

T.C
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mustafa ATALAN

DİAMİNOSPIRO SİKLOTETRAFOZFAZEN TÜREVLERİNİN
DNA VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUŞ-2016

T.C
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mustafa ATALAN

DİAMİNOPIRO SİKLOTETRAFOSFAZEN TÜREVLERİNİN
DNA VE ANTIMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Sedat BOZARI

MUŞ-2016

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Muş Alparslan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Diaminospiro Siklotetrafosfazen Türevlerinin DNA ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi ” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kağıt ve elektronik kopyalarının Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.
- Tezimin/Raporum sadece Muş Alparslan Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.
- Tezimin/Raporumunyıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

.../02/2016

Mustafa ATALAN

TEZ KABUL TUTANAĞI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yrd. Doç. Dr. Sedat BOZARI danışmanlığında, Mustafa ATALAN tarafından hazırlanan “Diaminospiro Siklotetrafosfazen Türevlerinin DNA ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı bu çalışma 16/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Sedat BOZARI

İmza: 

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Kerem ÖZDEMİR

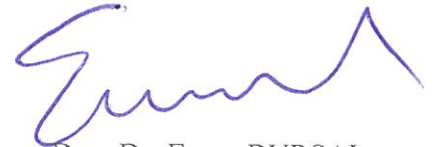
İmza: 

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN

İmza: 

Yukarıdaki imzalar adı geçen öğretim üyelerine aittir.

16/09/2015



Doç. Dr. Ercan BURSAL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın her aőamasında bana yol gosteren, bilgilerini paylaőan, her turlu destek, yardım ve ilgisini esirgemeyen, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Sedat BOZARI'ya çok teőekkürler ederim.

Ayrıca, tezimin konusu bileşikleri sentezleyen ve bu bileşiklerin kimyasal yapısını belirlemede yardımcı olan Prof. Dr. Zeynel KILIÇ ve Dr. Nuran ASMAFİLİZ'e teőekkürlerimi sunarım. Yine tezimin laboratuvar çalışmalarında, her turlu yardımı esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tezin oluőumunda tecrübelerinden yararlandığım değerli büyüğüm Prof. Dr. Ekrem ATALAN'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arő. Gör. Betül AYDIN ve Arő. Gör. Dr. Aytuę OKUMUŞ'a çok teşekkür ederim.

Mustafa ATALAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÇİZELGE LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
1.1.Genel Bilgiler	3
1.2. Fosfazenler	4
1.2.1. Fosfozen kimyasının gelişimi	5
2.MATERYAL ve METOD	11
2.1. Materyal	11
2.1.1. Fosfazenler	11
2.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	14
2.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler	15
2.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar	15
2.2. Metotlar	15
2.2.1. Maddelerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi.....	15
2.2.1.1. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi.....	15
2.2.1.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) yöntemi.....	16
2.2.2. Maddelerin DNA etkileşiminin belirlenmesi	16
Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler:.....	17
Agaroz jel elektroforezi	17
3.ARAŞTIRMA BULGULARI	18
3.1. Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktiviteleri	18
3.2. Bileşiklerin Mikroorganizmalar Üzerindeki MİK Değerlerinin Belirlenmesi	22
3.3. Bileşiklerin DNA ile Etkileşimleri.....	26
4.TARTIŞMA ve SONUÇ	29
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	39

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİAMİNOSPIRO SİKLOTETRAFOZFAZEN TÜREVLERİNİN DNA VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Mustafa ATALAN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sedat BOZARI

2016, 39 Sayfa

Bu çalışmada, yeni sentezlenmiş 6 fosfazen bileşiğinin; insan patojeni olan bakteri ve mantarlar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA etkileşimleri araştırıldı. Bu amaçla, 6 farklı fosfazen bileşiğinin antimikrobiyal aktivite çalışmaları için *Bacillus subtilis* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (NRLL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ve *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* olmak üzere 9 adet patojen bakteri ve *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) ve *Candida krusei* (34135) mayaları kullanıldı. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

Maddelerden PA4 hariç diğer bileşiklerin en az 1 bakteri suşuna karşı aktivite gösterdiği belirlendi. PA5 sadece *P. aureginosa* bakterisine karşı aktivite gösterirken PA1, PA3 ve PA6 bileşikleri sırasıyla 6, 5 ve 4 test bakteri suşuna karşı mikrobiyal aktivite gösterdiği belirlendi. Bileşiklerin hiç biri test edilen maya suşlarına karşı herhangi bir antifungal aktivite göstermemiştir. Çalışılan bileşikler arasında en fazla sayıda mikroorganizmaya karşı etki gösteren ve en geniş inhibisyon zonu oluşturan PA1'in en etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşik olduğu tespit edildi.

Sentezlenen bileşikler ile pBR322 plazmid DNA arasındaki etkileşim agaroz jel elektroforez yöntemiyle incelendi. Tüm maddelerin konsantrasyona bağlı olarak DNA'yı parçalama ve kesme şeklinde etkiler gösterdikleri belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Fosfazen, Antimikrobiyal Aktivite, DNA Etkileşimi

ABSTRACT

Master's Thesis

INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL AND DNA ACTIVITIES OF DIAMINOSPIRO CYCLOTETRAPHOSPAZEN DERIVATIVES INTERACTION

Mustafa ATALAN

Supervisor: Assistant Professor Sedat BOZARI

2016, Page 39

In this study, antimicrobial activities and DNA interaction on bacteria and fungus which are human pathogen of newly synthesized 6 phosphazene compounds have been searched. For this purpose, were evaluated against nine pathogen which are *Bacillus subtilis* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (NRL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ve *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* and ferments, *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) and *Candida krusei* (34135) have been used for antimicrobial activities of PA1, PA2, PA3, PA4, PA5 and PA6 compounds of phosphazenes. Agar well diffusion technique has been used to determine the antimicrobial activities of test compounds.

All of compounds, except PA4, shown activity against at least 1 bacterial strain. PA1, PA3 and PA6 compounds were shown antimicrobial activity against 6, 5 and 4 bacterial strains, respectively. No activity of compounds were observed against fungal strains, that is, all 3 test fungi strains were resistant to these newly synthesised phosphazene compounds. Among the synthesized compounds, PA1 was the highest inhibition zone and the most active agents against to susceptible the reference strain *Salmonella typhimurium*.

The interaction between the newly synthesised compounds and pBR322 plasmid DNA were observed on agarose gel electrophoresis. It was examined that all phosphazene compounds tested for this study, depending on the concentration of compounds, showed effects on DNA destruction and cleavage.

Key Words: Phosphazene, Biological Activity, DNA Interactions

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Biyolojik aktivite için kullanılan mikroorganizmalar.....	14
Çizelge 3.1. Bileşiklerin test bakterilerine karşı göstermiş oldukları antibakteriyal aktivite inhibisyon zon çapları (mm) (2500 µM).....	19
Çizelge 3.2. Bileşiklerin test maya türlerine karşı göstermiş oldukları antifungal aktivite inhibisyon zon çapları (mm) (2500 µM).....	20
Çizelge 3.3. Bileşiklerin Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri (µM).....	23
Çizelge 3.4. Bileşiklerin Minimal Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) Değerleri (µM)	24
Çizelge 3.5. Bileşiklerin test bakterilerine karşı göstermiş oldukları Mikrobiyal aktivite, Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) değerleri	25

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Son 30 yılda onaylanmış antibiyotik sayısı	2
Şekil 2.1. Çalışmamızda kullanılan yeni sentezlenmiş PA1 PA2 PA3 PA4 PA5 PA6 bileşiklerinin açık formülleri.....	13
Şekil 3.1. PA3 ve PA6 bileşiklerinin farklı patojen bakterilere 37°C ve 24 saat inkübasyondan sonra göstermiş oldukları antibakteriyal aktivite sonuçları	21
Şekil 3.2. PA1 (1-4) bileşiğinin pBR322 plazmid DNA'sı ile 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra etkisinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	27
Şekil 3.3. PA2 (1-4) bileşiğinin pBR322 plazmid DNA'sı ile 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra etkisinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (P, kontrol)	27
Şekil 3.4. PA3 (1-4) ve PA4 (1-4, ilk 4'ten sonraki sıralama) bileşiklerinin pBR322 plazmid DNA'sı ile 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra etkisinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (P, kontrol).....	28
Şekil 3.5. PA5 (1-4) ve PA6 (5-8) bileşiklerinin pBR322 plazmid DNA'sı ile 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra etkisinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (P, kontrol)	28

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra asetik asit
H	:	Hidrojen
IDSA	:	Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
M	:	Molar
MDR	:	Multi-Drug Resistance
MHA	:	Mueller Hinton Agar
MİK	:	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları
N	:	Azot
O	:	Oksijen
S	:	Kükürt
SDA	:	Sabouroud Dextrose Agar
TAE	:	Tris asetat
TE	:	Tris-EDTA

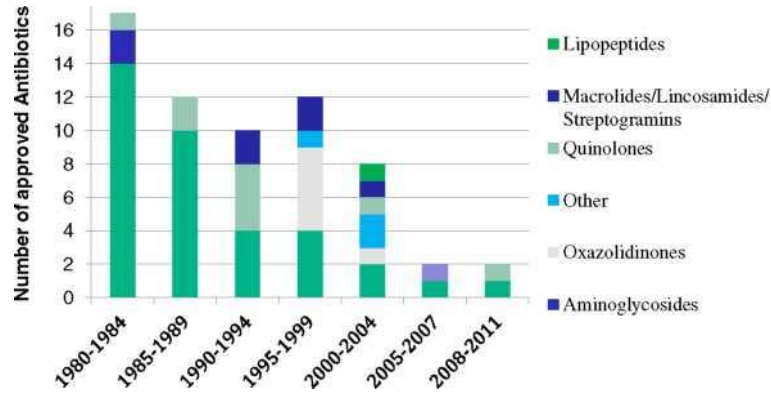
1.GİRİŞ

Patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı direnci, hem toplumda hem de hastane ortamında günden güne gelişirken, sebep oldukları mortalite ve morbilite oranları artırmakta ve ekonomik yönden kayda değer bir yük getirmektedir. Son otuz yılda, birden fazla ilaca dirençli mikroorganizmaların hem hastanede hem de toplumda artması; bilimsel çalışmalara yeni düzenlemeler getirerek verimli ve düşük rezistans profiline sahip, yeni antimikrobiyal bileşiklerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Böylece mevcut antibiyotik sınıfları göz önünde bulundurularak moleküler ve antimikrobiyal çalışmalardaki gelişmeler ışığında yeni maddelerin geliştirilmesi zorunluluk haline gelmiştir.

Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (Infectious Diseases Society of America, IDSA), 2020'ye kadar 10 yeni sistemik antibakteriyel ilaç geliştirme projesini destekleme kararı almıştır (Pendleton vd., 2013). Bu derneğin ana hedeflerinden birisi 'escape' patojenleri olarak bilinen antibiyotik maddelere dayanıklı (rezistans) olan mikroorganizma gruplarına (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae*) karşı yeni antibiyotik maddeler geliştirmektir. Mikrobiyal dayanıklılığın arttığı günümüzde özellikle beşinci nesil sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar, β -laktamaz inhibitörleri, aminoglikozitler, kinolonlar, oksazolidonlar, glikopeptidler çeşitli organizmalara karşı aktif olmalarından dolayı önemlidir. Bu bileşiklerden bazıları resmi kurumlar tarafından çoktan onaylanmış, bazıları ise hala çalışma aşamasındadır. Buna rağmen yeni antibiyotiklere; bakteriyel enfeksiyonların artmasından dolayı hala ihtiyaç duyulmaktadır. . Bu yüzden antimikrobiyal direnç, tüm paydaşlar tarafından yapılan koordine eylemleri teşvik etmeyi, gözetim ve teknik yardım desteğini de içermelidir (Bassetti vd., 2013).

Günümüzde bakteriyel dirençliliğin artması antibiyotiklerin klinikte kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle yeni bileşiklere acil ihtiyaç duyulmaktadır. Çok sayıda ilaca duyarlı MDR (multidrug resistance) olarak adlandırılan bakteriler mortaliteye neden olmakta, hastalık süresini artırmakta ve ekonomiyi olumsuz etkilemektedir.

Buna rağmen; 2000 yılından beri sadece 3 yeni antibiyotik sınıfı insanların kullanımı için piyasaya tanıtılmış ve bunlardan sadece biri günümüzde kullanılmaktadır. Bu sebepten dolayı ortaya çıkan 'Keşif boşluğu' terimi 1962'den beri yeni antibakteriyal maddelerin keşfedilmesinin yetersizliğini tanımlamada kullanılan bir ifadedir. Sayısız kuruluş, özellikle MDR gram negatif patojenler için yetersiz sayıda antibiyotik keşfinin yapıldığına dikkat çekmeye çalışmışlardır (Piddock, 2012). Özetle, eski antibiyotiklerin kullanılması her ne kadar bakteriyal gen dayanıklılığına neden olsa bile bu antibiyotiklerin optimizasyonlarına dikkat edilerek yeni keşfedilecek antibakteriyal maddelerle birlikte kullanımı önemlidir (Cassir vd., 2014). Şekil 1'de son otuz yılda onaylanmış antibiyotik sayıları verilmektedir.



