



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YENİ BİR ANTİBİYOTİK OLAN HEAA'nın
ENTEROCOCCUS-FAECALIS V-583 BAKTERİ
BİYOFİLMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

GÜLŞAH UYGUR

Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü

Fiziksel Kimya

Danışman

Prof. Dr. Ayben KİLİSLİOĞLU

Aralık, 2012

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YENİ BİR ANTİBİYOTİK OLAN HEAA'nın
ENTEROCOCCUS-FAECALİS V-583 BAKTERİ
BİYOFİLMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

GÜLŞAH UYGUR

Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü

Fiziksel Kimya

Danışman

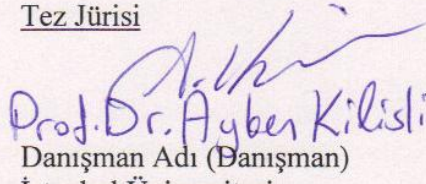
Prof. Dr. Ayben KİLİSLİOĞLU

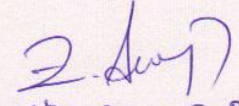
Aralık, 2012

İSTANBUL

26 0110034.....Öğrenci numaralı Gülşah Uygur tarafından hazırlanan bu çalışma
25.11.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafındanKonya..... Anabilim Dalı
Fiziksel Kimya programında Doktora / Yüksek Lisans Tezi olarak kabul
edilmiştir.

Tez Jürisi

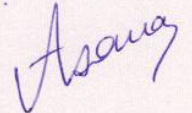

Prof. Dr. Ayben Kılıcıoğlu
Danışman Adı (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

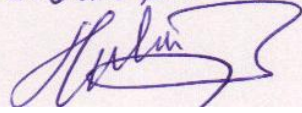

Jüri Adı Prof. Dr. Ayşe Z. ARDOĞAN
Üniversite İstanbul Univ.
Fakülte Mühendislik Fak.

Jüri Adı Prof. Dr. Bahme Ali Zerkal
Üniversite İstanbul Teknik Üniversitesi
Fakülte Fen-Ed. Fak., Kimya Böl.

Jüri Adı Prof. Dr. Ayfer SARAY
Üniversite Yıldız Teknik Univ.
Fakülte Fen-Ed. Fak., Kimya
Böl.

Jüri Adı Prof. Dr. Tuha Ekinçoğlu
Üniversite İstanbul Üniversitesi
Fakülte Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü





ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımından dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Ayben KİLİSLİOĞLU'na en içten dileklerle teşekkür ederim. Ayben hocam, bana University of Illinois'te çalışma imkanı sağlayarak, bugünkü doktora konumuma imkan sağlamıştır. Tüm katkı ve destekleriniz için size teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bu tez çalışmasının deneysel kısmını laboratuvarında gerçekleştirmeme imkan sağlayan ve her türlü desteğini esirgemeyen Prof. Luke HANLEY'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışmamı, hayatım boyunca beni sürekli destekleyen ve her zaman mükemmel bir ebeveyn olan, sevgili annem Selma UYGUR ve sevgili babam M.Ali UYGUR'a ithaf ediyorum.

Aralık, 2012

Gülşah UYGUR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. BAKTERİLER	2
2.2. BİYOFİLMLER	2
2.2.1. Enterococcus-Faecalis V-583 Biyofilm Bakteri Tabakası	3
2.3. ANTİBİYOTİKLER	3
2.3.1. Ampicillin	4
2.3.2. HEAA (MPA-Ampicillin)	5
3. KULLANILAN CİHAZLAR	6
3.1. YÜZEY KÜTLE SPEKTROMETRESİ	6
3.1.1. Kütle Spektrometresi Kullanım Alanları	7
3.1.2. Kütle Spektrometresindeki İyonlaştırma Yöntemleri	8
3.1.3. Kütle/Yük (m/z) Analizörleri	10
3.1.4. Dedektör	11
3.2. LAZER DESORPSİYON POSTİYONİZASYON KÜTLE SPEKTROMETRESİ	12

3.3. MATRİKS YARDIMLI LAZER DESORPSİYON İYONLAŞTIRMA KÜTLE SPEKTROMETRESİ	14
4. MALZEME VE YÖNTEM	17
4.1. HEAA`nın SENTEZİ	17
4.2. MATRİKS YARDIMLI KÜTLE SPEKTROMETRESİ (MALDI-MS) ile HEAA MADDESİNİN ANALİZİ	18
4.3. LDPI-MS ile HEAA MADDESİNİN ANALİZİ	19
4.4. LDPI-MS ve MALDI İÇİN NUMUNELERİN HAZIRLANIŞI.....	20
4.5. BAKTERİYEL LİKİD KÜLTÜRÜN HAZIRLANMASI	20
4.6. MEMBRANLAR KULLANILARAK BAKTERİ BİYOFİLM TABAKALARININ HAZIRLANMASI	20
4.7. BAKTERİ BİYOFİMLERİNDE CFU SAYIMI VE BAKTERİLERİN SÜSPANSE EDİLMESİ	21
4.8. HEAA ve AMPICILLIN ÇÖZELTİLERİNİN HAZIRLANMASI	23
5. BULGULAR	25
5.1. İLK DENEME SONRASI HEAA ve AMPICILLIN İÇİN BAKTERİ SAYIMI SONUÇLARI	25
5.2. İKİNCİ DENEME SONRASI HEAA ve AMPICILLIN İÇİN BAKTERİ SAYIMI SONUÇLARI	26
5.3. İLK ve İKİNCİ DENEY SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	28
5.4. HEAA MADDESİNİN MALDI ve LDPI-MS ile ANALİZ SONUÇLARI...30	
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	40

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Ampicillin`nin moleküler yapısı.....	5
Şekil 2.2	: HEAA`nin moleküler yapısı	6
Şekil 3.1	: Kütle spektrometresi ana kısımları.....	8
Şekil 3.2	: LDPI-MS örneğın ıyonlaştırılması mekanizması.....	12
Şekil 3.3	: Lazer Desorpsiyon Postiyonizasyonu Kütle Spektrometresi (LDPI-MS) ana kısımları.....	13
Şekil 3.4	: MALDI`de ıyonlaşma mekanizması.....	14
Şekil 4.1	: Enterococcus-faecalis V-583 Biyofilm Tabakası.....	21
Şekil 5.1	: HEAA ve Ampicillin ilk deneme sonrası sonuçların karşılaştırılması..	26
Şekil 5.2	: HEAA ve Ampicillin ikinci deneme sonrası sonuçların karşılaştırılması.....	28
Şekil 5.3	: İlk ve ikinci deney sonrası ortalama sonuçların karşılaştırılması.....	30
Şekil 5.4	: HEAA maddesinin MALDI-MS spektrumu.....	31
Şekil 5.5	: HEAA maddesinin MALDI-MS-MS spektrumu ve fragman spektrumları.....	32
Şekil 5.6	: 7.87 CHCA matriks maddesi ile birlikte hazırlanan HEAA maddesinin LDPI-MS kütle spektrumu.....	33
Şekil 5.7	: 7.87 eV LDPI-MS ile HEAA maddesinin kütle spektrumu.....	34

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1	: 24 saat sonraki bakteri hücresi sayım sonuçları.....	22
Tablo 4.2	: HEAA antibiyotiğinin seri olarak seyreltilmesi	23
Tablo 4.3	: Ampicillin antibiyotiğinin seri olarak seyreltilmesi.....	24
Tablo 5.1	: İlk deneme sonrasında elde edilen bakteri sayım sonuçları	25
Tablo 5.2	: İkinci deneme sonrasında elde edilen bakteri sayım sonuçları	27
Tablo 5.3	: HEAA ve Ampicillin bakteri sayım sonuçları.....	29

SEMBOL LİSTESİ

MS	: Mass Spectrometry/Kütle Spektrometresi
MALDI /MS	: Matrix Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry/Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma Kütle Spektrometresi
LDI/MS	: Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry/Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Kütle Spektrometresi
LDPI / MS	: Laser Desorption Postionization Mass Spectrometry/Lazer Desorpsiyon Postiyonizasyon Kütle Spektrometresi
HEAA	: MPA-Ampicillin
V-583	: Enterococcus-faecalis
CHCA	: α -Siyano-4-Hidroksisinnamik Asit
VUV SPI	: Vacuum Ultraviolet Single Photon İonization/Vakum Ultraviyole Tek Foton İyonizasyonu
CFU	: Colony Forming Unit/Koloni Oluşturma Birimi
YAG	: İttriyum (yttrium) Alüminyum Granat
Nd-YLF	: Neodimyum-İttriyum (yttrium) Lityum Florid
TSB	: Tryptic Soy Broth (bakteri besini)

ÖZET

YENİ BİR ANTİBİYOTİK OLAN HEAA'nın ENTEROCOCCUS-FAECALIS V-583 BAKTERİ BİYOFİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Bu çalışmada, Chicago'da bulunan Illinois Üniversitesi, Kimya Bölümünde Prof. Hanley ve araştırma grubu tarafından bulunan ve grup üyelerinin adlarının ilk harflerinin verildiği HEAA maddesi üzerinde çalışılmıştır.

Bu tezde, temel olarak iki farklı çalışma yapılmıştır. İlk olarak, HEAA maddesinin antibakteriyel özelliğinin olup olmadığı, Enterococcus faecalis biyofilm tabakaları üzerinde çalışılmış ve bu etki Ampicillin antibiyotiği ile kıyaslanmıştır.

HEAA maddesi güçlü bir antibiyotik olan Ampicillin üzerinden sentezlenen bir antibiyotiktir. Ampicillin maddesinin N-metilpiperazin asetamid türevidir.

HEAA ve Ampicillin antibiyotikleri ile, Enterococcus faecalis patojen bakteri biyofilm tabakaları üzerinde çalışılmıştır. Enterococcus faecalis bakteri biyofilmleri canlı veya cansız hücrelerde hızlı bir şekilde çoğalarak, insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. İdrar yolları ve solunum yolu enfeksiyonlarının önemli bir nedenidir. Ayrıca genel cilt yaralarına, kök kanal ve çeşitli tıbbi implantlarda iltihaplanmalara yol açmaktadır.

HEAA ve Ampicillin antibiyotiklerinin, antibakteriyel etkisi Enterococcus faecalis biyofilmleri ile test edilmiştir. Sonuçlar, HEAA'nın, bakteri öldürücü etkisinin Ampicilline kıyasla daha fazla olduğunu kanıtlamıştır.

İkinci olarak, 7.87 eV lazer desorpsiyon postiyonizasyon kütle spektrometresi (LDPI-MS) ve matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma kütle spektrometresi (MALDI-MS) analiz yöntemleri kullanarak HEAA maddesi ve fragmanları tanımlanmıştır.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF A NEW ANTIBIOTIC HEAA ON ENTEROCOCCUS-FAECALIS V-583 BACTERIAL BIOFILMS

In this study, a new antibiotic which has been found by Prof. Luke Hanley and his research group was examined at University of Illinois at Chicago, Chemistry Department.

Two basic experimental studies were studied in this thesis. Primarily, the antibacterial effect of HEAA on Enterococcus-faecalis biofilms was examined. Then, the results of both antibiotics of HEAA and Ampicillin were compared.

HEAA has been synthesized through Ampicillin which is a very effective antibiotic. HEAA is the N-methylpiperazine acetamide of Ampicillin, so it is called MPA-Ampicillin.

