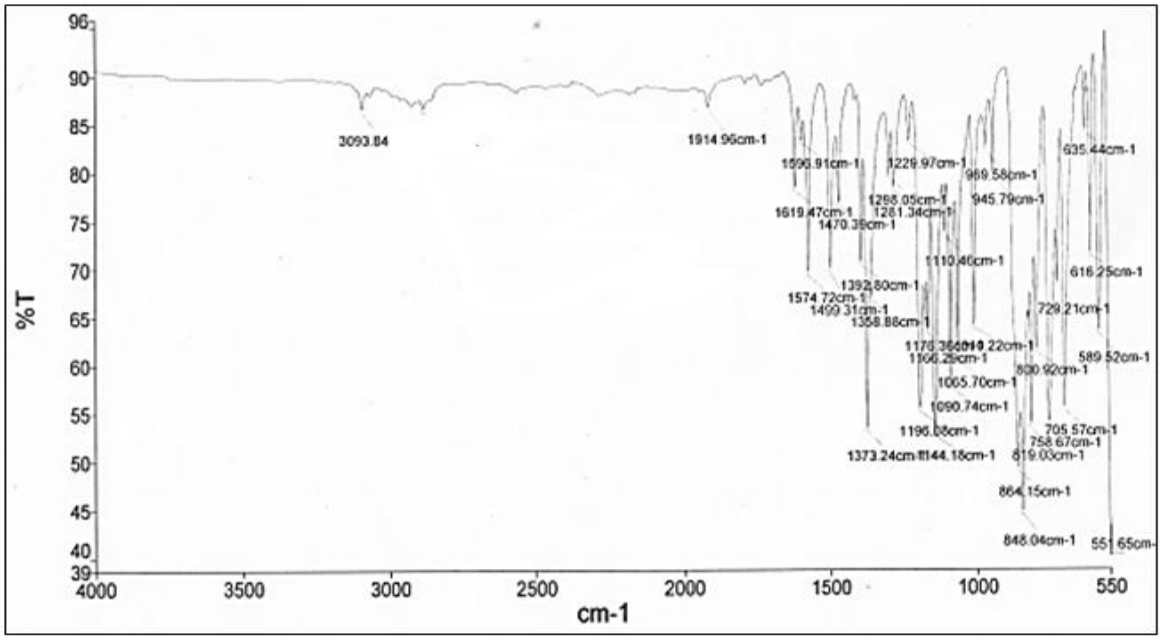
Yılmaz, F. (2011). *Bazı İmidazol Türevlerinin Metal Kompleksleri Üzerine Yapılan Kuantum Kimyasal Hesaplamalar*. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 22-27.

Yılmaz, İ. ve Çukurovalı, A. (2019). Synthesis and antimicrobial activity studies of cyclobutane ring containing Schiff base and their metal complexes. *European Journal of Science and Technology*, 17, 437-444.

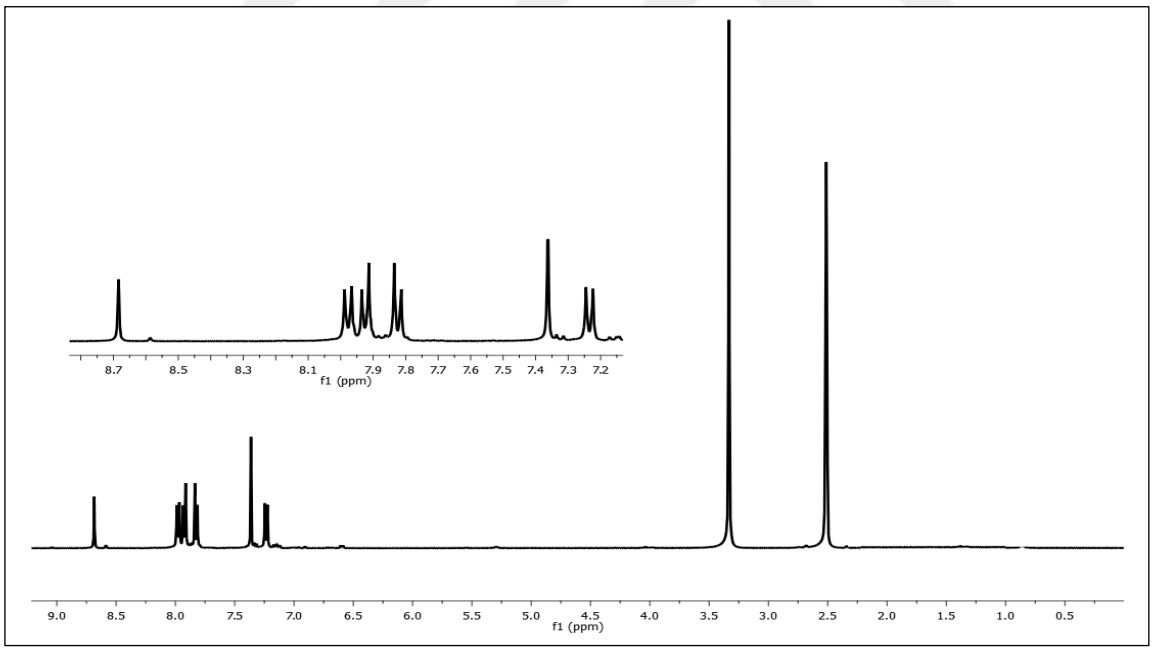
Yüksekdağ, Z. N. ve Baltacı, N. (2013). Staphylococcus aureus türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 43, 77-83.