Şekil 1.1. Son 30 yılda onaylanmış antibiyotik sayısı (Basetti vd., 2013)

Ülkemizde de yeni antibiyotik veya antimikrobiyal madde keşfetme çalışmaları hızlanmakla birlikte, hatırı sayılır ilerlemeler gerçekleşmemiş ve genelde mikrobiyal aktivite çalışmaları safhasında kalmıştır. Aktif molekül belirleme seviyesinde çalışmalar yok denecek kadar az sayıdadır. Öte yandan laboratuvar ortamında sentezlenmiş maddelerin moleküler yapısı bilineceğinden aktivite göstermeleri durumunda klinik uygulamalarında kısa sürede denenebileceklerdir.

Mevcut çalışma kapsamında yukarıda bahsedilen durum gözetilerek yeni sentezlenmiş 6 farklı diaminosporia siklotetrafosfazen bileşiğinin antimikrobiyal aktiviteleri ve pBR322 plazmid DNA üzerine muhtemel etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, yeni sentezlenen fosfazen bileşiklerinin insan patojeni olan bakteri ve mayalar üzerindeki etkileri araştırılmışı, sözkonusu maddelerin ileride antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilip değerlendirilemeyecekleri tartışılmıştır. Çalışmada kullanılan 6 fosfazen

bileşigi (PA1, PA2, PA3, PA4, PA5 ve PA6) Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü laboratuvarlarında sentezlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları için insan patojeni mikroorganizmalar olan *Bacillus subtilis* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (NRLL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* olmak üzere 9 adet patojen bakteri ile *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) ve *Candida krusei* (34135) mayaları kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi kullanılmıştır. Sentezlenen fosfazen bileşikleri (PA1, PA2, PA3, PA4, PA5 ve PA6) ile pBR322 plazmid DNA arasındaki etkileşim agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir.

1.1.Genel Bilgiler

Yeryüzünde artan nüfus; beraberinde birçok hastalık ve bu hastalıklara bağlı olarak salgınlara neden olmaktadır. Bu hastalıkların büyük bir kısmının ilaçla tedavisi mümkünken bazılarında ise palyatif çözümler geliştirilmiştir. Kanser gibi bazı hastalıkların tedavisi için ise hala kayda değer çözümler bulunamamıştır. Kullanılan ilaçların ise yan etkileri mevcuttur. Günümüzde klinik kullanımdaki çoğu anti kanserojen ilaç, tedavi edici özelliklerinin yanı sıra tümör seçiciliklerinin yetersizliklerinden dolayı hastaya karşı ağır toksisite göstermektedir. Bir ilacın tümör seçiciliğini geliştirmek için akılcı bir yaklaşım; ilaç molekülü ile tümör hücrelerinde fazladan üretilen iyonik folik asit reseptörlerine yüksek yakınlık gösteren iyonik folik asit gibi hedeflenen taşıyıcı ile birleştirmektir. Diğer bir yaklaşımda; polimerler ya da gelişmiş geçirgenlik ve durdurma etkisi gösteren ilaç taşıyıcıları gibi liposomlar ya da termosensitif sol-gel özellikleri kullanmaktır (de Visscher vd., 2006; Gabriel, 2007). Polimerlerin ya da liposomların kullanıldığı hedeflenen ilaç ulaşımı durumlarının çoğunda; ilaç, taşıyıcı molekülle kimyasal olarak birleşmez fakat ilaç ya da taşıyıcının fizikokimyasal özelliklerinin değişmesinden kaçınmak için fiziksel olarak kapsülleme ya da taşıyıcı yüzeyinde homojen olarak doldurulur. Fakat antikanserojen bir ilaç, vücut sıcaklığının altında termosensitif özelliklerini kaybetmeden, Alt Kritik Çözülme Sıcaklığı (LCST)'nda termosensitif bir polimerle birleştirilebilirse, tümör bölgesine, seçici lokal bir noktaya, minimum yan etkiyle direkt olarak uygulanabilir. Bu çalışmaya

göre, kendinden LCST ısıya duyarlılık gösteren bir antikanserojen ilaç bulunmamaktadır (Songa vd., 2003).

1.2. Fosfazenler

Fosfat-azot bağına sahip fosfazenler bilinen inorganik makromoleküllerin bir sınıfını teşkil etmektedirler (Chaplin vd., 2005). Fosfazenler, organik çözücülerde çözüldükleri için organik, fakat yapılarında P=N grubu bulduklarından dolayı anorganik özelliğe sahiptirler (Kando, 2009) ve genellikle kristal yapıdadırlar. Fosfazen bileşikleri 3 farklı yapıda bulunmaktadır. Bunlar düz zincirli (doğrusal), halkalı (siklofosfazen) veya polimerik (polifosfazen) yapıdır. Düz zincirli fosfazenler $(R)HN=PX_3$ veya $X_2P(Y)N=PX_3$ (R: alkil; X: F, Cl, alkil, aril, alkoksi, amino; Y: O, S); halkalı fosfazenler $[(NPX_2)_n]$ (X: F, Cl, Br; n: 3-12); polimerik fosfazenler ise $[X_2P(Y)-(N=PX_2)_n-N=PX_3]$ (R=alkil, X=halojen, alkil, aril, alkoksi, amino; Y=O,S)] genel formüllerine sahiptirler (Greenwood ve Earnshaw, 1997). Tekrarlanma sayısına bağlı olarak, küçük moleküllü bileşiklerden polimerlere kadar pek çok bileşiği içermektedirler (Jager vd., 1998). Halkalı fosfazenler uygun şartlarda ısıtıldığında halka açılır ve düz zincirli yapıya dönüştürülür ve böylece polimerik fosfazenler elde edilir.

Fosfazenler; doğrusal monofosfazen, polifosfazen, siklodifosfazen, siklotrifosfazen, siklotetrafosfazen halkalı fosfazenler, halkadaki $(N P X_2)_n$ sayısına göre, trimer (n=3), tetramer (n=4) ve pentamer (n=5) olarak adlandırılırlar. Bir halkalı fosfazen bileşik olan trimerin, $(NPCl_2)_3$ mono ve bifonksiyonel amin ve alkollerle nükleofilik yer değiştirme reaksiyonları ilgili çok sayıda çalışma mevcut iken halka yapısı farklı olan tetramerin süstitüsyon reaksiyonları ile ilgili literatür az sayıdadır.

Fosfazenler, farklı gruplarla nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu yaparak farklı fosfazen bileşikleri oluşturmakta ve oluşan bileşikler farklı özellikler taşımaktadır (Sethuraman vd., 2010). Farklı özellik gösteren fosfazen türevleri ısıya ve yangına dayanıklılık (Allcock, 1996), elastomerik, antikanser ve antitümör karakter (Yıldırım vd., 2012), doğrusal olmayan optik karakter (Minto vd., 1995), elektrolit karakter (Marin vd., 2010), antimikrobiyal karakter (Allcock vd., 1992), DNA ile etkileşim (Zhu vd., 2011), sıvı kristal karakter (Moriya vd., 2001), üreaz aktivitesi (Amtul vd., 2002), biyobozunur karakter (Zhang vd., 2009) gibi karakterlerinden dolayı farklı amaçlarla kullanılmaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı fosfazen bileşikleri endüstriyel ve tıbbi alanlarda öneme sahiptirler. Özellikle polifosfazenler malzeme biliminde hızla artan

kullanıma sahiptir ve yeni polimerlerin oluşmasını ve yeni materyallerin geliştirilmesini sağlamaktadırlar.

Bu gün endüstride, ısıya ve yangına dayanıklı karakterlerinden dolayı tutuşmayı önleyici ve geciktirici maddeler üretiminde (Liu vd., 2009), ısıya direnç, hidrolitik kararlılık, elastomerik uyumluluk ve iyonik sıvı karakterlerinden dolayı hidrolik sıvı uygulamalarında, hidrolik ve yağlayıcı sistemlerde kullanılan ısıya dirençli sıvılar üretilmektedir (Omotowa vd., 2004). İyonik özellikteki bu sıvılar çok kullanışlı materyal özellikleri olan bileşiklerin bir çeşididir. Ayrıca fosfazenler doğrusal olmayan optik ve yüksek kırılma indisine sahip olma özelliklerinden dolayı transparan film ve cam yapımında; ayrıca elektrolit şarj edilebilir lityum pilleri yapımında kullanılmaktadır. Tıpta ise fosfazenler daha çok polifosfazen nanofiberler, proton iletken membranlar, ve doku mühendisliğinde iskelet doku, yapay implantları kaplama malzemesi gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Benzer şekilde ilaç endüstrisinde, kontrollü salım ve ilaç taşıyıcı sistemlerde, viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerde, ilaç formülasyonunda, sulu çözeltilerde protein dengeleyici ve ilaç adjuvanı olarak kullanılmaktadır (Klein vd., 2007; Garlapati vd., 2009; He vd, 2010).

Moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği, biyoteknoloji ve ilaç tasarımı için yapay nükleazların sentezlenmesi önemlidir (Fang vd., 2007). *In vitro* sentezlenmiş kimyasal nükleazlar, DNA'yı oksidatif, foto-uyarılmış ve hidrolitik işlemlerle kesebilirler (Ray, vd., 2009). Büyüklük olarak *in vivo* enzimatik nükleazlardan daha küçük olmaları nedeniyle daha üstün avantajlara sahiptir. Yapay nükleazların sentezlenmesinde özellikle siklofosfazenler etkin DNA kesimi için kompleksler oluşturduklarından dolayı önemlidir (Zhu vd., 2011).

1.2.1. Fosfozen kimyasının gelişimi

İlk olarak 1834 yılında Rose ve Liebig'in ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarla fosfazenlerle ilgili çalışmalar yaptığı Shaw vd.(1962) tarafından belirtilmiştir. Daha sonra 1846 yılında Gerhardt ve Laurent, verilen formülün hatalı olduğunu belirtmişlerdir ve ampirik formülün NPCl_2 olduğunu belirlemişlerdir. 1864 yılında ise Gladstone, Holmes ve Wichelhnus molekül formülünü $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6$ olarak rapor etmişlerdir. Çok sayıda bilim adamı aromatik amino türevleri karakterize edilmiş ve bir bromofosfazen sentezlemişlerdir. Stokes, 1897'de heksaklorotrifosfazen'in halkalı yapısını önermiş ve çalışması fosfazen kimyasının temellerini oluşturmuştur. Daha

sonra Schenk ve Romer 1924 yılında klorofosfazen sentezini modifiye ederek inert bir çözücü kullanımına ilişkin yöntemler günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Shaw, 1962).

Fosfazen bileşikleri ile ilgili 1950’li yıllardan itibaren çalışmalar hız kazanmış ve günümüze kadar çok sayıda fosfazen bileşiği sentezlenmiştir (Sethuraman vd., 2010). Yapılan bu çalışmalar hem yeni fosfazen bileşiklerin sentezlenmesi hem yapılarının incelenmesi hem de sentezlenen bileşiklerin çeşitli özelliklerin araştırılması ve çok farklı alanlarda kullanılmasına yöneliktir.

Son yüzyılda fosfazen kimyası ve fosfazenlerin uygulama alanları üzerine pek çok çalışma yapıldığı, özellikle son 50 yılda bu çalışmaların hız kazandığı görülmektedir. Bununla birlikte, fosfazenlerin biyolojik aktiviteleri üzerine çok fazla çalışma yapılmamıştır. Yeni sentezlenen fosfazen bileşiklerinin kimyasal özelliklerinin incelenmesinin yanında antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin ve DNA üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar 2000’li yıllardan itibaren artmaya başlamıştır.

Allcock vd. (1992), suda çözülebilen bazı fosfazen yüksek polimerlerinin 6 farklı bakteri suşu üzerinde antibakteriyel aktivitelerini araştırmışlar ve hidrojel gibi bazı makro polimerlerin bakteri büyümesini engellediğini belirtmişlerdir. Yine bazı bileşiklerin bakteri suşları üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğunu, konsantrasyonu azaltıldığında bakteri suşları üzerindeki aktivitenin de azaldığını gözlemişlerdir. Ayrıca bu bileşiklerin yapay implantlar için kaplayıcı olarak kullanılabilmesini belirtmişlerdir (Allcock vd., 1992).

Konar vd. (2000), bazı monofosfazenlerin tüm konsantrasyonlarının bakteri ve maya suşları üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu gözlemişlerdir. Mikrobiyal besi ortamlarında klor atomlarının antiseptik olduğunu, monofosfazen sentezi (SM) bileşiğinin yapı iskeletindeki klorin atomlarının antimikrobiyal aktiviteye neden olmuş olabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte bazı fosfazen bileşiklerinin düşük konsantrasyonlarında etkili olmadığını ve bununda moleküler yapısındaki benzen halkasından kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir.

Öztürk vd. (2000), elde ettikleri sonuçlara göre monofosfazen moleküllerinin belirli konsantrasyonlarda bakteri ve maya hücreleri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu etkinin klorin atomlarının mikrobiyal büyüme

üzerinde antiseptik etkiye sahip olduğundan bileşiğin yapısındaki klorin atomları nedeniyle olabileceğini belirtmişlerdir.