The antibacterial effect of HEAA and Ampicillin have been studied on Enterococcus faecalis pathogen biofilms. Enterococcus faecalis biofilms can grow on live and dead cells, and cause health problems on human beings. It can major cause of infections of the urinary tract, respiratory tract. Also, general skin wounds, root canal and various medical implant infections.

The antibacterial effect of HEAA and Ampicillin have been examined on Enterococcus faecalis biofilms. By comparing the results HEAA is found much more effective on Enterococcus faecalis biofilms than Ampicillin.

Secondly, HEAA and its fragments have been identified by 7.87 eV laser desorption postionization mass spectrometry (LDPI-MS) and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS).

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasının tüm deneysel kısımları, Chicago’da bulunan Illinois üniversitesi, Analitik Kimya Bölümünde çalışmakta olan, Prof. Luke Hanley’nin araştırma laboratuvarlarında yapılmıştır. Bu çalışmadaki amaç, Prof. Hanley ve araştırma grubu tarafından sentezlenen yeni bir maddenin (HEAA), antibakteriyel özelliğinin belirlenmesi ve bu maddenin, iki farklı yüzey kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmesidir.

Bu yeni maddeye, Prof. Hanley ve araştırma çalışanlarının isimlerinin baş harflerinden oluşan HEAA adı verilmiştir. HEAA maddesi, Ampicillin ve Piperacillin antibiyotikleri kullanılarak sentezlendiği için, bu madde MPA-Ampicillin olarak da adlandırılmıştır. Ancak patent alma aşamasında maddenin bileşimini saklamak amacıyla MPA-Ampicillin adı yerine HEAA ismi kullanılmıştır.

Deneyleerde, HEAA maddesinin antibakteriyel özelliğini test etmek için, *Enterococcus faecalis* kod adı ile V-583 bakterileri üzerinde çalışılmıştır. *E. faecalis* bakterileri birçok antibiyotik türüne karşı dirençli olup, insan sağlığı için büyük tehdit oluşturan bir bakteri türüdür.

Bakteriler biyofilm denilen tabakalar halinde yetiştirildiklerinde, antibiyotiklere karşı daha fazla direnç kazanırlar. Bu nedenle, bu tez çalışmasında *E. faecalis* biyofilm tabakaları ile çalışma tercih edildi.

Çalışmada HEAA maddesi, sentezinde kullanılan Ampicillin maddesi ile karşılaştırılmıştır. Deneysel sonuçlara göre, HEAA maddesinin Ampicilline göre *E. faecalis* biyofilm bakterileri üzerinde daha etkili olduğu saptanmıştır.

HEAA maddesinin moleküler yapısı; MALDI-MS, MALDI-MS/MS ve LDPI-MS kütle spektrometresi yöntemleri ile analiz edilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BAKTERİLER

Bakteriler tek hücreli mikroorganizmalar olup, tipik olarak birkaç mikrometre uzunluğundadırlar. Bakterilerin çeşitli şekilleri vardır, kimi küresel, kimi spiral şekilli, kimi çubuksu olabilir. Bakteriler yeryüzündeki her ortamda mevcuttur. Toprakta, deniz suyunda, yer kabuğunda, deride, hayvanların bağırsaklarında, asitli sıcak su kaynaklarında, radyoaktif atıklarda büyüeyebilen tipleri vardır. Bakterilerin araştırıldığı bilim bakteriyolojidir.

İnsan vücudunda, özellikle deride ve sindirim yolu içinde bulunan bakteri sayısı, insan hücresi sayısının on katı kadardır. Bunların büyük bir kısmı yararlı (probiyotik) olsalar da, bazıları patojen bakterilerdir ve enfeksiyöz hastalıklara neden olurlar; kolera, frengi, şarbon, cüzzam ve veba bu cins hastalıklara dahildir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde çoğunlukla antibiyotikler kullanılır. Bakterilerin, kullanımı yaygın olan antibiyotiklere karşı direnci yaygınlaşmaktadır. Bu durum, beraberinde yeni antibiyotik türlerine olan ihtiyacı gündeme getirmektedir.

2.2. BİYOFİLMLER

Bakteriler yüzeylere bağlanıp biyofilm denen yoğun kümeler oluştururlar. Bu filmler birkaç mikrometre kalınlıktan yarım metre derinliğe kadar değişebilir ve birden çok bakteri, protista ve arke türü içerebilir. Biyofilmlerde yaşayan bakteriler, hücre ve hücre dışı bileşenler ile karmaşık bir düzen oluştururlar. Meydana gelen ikincil yapılar arasında mikro koloniler de sayılabilir, bunların içinde bulunan kanal şebekleri gıdaların daha kolay difüzyonunu sağlar (Donlan, 2002; Branda ve diğ., 2005).

Doğal ortamlarda, örneğin toprak ve bitkilerin yüzeyinde, bakterilerin çoğunluğu biyofilm aracılığıyla yüzeye bağlanır (Davey, ve O'toole, 2000). Biyofilmler tıpta da önemlidir, çünkü bu yapılar kronik bakteriyel enfeksiyonlarda ve vücut içine yerleştirilmiş tıbbi cihazlarda bulunurlar.

Biyofilmler içinde kendini koruyan bakterilerin imhası, tek başına ve izole durumda olan bakterilerinkinden çok daha zordur (Donlan ve Costerton, 2002).

2.2.1. Enterococcus-Faecalis V-583 Biyofilm Bakteri Tabakası

Bu çalışmada HEAA olarak bilinen yeni bir antibiyotik ile Enterococcus-faecalis V-583 bakteri biyofilmleri üzerinde çalışılmıştır. Amaç; HEAA'yı bilinen, geniş bir kullanıma sahip Ampicillin antibiyotiği ile karşılaştırmak ve hangi antibiyotiğin, Enterococcus-faecalis V-583 bakteri biyofilmleri üzerinde daha etkili olduğunu saptamaktır.

Enterococcus-faecalis V-583, birçok doğal ortamda hızla çoğalabilen ve yaklaşık 3-4 saate kadar cansız ortamda canlı kalabilen ve çoğunlukla hastane enfeksiyonlarına neden olan bir bakteri türüdür. E. faecalis oksidatif ve su içermeyen ortamlara, aşırı sıcaklık, pH gibi olumsuz koşullara karşı dayanıklıdır. Ayrıca tuzluluk, safra asitleri, deterjan ve antibiyotiklere karşı yüksek endojen direnç gösterir (Aakra, 2005). Özellikle E. faecalis V583 güçlü bir antibiyotik olan vankomisine karşı dirençli olup, Amerika'da ilk kez vankomisine karşı direnç gösteren bakteri türü olarak kayıtlara geçmiştir (Aakra, 2005).

Birçok olumsuz koşullara ve güçlü antibiyotik türlerine karşı dirençli olan E. faecalis V583, başta Amerika olmak üzere pek çok ülkede insan sağlığı için tehdit olarak görülmektedir. Pek çok araştırma kliniğinde ve laboratuvarlarında V-583 üzerine deneyler ve araştırmalar yapılmakta, bu bakteri üzerinde etkili olabilecek yeni antibiyotik türleri aranmaktadır.

2.3. ANTİBİYOTİKLER

Bir mikroorganizmayı öldürmek veya çoğalmasını durdurmak için üretilen her türlü maddeye antibiyotik denir.

Antibiyotikler, bakteriler üzerindeki etki mekanizmalarına göre sınıflara ayrılırlar. Genellikle etkili oldukları bakterilerin metabolik işlemlerine müdahale ederek çalışırlar. Bu metabolik işlemler; protein sentezi, hücre çeperi sentezi, nükleik asit sentezi veya hücre zarı fonksiyonlarıdır.

Penisilin, ampicillin, vankomisin, florokinolon ve sefalosporin gibi antibiyotikler en çok kullanılan antibiyotiklerdendir. Bu antibiyotiklerin hepsi bakterilerin hücre çeperlerini zayıflatırlar. Bakterilerin hücre çeperleri uzun peptidoglikan zincirlerinden oluşur. Antibiyotikler bu molekülleri bir arada tutan peptit bağlantılarının sentezini önlerler. Böylece hücre çeperleri zayıflar ve bakteri hücresi patlar.

Streptomisin, eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol gibi antibiyotikler ise ya protein sentezini önlerler ya da anormal proteinlerin sentezlenmesine yol açarlar. Antibiyotikler bunları bakterilerin ribozomlarına bağlanarak yaparlar.

Rifampisin ve antrasiklin gibi antibiyotikler ise nükleik asit sentezine müdahale ederler. Antrasiklinler bunu DNA replikasyonunu önleyerek yaparken, rifampisin bakteriyel transkripsiyonu önler.

Bazı antibiyotikler ise patojenleri hücre zarlarına müdahale ederek yok ederler. Hücre zarına yapılan müdahaleler, hücre zarının yapısını değiştirerek onun birçok özelliğini de kaybetmesine yol açar. Bu hücre sitoplazmasının hücre dışına akması gibi hücrenin yıkımıyla sonuçlanacak olaylara yol açabilir.

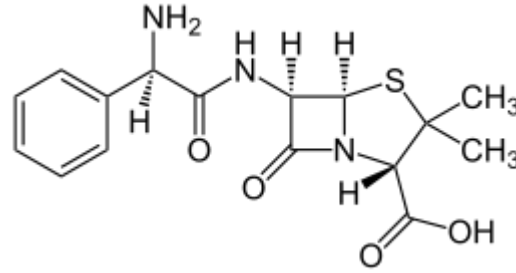
Antibiyotiklerin çok sık aralıklarla kullanılması bakterilerin, antibiyotiklere karşı direnç kazanmasına yol açmaktadır.

2.3.1. Ampicillin

Ampicillin, 1961 yılından bu yana bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir beta-laktam antibiyotiktir. Ampicillin, penisilinler olarak adlandırılan antibiyotik sınıfına aittir ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılırlar.

Bu sınıfın diğere üyeleri amoksisilin (Amoxil), piperasilin (Pipracil), tikarsilin (Ticar) olarak sayılabilir. Bu antibiyotikler, bakteri metabolizması üzerinde benzer bir mekanizma gösterirler. Bakteri hücre duvarı sentezini durdurarak, bakterilerin çoğalmasını önlerler. Bakteri hücre duvarı bakteri hücrelerinin bir arada kalmasını sağlamakla birlikte aynı zamanda bakterileri çevre şartlarına karşıda korumaktadır. Bir bakteri hücre duvarı olmadan hayatta kalmaz. Penisilinler özellikle bakterinin hücre duvarı sentezi ve çoğalması sırasında oldukça etkilidirler.

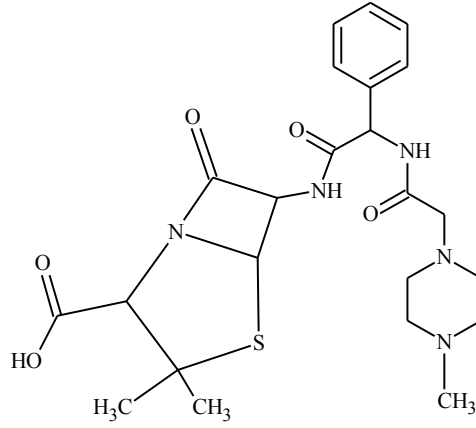
Ampisilin *H. influenzae*, *N. gonore*, *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, streptokok ve stafilokok türleri dahil birçok bakterilere karşı etkilidir. Ampisilin 1963, yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından antibiyotik maddesi olarak kabul edilmiştir. Şekil 2.1, Ampicillin antibiyotiğinin moleküler yapısını göstermektedir. Ampicillin, *Enterococcus-faecalis* V-583 biyofilm bakteri tabakaları üzerinde etkilidir.