EKLER

EK-1. Bileşiğin FTIR ve NMR spektrumları

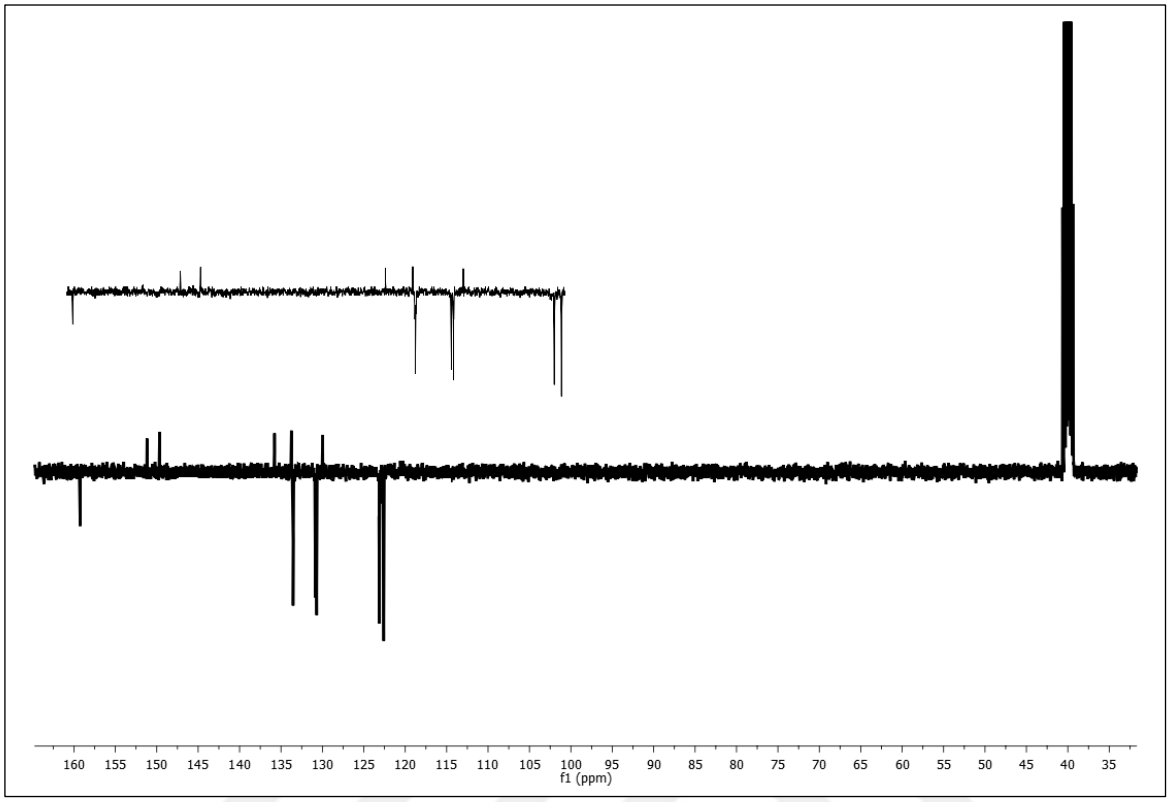


Şekil E.1. Bileşik I'in FTIR spektrumu



Şekil E.2. Bileşik I'in ^{1}H-NMR spektrumu

EK-1. (devam) Bileşiğin FTIR ve NMR spektrumları



Şekil E.3. Bileşik I'in ^{13}C-NMR spektrumu



Gazili olmak ayrıcalıktır