Yine Yılmaz ve çalışma grubu (2002) fosfazen bileşiklerden trifenil monofosfazen-II bileşiğinin test ettikleri tüm bakteri ve maya hücreleri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu, ancak tri(o-tolil)monofosfazen-III bileşiğinin sadece bazı bakteri hücreleri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Elde edilen veriler, aynı mikroorganizmalar üzerinde tri(o-tolil) monofosfazen-III'ün trifenil monofosfazen-II'ye göre daha düşük antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir neden olarak da trifenil monofosfazen-II'nin iskelet yapısındaki fenol halkasının, tri(o-tolil) monofosfazen-III bileşiğinde ise yapısındaki tolüen halkasından kaynaklandığını belirtmişlerdir (Yılmaz vd., 2002). Yine Yılmaz (2004)'de yaptığı çalışmada ise bazı halkalı fosfazenlerin sentezini, polimerizasyonu ve karakterizasyonunu yapmış ve bu yeni amino fosfazen bileşikleri ve polimerlerinin bakteriler ile maya kültürlerine karşı antimikrobiyal aktivitelerinin polimer bileşiklerin monomer bileşiklere göre daha aktif olduğunu bildirmişlerdir (Yılmaz, 2004).

Yıldız ve çalışma grubu (2007)'de yaptıkları bir çalışmada bazı yeni amino fosfazen bileşikleri ve polimerlerini sentezledikten sonra bakteriler ile maya kültürlerine karşı antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuçları polimer bileşiklerinin monomer bileşiklerine göre daha güçlü antimikrobiyal aktivite ortaya koyduğunu belirlemişlerdir. Gram-pozitif bakterilere karşı olan aktivitenin gram-negatif bakterilere kıyasla yüksek aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Sebep olarak da gram pozitif bakterilerin membran yapısından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Hatta sentezledikleri bazı bileşiklerin referans antibiyotiklerden daha fazla etkili olduğundan enfektöz hastalıklara karşı potansiyel ilaçlar olarak daha ileri farmakolojik uygulamalar için kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yine, polimer IV bileşiğinin mayalara karşı ticari antifungal ajanlardan daha etkili olduğu belirtmişlerdir. Bu sebepten, bu bileşiklerden güçlü antikandidal ajanlar geliştirilebileceğini belirtmişlerdir (Yıldız vd., 2007).

Durmaz ve çalışma grubu (2007), bazı fosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal etkilerini 14 farklı mikroorganizma suşu üzerinde yaptıkları çalışmada, bileşiklerden bazılarının vankomisin ve metisilin gibi antibiyotiklerle eşdeğer etkiye sahip olduklarını, Yıldız ve çalışma grubu (2008), sentezledikleri bazı yeni fenoksi-, fenoksi-

amino- ve anilinosfazen bileşiklerinin bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal aktivite çalışmalarında test edilen tüm sfazen bileşiklerinin 14 farklı mikroorganizmaya karşı aktivite gösterdiklerini ve bazılarının standart antibiyotiklerde daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir ve gelecekte ticari amaçlı kullanılabilineceğini belirtmişlerdir.

Asmafiliz ve çalışma grubu (2009), sentezledikleri yeni mono- ve bisferrosenilfosfazen türevlerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA etkileşimleri için yaptıkları araştırmada tüm bileşiklerin *B. cereus* ve *C. albicans*'a karşı çok güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yine ferrosenildiamin bileşiğinin antitüberküloz aktivitesi incelenmiş ve yapılan duyarlılık testinde bileşiklerin dilüsyon serilerine duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bileşiklerin DNA etkileşimlerinin incelenmesi neticesinde tüm bileşiklerin pBR322 plazmit DNA'sının hareketliliğini değiştirmede etkili olduğu, bazı bileşiklerin etkisinin diğerlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir.

Yavuz (2010) NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 adlı sfazen bileşiklerinin biyolojik aktivitelerini bir grup insan patojeni bakterisi olan *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 292112), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* mayalarına karşı incelemiştir. Ayrıca bileşiklerin *Mycobacterium tuberculosis* ATCC H37 Rv referans suşu ve çoklu antibiyotik direnci gösteren 6 farklı klinik *M. tuberculosis* suşu üzerinde etkilerini çalışmış ve bu maddelerin DNA üzerine etkilerini araştırmış ve bazı bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve DNA üzerinde de etkili olduğunu belirtmiştir.

İlter ve çalışma grubu (2010) tarafından sentezlenen yeni spirosiklik monoferrosenil siklotrifosfazenleri bakterilere karşı antibakteriyal aktivite yönünden, maya suşlarına karşı antifungal aktiviteleri yönünden, *M. tuberculosis* H37Rv referans suşu ve çoklu antibiyotik direnci gösteren 6 farklı klinik *M. tuberculosis* suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri yönünden incelemiştir. Buna ek olarak bileşiklerin DNA ile olan etkileşimlerini gözlemlemiştir. Elde ettikleri verilere göre bazı maddelerin patojen bakterilere karşı aktif olduğu, tüberküloz referans suşuna ve klinik suşlara karşı etkin olduğunu rapor etmişlerdir. Bileşiklerin plazmit DNA'sının hareketini ve yoğunluğunu etkilediğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde tüm bileşiklerin BamHI

enziminin DNA'nın kesimini engellerken HindIII enziminin aktivitesini engellemediğini gözlemlemişlerdir (İlter vd., 2010). Benzer bir çalışma Işıklan ve çalışma grubu (2010) tarafından yapılmıştır. Çalışmalarında sentezledikleri yeni N/O spirosiklik fosfazen türevlerinin güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını belirtmişlerdir. Spirosiklikfosfazenlerin, mono- ve bisferroseniltetrapirrolidinofosfazen'lere kıyasla daha etkili antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Yine sentezledikleri bileşiklerin plazmit DNA'nın hareketinde etkili olduğu ve yapılan restriksiyon analizinde tüm bileşiklerce BamHI ve HindIII enzimlerinin kesimini engellendiğini gözlemlemişlerdir.

Oysa Okumuş ve çalışma grubu (2011), sentezledikleri mono ve bis spirosiklofosfazenlerden sadece ikisinin bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ve bileşiklerin pBR322 plazmid DNA'sının hareketi üzerine etkili olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Asmafiliz ve çalışma grubu (2012) sentezledikleri yeni N/O spirosiklotrifosfazenlerin bakteri ve mayalara karşı herhangi bir güçlü antimikrobiyal aktivite gözlemleyememişlerdir. Bunun nedeni olarak da maddelerin hücreye geçmemesi veya sonrasında hücreden atılması veya hücre tarafından maddeyi inaktif eden bir enzim üretiminin olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Diğer yandan, bileşiklerin pBR322 plazmid DNA'sını uygulanan konsantrasyona bağlı olarak DNA hareketliliğini az da olsa etki ettiklerini göstermişlerdir.

Çil ve çalışma grubu (2012) ise spirosiklofosfazen'in farklı aminlerle reaksiyonu sonucu elde ettikleri Schiff baz ve dioksifenil grupları taşıyan yeni fosfazen türevlerinin farklı bakterilere karşı değişen antibakteriyal aktiviteye sahip olduklarını belirlemişlerdir. Bileşiklerden OH, Cl ve CN gruplar içerenlerin diğerlerine kıyasla daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca hem OH hem de Cl grubunu içeren bileşiğin daha yüksek antibakteriyal aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Çil vd., 2012). Yıldırım ve çalışma grubu (2012) ise siklotrifosfazen türevlerinin antikanserojenik etkilerini, yeni dispirobino ve dispiroansa spermin türevlerinin antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda bileşiklerin kayda değer antibakteriyal ve antifungal aktiviteye sahip olmadıklarını belirlemişlerdir.

Avcı (2013), dört dişli ligandların trimer ile etkileştirilmesinden oluşan fosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesi ve DNA ile etkileşimleri araştırmasında 11 farklı fosfazen bileşiğinden (İF1-İF11) İF5, İF6, İF7 ve İF8 bileşiklerinin antimikrobiyal

aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Çalışılan bileşikler arasında en fazla sayıda mikroorganizmaya karşı etki gösteren ve en geniş inhibisyon zonu oluşturan İF6'nın en etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşik olduğunu tespit etmiştir. Bileşiklerin pBR322 plazmid DNA'ya etkileri maddelerin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak DNA'yı parçalama ve kesme şeklinde etkiler gösterdiklerini belirtmiştir. Ayrıca bu maddelerin varlığında hem BamHI hem de HindIII kesimi gözlenmiştir.

Brandt ve çalışma grubu (2001), taç taşıyan siklotrifosfazenlere azidiril gruplarının ekleyerek elde ettikleri fosfazen türevlerinin AIDS ilişkili lenf kanserinde tümör büyümesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir ve ayrıca DNA üzerinde etkili olduğunu gözlemlenmişlerdir. Aziridinilsiklofosfazen ilaçların terapötik özelliklerini geliştirmek için daha ileri olasılıklar aramışlardır.

Yapılan diğeri bir çalışmada çok dişli siklotrifosfazen ligandlar ile yapılan çalışmada sentezlenen beş dişli çok çekirdekli siklotrifosfazen ligandların Cu kompleksleri varlığında plazmid DNA üzerindeki kesimin etkili olduğu ve test edilen bileşiklerin fizyolojik koşullar altında plazmid DNA'nın kesimi için güçlü bir katalizör olarak fonksiyon yapacakları belirtilmiştir (Wang vd., 2009). Yine Wang ve çalışma grubu (2009)'da siklotrifosfazen ligandların DNA kesimi üzerine yaptıkları çalışmada, çok çekirdekli siklotrifosfazen ligantları sentezlemişler ve yapay nükleaz enzim modeli olarak kullanıldığında özellikle metal kompleksleri varlığında pUC19 plazmid DNA'sının ligandlarca etkili biçimde kesildiğini rapor etmişlerdir (Wang vd., 2009).

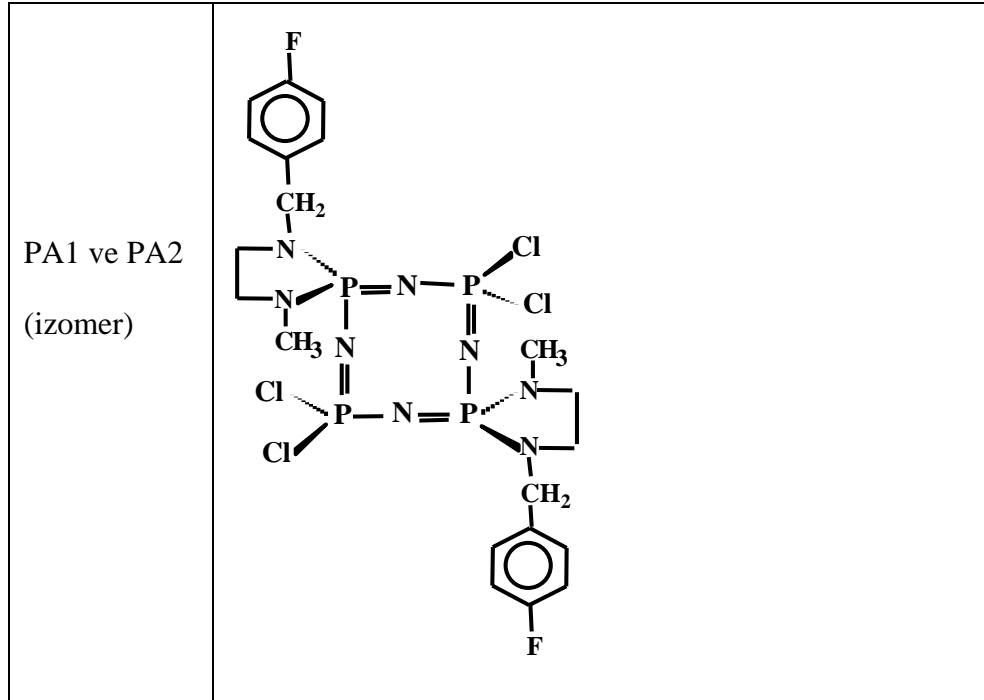
Yang ve çalışma grubu (2010), bazı polifosfazenlerin DNA üzerinde transfeksiyon aktivitesi çalışmalarında tek birincil (1°) amino grupları olan veya çok sayıda birincil (1°) amino grubu taşıyan polimerlerin, çoğunlukla veya tamamen ikincil (2°) veya üçüncül (3°) amino grupları olanlardan daha etkili biçimde DNA'ya bağlandıklarını rapor etmişlerdir. Zhu ve çalışma grubu (2011) çalışmasında iki yeni siklotetrafosfazen türevini sentezlemişler ve pUC19 plazmid DNA'sını Cu²⁺ kompleksi ile kesimi etkilediğini belirtmişlerdir. Cu²⁺ kompleksinin tek başına DNA kesiminde etkili olmadığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca DNA kesiminin bileşik/Cu²⁺ kompleksinin konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını veya azaldığını belirtmişlerdir. Kendi trimer analoglarında, esnek sekiz elemanlı bir halka ihtiva eden siklotetrafosfazenlerin, katı düzlemsel altı elemanlı halka bulunduranlardan daha etkili DNA kestini belirtmişlerdir.