Şekil 2.1 : Ampicillin`nin moleküler yapısı

2.3.2. HEAA (MPA-Ampicillin)

Prof. Luke Hanley doktora araştırma grubu tarafından bulunan ve grup üyelerinin isimlerinin baş harflerinin verildiği, yeni bir antibiyotik olan HEAA, Ampicillin antibiyotiği üzerinden sentezlenmiştir. HEAA maddesi güçlü bir antibiyotik olan Ampicillin üzerinden sentezlenen bir antibiyotiktir. Ampicillin maddesinin N-metilpiperazin asetamid türevidir. Şekil 2.2, sentezlenen HEAA maddesinin moleküler yapısını göstermektedir.



Şekil 2.2 : HEAA'nın moleküler yapısı

3. KULLANILAN CİHAZLAR

3.1. YÜZEY KÜTLE SPEKTROMETRESİ

Belirli bir düzenek kullanılarak, pozitif yüklü parçacıkların oluşturulması, bu parçacıkların m/z (kütle/yük) oranlarına göre dedektörde ayrılması ve bu bilgiye dayalı olarak maddelerin analiz edilmesi yöntemine kütle spektrometresi denir (Öner, 2001). İyonların m/z (kütle/yük) oranına göre çizilen grafiğine kütle spektrumu denir. Genel olarak, pozitif yüklü iyonlar analiz edilir (Yaman, 2010). Pozitif veya negatif yüklü iyonların oluşması, enstrümantal koşullara göre değişmektedir. Bu pozitif parçacıklar; bir molekül iyonu, metal iyonu veya molekülün parçalanması ile oluşan parçacıklar olabilir (Öner, 2001). Kütle spektrometresinde analiz temel olarak bu yüklü parçacıkların m/z oranlarına göre dedektörde oluşturduğu sinyalin yorumlanması esasına dayanmaktadır. Bir kütle spektrometresi bugüne kadar dünyada kullanılan en küçük tartı olarak tarif edilir (Blaze ve diğ., 2012).

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü tanecikleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü taneciklerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışan cihazlardır (Öner, 2001).

Yüzeyde yer alan moleküler türlerin kütle spektrometresi ile kimyasal analizi yüksek teknoloji gerektirir. Yüzey kütle spektrometrelerinden yaygın olan iki tür Lazer desorpsiyon postiyonizasyon kütle spektrometresi (LDPI-MS) ve Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaştırma kütle spektrometresi (MALDI-MS)'tir. Yüzeyde yer alan moleküllerin desorpsiyonu için lazer kullanılır. Lazerle desorplanan türlerin %99'u nötral yapılardır. Bunların iyonlaştırılabilmesi için ikinci bir lazer kaynağı kullanılır. Böylece yüzeyden kopan türlerin tayini mümkün olur. Bu iki yöntemde deneylerimizde kullanıldığından ötürü daha detaylı anlatılacaktır.

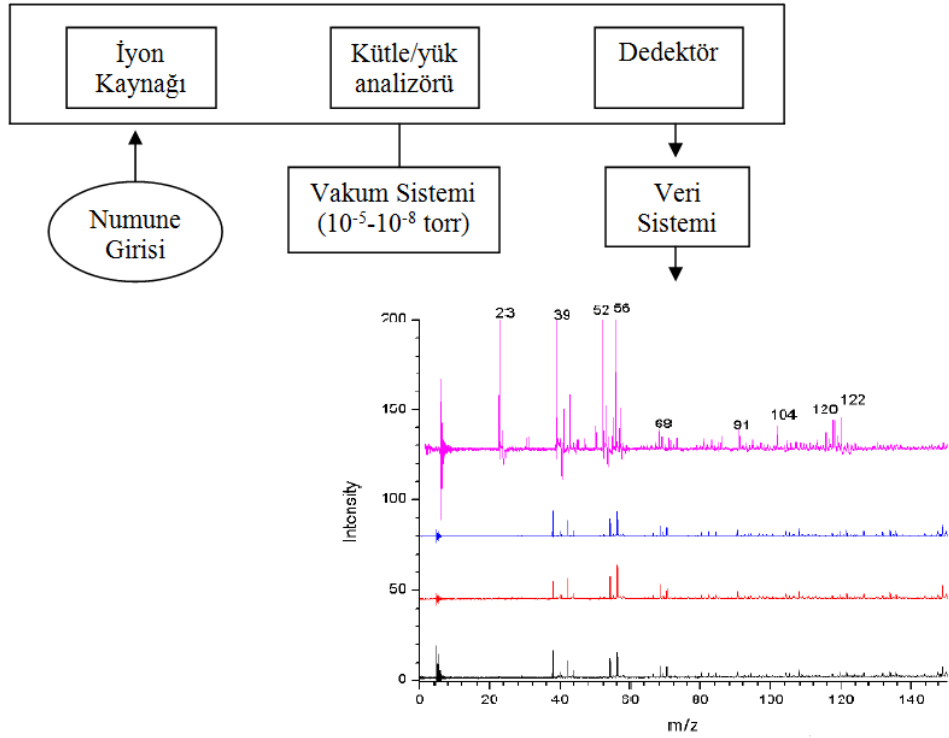
3.1.1. Kütle Spektrometresi Kullanım Alanları

Kütle spektrometresi, özellikle analitik kimya alanında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Kütle spektrometreleri;

- Fragman piklerinin yorumlanması ile maddelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesinde,
- Moleküler piklerin yorumlanması ile organik ve inorganik moleküllerin yapısının belirlenmesinde,
- Karışımların kalitatif ve kantitatif analizlerinde,
- Katı yüzeylerin analiz edilmesinde,
- Atomların izotopik oranlarının ve doğada yüzde (%) bulunma miktarlarının hesaplanmasında,
- Bir elementte kaç izotop bulunduğunun, her izotopun tam olarak kütle ve bağıl miktarının saptanması için kullanılırlar (Yaman, 2010).

Bir kütle spektrometresinin ana parçaları (Şekil 3.1) de verilmiştir (Yaman, 2010).

1. Numunenin yüklendiği bölme,
2. İyonlaştırıcı kaynak/kaynaklar,
3. m/z (kütle/yük) analizörü/analizörleri,
4. Dedektör,
5. Bilgisayar şeklindedir (Yaman, 2010).



Şekil 3.1 : Kütle spektrometresi ana kısımları

Kütle spektrometresinde, örneğin iyonlaştırılması ve kütle analizöründe m/z oranına göre ayrılarak dedektöre ulaşması vakum altında gerçekleştirilir. Basınç yaklaşık olarak 10⁻⁸ torr olarak ayarlanır. Bu sayede, pozitif yüklü parçacıklar birbirlerine çarpmadan dedektöre ulaşırlar.

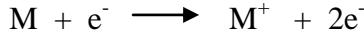
Parçacıkların çarpışması, ortalama serbest yollarının ve hızlarının değişmesine yol açabileceği için vakum sistemi ile önlenmekte ve bu durumda analizin duyarlılığını arttırmaktadır.

3.1.2. Kütle Spektrometresindeki İyonlaştırma Yöntemleri

Örnek öncelikle, gaz fazına geçer ve daha sonra çeşitli iyonlaştırma yöntemleri kullanılarak iyonlaştırılır.

3.1.2.1. Elektron İyonizasyonu (Elektron bombardımanı ile)

Bu iyonlaştırma yönteminde, ısıtılmış bir flamanın yaydığı elektronlar elektrik alanından geçirilerek 50-80 eV'luk bir enerjiye ulaşır (Yaman, 2010). Numune, yüksek enerjili elektronlar ile bombardıman edilerek, pozitif yüklü iyonlar elde edilir. Reaksiyon mekanizması, aşağıda gösterilmektedir.



Elektron iyonizasyonunda, yüksek enerjili elektronlar kullanılması, moleküler iyonun fragman iyonlarına ayrılmasına yol açmaktadır. İyonlaşma ve parçalanma birlikte gerçekleşmektedir. Bu nedenle, elektron iyonizasyonu *güçlü iyonlaştırıcı yöntem* olarak da adlandırılmaktadır.

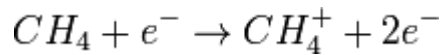
Bazı durumlarda moleküler iyonun kütle spektrumunda gözlenememesi gibi olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. Bununla birlikte, elektron iyonizasyonu ile analiz tekrarlandığında aynı sonuçlar alınabilmektedir. Elektron iyonizasyonu, özellikle gaz kromatografisi kütle spektrometresi ile kullanılmaktadır (Ersöz, 2010).

3.1.2.2. Kimyasal İyonizasyon

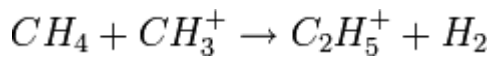
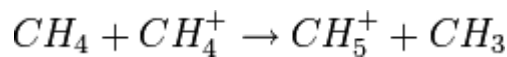
Elektron bombardımanına göre iyonlaşma daha düşük enerjide gerçekleşir. Bu yöntem, *hassas yumuşak iyonlaştırma* olarak adlandırılmaktadır.

Fragman iyonlarının oluşturulması için özel bir sistem eklenmelidir. Genel olarak, fragmanlaştırma He gibi büyük molekül kütleli bir inert gazın moleküler iyonla çarpıtılması ile elde edilir. İyonlar, iyon kaynağında mevcut olan bir reaktif gaz iyonları ile bir analit arasında çarpışma sayesinde üretilmektedir. İyon kaynağı bazı yaygın reaktif gazlar içerir: metan, amonyak ve izobütan. İyon kaynağı içinde, reaktif gaz analitten daha yüksek oranda bulunmaktadır. İyon kaynağı ile öncelikle reaktif gaz iyonize olur. Diğer reaktif gaz molekülleri ile çıkan çarpışmalar bir iyonizasyon plazmasına yol açar. Pozitif ve negatif analit iyonları, bu plazma ile reaksiyona girerek oluşur. Bahsi geçen reaksiyonlar, aşağıda ayrıntılı biçimde gösterilmektedir.

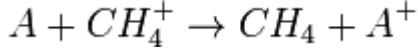
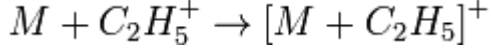
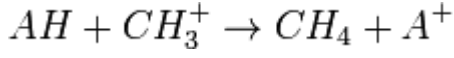
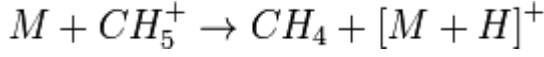
Birincil reaksiyon iyonunun oluşumu,



İkincil reaksiyon iyonlarının oluşumu,



Analit iyonlarının oluşumu,



3.1.3. Kütle/Yük (m/z) Analizörleri

İyonlaştırma bölgesinden çıkan iyonlar, kütle analizörüne gelerek burada m/z oranlarına göre ayrılırlar. Pozitif yüklü iyonlar, eksi yüklü bir levhaya doğru çekilerek bu levha üzerinde bulunan dar bir aralıktan hızla geçirilirler (Ersöz, 2010). Bunu takiben, iyon demeti magnetik bir alan içinden geçirilir. Yüklü tanecikler, magnetik alan içinde dairesel bir yörünge izlerler. Taneciğin yükü arttıkça doğrusal yörüngesinden sapma da artar. Bu nedenle, magnetik bir alanda artı yüklü bir iyonun izlediği dairesel yörüngenin yarıçapı o iyonun m/z değerine bağlıdır (Ersöz, 2010). Farklı m/z değerine sahip iyonların bu son aralıktan geçmesi ise magnetik alan şiddeti veya iyonları hızlandırmak için kullanılan voltaj ayarlanarak sağlanır. Böylece aygıttaki farklı iyon türlerinden her biri bu aralıktan ayrı ayrı geçirilirler. Dedektör, her farklı iyon demetinin şiddetini ölçer; bu iyon şiddeti örnekte bulunan izotopların bağıl miktarına bağlıdır (Ersöz, 2010).