2. MATERYAL ve METOD

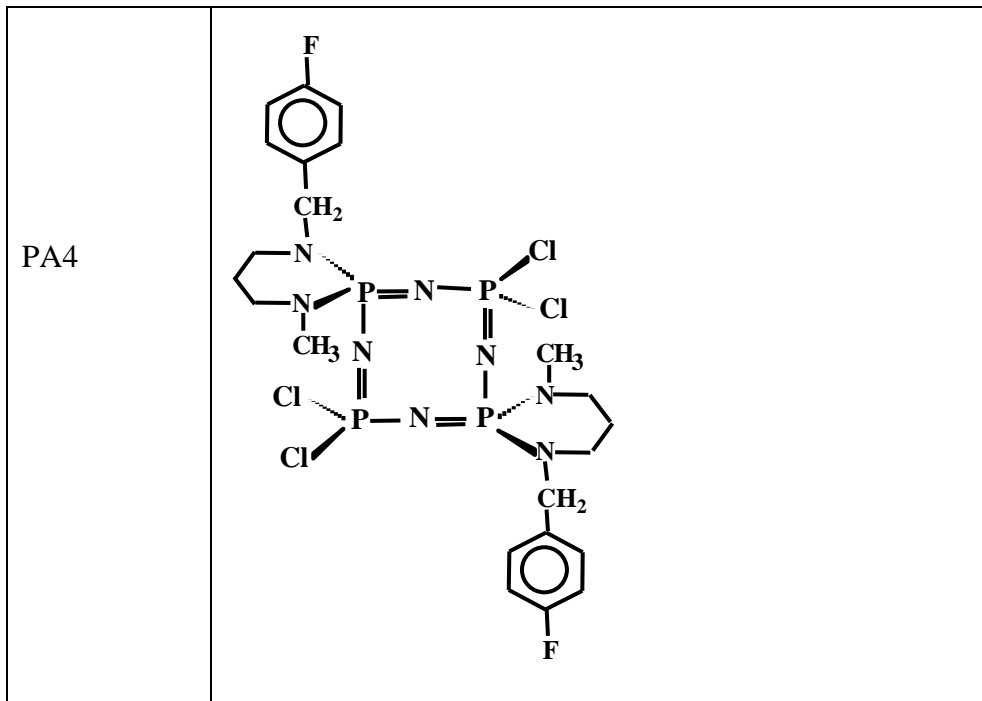
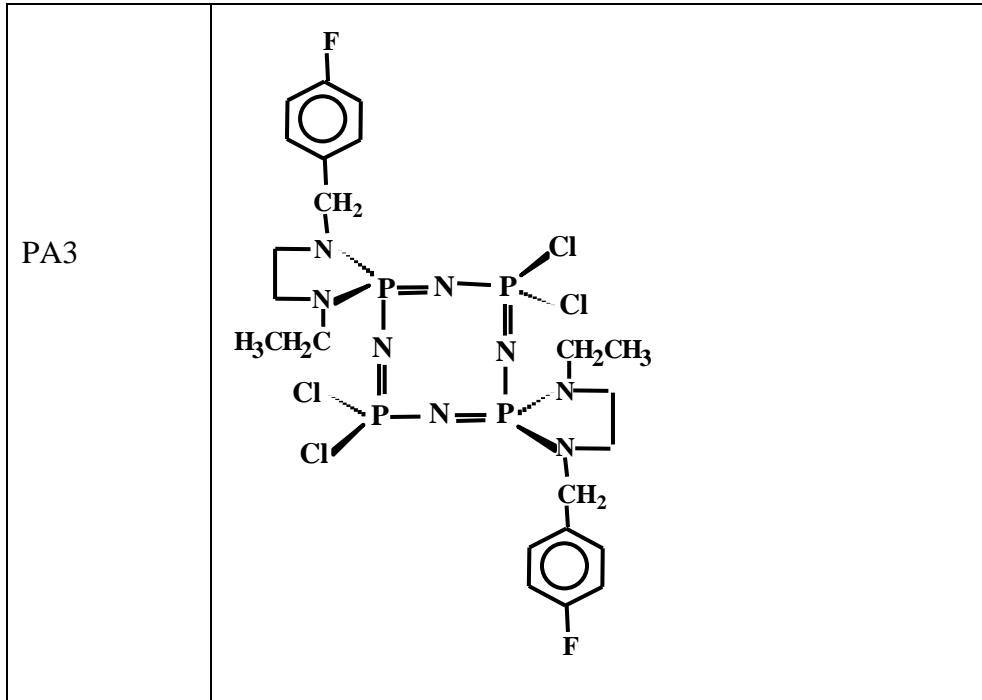
2.1. Materyal

2.1.1. Fosfazenler

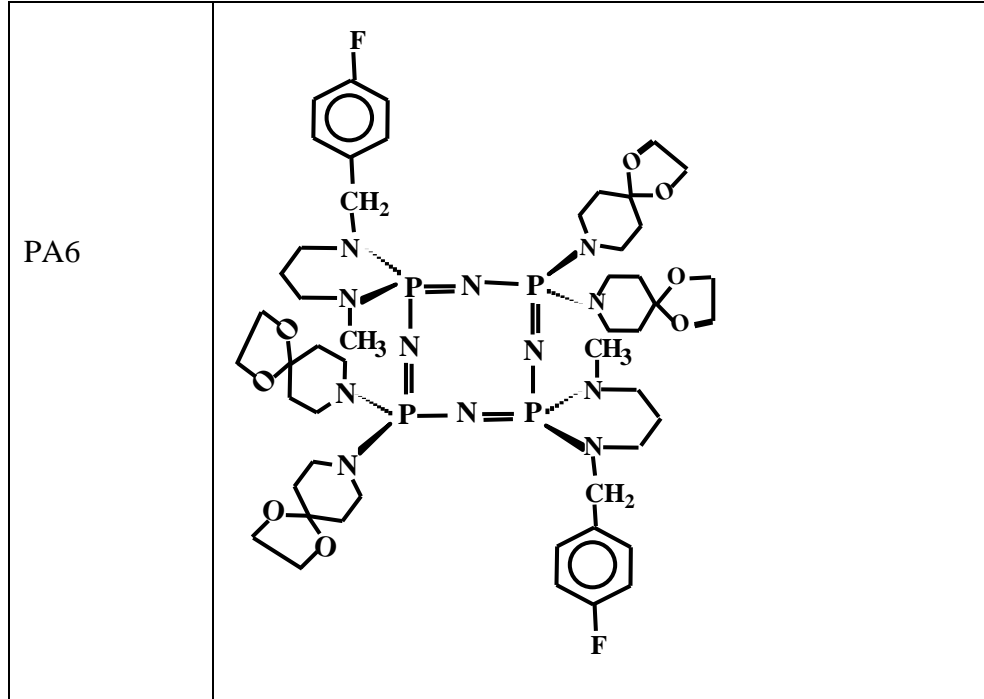
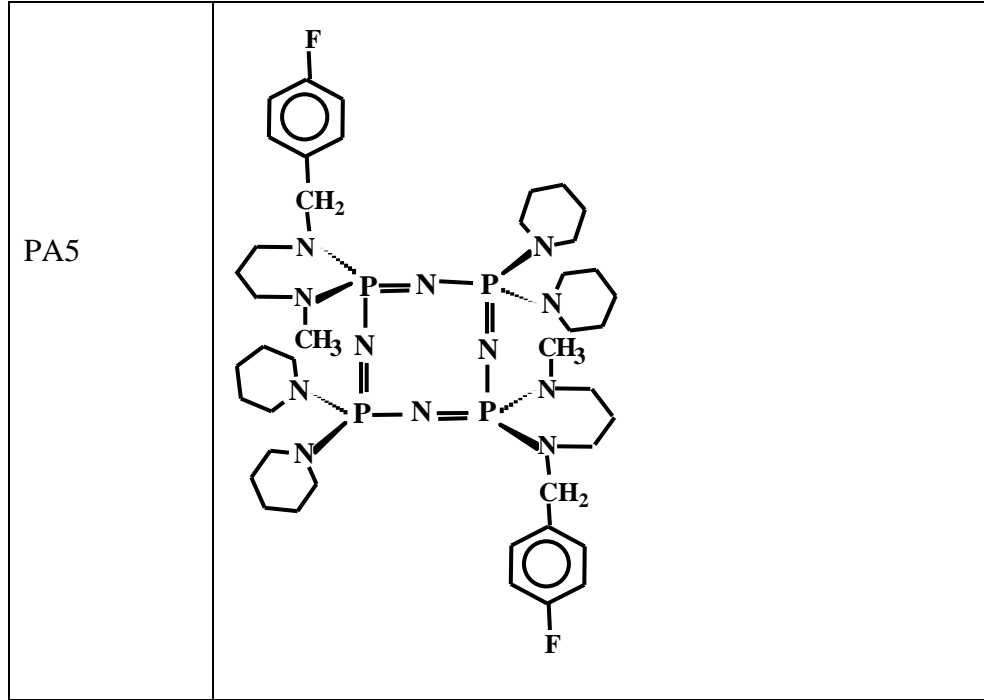
Araştırma materyali olarak kullanılan orijinal fosfazen bileşikleri Prof. Dr. Zeynel KILIÇ ve Dr. Nuran Asmafiliz tarafından Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü laboratuvarlarında sentezlenmiştir. PA1, PA2, PA3, PA4, PA5 ve PA6 olarak adlandırdığımız 6 farklı fosfozen bileşiği ve çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bileşiklerin açık yapıları Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. (devamıdır)



Şekil 2.1. (devamıdır)



Şekil 2.1. Çalışmamızda kullanılan yeni sentezlenmiş PA1 PA2 PA3 PA4 PA5 PA6 bileşiklerinin açık formülleri

2.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Araştırmada *Bacillus subtilis* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (NRLL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* olmak üzere 9 adet patojen bakteri ve *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) ile *Candida krusei* (34135) olmak üzere 3 maya suşu kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 2.1. Biyolojik aktivite için kullanılan mikroorganizmalar

	Mikroorganizmalar	Suş No	Ortam	Sıcaklık	
1	<i>Bacillus cereus</i>	NRRL-B-3711	MHA *	37 °C	Patojen
2	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	MHA	37 °C	Patojen
3	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	MHA	37 °C	Patojen
4	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	MHA	37 °C	Patojen
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 292112	MHA	37 °C	Patojen
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	MHA	37 °C	Patojen
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	MHA	37 °C	Patojen
8	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	MHA	37 °C	Patojen
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	MHA	37 °C	Patojen
10	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	SDA **	30 °C	Patojen
11	<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803	SDA	30 °C	Patojen
12	<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	SDA	30 °C	Patojen

*MHA=Mueller Hinton Agar

**SDA= Sabouraud Dekstroz Agar

2.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

Çalışmamızda Nutrient agar, Nutrient broth, Saboroud dekstroz agar, Sodyum klorür (NaCl), Dimetil sülfoksit (DMSO), Distile su, Agaroz, Tris Asetat EDTA (TAE), Brom fenol blue ve Etidyum bromür kullanıldı.

2.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar

Çalışmamızda; otoklav, etüv, spektrofotometre, hassas terazi, mikrodalga fırın, manyetik karıştırıcı, yatay elektroforez, güç kaynağı, derin dondurucu, ısıtmalı karıştırıcı, vortex, mikrosantrifüj, pipetler, pipet uçları, petri kapları, şırınga filtreleri, şırıngalar, ependorf tüpler, balon joje, beher, cam şişe, öze, drigalsky öze, steril cerrahi eldiven ve buzdolabı (+4) kullanıldı.

2.2. Metotlar

2.2.1. Maddelerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi

Çalışmada bakterilerinin gelişmesi için Nutrient agar ve Nutrient broth kullanıldı. Nutrient agardan 28 gr alınıp 1000 ml saf su içinde karıştırılarak çözülmesi sağlandı. Besiyerleri hazırlandıktan sonra 121⁰C'de, 1.5 Atm basınçta, 15 dakika steril edildi. Steril petri kaplarına yaklaşık 25ml olacak şekilde döküldü, katılaştıktan sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi. Nutrient broth 8 gr alınıp 1000 ml saf su içinde karıştırarak çözülmesi sağlandı ve kapaklı tüplere 5 ml konularak steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

2.2.1.1. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi

Çalışmada kullanılan bakteriler ve mayalar stok kültürlerin aktive edilmesiyle elde edilmiştir. Aktifleştirmede bakteriler için Nutrient agar, mayalar için Saboroud dekstroz agar kullanılarak hazırlanan besiyerlerine ekilerek etüvde bakteriler 37⁰C'de 24 saat, mayalar 30⁰C'de 48 saat inkübe edildi. % 0,9'luk NaCl (serum fizyolojik) çözeltisi hazırlanarak, besiyerlerinde tek koloni düşen mikroorganizmalar öze yardımıyla çözeltilmeye alınmıştır. Mikroorganizma süspansiyonu 0,5'lik McFarland standardına göre ayarlanmıştır.

Agar kuyucuk yönteminde 0,5 McFarland standardına göre ayarlanan mikroorganizma süspansiyonlarından 100µl alınarak besiyerine drigalski özesiyle petrilere yayılmıştır. 6 mm çapındaki delgeç ile besiyerlerinin belirli noktalarında

kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuklara farklı? konsantrasyondaki fosfazen bileşikleri konulmuştur. Bakteriler 37⁰C'de 24 saat, mayalar 30⁰C'de 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan zonların çapları mm olarak ölçülmüştür. Bakterilerin pozitif kontrol büyümeleri için kloramfenikol ve ampisilin kullanılırken mantar türleri için ketokanozol antibiyotik diskleri kullanıldı.

2.2.1.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) yöntemi

Fosfazen bileşiklerinin herbiri için 2500 µM konsantrasyonundan başlayarak DMSO ile 9 adet seyreltme yapılmıştır. Katı besiyerinden % 0,9 NaCl'ye öze yardımıyla ekilen bakteriler 0,5 Mc Farland standardına göre ayarlandı. 96 kuyucuk içeren petrielerin her bir kuyucuğuna 95 µl nutrient broth konuldu. Seyreltilen bileşiklerden 100 µl ilave edildi. Üzerine bakteri içeren süspansiyondan 5 µl eklenerek spektrofotometre cihazında absorbansı ölçüldü. Negatif kontrol olarak DMSO kullanıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra tekrar spektrofotometre cihazında absorbansı ölçüldü. İnkübasyon öncesi ve sonrası çıkan değerler karşılaştırıldı (C.A.L.S. Institute, 2012). Aynı işlem mayalar için de yapıldı. Ancak bakterilerle yapılan işlemde farklı olarak Sabouroud Dextrose Broth besiyeri kullanıldı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Yine inkübasyon öncesi ve sonrası çıkan değerler karşılaştırıldı. Böylece minimum inhibisyon konsantrasyon ve minimum bakterisidal konsantrasyon değerleri tespit edildi (C.A.L.S. Institute, 2008). MİK değeri büyümenin olmadığı en düşük konsantrasyon olarak tanımlanırken; MBK değeri ise tüm bakterilerin tamamen öldüğü en düşük konsantrasyon olarak tanımlanmıştır.

2.2.2. Maddelerin DNA etkileşiminin belirlenmesi

DMSO çözücüsünde çözülerek 2500 µM olarak hazırlanan bileşikler pBR322 plazmid DNA üzerinde etkisi araştırıldı. 4 farklı (2500, 1250, 625 ve 312 µM) konsantrasyondaki bileşikler pBR322 plazmid DNA ile 37 C'de inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda agaroz jel elektroforezi koşuturuldu ve oluşan bantlar incelendi. Kontrol olarak bileşik ile etkileşime sokulmamış pBR322 plazmid DNA'sı jeldeki birinci kuyucuğa konuldu.

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler:

- **Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH: 8,0):** 242 g Tris, 57,1 ml glasiyal asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH 8,0) distile su içerisinde çözülerek hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
- **Agaroz:** %0,8 ve %2'lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.
- **Yükleme tamponu:** 40 g. sükroz, 0,025 g. bromofenol mavisi, 0,25 g. ksilensiyanol 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.
- **Etidyum bromür:** 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi

% 1 (w/v) agaroz, TAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra jel tabağına döküldü. Polimerizasyon için oda sıcaklığında yaklaşık 45 dakika beklendi. Jelin polimerizasyonundan sonra jel tabağı elektroforez tankına yerleştirildi. Bileşik-DNA solüsyonu ile yükleme tamponu karıştırılarak jelde oluşan kuyucuklara yüklendi ve TAE tamponu içinde 40-90 V uygulanarak 3-4 saat süre ile doğru akımda koşturuldu. 0,5 µg/ml Etidium bromür solüsyonu ile jel birkaç dakika bekletilerek boyama yapıldı. Daha sonra jellerin görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra BioDoc Analyze, Goettingen, Germany) görüntüleme cihazında yapıldı ve bilgisayar ortamında fotoğrafları çekildi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

PA1, PA2, PA3, PA4, PA5 ve PA6 bileşikleri DMSO çözücüsünde çözülerek 2500 µM stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu bileşikler için Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi 3 tekrarlı olarak kullanılmış ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilmiştir. PA3 ve PA6 bileşiklerinin petri kutularında 37°C ve 24 saat inkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zon görüntüleri Şekil 3.1’de görülmektedir. PA1 altı, PA2 dört, PA3 beş, PA5 bir ve PA6 üç farklı bakteri suşuna 9 ila 11 mm arasında değişen zonlar oluştururken PA4 bileşiği hiçbir test bakterisine etki göstermemiştir. Öte yandan bileşiklerin hiçbirinin antifungal aktivite göstermediği belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak DMSO kullanılmış ve herhangi bir etki gözlenmemiştir. Antibakteriyal aktivite gösteren bileşiklerden PA1, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* (ATCC 35218), *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* ile 10 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken *Salmonella typhimurium* ile 11 mm inhibisyon zonu oluşumuna neden olmuştur. PA5 bileşiği ise sadece *P. aeruginosa* ile 10 mm çapında inhibisyon zonu oluşturmuştur. PA6 bileşiği ise *B. cereus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* (ATCC 35218) test bakterilerine karşı 10 mm çapında inhibisyon zonları oluşturmuştur. Bileşiklerin antibakteriyal inhibisyon zonları ortalama 10 mm çapında gözlenmiştir. Sadece PA2 bileşiği *B. cereus* ve *B. subtilis* bakteri türlerine karşı 9 mm çapında inhibisyon zonları oluşturmuştur. PA3 bileşiği ise *P. aeruginosa* ile 11 mm çapında inhibisyon zon oluşturarak ortalama zondan fazla olmuştur. Pozitif kontrol amaçlı kullanılan ampisilin ve kloramfenikol antibiyotikleri test bakterilerine karşı yüksek seviyede inhibisyon zonları oluşturmuşlardır. En yüksek inhibisyon zonu Ampisilin antibiyotiği 60 mm inhibisyon zonu ile *Pseudomonas aeruginosa*’ya karşı gösterirken en düşük inhibisyon zonu ise kloramfenikol antibiyotiği 8 mm çapında *E. coli* (ATCC 35218) bakterisi etrafında gözlenmiştir. Bunun yanında antifungal aktiviteyi ölçmek için kullanılan Ketokanazol antibiyotiği test edilen tüm maya türlerine karşı etki göstermiş ve en yüksek inhibisyon zonu ise *Candida tropicalis* türü 34 mm çapı ile etrafında gözlenmiştir. İnhibisyon çapları incelendiğinde antimikrobiyal aktivite gösteren tüm bileşiklerin (PA1, PA2, PA3, PA5 ve PA6) *P. aeruginosa* bakterisine karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Çalışılan bileşikler arasında en fazla sayıda

mikroorganizmaya karşı etki gösteren PA1 bileşiğinin en fazla antibakteriyal aktiviteye sahip bileşik olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 3.1., Çizelge 3.2. ve Şekil 3.1.).

Çizelge 3.1. Bileşiklerin test bakterilerine karşı göstermiş oldukları antibakteriyal aktivite inhibisyon zon çapları (mm) (2500 µM)

Bileşikler	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
Ampicillin (PK*)	-	-	23 ± 1	18 ± 0	44 ± 1	27 ± 0	60 ± 0	-	19 ± 1
Kloramphenicol(PK)	8 ± 0	-	21 ± 0	25 ± 0	24 ± 1	20 ± 0	34 ± 0	31 ± 1	38 ± 1
DMSO(NK**)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA1	10 ± 0	10 ± 1	10 ± 0	-	-	-	10 ± 1	10 ± 0	11 ± 1
PA2	-	9 ± 0	9 ± 0	-	-	10 ± 1	10 ± 0	-	-
PA3	10 ± 1	10 ± 1	9 ± 0	-	-	10 ± 1	11 ± 1	-	-
PA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA5	-	-	-	-	-	-	10 ± 0	-	-
PA6	10 ± 0	10 ± 0	-	-	-	-	11 ± 0	-	-

*PK: Pozitif Kontrol

**NK: Negatif Kontrol

Çizelge 3.2. Bileşiklerin test maya türlerine karşı göstermiş oldukları antifungal aktivite inhibisyon zon çapları (mm)

	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
Ketokanozol	11 ± 1	34 ± 2	18 ± 1
PA1	-	-	-
PA2	-	-	-
PA3	-	-	-
PA4	-	-	-
PA5	-	-	-
PA6	-	-	-



Escherichia coli ATCC 35218



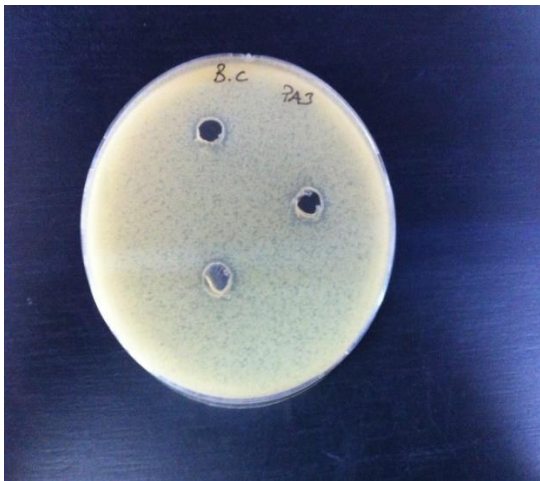
Escherichia coli ATCC 25922



Escherichia coli ATCC 35218



Bacillus cereus



Bacillus cereus



Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Şekil 3.1. PA3 ve PA6 bileşiklerinin farklı patojen bakterilere 37°C ve 24 saat inkübasyondan sonra göstermiş oldukları antibakteriyal aktivite sonuçları

3.2. Bileşiklerin Mikroorganizmalar Üzerindeki MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri gözlenen bileşiklerin MİK değerleri için aynı yöntem uygulanmıştır. 2500 µM konsantrasyona sahip bileşik kullanılarak inhibisyon zonu oluşmasına neden olan bileşikler için 1250 µM konsantrasyonundan başlayarak 9,76 µM konsantrasyona kadar DMSO ile 8 adet seyreltme yapılmıştır. Bulunan minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Aynı şekilde minimum bakterisidal konsantrasyon değerleri (MBK) bileşikler için test yapılmış ve hesaplanmıştır (Çizelge 3.4). Çizelge 3.3 ve 3.4'de görüldüğü gibi PA1 bileşiğinin *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Enterococcus faecalis* bakterileri hariç tüm test bakterilerine karşı MİK değerleri belirlenmiştir. PA2 bileşiğinin ise 9 test bakterisinden 5'i (*Escherichia coli* ATCC35218, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*) hariç diğer test bakterileri için MİK değerleri belirlenmiştir. PA3 bileşiğinin 4 test bakterisi (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella typhimurium*) hariç diğer test bakterileri için MİK değerleri belirlenmiştir. PA4 herhangi bir aktivite göstermezken PA5 sadece *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 karşı aktivite göstermiş ve MİK değeri 156 µM olarak belirlenmiştir. PA6 bileşiğinin *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakterilerine karşı 312,5 µM MİK değeri verirken *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bakterisine karşı ise 156 µM MİK değeri belirlenmiştir. Diğer yandan Bileşiklerin MİK değerleri genelde ya 625 µM ya da 312,5 µM olarak gözlenmiştir. PA5 ve PA6 bileşikleri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 bakterisine karşı MİK değerleri 156 µM olarak belirlenmiştir.

Bileşiklerin Minimal Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) değerleri yine MİK değerleri ile paralelik arz etmiştir. En yüksek MBK değeri >1250 µM olarak belirlenirken en düşük MBK değeri 156 µM (PA6 bileşiği *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bakterisi için gözlenmiştir) olarak belirlenmiştir. Sentezlenen bileşikler için ölçülen MBK değerleri çoğunlukla 1250 µM olarak belirlenirken PA1 bileşiği bir (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ve PA6 bileşiği ise iki (*Escherichia coli* ATCC 35218 ve *B. cereus*) test bakterisine karşı MBK değerleri 625 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4). MBK değerleri dikkate alındığında PA1 bileşiği en fazla

sayıda test bakterisine karşı hem bakterisidal hem de inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Test mikroorganizmalarının göstermiş oldukları mikrobiyal aktivite, MİK ve MBK değerleri Çizelge 3.5’te kıyaslamalı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3. Bileşiklerin Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri (μM)

Bileşikler	<i>Escherichia coli</i> ATCC35218	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
PA1	625 μM	625 μM	312,5 μM	-	-	-	312,5 μM	625 μM	625 μM
PA2	-	625 μM	625 μM	-	-	312,5 μM	625 μM	-	-
PA3	625 μM	312,5 μM	625 μM	-	-	625 μM	312,5 μM	-	-
PA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA5	-	-	-	-	-	-	156 μM	-	-
PA6	312,5 μM	312,5 μM	-	-	-	-	156 μM	-	-

Çizelge 3.4. Bileşiklerin Minimal Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) Değerleri (µM)

Bileşikler	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27062	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
PA1	1250 µM	>1250 µM	1250 µM	-	-	-	625 µM	1250 µM	1250 µM
PA2	-	>1250 µM	>1250 µM	-	-	1250 µM	1250 µM	-	-
PA3	1250 µM	>1250 µM	>1250 µM	-	-	1250 µM	312,5 µM	-	-
PA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA5	-	-	-	-	-	-	312,5 µM	-	-
PA6	625 µM	>625 µM	-	-	-	-	156 µM	-	-

Çizelge 3.5. Bileşiklerin test bakterilerine karşı göstermiş oldukları Mikrobiyal aktivite, Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) değerleri

Bileşikler	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218			<i>Bacillus cereus</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			<i>Enterococcus faecalis</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Salmonella typhimurium</i>		
	MA*	MİK	MBK	M	MİK	MBK	M	MİK	MBK	M	MİK	MBK	M	MİK	MBK	M	MİK	MBK	M	MİK	MBK	M	MİK	MBK	M	MİK	MBK
PA1	10	625	1250	10	625	>1250	10	312,5	1250	-	-	-	-	-	-	-	-	10	312,5	625	10	625	1250	11	625	1250	
PA2	-	-	-	9	625	>1250	9	625	>1250	-	-	-	-	-	10	312,5	1250	10	625	1250	-	-	-	-	-	-	
PA3	10	625	1250	10	312,5	>1250	9	625	>1250	-	-	-	-	-	10	625	1250	11	312,5	312,5	-	-	-	-	-	-	
PA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PA5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	156	312,5	-	-	-	-	-	-	
PA6	10	312,5	625	10	312,5	>625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	156	156	-	-	-	-	-	-	

MA, Mikrobiyal Aktivite (mm); MİK, Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (μM); MBK, Minimal Bakterisidal Konsantrasyonu (μM)

*Bu sütunda yer alan değerler ± 1 şeklindedir.