3.1.3.1. Kütle/yük analizör çeşitleri

Manyetik alanda ayırma: Manyetik alana giren ilk hıza sahip yüklü bir cismin üzerine bir kuvvet etki eder. Bu kuvvet sayesinde farklı kütleyle sahip moleküller farklı miktarlarda saparlar (Ersöz, 2010).

Kuadrupol (Dört Kutuplu) Ayırıcı: Yüklü moleküller bir karenin köşelerine denk gelecek şekilde dizilmiş 4 silindirik çubuğun tam ortasından uçarlar. Bu çubuklara uygulanan, DC yüksek voltajı ve bir radyo frekansı (AC) voltajı sayesinde iyonlar hızlandırılarak spiral bir yörünge kazanır. Hızlandırılan iyonlar, m/z oranlarına göre ayrılarak dedektöre ulaşır (Ersöz, 2010).

Uçuş tüpü ile ayırma: Yüklü moleküller yüksek bir elektrik alan ile hızlandırılarak, tüm kütlelerin aynı ilk enerjiye sahip olması sağlanır. Hızlandırılan iyonlar, uçuş tüpü denilen yaklaşık 1-1,5 metrelik bir tüp boyunca yol alırlar (Ersöz, 2010).

Hepsi aynı ilk enerjiye sahip olmasına rağmen, hafif olan moleküller daha hızlı, ağır olanlar daha yavaş yol alacaktır. Böylece, dedektöre ulaşma zamanlarına göre kütleler tespit edilir (Ersöz, 2010).

3.1.4. Dedektör

Kütle analizörlerinde ayrılan iyonlar, dedektörlerde sayılarak sinyale yani dataya dönüştürülürler. Sayma işlemi faraday kabı, elektron çoğaltıcılar, sintilasyon tipi dedektör ve mikrokanal plak dedektörler kullanılarak yapılabilir (Ersöz, 2010). Faraday kabı, diğer kısımlara göre negatif tutularak, kaba ulaşan pozitif iyonların elektrik akımına çevrilmesi sağlanır. Elektron çoğaltıcılar, dedektör ikincil yüzeyinden yayılan ikincil elektronların çoğaltılması esasına dayanır. Sintilasyon türü dedektörlerde, iyonlar fosforesans maddeye çarptırılarak, etrafa saçılır. Saçılan ışınlar, fotoçoğaltıcı ile algılanır. Mikrokanal plak dedektörler, 10 µm'lik kanal serilerden yapılmış plaklardan oluşur. İyonlar kanallardan geçirilerek, platforma yansıtılır ve bu şekilde elektrik akımına çevrilirler (Ersöz, 2010).

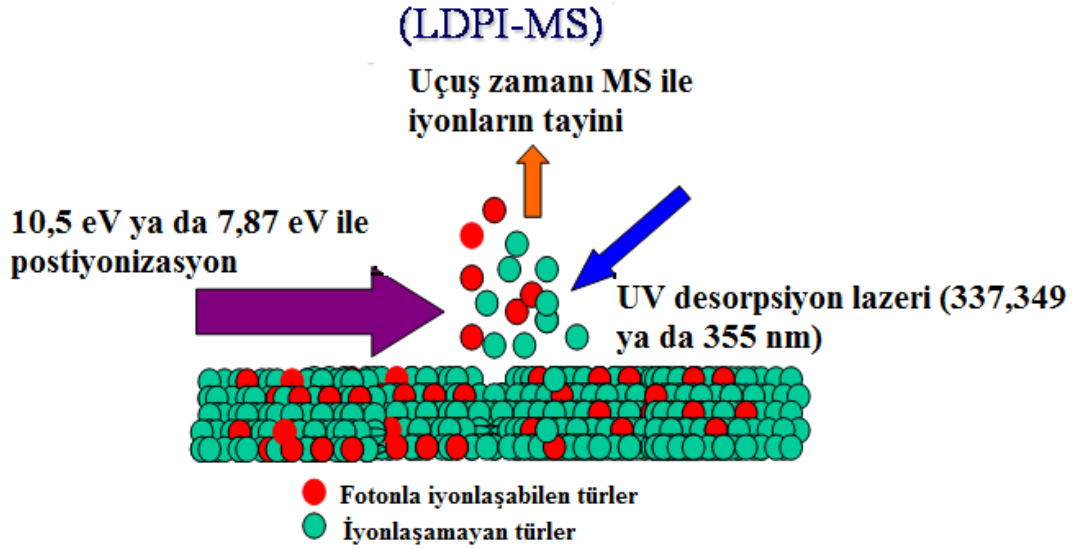
Kütle spektrometresi, büyük biyomoleküler kompleksleri, bireysel biyomoleküllerin, küçük organik moleküllerin, tek atomların ve bunların izotoplarının analiz edilmesinde kullanılabilen büyük bir teknolojik araçtır.

Kütle spektrometresi, yirminci yüzyılda bulunmasından günümüze kadar; duyarlılık, çözünürlük ve kütle aralığı bakımından olağanüstü gelişmelere uğramıştır. Örneğin, şu anda kimya, fizik, biyoloji, farmakoloji, tıp, biyokimya ve biyoagro tabanlı endüstri başta olmak üzere tüm bilimsel disiplinlerde kütle spektrometresinin uygulamaları bulunmaktadır (Akhmetov, ve diğ., 2010).

Görüntüleme kütle spektrometresinin amacı, makro boyuttaki biyolojik yapıları kimyasal iyon sinyallerinin korelasyonunu sağlayarak ve içinde buldukları ortamdaki dağılımları hakkında bilgiyi koruyarak, biyolojik örnekler içerisinde bilinen ve bilinmeyen türleri analiz etmektir (Blaze ve diğ., 2011).

3.2. LAZER DESORPSİYON POSTİYONİZASYON KÜTLE SPEKTROMETRESİ

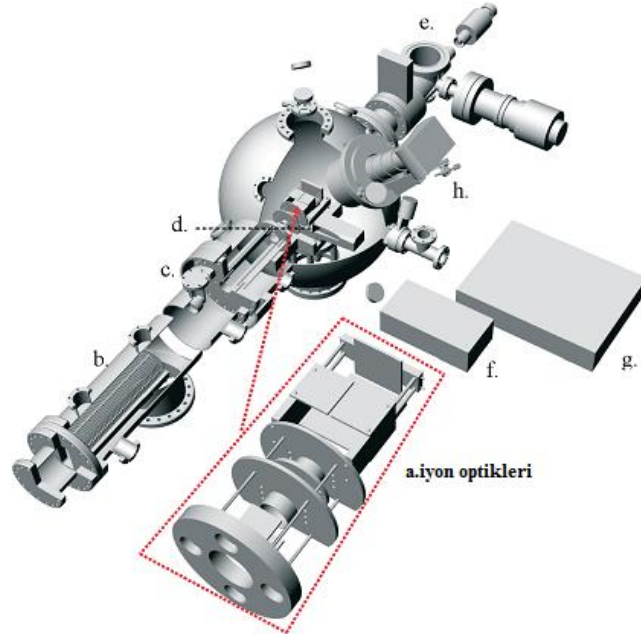
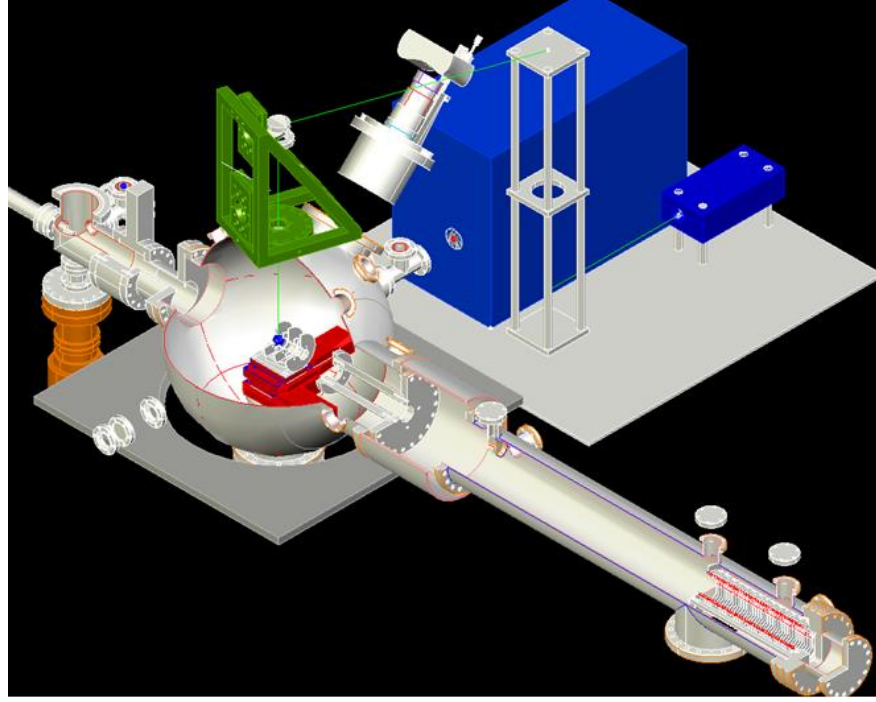
Lazer desorpsiyon postiyonizasyon kütle spektrometresi; Chicago Illinois Üniversitesi'nde Prof. Hanley'nin araştırma laboratuvarında bulunan ve Dr. Jerry assistanlığında, Hanley grup doktora öğrencileri tarafından dizayn edilmiş ve kurulmuş bir kütle spektrometresidir. LDPI-MS iki farklı enerjili iyonlaştırıcı lazer ile çalışabilmektedir. 7.87 eV enerjili F₂ lazeri ve 10.5 eV enerjili YAG lazeri iyonlaştırıcı lazerler olarak kullanılmaktadır. LDPI-MS'in diğer kütle spektrometrelerinden farklı kılan özelliği, desorpsiyonun ve iyonizasyonun farklı lazerlerle gerçekleştirilmesidir. Nd-YLF desorpsiyon lazeri her iki mod için kullanılabilir. Cihaz, 3 mekanik ve 3 adet turbo pompaları ile vakum altında tutulmaktadır. Şekil 3.2' de görüldüğü üzere örnek bölmesinde, desorpsiyon lazeri örnek tabağının (MALDI çelik tabağı) üzerine dik bir açı ile yukarıdan gelmektedir. İyonizasyon lazeri ise desorbe olan molekülleri iyonlaştırmaktadır.