3.3. Bileşiklerin DNA ile Etkileşimleri

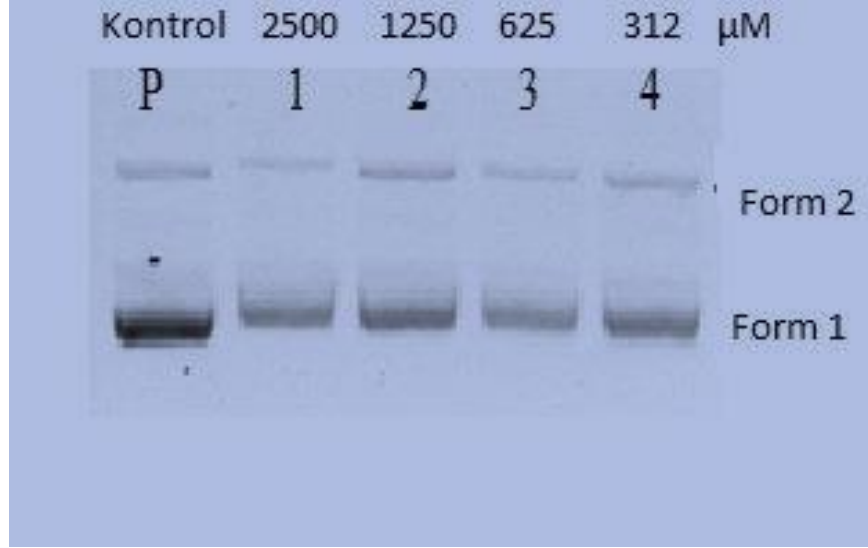
DMSO çözücüsünde çözülerek 2500 µM stok konsantrasyonda olarak hazırlanan PA1, PA2, PA3, PA4, PA5 ve PA6 bileşiklerinin pBR322 plazmid DNA üzerine etkisi agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir. Bileşiklerin dimetilsülfoksit (DMSO) içerisindeki çözeltileri 2500, 1250, 625 ve 312 µM olacak şekilde 4 farklı konsantrasyonda hazırlandıktan sonra plazmit DNA ile 37°C’de inkübasyona bırakılmış ve %1’lik agaroz jel elektroforezde yürütülerek etkileşim belirlenmiştir. Bahsi geçen konsantrasyonlarda PA1, PA2, PA3, PA4, PA5 ve PA6 bileşiklerinin plazmid DNA’nın jel kuyucuklarına hapsedmesi nedeniyle, bu bileşikler için 2500 µM’dan başlayan 4 seyreltme kullanılarak elektroforetik çalışma tekrarlanmıştır.

Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimlerini gösteren elektrofotogramlar Şekil 4.2 ve 4.3’de verilmiştir. PA1 bileşiği plazmid DNA ile 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda yapılan elektroforezle bu maddelerle DNA arasında oluşan etkileşim Şekil 4.2’de gösterilmektedir.

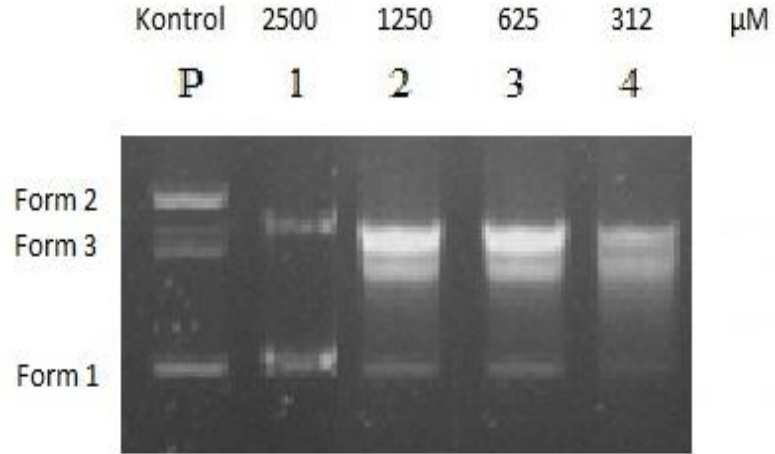
24 saatlik inkübasyon sonucu PA1 bileşiğinin plazmid DNA’yı hiçbir konsantrasyonda etkilemediği belirlendi. Fakat PA2 tüm konsantrasyonlarda plazmid DNA’nın Form I’i tamamen parçalarken Form II’nin yoğunluğunu azaltmıştır ve Form 3 band oluşturdu. PA2 bileşiği plazmid DNA Form I ve Form II bandlarının hareketini etkilediği ve hareketliliğin de arttığı görülmektedir. Yine PA1 bileşiğinin farklı konsantrasyonları plazmid DNA hareketini çok az etkilediği Şekil 4.2.’de görülmektedir. Yukarıda etkilemediği yazıyor PA1 ve PA2 bileşikleri izomer olmasına rağmen hem mikrobiyal aktivite hem de DNA etkileşmesi üzerine farklı yönden etki gösterdi.

PA3 ve PA4 bileşiklerinin plazmid DNA üzerine olan etkisi PA2 bileşiklerinin etkisine benzer sonuçlar vermiştir (Şekil 4.4.). 24 saatlik inkübasyon sonucu en yüksek konsantrasyonda PA3 plazmid DNA’yı tamamen parçalarken, diğer konsantrasyonların plazmid DNA’nın hareketini yavaşlattığı görülmektedir. PA4 bileşiği ise en yüksek konsantrasyonda (2500 µM) plazmid DNA’yı parçalarken diğer konsantrasyonları (1250, 625 ve 312 µM) DNA’nın hareketini azalttığı Şekil 4.4.’te görülmektedir. PA5 ve PA6 bileşikleri Şekil 4.5.’te görüldüğü gibi plazmid DNA’sıyla herhangi bir etkileşime girmediği gözlenmiştir. Bununla birlikte PA5 bileşiğinin en yüksek iki konsantrasyonunun (2500 ve 1250 µM) Form I yoğunluğunu azalttığı gözlenirken PA6

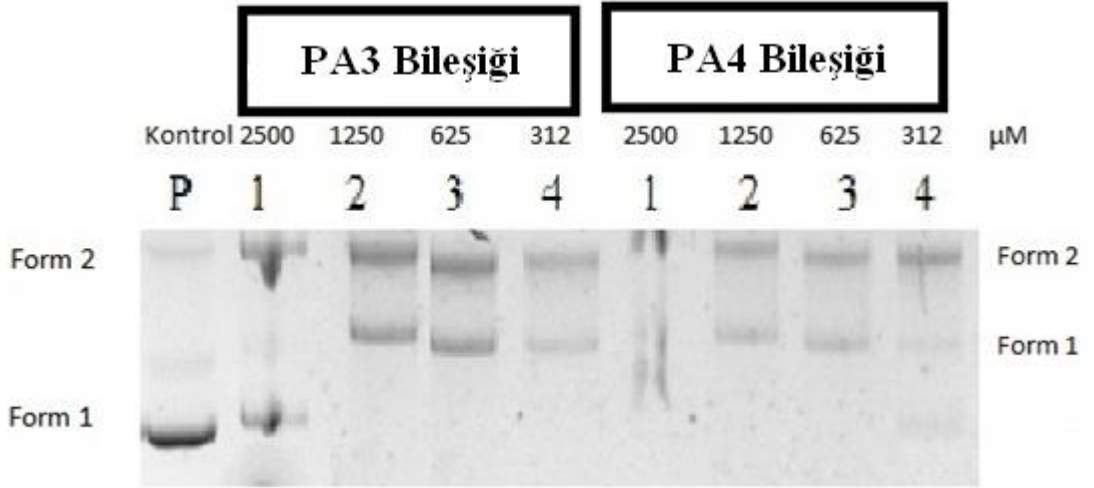
bileşiminin tüm konsantrasyonlarının Form I bandının yoğunluğunu azalttığı gözlenmiştir. Her iki maddenin herhangi bir konsantrasyonu plazmid DNA hareketliliğini etkilememiştir.



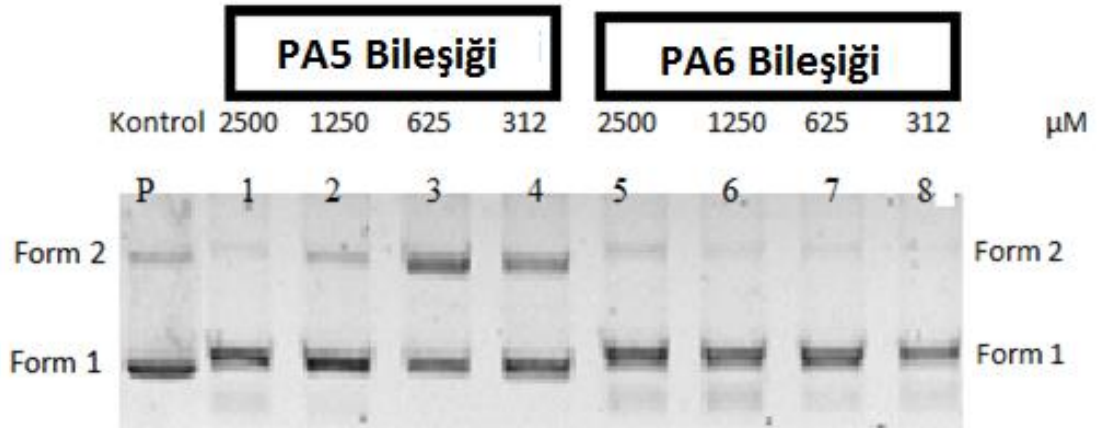
Şekil 3.2. PA1 (1-4) bileşiminin pBR322 plazmid DNA'sı ile 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra etkisinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü



Şekil 3.3. PA2 (1-4) bileşiminin pBR322 plazmid DNA'sı ile 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra etkisinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (P, kontrol)



Şekil 3.4. PA3 (1-4) ve PA4 (1-4, ilk 4'ten sonraki sıralama) bileşiklerinin pBR322 plazmid DNA'sı ile 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra etkisinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (P, kontrol)



Şekil 3.5. PA5 (1-4) ve PA6 (5-8) bileşiklerinin pBR322 plazmid DNA'sı ile 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra etkisinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (P, kontrol)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde ilaçlara karşı patojen mikroorganizmalarda dayanıklılığın gelişmesi ve yeni antibiyotiklerin keşfedilmesindeki yetersizlik yeni aktif bileşiklerin sentezlenmesini zorunlu kılmaktadır. Mevcut antimikrobiyal ilaçlar için sınırlı pazarda kar hesabı yapılmadan yeni düzenlemelerin yapılması gerekir. Son 20 yılda ilaç firmaları yeni antibiyotikleri keşfetmekten ziyade kronik hastalıkları (hipertansiyon, diyabet, dislipidemia-kandaki yağ oran değişiklikleri-, psikiyatrik hastalık gibi) tedavi etmek için yüksek kar oranları olan ilaçlar geliştirmişlerdir (Spellberg vd., 2004). Muhtemelen benzer nedenlerle, az gelişmiş ülkelerde eski antibiyotiklerin piyasadan çekilmesi ya da eksikliği ortaya çıkmıştır (Pulcini vd., 2012). Günümüzde bazı antibiyotikler (fusidic acid, intravenous fosfomycin, pivmecillinam, temocillin, pristinamycin gibi) etkili ve güvenilir olmasına rağmen, kullanımları FDA (ABD Besin ve İlaç Müdürlüğü) tarafından onaylanmamaktadır. Farmasikinetik ve farmasodinamik açıdan; antibiyotiklerin terapide kullanılırken optimizasyonu ve terapatik sonuçlarının belirlenmesi gerekir. Antibiyotiklerin düşük konsantrasyonda kullanımları hem patojen hem de kommensal florada dayanıklılığın gelişmesini artırdığı bilinen gerçektir (Mouton vd., 2011; Mohamed vd., 2012). Yeni antimikrobiyal maddelerin tedavi amaçlı kullanımında ve antimikrobiyal dirençliliğin engellenmesinde bazı noktalar kritik öneme sahiptir. Bu kritik noktaların ilki; klinik güvenilirlik ve maliyetlerin kıyaslanması ikincisi ise bu maddelerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanımının takip edilmesi ve gözetilmesi gerekir. Üçüncü olarak optimizasyon önemli faktördür (Cassir vd., 2014).

Ülkemizde de bakteriyal dirençlilik dünyada olduğu gibi etkili bir sorundur. Çalışmamızda yeni sentezlenen bazı fosfazen bileşikleri (PA1, PA2, PA3, PA4, PA5 ve PA6) insan patojeni bakteriler olan, *Bacillus subtilis* (ATCC29213), *Bacillus cereus* (NRLLB-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC35218), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Pseudomonas aureginosa* (ATCC27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* olmak üzere 9 adet patojen bakteri ve *Candida albicans* (ATCC10231), *Candida tropicalis* (ATCC13803) ile *Candida krusei* (34135) mayaları üzerindeki biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca, bileşiklerin, plazmid DNA üzerine etkileri ve etkileşimleri

incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre PA4 dışındaki maddelerin, patojen bakteriler üzerine etkili olduğu görülmüştür. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları; hücre duvarının sentezini engelleyerek, zar geçirgenliğini bozarak, protein sentesini inhibe ederek ya da nükleik asitlerin yapısını bozmak suretiyle gerçekleşebilir. Bir bileşiğin antimikrobiyal aktivitesi ise bileşiğin sterik, elektronik ve farmasokinetik faktörlerin kombinasyonuna bağlıdır. Antibiyotik maddeler hücredeki hidrojen alıcı/verici atomlarla ilişkiye girererek H bağı oluşturmak suretiyle normal hücre faaliyetini engelleyerek de etkisini gösterebilirler. Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre bileşiklerin çoğunluğunun bakteri büyümesini inhibe ettiği görülürken mantar türlerine etki göstermediği gözlenmiştir. Fosfazen türlerinin bakterilere karşı etkili olması bileşiklerin kimyasal yapısından kaynaklandığı Mutlu ve çalışma grubunca (2015) rapor edilmiştir. Yaptıkları çalışmada sentezledikleri spiro-bino-spiro ve 2,6-spiro-ansa-spiro fosfazen bileşiklerinin 7 bakteri ve 3 mantara karşı etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Mevcut çalışmada benzer bakteriyel aktivite görülürken sentezlenen bileşiklerin maya türlerine karşı etkili olmadığı gözlenmiştir. Bu bileşiklerin bakteri hücre moleküllerinin aktif bölgeleri ile yaptıkları H bağı nedeniyle etkili oldukları düşünülmektedir. Sentezlenen fosfazen bileşikleri arasındaki farklı bağların antimikrobiyal potansiyellerini etkilediği görülmektedir. Mutlu ve çalışma grubu (2015) sentezledikleri fosfazen (spiro-bino-spiro ve 2,6-spiro-ansa-spiro) türevlerinin akciğer kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkileşimlerini incelemiş 100 µg/ml konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerinin düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Fosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine oldukça sınırlı sayıda çalışmalar yapılmıştır. Allcock ve çalışma grubu (1992), suda çözünen bazı fosfazen bileşiklerinin bazı bakteriler üzerine antibakteriyel etkilerini yüksek konsantrasyonda gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Koçak ve çalışma grubu (2013) fosfazen türevlerinin 6 patojen bakteri suşuna ve 2 maya suşun karşı mikrobiyal aktivite gösterdiğini rapor etmiştir. Brandt ve çalışma grubu (2001) çalışmasında da bazı fosfazen bileşiklerinin HIV virüsü üzerine etkili olduğu rapor etmişlerdir. Durmaz ve çalışma grubu (2007), bazı fosfazenlerin test edilen tüm gram pozitif bakterilere karşı kuvvetli inhibisyon etkisi olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmada kullanılan patojen bir maya olan *C. albicans*'ın da bu bileşiklere hassas olduğu gösterilmiştir. Bulgularımız bileşiklerin bazı bakterilere karşı etkili olmasından dolayı kısmen Durmaz ve çalışma grubunun (2007)

sonuçları ile paralellik arz etmektedir. Bazı monofosfazen bileşiklerinin bakteriler ve bazı mantarlara karşı antimikrobiyal ve biyolojik etkileri araştırılmış ve etkinlikleri gösterilmiştir. Bileşiğin antimikrobiyal etkinliği yapısındaki klor atomlarının antiseptik etkisi üzerinden gerçekleştirdiği ve diğer bir bileşiğin ise yapısındaki benzen halkası sayesinde gerçekleştirdiğini bildirmiştir (Konar vd., 2010).

Asmafiliz ve çalışma grubu (2012) sentezledikleri 6 yeni spirociklotrifosfazen bileşiğini, çalışmamızda kullandığımız 8 mikroorganizmaya (2'si maya türü) karşı etkili olmadığını gözlemlemişlerdir. Yine aynı grup farklı bir çalışmalarında (2013) 12 fosfazen türevi bileşiğinin antikanserojenik ve antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir ve bazı türevlerin bakterilere karşı aktif olduğunu bildirmişlerdir. Bulgularımız bazı bakteri ve maya türlerine karşı bileşiklerin inaktif olması açısından benzerlik göstermektedir. Bunun sebebi farklı nedenlerden dolayı olabilir. Özellikle ökaryotik bir canlı olan maya türlerinin dış membranlarının koruyucu etkisi olabilir. Ayrıca bütün antimikrobiyal ajanlar bakteri ve maya hücrelerine karşı toksisite açısından seçici olabilirler. Yine bir hücrenin antibiyotik veya antimikrobiyal bileşiğe karşı dirençliliği, ya bileşiğin hücreye girememesi ya da hücreye girdikten sonra hücre içi transferi olmaması bu duruma neden olabilir. Bilindiği üzere bütün antimikrobiyal bileşikler protein, DNA veya folik asit sentezini engelleyerek etkisini gösterirler. Bunlara ek olarak hücrede sentezlenen bazı enzimler antimikrobiyal bileşikleri inaktif forma dönüştürebilirler (Asmafiliz vd., 2012).

Sentezlenen bileşiklerin genotoksik etkilerinin belirlenebilmesi için agaroz jel elektroforezi kullandığımız çalışmamızda fosfazen bileşiklerinin plazmid DNA'daki yapısal değişiklikleri ölçüldü. Plazmid DNA, agaroz jelde koşturulduğunda elektriksel alanda pozitif yöne doğru hareket eder. Bu tamamen plazmidlerin farklı formlarının jeldeki göç sırası, agaroz konsantrasyonu, DNA'nın büyüklüğüne uygulanan akım ve tamponun iyonik kuvvetine bağlıdır. Plazmid DNA jelde yürütüldüğünde; süper sarmal biçim (Form I), gevşek sarmal biçim (Form II) ve doğrusal biçim (Form III) olmak üzere 3 farklı şekilde agaroz jel üzerinde gözlenir (Akerman ve Cole, 2002; Navarro vd., 2003). Genelde herhangi bir muameleye tabii tutulmamış plazmid DNA'sı Form 1 ve Form 2 olmak üzere 2 band şeklinde jelde görünür. Herhangi bir enzim ile muamele edilmiş veya zarar görmüş olan plazmid DNA'sı Form 3 bandı olarak jelde gözlemlenir.

Bazı antibiyotikler DNA'nın yapısını değiştirerek jeldeki hareketini bu şekilde etkiler (Enjun vd., 2009; Huq vd., 2009).

Çalışmada sentezlediğimiz; PA1, PA2, PA3, PA4, PA5 ve PA6 fosfazen bileşikleri plazmid DNA'sına olan etkisini incelemek için kullanıldı. Bileşiklerden sadece PA2 tüm konsantrasyonlarda plazmid DNA'sını etkileyerek Form 3 bandı oluşturdu ve Form 1 band konsantrasyonunu düşürdü (Şekil 4.3). PA5 (2500 ve 1250 µg/ml konsantrasyonları) ve PA6 (2500, 1250, 625 ve 312 µg/ml konsantrasyonları) plazmid DNA'nın Form I yoğunluğunu azaltmışlardır. Yani plazmid DNA'yı kısmi olarak kesmişlerdir ve dolayısı ile doğrusal form oluşmuştur. Diğer bileşiklerin plazmid DNA'sını etkilemediği görüldü (Şekil 4.2, 4.4., ve 4.5). Benzer sonuçlar Mutlu ve çalışma grubunun (2015) test ettiği 22 bileşiğin yarısında gözlenmiştir. Asmafiliz ve çalışma grubu (2012) ise test ettikleri bileşiklerin çoğunluğunun ancak yüksek konsantrasyonda (5000 µg/ml) etkili olduğunu rapor edilmişlerdir. Yine mevcut çalışmamızda PA3 ve PA4 bileşikleri Form 1 DNA'nın hareketini engelleyerek normal DNA'ya kıyasla daha az mesafe kat etmiştir. Koçak ve çalışma grubu (2013) pBR322 plazmid DNA ile yaptıkları çalışmada DNA'yı sas3 ve sbs4 bileşiklerinin kısmi olarak kestiğini belirlemişlerdir.

Bileşikler aktivitelerini pBR322 plazmid DNA'sının nükleotidlerine bağlanarak gösterirler. Nükleotidlere bağlanma sonucu hem DNA'nın yapısını (konformasyonunu) değiştirirler hem de DNA'ya zarar verirler. (Neto ve Lapis, 2009). DNA antimikrobiyal/antibiyotikler için duyarlı hedef bir moleküldür. Bu nedenle, bileşiğin DNA'ya bağlanması ve sonuçta hücre fonksiyonunu baskılaması gerçekleşir. Bu yüzden DNA'yı hedefleyen bileşiklerin antimikrobiyal madde olarak geliştirme ihtimali yüksektir. Çalışmamızın bulguları, özellikle PA2 bileşiği için daha detaylı bilimsel çalışmalar yapılmasını gerektirmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız da PA6 fosfazen bileşiği en az 3 farklı patojen bakteriye karşı mikrobiyal aktivite gösterirken PA1, PA2, PA3 bileşikleri ise en fazla 4 bakteriye karşı aktivite göstermiştir. Her ne kadar bileşikler test edilen 3 farklı mayaya karşı aktivite göstermese de kullandığımız fosfazen bileşiklerinin daha fazla sayıda bakteriye karşı duyarlılık testlerinin yapılması bileşiklerin geleceği açısından önem arz etmektedir. Sentezlenen bileşiklerin, patojen bakterilere karşı etkili olması nedeniyle yeni antibiyotik ilaç üretimi için geliştirilip kullanılabilir.

Özetle; test edilen bileşikler hem patojen bazı bakterikler üzerine aktivite göstermiş hemde bazılarının pBR322 plazmid DNA'yı kısmi de olsa kesmiş ve hareketlerini etkilemişlerdir.

KAYNAKLAR

- Akerman, B., Cole, K. D. 2002. Electrophoretic capture of circular DNA in gels. *Electrophoresis*, 23, 2549-2561.
- Allcock, H. R. 2006. Recent developments in polyphosphazene materials science. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 10, 231-240.
- Allcock, H. R., Napierala, M. E., Cameron, C. G., O'Connor, S. J. M. 1996. Synthesis and Characterization of Ionically Conducting Alkoxy Ether/Alkoxy Mixed-Substituent Poly(organophosphazenes) and Their Use as Solid Solvents for Ionic Conduction. *Macromolecules*, 29, 1951-1956.
- Allcock, H. R., Pucher, S. R., Fitzpatrick, R. J., Rashid, K. 1992. Antibacterial activity and mutagenicity studies of water-soluble phosphazene high polymers. *Biomaterials*, 13, 857-862.
- Amtul, Z., Atta-ur-Rahman, A., Siddiqui, R. A., Choudhary, M. I. 2002. Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 9, 1323-1348.
- Asmafiliz N., Kılıç Z., Hökelek T., Koç, L. Y., Açık, L., Süzen Y., Öner Y. 2013. Phosphorus-nitrogen compounds: Part 26. Syntheses, spectroscopic and structural investigations, biological and cytotoxic activities, and DNA interactions of mono and bisferrocenylspirocyclotriposphazenes. *Inorganica Chimica Acta*, 400, 250-261.
- Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Öztürk, A., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Kısa, Ö., Albay, A., Üstündağ, Z., Solak, A. 2009. O. Phosphorus-Nitrogen Compounds. 18. Syntheses, Stereogenic Properties, Structural and Electrochemical Investigations, Biological Activities, and DNA Interactions of New Spirocyclic Mono- and Bisferrocenylphosphazene Derivatives. *Inorganic Chemistry*, 48, 10102-10116.
- Asmafiliz, N., Kılıç Z., Hayvalı Z., Açık L., Hökelek T., Dal H., Öner Y. 2012. Phosphorus-nitrogen compounds. Part 23: Syntheses, structural investigations, biological activities, and DNA interactions of new N/O spirocyclotriposphazenes. *Spectrochimica Acta Part A*, 86, 2014-228.
- Avcı, O. 2013. Dört dışlı ligandların trimer ile etkileşmesinden oluşan fosfazene bileşiklerinin biyolojik aktivitesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü.
- Barbera, J., Bardají M., Jimenez J., Laguna A., Martinez M.P., Oriol L., Serrano J.L., Zaragoza I., Am J. 2005. *Chem. Soc.*, 127, 8994-9002.
- Basetti M., Merelli M., Temperoni C., and Astilean A., 2013. A New antibiotics for bad bugs: where are we?. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12, 1-22.
- Basetti M., Merelli M., Temperoni C., and Astilean A. 2013. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12, 22, 1- 15.
- Besli, S., Mutlu C., Ibişoğlu H., Yuksel F., Allen C. W. 2015. *Inorg. Chem.* 54, 334.
- Brandt, K., Kruszynski, R., Bartczak, T. J., Porwolik-Czomperlik, I. 2001. AIDS- related lymphoma screen results and molecular structure determination of a new crown ether bearing aziridinylcyclophosphazene, potentially capable of ion-regulated DNA cleavage action. *Inorganica Chimica Acta*, 322, 138-144.