Şekil 3.2 : LDPI-MS örneğin iyonlaştırılması mekanizması

Oluşan iyonlar, iyon optikler yardımı ile uçuş tüpüne doğru yönlendirilmektedir. Uçuş tüpünde iyonların aynı zamanda dedektöre ulaşabilmesi için reflektör kullanılmaktadır. Reflektör ile iyonlar, uçuş tüpünde bir tur attıktan sonra dedektöre ulaşırlar.

Bu şekilde hafif kütleli iyonlar ile ağır kütleli iyonların, farklı yolları kullanarak aynı zamanda dedektöre ulaşması sağlanır. Şekil 3.3, LDPI-MS'in temel kısımlarını göstermektedir.

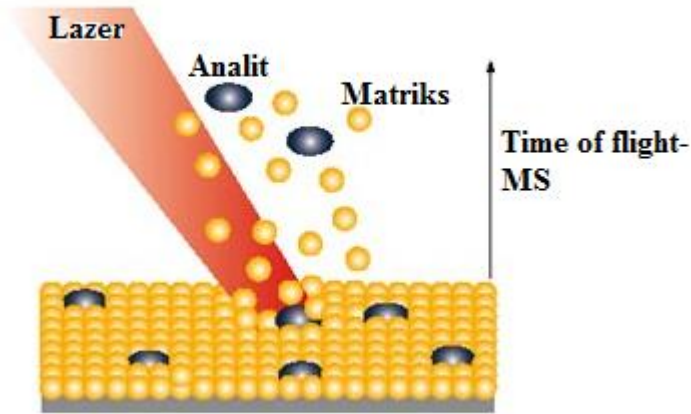


Şekil 3.3: Lazer Desorpsiyon Postionizasyonu Kütle Spektrometresi (LDPI-MS) ana kısımları.(a) iyonizasyon bölge optikleri. (b) reflektron, (c) reflektron dedektörü, (d) çevirme bölgesi, (e) numune yükleme bölgesi, (f) 349 nm Nd: YLF desorpsiyon lazeri, ve (g) 157 nm fluorine VUV postionizasyon lazeri (Akhmetov, ve diğ., 2010).

3.3. MATRİKS YARDIMLI LAZER DESORPSİYON İYONLAŞTIRMA KÜTLE SPEKTROMETRESİ

Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma kütle spektrometresi (MALDI-MS), 1988 yılında Karas ve Hillenkamp'ın çalışma grubu tarafından geliştirilen, hızlı bir kütle spektrometresidir. MALDI yöntemi, özellikle büyük molekül kütleli moleküllerin tayininde kullanılmaktadır. MALDI'de örnek, matriks kullanılarak hazırlanır. Matriks, örneğin iyonlaştırılmasını sağlar. İyonlaşma mekanizması, kimyasal iyonizasyona benzemektedir. Önce matriks molekülü, kullanılan lazer ile iyonlaşır ve iyonlaşan matriks molekülleri, örnek ile reaksiyona girerek, örneğin iyonlaştırılmasını sağlar. Matriks olarak α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) kullanılmaktadır. MALDI tekniği, küçük molekül ağırlıklı moleküllerin analizinde tercih edilmez. Çünkü matriks maddesi bu aralıkta piklerin oluşmasına yol açmaktadır.

Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma kütle spektrometresi (MALDI-MS), lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometresi'nin (LDI-MS) geliştirilmesi ile bulunan bir analiz yöntemidir. Doğrudan biyomoleküllerin analizinde geniş bir algılama sağlayan güçlü bir yöntemdir. Şekil 3.4, MALDI'de iyonlaşma mekanizmasını göstermektedir.



Şekil 3.4. MALDI'de iyonlaşma mekanizması

MALDI, enerji soğuran matriks molekülleri ile birlikte vuruşlu bir lazer ışını kullanımı ile büyük molekül ağırlıklı iyonları üretebilen bir iyonizasyon yöntemidir (Blaze ve diğ., 2011). Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometresi (MALDI-MS), protein tanımlama yoluyla bakteriyel suşların belirlenmesi için kullanılabilir (Blaze ve diğ., 2011).

Görüntülemeli kütle spektrometresinde matriks yardımcı lazer desorpsiyon /iyonizasyonun (MALDI) bir avantajı, farklı analit sınıflarının analizi için numune hazırlama protokollerinin mevcudiyetidir. Diğer avantajı ise, yüksek hassasiyet, geniş kütle aralığı ve üç boyutlu çözünürlüğü ile ticari araçların varlığıdır. Bu avantajları; peptitler, proteinler, uyuşturucu maddeler ve sağlam doku içindeki metabolitlerin görüntülenmesinde kütle spektrometresi olarak MALDI'nin yaygın olarak kullanımına yol açmaktadır (Edirisinghe, 2003).

Bununla birlikte, MALDI'nin görüntülemeli kütle spektrometresinde kullanımı ile ilişkili çeşitli eksiklikleri de vardır. Örnek hazırlanması genellikle doku yıkama-matris uygulaması dahil olmak üzere birçok adım gerektirir. MALDI'de adsorbe olan moleküllerin, iyonu ile birlikte bulunduğu nötrallerinin, nötral atomlarına oranı yaklaşık 10^{-3} ile 10^{-5} arasında değişmektedir.

MALDI'de hedef analitler için olan sinyaller bastırılarak, maddedeki spesifik iyonizasyon verimleri görüntülenebilmektedir. Tuzlar, doku spesifik iyon bastırma ve çeşitli analitler arasındaki etkileşimler ortam üzerinde bir iyonizasyon verimliliğine yol açmaktadır. Yer spesifik iyon verimliliği görüntülemeli kütle spektrometresi için ciddi bir sorundur. Çünkü belirli bir konumda sinyali olmadığı için analitin gerçekten yokluğuna mı yoksa iyon bastırmaya mı bağımlı olup olmadığını saptamak zordur, gerçek analit dağılımları kendisini temsil etmeyen görüntülerin oluşmasına yol açar. Bu gerekçeler ile MALDI'de alınan sonuçlar, MALDI'nin görüntülemeli kütle spektrometresi olarak kullanılması konusunda tartışmalara yol açmaktadır (Blaze ve diğ., 2011).

Yumuşak bir iyonizasyon tekniği olan vakum ultraviyole tek foton iyonizasyonu (VUV SPI), MALDI'nin yukarıda bahsedilen sınırlamalarının çoğunu ortadan kaldıran bir potansiyele sahiptir. VUV SPI'nun biyolojik örnekler için, görüntülü kütle spektrometresi olarak kullanımı son zamanlarda araştırılmaktadır (Edirisinghe, 2003). Deneysel olarak, lazer ile desorplanmış nötrallerin post iyonizasyonu için VUV SPI kullanılması, vuruşlu bir VUV ışık kaynağı ilave edildiği için MALDI'ye paraleldir. Postiyonizasyon VUV SPI yerine, rezonans multifoton iyonizasyon yoluyla gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, bu metod lazer desorpsiyon post iyonizasyonu (LDPI) ya da ikili lazer kütle spektrometresi (MS veya L2 L2MS) olarak adlandırılır (Blaze ve diğ., 2012).

Desorpsiyon ve iyonizasyon adımlarının ayrılması gibi farklı analit sınıfları için VUV SPI, kesit benzerliği, çoklu foton süreçlerle kıyaslandığında miktar belirlemeyi artırır (Akhmetov, ve diğ., 2010). Vuruşlu lazer desorpsiyon radyasyonu, gaz fazı içinde üretilen kondense atomları, molekülleri ve polimer yüzey türlerini belirlemek üzere kullanılır. Fragmanlarına ayrılmayan moleküller için lazer desorpsiyon yöntemleri geliştirmek güçtür. Ancak moleküllerin çoğu yüzeyden nötraller halinde desorbe olmaktadır (Akhmetov, ve diğ., 2010).

Doğrudan lazer desorpsiyonu pozitif iyonlar oluşturur ve bu mekanizma çoğu zaman önemli fragmanların oluşmasına neden olur (Blaze ve diğ., 2011). Yüzey kütle spektrometresi için lazer desorpsiyonunun avantajları, oldukça etkin lazer yoğunluğu ile 1 mikron veya daha düşük birçok küçük kırınım sınırlı noktaya odaklı yüksek çözünürlük ve mekansal bütünlük içermesidir. Püskürtmeli lazer desorpsiyonu (sputtering lazer desorpsiyonu) ile karşılaştırıldığında, daha yüksek verim ve yararlı desorplanmış türlerin dar bir kinetik enerji dağılımı olduğu görülür (Blaze ve diğ., 2011).

Doğrudan desorpsiyon kullanmanın bir dezavantajı lazer atışlarının tekrarlanabilirliğindeki kısıtlamadır. Bu desorplanmış türün verimi yüzeyin ısınması ile doğrusal değildir ve dalgalanmalar desorpsiyon olayının meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır.

Lazer desorpsiyonunu etkileyen diğ er bir parametre, yüzey maddesinin doğ asıdır. Ayrıca lazer güç ve matris etkilerindeki dalgalanmalar ve aynı zamanda iyon verimliliğ i de etkilemektedir. Desorplanmış türlerin desorpsiyon ve iyonizasyonunu arttıran bu etkiler, adsorplanmış enerji ve salınan türlerin iyonizasyon potansiyelinin de bir sonucudur. Buhar basınçları, sıcaklık ile katlanarak değ iştiğ i için, deneysel sonuçları karşılaştırmak zordur (Blaze ve diğ ., 2011).

Eğ er LDPI-MS ile MALDI yöntemini kıyaslarsak, LDPI-MS'de matris kullanılmasına gerek yoktur. LDPI-MS'de, sadece iyonlaşma enerjisi 7.87 eV'un altında olan bileşiklerin kütle spektrometresi analizi yapılabilmektedir. Bileşiklerin çoğunun iyonlaşma enerjisi 7.87 eV'un altında olduğ u için bu bir dezavantaj olarak görülmemektedir. Benzoik asit gibi iyonlaşma enerjisi 7.87 eV'un üstünde olan moleküller için 10.5 eV enerjili YAG lazeri kullanılmaktadır.

MALDI'de, desorbe edilen türlerin yaklaşık % 90'i nötral moleküllerdir. LDPI-MS, nötraller üzerinde analiz imkanı sunar, çünkü LDPI-MS'in iyonizasyon lazeri, bu nötralleri iyonlaştırabilir. Çünkü LDPI-MS, MALDI'ye kıyasla daha hassas bir analiz yöntemidir.

4. MALZEME VE YÖNTEM

4.1. HEAA'nın SENTEZİ

Prof. Luke Hanley doktora araştırma grubu tarafından bulunan ve grup üyelerinin isimlerinin baş harflerinin verildiğ i, yeni bir antibiyotik olan HEAA, Ampicillin antibiyotiğ i üzerinden sentezlenmiştir. Bu sentez iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada bir piperazin bileş iğ i olan N-metil piperazin (NMP) sentezlenir ve ince bir toz haline gelecek şekilde ezilir. Toz haline getirilen N-metil piperazin, yuvarlak dipli bir cam erlenmeyer içerisine konulur ve diklorometan (DCM) içinde süspanse edilir. Damla damla oksalil kloride (4M in DCM) ilave edilir. Bir taraftan da karıştırılarak oda sıcaklığ ında 30 dakika boyunca tepkimeye bırakılır.