- C.A.L.S. Institute, 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- C.A.L.S. Institute, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standards-third edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Cassir N., Jean-Marc R., Brouqui F. 2014. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Microbiology*, 5, 1-15.
- Chaplin, A. B., Harrison, J. A., Dyson, P. J. 2005. Revisiting the Electronic Structure of Phosphazenes. *Inorganic Chemistry*, 44, 8407-8417.
- Cil, E., Tanyildizi, M. A., Ozen, F., Boybay, M., Arslan, M., Gorgulu, A. O. 2012. Synthesis, Characterization, and Biological-Pharmacological Evaluation of New Phosphazenes Bearing Dioxybiphenyl and Schiff Base Groups. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 34, 476-485.
- Conner, D.A., Welna. D.T., Chang, Y., Allcock, H.R. 2007. *Macromolecules*, 40, 322-328.
- De Visscher, S. H., van Ginkel, R. J., Wobbes, T., Veth, R., ten Heuvel, S. E., Suurmeijer, A., Hoekstra, H. J. 2006. Epithelioid sarcoma: Still an only surgically curable disease. *Cancer*, 107, 606-612.
- Durmaz G., Ateş B., Alataş S., Çetin M. Ş., Begeç S. 2007. 2-Merkaptopirimidin süstitüye fosfazen türevi bileşiklerin antimikrobiyal özellikleri. XXI. Ulusal Kimya Kongresi, Malatya.
- Elmas G., Okumus A., Kılıç Z., Hökelek T., Açık L., Dal H., Ramazanoglu N., Koç, L. Y. 2012. *Inorg. Chem.*, 51, 12841.
- Enjun, L., Mingchang Z., Qiong W., Chin. J. 2009. *Chem.*, 27, 1285-1290.
- Fang, Y.G., Zhang, J., Chen, S.Y., Jiang, N., Lin, H.-H., Zhang, Y., Yu, X.Q. 2007. Chiral multinuclear macrocyclic polyamine complexes: Synthesis, characterization and their interaction with plasmid DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 696-701.
- Gabriel, J. 2007. What is Cancer?. Second Edition, Editor, Gabriel, J., The Biology of Cancer, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 3-10.
- Garlapati, S., Facci, M., Polewicz, M., Strom, S., Babiuk, L. A., Mutwiri, G., Hancock, R. E. W., Elliott, M. R., Gerdts, V. 2009. Strategies to link innate and adaptive immunity when designing vaccine adjuvants. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 184-191.
- Greenwood, N. N., Earnshaw, A. 1997. Chemistry of the Elements, Second Edition. Butterworth-Heinemann, Oxford, 489-546.
- Greish, Y.E., Bender J. D., Lakshmi S., Brown P. W., Allcock H. R., Laurencin C. T. 2005. *Biomaterials*, 26, 1-9.
- Huq, H., Tayyem, J., Yu Q., Beale P., Fisher, K. 2009. *Med. Chem.*, 5, 372-381.
- Işıklan, M., Asmafiliz, N., Özalp, E. E., İlter, E. E., Kılıç, Z., Çoşut, B., Yeşilot, S., Kılıç, A., Öztürk, A., Hökelek, T., Bilir, L. Y. K., Açık, L. 2010.. Synthesis, Structural Investigations, Biological Activities, and DNA Interactions of New N/O Spirocyclic

- Phosphazene Derivatives. The NMR Behaviors of Chiral Phosphazenes with Stereogenic Centers upon the Addition of C. *Inorganic Chemistry*, 49, 7057-7071.
- İlter, E. E., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Açık, L., Yavuz, M., Bali, E. B., Solak, A. O., Büyükkaya, F., Dal, H., Hökelek, T. 2010. Phosphorus-nitrogen compounds: Part 19. Syntheses, structural and electrochemical investigations, biological activities, and DNA interactions of new spirocyclic monoferrocenylcyclotriphosphazenes. *Polyhedron*, 29, 2933-2944.
- İlter, E., Asmafiliz N., Kılıç, Z., Açık, L., Yavuz, M., Bali, E.B., Solak, A.O., Büyükkaya, F., Dal, H., Hökelek, T. 2010. *Polyhedron*, 29, 2933-2944.
- Klein, R. J., Welna, D. T., Weikel, A. L., Allcock, H. R., Runt, J. 2007. Counterion Effects on Ion Mobility and Mobile Ion Concentration of Doped Polyphosphazene and Polyphosphazene Ionomers. *Macromolecules*, 40, 3990-3995.
- Koçak, S.B., Koçoğlu, S., Okumuş A., Kılıç, Z., Öztürk, A.İ., Hökelek, T., Öner, Y., Açık, L. 2013. Syntheses, spectroscopic properties, crystal structures, biological activities, and DNA interactions of heterocyclic amine substituted spiro-ansa-spiro- and spiro-bino-spiro-phosphazenes. *Inorganica Chimica Acta*, 406, 160-170.
- Konar, V., Yılmaz, Ö., Öztürk, A.İ., Kirbağ, S., Arslan, M. 2000. *Bioorg. Chem*, 28, 214-225.
- Liu, R., Wang, X. 2009. Synthesis, characterization, thermal properties and flame retardancy of a novel nonflammable phosphazene-based epoxy resin. *Polymer Degradation and Stability*, 94, 617-624.
- Marin, A., DeCollibus, D. P., Andrianov, A. K. 2010. Protein Stabilization in Aqueous Solutions of Polyphosphazene Polyelectrolyte and Non-Ionic Surfactants. *Biomacromolecules*, 11, 2268-2273.
- Minto, F., Gleria, M., Bortolus, P., Fambri, L., Pegoretti, A. 1995. Grafting reactions onto poly(organophosphazenes). IV. Light-induced graft copolymerization of organic polymers containing free acid or basic functionalities onto poly[bis(4-benzylphenoxy)phosphazene]. *J. Appl. Polym. Sci.*, 565, 747-756.
- Mohamed, A. F., Karaiskos, I., Plachouras, D., Karvanen, M., Pontikis, K., Jansson, E. 2012. Application of a loading dose of colistin methanesulfonate in critically ill patients: population pharmacokinetics, protein binding, and prediction of bacterial kill. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 4241-4249. doi: 10.1128/AAC.06426-11.
- Moriya, K., Suzuki, T., Yano, S., Miyajima, S. 2001. ³¹P and ¹³C NMR Studies of a Liquid-Crystalline Cyclotriphosphazene Derivative Orientational Characteristics and Contrasting Shielding Anisotropies for Inorganic and Organic Moieties. *J. Phys. Chem. B*, 105, 7920-7927.
- Mouton, J. W., Ambrose, P. G., Canton, R., Drusano, G. L., Harbarth, S., MacGowan, A., et al. 2011. Conserving antibiotics for the future: new ways to use old and new drugs from a pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Drug Resist. Updat.* 14, 107-117. doi: 10.1016/j.drug.2011.02.005.
- Mutlu G., Elmas, G., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L.Y., Türk, M., Açık, L., Aydın, B., Dal, H. 2015. Phosphorus-nitrogen compounds: Part 31. Syntheses, structural and stereogenic properties, in vitro cytotoxic and antimicrobial activities, and DNA interactions of bicyclotetraphosphazenes containing bulky side group. *Inorganica Chimica Acta*, 436, 69-81.
- Navarro, M., Cisneros-Fajardo, E. J., Fernandez-Mestre, M., Arrieche, D., Marchan, E. 2003. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against

- Leishmania mexicana of [Cu(dppz)₂]BF₄. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97, 364-369.
- Neto B.A.D., Lapis, A.A.M. 2009. *Molecules*, 14, 1725-1746.
- Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Dal, H., Açıık, L., Öner, Y., Koç, L. Y. 2011. Phosphorus-nitrogen compounds part 22. Syntheses, structural investigations, biological activities and DNA interactions of new mono and bis (4-fluorobenzyl) spirocyclophosphazenes. *Polyhedron*, 30, 2896-2907.
- Omotowa, B. A., Phillips, B. S., Zabinski, J. S., Shreeve, J. M. 2004. Phosphazene- Based Ionic Liquids: Synthesis, Temperature-Dependent Viscosity, and Effect as Additives in Water Lubrication of Silicon Nitride Ceramics. *Inorganic Chemistry*, 43, 5466-5471.
- Öztürk, A. İ., Yılmaz, Ö., Kırbag, S., Arslan, M. 2000. Antimicrobial and Biological Effects of Ipermphos and Amphos on Bacterial and Yeast Strains. *CellBiochem. Funct*, 18, 117-126.
- Pendleton JN., Gorman SP., Gilmore BF. 2013. Clinical relevance of the escape pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 11, 297-308.
- Piddock LJ. 2012. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward?. *Lancet Infect Dis*, 12, 249-253.
- Pulcini, C., Bush, K., Craig, W. A., Fridodt-Moller, N., Grayson, M. L., Mouton, J. W., et al. 2012. Forgotten antibiotics: an inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia. *Clin. Infect. Dis.*, 54, 268-274. doi: 10.1093/cid/cir838
- Ray, A., Rosair, G. M., Kadam, R., Mitra, S. 2009. Three new mono-di-trinuclear cobalt complexes of selectively and non-selectively condensed Schiff bases with N₂O and N₂O₂ donor sets: Syntheses, structural variations, EPR and DNA binding studies. *Polyhedron*, 28, 796-806.
- Sethuraman, S., Nair, L. S., El-Amin, S., Nguyen, M.-T., Singh, A., Krogman, N., Greish, Y. E., Allcock, H. R., Brown, P. W., Laurencin, C. T. 2010. Mechanical properties and osteocompatibility of novel biodegradable alanine based polyphosphazenes: Side group effects. *Acta Biomaterialia*, 6, 1931-1937.
- Shaw, R. A., Fitzsimmons, B. W., Smith, B. C. 1962. The Phosphazenes (Phosphonitrilic Compounds). *Chemical Reviews*, 62, 247-281.
- Siwy, M., Sek, D., Kaczmarczyk, B., Jaroszewicz, I., Nasulewicz, A., Pelczynska, M., Opolski, J. 2006. *Med. Chem.*, 49, 806-810.
- Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G., Edwards, J. E. 2004. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.*, 38, 1279-1286. doi: 10.1086/420937.
- Wang, L., YE, Y., Zhong, S. B., Zhao, Y. F. 2009. Polydentate cyclotriphosphazene ligands: Design, synthesis and bioactivity. *Chinese Chemical Letters*, 20, 58-61.
- Yavuz, M., 2010. Bazı fosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi ve bu bileşiklerin DNA ile etkileşimi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü.
- Yıldırım, T., Bilgin, K., Çiftçi, Y., Eçik, E. T., Şenkuytu, E., Uludağ, Y., Tomak, L., Kılıç, A. 2012. Synthesis, cytotoxicity and apoptosis of cyclotriphosphazene compounds as anticancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 213-220.
- Yıldız, M., Dülger, B., Erdener, D., Kiraz, A., Hacıoğlu, N. 2008. Spiro, ansa fosfazen

bileşiklerinin sentezi, yapılarının ve antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Çanakkale.

- Yılmaz, S., 2004. Bazı halkalı fosfazenlerin sentezi, polimerizasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, 1-44.
- Yildiz, M., Yılmaz, S., Dülger, B. 2007. Synthesis, spectral properties, and antimicrobial activity of 2-aryl-amino-2,4,4,6,6-pentachloro-triazatriphosphines and poly[bis(4-fluorophenylamino) phosphazene]. *Russian Journal of General Chemistry*, 77, 2117-2122.
- Zhang, Q. S., Yan, Y. H., Li, S. P., Feng, T. 2009. Synthesis of a novel biodegradable and electroactive polyphosphazene for biomedical application. *Biomed. Mater.*, 4, 035008.
- Zhu, X. F., Liang, Y. H., Zhang, D., Wang, L., YE, Y., Zhao, Y. 2011. Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem., 186, 281-286.
- Zhu, X. F., Liang, Y. H., Zhang, D., Wang, L., YE, Y., Zhao, Y. 2011. Synthesis and Characterization of Side Group-Modified Cyclotetraphosphazene Derivatives. Phosphorus, Sulfur, and Silicon, 186, 281-286.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Malatya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Malatya'da tamamladı. 2011 yılında Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. 2012 yılında Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.