Çözücü vakumlu kurutma yöntemi ile uzaklaştırılır. Elde edilen katı DCM içinde çözülür. Bütün katı şişenin duvarlarından bitene kadar çözelti sonike edilir. N-hidroksisüksinimid (NHS) 1.3 eşdeğer bileşiği olarak, 1,3,4,6,7,8-heksahidro-2H-pirimido[1,2-a]pirimidin polimer bileşiği ile birlikte çözeltiye ilave edilir. Meydana gelen çözelti, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca reaksiyona bırakılır ve vakumla kurutulur. Neticedeki katı, 1,3,4,6,7,8-heksahidro-2H-pirimido[1,2-a]pirimidin bağlı polimer bileşiğinden ayrılmak için süzülür, susuz asetonitril içinde çözülür ve liyofilize edilir.

Ortaya çıkan ürün, ampicilline bağlamak için kullanılan etikettir. Ampicillin su içerisinde çözülür, çözelti pH'ı trietilamin (TEA) ilave edilmesi ile bazik olacak şekilde ayarlanır. Hazırlanan etiket, susuz asetonitril içinde çözülür ve pH'ı trietilamin (TEA) bileşiğinin ilave edilmesi ile bazik hale gelen Ampicillin çözeltisi, hazırlanan etiket çözeltisine ilave edilir. Çözelti 45-50 °C de en az iki saat boyunca tepkimeye bırakılır. Oluşan ürün liyofilize edilir ve HPLC kullanılarak saflaştırılır.

4.2. MATRİKS YARDIMLI KÜTLE SPEKTROMETRESİ (MALDI-MS) ile HEAA MADDESİNİN ANALİZİ

Sentezlenen HEAA bileşiği , kütle spektrometresi (MS) ve kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (MS/MS) modu altında bir MALDI-MS (4700 TOF/TOF, AB Sciex, Foster City, CA, USA) kullanılarak analiz edildi.

MALDI-MS cihazında 355 nm Nd: YAG lazeri kullanılmıştır. Nd: YAG lazeri, yaklaşık olarak 150 mikron bir lazer leke büyüklüğü ile 200 arbitrary birimi (Donlan ve Costerton, 2002) ve 13 lazer gücü ile çalışmaktadır. Lazer gücü 2.800 arbitrary birimine ayarlanır, maksimum lazer gücü 121-7000 arbitrary birimi arasında değişmektedir. Kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (MS/MS) modunda, yaklaşık 14 µJ enerjili helyum çarpışma gazı ile kullanılmıştır.

Tüm veriler, ticari yazılım (4000 Serisi Explorer V3, AB Sciex) kullanılarak toplandı. Cihazın kalibrasyonu standart kalibrasyon karışımı kullanılarak gerçekleştirildi (mass standards kit for calibration, 4333604, AB SCIEX). Bu standart kalibrasyon karışımının kütle/yük (m/z) oranları: 905.05, 1297.51, 1571.61, 2094.46, 2466.72 and 3660.19`dur. Kütle spektrometresi (MS), görüntü alımı 150 µm ve spot başına 255 lazer çekim bir raster boyutu ile açık kaynak yazılım (4700 Görüntüleme V3, <http://maldi-msi.org>) kullanılarak yapıldı. Elde edilen MS görüntüleri daha açık kaynak kodlu BioMAP yazılımı kullanarak işlendi (BioMap V3803, <http://maldi-msi.org>) (Akhmetov, ve diğ., 2010).

4.3. LDPI-MS ile HEAA MADDESİNİN ANALİZİ

Chicago'daki Illinois Üniversitesi'nde Prof.Hanley`nin araştırma laboratuvarında bulunan 7.87 eV enerjili lazer LDPI-MS, 157 nm foto iyonizasyon için lazer vuruşlu kütle spektrometresi aracı olarak kullanılmıştır (Blaze ve diğ., 2012).

LDPI-MS cihazında 349 nm Nd: YLF desorpsiyon lazeri kullanılmıştır. Nd: YLF desorpsiyon lazeri, yaklaşık olarak 100 mikron bir lazer spot büyüklüğü ile 30-65 mW/cm² arasında değişen tipik desorpsiyon lazer pik güç yoğunluğu ile çalışmaktadır. Örnek, lazere göre 100 µm/s rastered edildi, her örnek nokta için yaklaşık 20 desorpsiyon lazer vuruşu yapılmıştır.

Desorplanan nötral moleküller, 400 µJ enerjili/vuruş iyonizasyon bölgesi ve yaklaşık 8 mm leke boyutu ile 100 Hz'lik bir 157 nm (7.87 eV) moleküler flor lazeri kullanılarak iyonize edildi. İyonlaştırılan nötraller yaklaşık 90° dönüş ile ekstraksiyon edilir. Prof. Hanley ve grubu tarafından tasarlanan iki aşamalı refletron uçuş zamanlı kütle spektrometresi inşa edilmiştir.

Cihaz ayrıca numune manipülasyonlu ve yüksek çözünürlüklü, gerçek zamanlı olarak örnekleri görüntülemek için bir dijital tek lens refleks kamerası ile bilgisayara ilave bir monitör vasıtasıyla, yüksek vakuma uyumlu çeviri aşaması ile donatılmıştır. Veri toplama ve örneğin ortam hareketleri bilgisayar ile özelleştirilmiş yazılım kullanılarak kontrol edilir.

4.4. LDPI-MS ve MALDI İÇİN NUMUNELERİN HAZIRLANIŞI

1 mg HEAA, 1 mL ACN (asetonitril) çözeltisi kullanılarak hazırlandı ve çözeltinin 1µL'si autopipet yardımı ile paslanmaz çelik MALDI tabağı üzerine damlatıldı. Oda sıcaklığında birkaç dakika kurumaya bırakıldı. Bu yöntem, çözeltinin 1µL'sinin damlatıldığı, aynı yerde birkaç kez (3-4 kez) tekrarlandı. 20 mg/ml α-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) matris çözeltisi (7:3 v:v) asetonitril: trifloroasetik asit (0.1% v:v) kullanılarak hazırlanmıştır ve bu çözeltinin 1µL si MALDI tabağı üzerindeki örnek üzerine damlatılır ve kurumaya bırakılır. İşlem gerekirse tekrarlanır. MALDI tabağı tamamen kurduğunda MALDI-MS analizi için hazırdır.

LDPI-MS analizi için CHCA matris çözeltisi kullanılmaz. Daha öncede açıklandığı gibi paslanmaz çelik MALDI tabağı üzerine birkaç kez aynı bölgeye örnek damlatılır ve kurumaya bırakılır. LDPI-MS, paslanmaz çelik MALDI tabağı üzerinde C ve D bölgelerinde daha iyi analiz imkanı sağladığı için örnek bu aralıkta olacak şekilde enjekte edilmelidir.

4.5. BAKTERİYEL LİKİD KÜLTÜRÜN HAZIRLANMASI

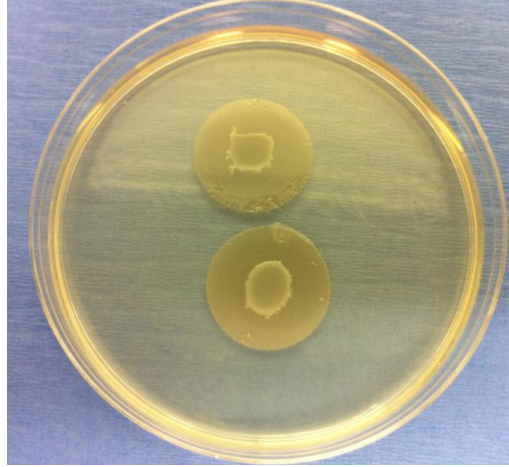
Enterococcus-faecalis V-583 bakterisinin -80°C muhafaza edilen kristal stoklarından bir tane alınır. Bu bakteri kristali avuç içinde tutularak oda sıcaklığında eritilir ve sıvı hale getirilir. 15 mL'lik test tüpüne, 5 mL TSB alınır ve üzerine V-583 enjekte edilir ve pipetle karıştırılır. Tüpün ağzı bakterinin hava alabilmesi için tamamen kapatılmaz, kapak hafif aralıklı olarak kapatılıp, bantlarla yanlardan tutturulur. 24 saat inkübatörde 37 °C ve 300 rpm de çalkalanmaya bırakılır.

4.6. MEMBRAN KULLANILARAK BAKTERİ BİYOFİLM TABAKALARININ HAZIRLANMASI

4 adet GE polikarbonat (black,0.22 micron,25 mm 100/pk) membran filmleri, bir plastik petri kabı içerisine yerleştirilerek UV lambası ile 15 dakika steril edilir. Steril cımbızlar kullanılarak membran ters çevrilir ve arka kısmıda 15 dakika UV lambası ile sterile edilir.

Bir adet steril TSA agar tabağı buzdolabından alınır ve önceden sterilize edilen membranlar, agar tabakası üzerine yerleştirilir. Her membran film tabakasının ortasına 40 µL bakteri kültüründen enjekte edilir. TSA agar tabağının üzeri kapağı ile kapatılarak inkübatörde 37°C büyümeye bırakılır. 24 saat sonra, membranlar dikkatlice yeni bir TSA agar tabağına yerleştirilmelidir. Tabaklar parafilm tabakası ile kaplanmamalıdır, böylece büyüme oksijen ile hızlandırılmış olur. Her 24 saatte bir TSA agar tabağı değiştirilmelidir, böylece bakteri için her 24 saatte bir besin tazelenmiş olur. 4 gün boyunca bu işlem tekrarlanır ve bakteri biyofilm tabakası büyümeye bırakılır. 4 günün sonunda biyofilm tabakaları çalışmak için hazırdır.

Bu çalışma için, 2 ayrı petri kabında toplamda 8 membranda V-583 bakteri biyofilmleri yetiştirilmiştir. Şekil 4.1, membran üzerinde yetiştirilen, *E. faecalis* V-583 biyofilm tabakalarını göstermektedir.



Şekil 4.1 : *Enterococcus-faecalis* V-583 Biyofilm Tabakası

4.7. BAKTERİ BİYOFİMLERİNDE CFU SAYIMI VE BAKTERİLERİN SÜSPANSE EDİLMESİ

30 mL `lik cam tüp içerisine, cam boncuklar ilave edilir. 1.5 mL PBS çözeltisi bu tübe ilave edilir. 4 adet V-583 biyofilm membranı bu çözelti içerisine atılır, tüpün ağzı iyice kapatılarak, yarım saat vorteks edilir. Bu sayede tüm bakteri hücreleri membrandan çözelti içerisine alınmış olur. Bu işleme yeniden süspanse etme (resuspension) denir.

6 adet sıralı seyreltme tüplerine 900 μL PBS çözeltilisi konulur. Süspansiyon işlemi tamamlanan bakteri kültüründen 100 μL alınarak, ilk tüpe konulur ve pipetle karıştırılır. Daha sonra bu tüpten 100 μL alınıp, ikinci tüpe konulur. Yeni bir pipetle karıştırılır. Üçüncü tüp için, ikinci tüpten 100 μL alınır ve yeni bir pipetle karıştırılır. Bu seri seyreltme işlemi 7.tüpe kadar yapılır. Son olarak 6.tüpten 100 μL alınır ve atılır. Seyreltme işlemi tamamlandıktan sonra, steril bir TSA agar tabağı alınır. Tabak ters çevrilerek, cetvelle 4 eşit parçaya bölünür. Bu bölmeler 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 olacak şekilde isimlendirildikten sonra, sırasıyla 3, 4, 5, 6 numaralı seyreltme tüplerinden 100 μL alınarak, toplamda 10 damla ve her bir damla 10 μL olacak şekilde ayarlı pipetle enjekte edilir. Agar tabağın ağzı dikkatlice kapatılıp, damlalar birbirine karışmayacak şekilde inkübatöre taşınır. Tabak parafilm tabakası ile çevrilmemelidir. Bu şekilde bakterilerin oksijeni kesilmemiş olur. Inkübatörde 37°C de 24 saat bekletildikten sonra, sonuçlar okunur. Her bir damlada yetişen bakteri sayısı sayılır. 10^6 bölmesindeki 10 noktadaki bakteri hücreleri sayılarak, 10'a bölünüp, ortalama olarak 1 mL'deki bakteri sayısı CFU bulunur. CFU (cell forming unit) bir bakteri çözeltilisindeki, koloni halinde çoğalan, bakteri sayısını ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Bu değer, plating çalışması sonucunda 40×10^8 CFU/mL olarak bulunmuştur. 10^3 , 10^4 ve 10^5 bölmelerinde bakteri konsantrasyonu yüksek olduğu için hücreler sayılamayacak, kadar çoktur ve 40×10^8 CFU/mL'den büyük olarak kabul edilir. Tablo 4.1: bakteri agar tabaklarında, 24 saat sonraki bakteri değerlerini göstermektedir.

Tablo 4.1: 24 saat sonraki bakteri hücreleri sayım sonuçları

10^3	$>40 \times 10^8$ CFU/mL
10^4	$>40 \times 10^8$ CFU/mL
10^5	$>40 \times 10^8$ CFU/mL
10^6	40×10^8 CFU/mL

1 mL V-583 bakteri çözeltilisinde 40×10^8 CFU bakteri hücreleri bulunmaktadır. 1.5 mL için bu rakam 60×10^8 CFU'dur. Çalışma için ideal olarak 5×10^5 CFU bakteri hücreleri gerekli ve yeterlidir.

4 adet V-583 biyofilm membranı, 30 mL'lik cam tüpte, cam boncuklar ve 10 mL PBS çözeltilisi ile yarım saat vorteks edilerek süspansiyon işlemi yapıldı. Bu bakteri çözeltilisinden, 1 mL ayrı bir tüpe alındı ve üzerine 9 mL PBS çözeltilisi ilave edilerek seyreltildi.

Bu tüpten de, 1 mL bakteri çözeltisi ikinci bir tüpe alındı ve üzerine 9 mL PBS çözeltisi ilave edilerek tekrar seyreltildi. Bu ikinci tüpteki son bakteri konsantrasyonu 6×10^5 CFU/mL olup, bizim çalışmamız için yeterlidir.

4.8. HEAA ve AMPICILLIN ÇÖZELTİLERİNİN HAZIRLANMASI

6×10^5 CFU/ mL V-583 bakteri çözeltisi hazırlandıktan sonra, 5 mg HEAA ve 5 mg Ampicillin 10 μ L DMSO, 40 μ L steril destile su ve 50 μ L PBS çözeltisinde çözüldü. Seri olarak seyreltme işlemi yapılarak 7 farklı konsantrasyonda HEAA ve Ampicillin çözeltisi hazırlandı.

Tablo 4.2: HEAA antibiyotığının, 7 farklı tüp için seyreltilmesini göstermektedir. 1.tüpte en yüksek konsantrasyonda HEAA maddesi bulunmaktadır. Bu konsantrasyon azalarak, 7. Tüpte en düşük seviyededir.

Tablo 4.2 : HEAA antibiyotığının seri olarak seyreltilmesi

Tüp No	İlk Konsantrasyon	Ardışık tüpe transfer edilen miktar	Transfer sonrası eklenen çözelti	Tüplerdeki son Konsantrasyon
1	5.000000 mg HEAA/100 μ L	1.tüpten 50 μ L, 2 numaralı tüpe alındı	40 μ L PBS,10 μ L bakteri solüsyonu eklendi	12.500000 mg/mL
2	2.500000 mg HEAA/100 μ L	2.tüpten 50 μ L, 3 numaralı tüpe alındı	40 μ L PBS,10 μ L bakteri solüsyonu eklendi	6.250000 mg/mL
3	1.250000 mg HEAA/100 μ L	3.tüpten 10 μ L, 4 numaralı tüpe alındı	10 μ L bakteri solüsyonu eklendi	10.125000 mg/mL
4	0.125000 mg HEAA/100 μ L	4.tüpten 10 μ L, 5 numaralı tüpe alındı	10 μ L bakteri solüsyonu eklendi	1.125000 mg/mL
5	0.012500 mg HEAA/100 μ L	5.tüpten 10 μ L, 6 numaralı tüpe alındı	10 μ L bakteri solüsyonu eklendi	0.112500 mg/mL
6	0.001250 mg HEAA/100 μ L	6.tüpten 10 μ L, 7 numaralı tüpe alındı	10 μ L bakteri solüsyonu eklendi	0.011250 mg/mL
7	0.000125 mg HEAA/100 μ L	7.tüpten 10 μ L alınarak atılır	10 μ L bakteri solüsyonu eklendi	0.001125 mg/mL

Kontrol tüpü, 50 μ L %10 DMSO,40 μ L PBS and 10 μ L bakteri solüsyonu içermektedir. Kontrol tüpü, HEAA antibiyotığını içermemektedir.

Tablo 4.3'de HEAA maddesi yerine Ampicillin antibiyotığının kullanılması ile hazırlanan deney tüplerine ait bilgiler verildi

Seyreltme işlemi HEAA'ya benzer olarak aynı şekilde yapılmıştır. 1.tüpte en yüksek konsantrasyonda Ampicillin maddesi bulunmaktadır. Bu konsantrasyon azalarak, 7. tüpte en düşük seviyededir.

Tablo 4.3 : Ampicillin antibiyotiğinin seri olarak seyreltilmesi

Tüp No	İlk Konsantrasyon	Ardışık tüpe transfer edilen miktar	Transfer sonrası eklenen çözelti	Tüplerdeki son Konsantrasyon
1	5.000000 mg Ampicillin/100µL	1.tüpten 50 µL, 2 numaralı tüpe alındı	40 µL PBS,10 µL bakteri solüsyonu eklendi	12.500000 mg/mL
2	2.500000 mg Ampicillin/100µL	2.tüpten 50 µL, 3 numaralı tüpe alındı	40 µL PBS,10 µL bakteri solüsyonu eklendi	6.250000 mg/mL
3	1.250000 mg Ampicillin/100µL	3.tüpten 10 µL, 4 numaralı tüpe alındı	10 µL bakteri solüsyonu eklendi	10.125000 mg/mL
4	0.125000 mg Ampicillin/100µL	4.tüpten 10 µL, 5 numaralı tüpe alındı	10 µL bakteri solüsyonu eklendi	1.125000 mg/mL
5	0.012500 mg Ampicillin/100µL	5.tüpten 10 µL, 6 numaralı tüpe alındı	10 µL bakteri solüsyonu eklendi	0.112500 mg/mL
6	0.001250 mg Ampicillin/100µL	6.tüpten 10 µL, 7 numaralı tüpe alındı	10 µL bakteri solüsyonu eklendi	0.011250 mg/mL
7	0.000125 mg Ampicillin/100µL	7.tüpten 10 µL alınarak atılır	10 µL bakteri solüsyonu eklendi	0.001125 mg/mL

Tüm tüpler inkübatörde 18 saat boyunca çalkalanmaya bırakıldı. (37 ° C and 300 rpm). 18 saat sonra 900 µL PBS ile seri seyreltme işlemi yapıldı. Seyreltme işleminden sonra, her tüpten 100 µL çözelti alınıp, agar tabaklara 10 nokta halinde damlatıldı. Hazırlanan agar tabakları, inkübatöre konularak 37 ° C'de 24 saat bekletildikten sonra, petri tabağındaki bakteri hücreleri sayıldı.

MBC (minimum bakteri konsantrasyonu) çalışmaları HEAA ve Ampicillin ile iki defa tekrarlanmış ve aynı sonuçlar alınmıştır.

5. BULGULAR

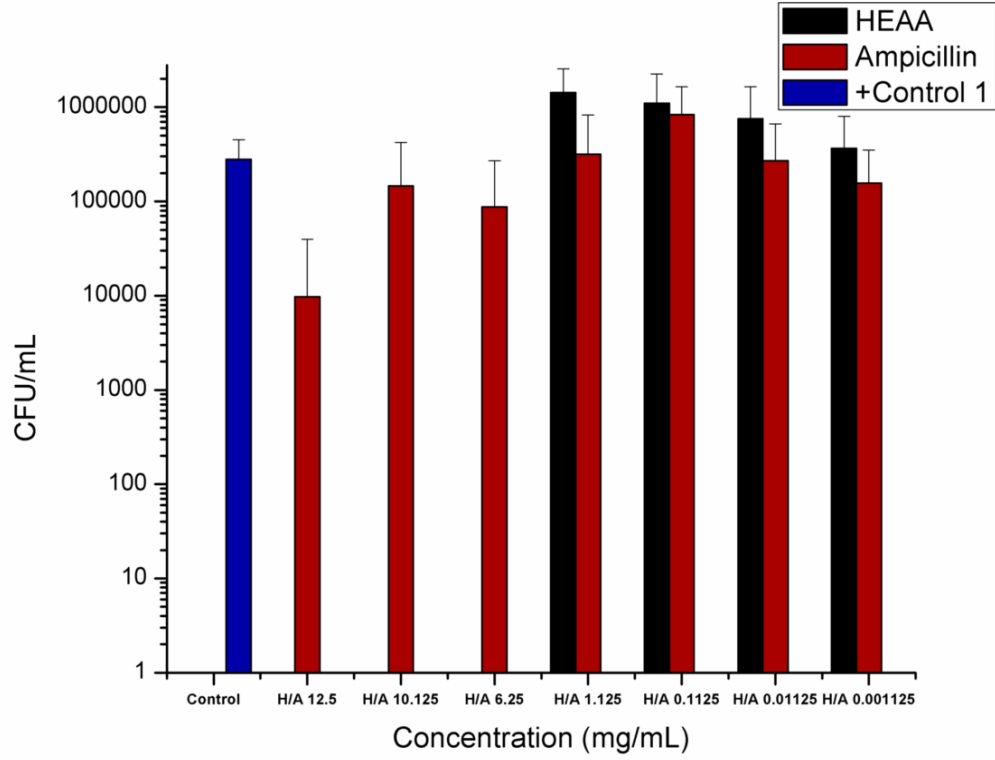
5.1. İLK DENEME SONRASI HEAA ve AMPICILLIN İÇİN BAKTERİ SAYIMI SONUÇLARI

Agar tabaklarında 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6 olarak ayrılan kısımlarda bakteriler sayılarak, 10 bölünür ve ortalama olarak 1 mL'deki bakteri sayısı CFU bulunur. Tablo 5.1: HEAA ve Ampicillin için, 7 farklı konsantrasyondaki bakteri sayısını CFU biriminde göstermektedir. HEAA maddesinin 10.125 mg/mL ve daha yüksek konsantrasyonlarda tüplerdeki tüm bakterilerin öldüğü gözlenmiştir. Ampicillin maddesinin, en yüksek konsantrasyonlu tüplerinde bile bakterileri öldüremediği gözlenmiştir. Sonuçlar, HEAA'nın Ampicillin'e kıyasla V-583 bakterileri üzerinde daha etkili olduğunu göstermiştir. Pozitif kontrol tüpünde 37×10^5 CFU/ mL bakteri bulunmuştur.

Tablo 5.1 : İlk deneme sonrasında elde edilen bakteri sayım sonuçları

Konsantrasyon mg/mL	HEAA 1. Deneme V-583 CFU/mL	Ampicillin 1. Deneme V-583 CFU/mL
12.500000 mg/mL	Tüm bakteriler öldü	4.0×10^5
6.250000 mg/mL	Tüm bakteriler öldü	5.4×10^5
10.125000 mg/mL	Tüm bakteriler öldü	9.7×10^5
1.125000 mg/mL	29.5×10^5	8.8×10^5
0.112500 mg/mL	15.5×10^5	16×10^5
0.011250 mg/mL	38.4×10^5	5.5×10^5
0.001125 mg/mL	13.6×10^5	12×10^5

Alınan sonuçlar, origin lab (2008 versiyon) kullanılarak grafik haline getirilmiştir. Şekil 5.1: HEAA, Ampicillin ve pozitif kontrol için bakteri sayısını göstermektedir. HEAA maddesi 12.5, 10.25 ve 6.25 mg/mL konsantrasyonlarında tüm bakteriler üzerinde antibakteriyel etki göstermektedir. Ampicillin, 12.5 mg/mL'den daha yüksek konsantrasyonlarda tüm bakterileri öldürebilmektedir.



Şekil 5.1: HEAA ve Ampicillin ilk deneme sonrası sonuçların karşılaştırılması

5.2. İKİNCİ DENEME SONRASI HEAA ve AMPICILLIN İÇİN BAKTERİ SAYIMI SONUÇLARI

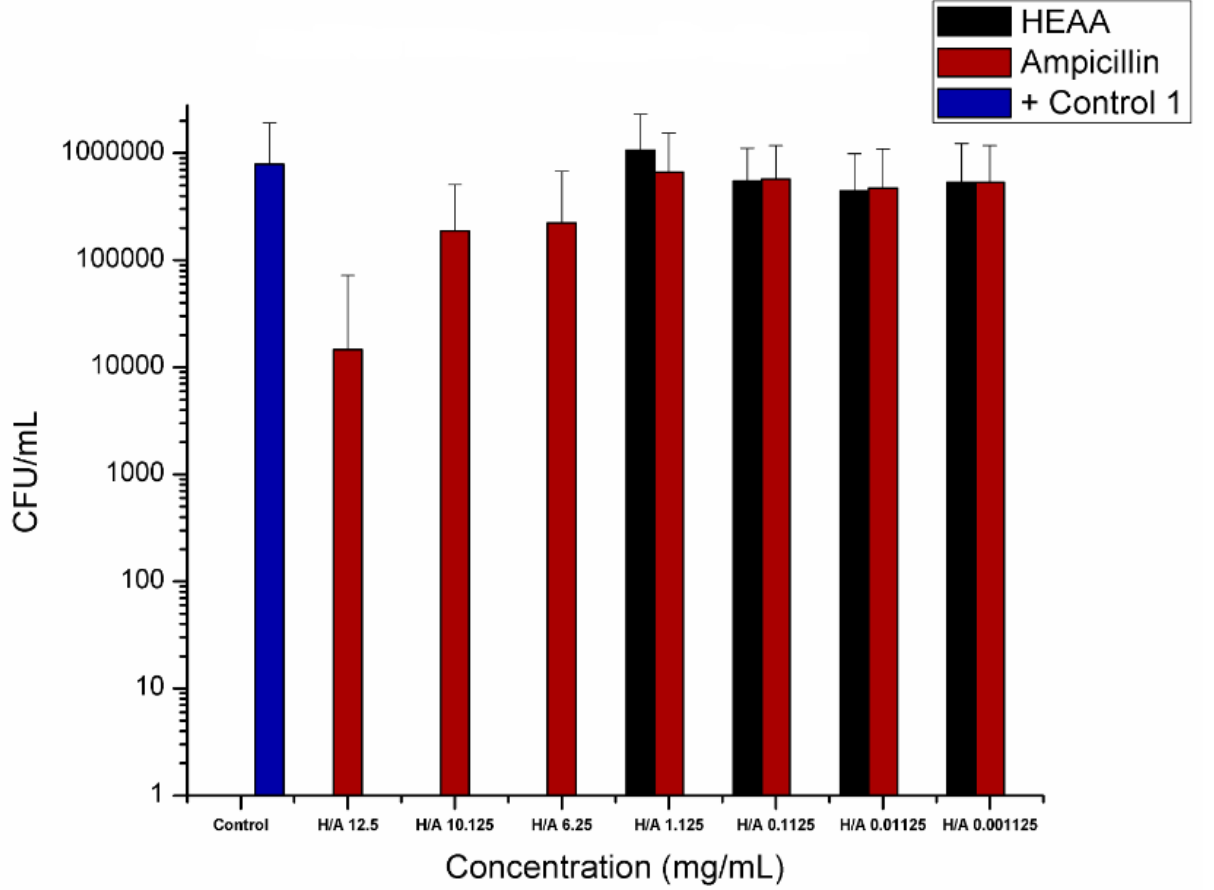
Sonuçların kesinleştirilebilmesi için aynı deney tekrarlanmıştır. İkincil deney sonuçları, birincil deneyle uyushmaktadır. Tablo 5.2: ikinci deneme sonrası elde edilen sonuçları göstermektedir. HEAA maddesi, Ampicilline göre daha etkili bir şekilde bakterileri öldürmektedir. Birincil deney sonuçlarına paralel olarak, HEAA maddesinin 10.125 mg/mL ve daha yüksek konsantrasyonlarda tüplerdeki tüm bakterileri öldürdüğü gözlenmiştir. Ampicillin maddesinin en yüksek konsantrasyonlu tüplerinde bile bakterileri öldüremediği gözlenmiştir. Sonuçlar, HEAA'nın Ampicillin'e kıyasla V-583 bakterileri üzerinde daha etkili olduğunu birkez daha göstermektedir.

Tablo 5.2 : İkinci deneme sonrasında elde edilen bakteri sayım sonuçları

Konsantrasyon mg/mL	HEAA 2. Deneme V-583 CFU/mL	Ampicillin 2. Deneme V-583 CFU/mL
12.500000 mg/mL	Tüm bakteriler ölü	6.0×10^5
6.250000 mg/mL	Tüm bakteriler ölü	9.7×10^5
10.125000 mg/mL	Tüm bakteriler ölü	15.8×10^5
1.125000 mg/mL	3.5×10^5	18.1×10^5
0.112500 mg/mL	7.3×10^5	7.9×10^5
0.011250 mg/mL	15.8×10^5	16.1×10^5
0.001125 mg/mL	21.5×10^5	45.5×10^5

Pozitif kontrol tüpünde 38.3×10^5 CFU/ mL bakteri bulunmuştur.

İkincil deney sonuçları, origin lab ile grafik haline getirilmiş ve birincil deney sonrası grafiği ile paralel sonuçlar alınmıştır. Şekil 5.2 : HEAA, Ampicillin ve pozitif kontrol için bakteri sayısını göstermektedir. HEAA maddesi 12.5, 10.25 ve 6.25 mg/mL konsantrasyonlarında tüm bakteriler üzerinde antibakteriyel etki göstermektedir. Ampicillin, 12.5 mg/mL'den daha yüksek konsantrasyonlarda tüm bakterileri öldürebilmektedir.



Şekil 5.2 : HEAA ve Ampicillin ikinci deneme sonrası sonuçların karşılaştırılması

5.3. İLK VE İKİNCİ DENEY SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Genel olarak, mikrobakteriyel çalışmalarda aynı deney çalışmasının tekrarlanmasına rağmen benzer sonuçların alınması zordur. Çünkü, burada esas olan bakterinin antibiyotik karşısındaki davranışdır ve bunu önceden tahmin etmek oldukça güçtür.

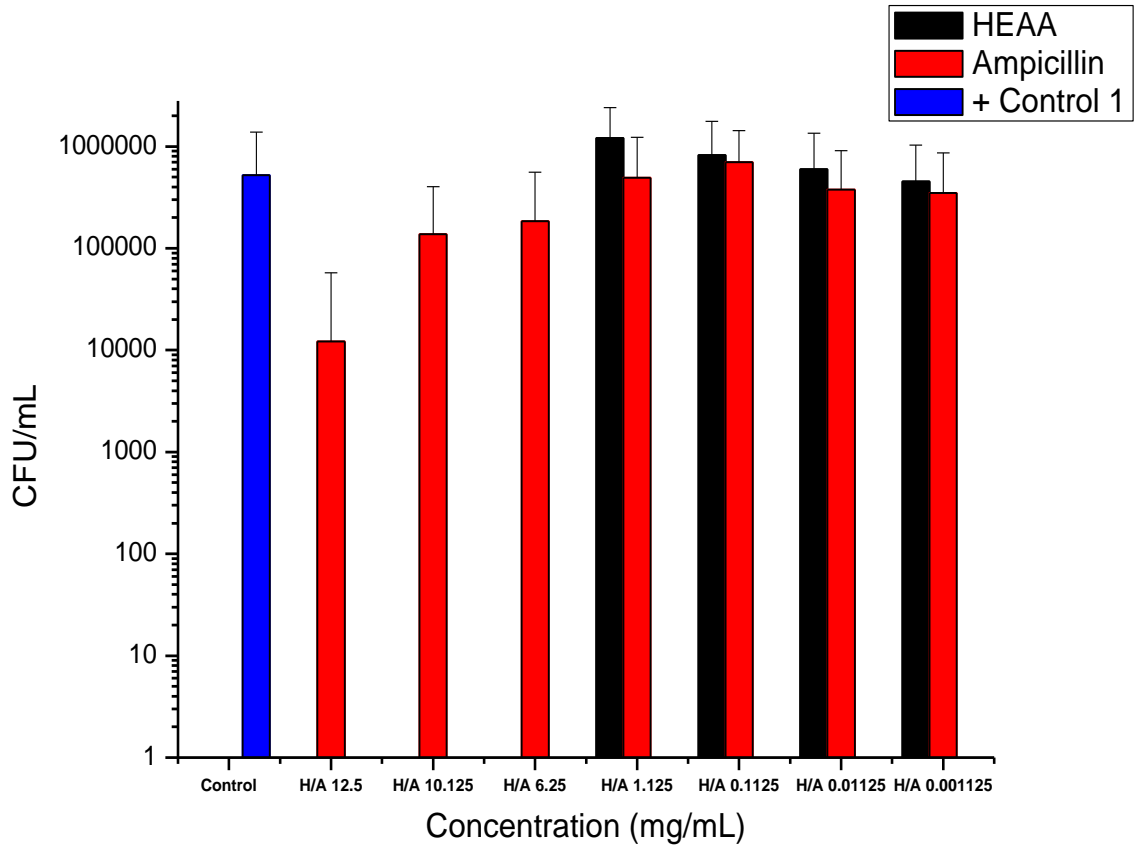
Bu çalışmada, ilk deney sonrasında, alınan sonuçların kesin olması için aynı çalışma ikinci kez tekrarlandı ve birbirine paralel sonuçlar alındı. Tablo 5.3: ilk ve ikinci deney sonuçlarını bir arada göstermektedir. Sonuçlar, HEAA maddesinin, bilinen Ampicillin antibiyotiğine kıyasla daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu deney sonuçlarından yola çıkarak, Prof. Hanley tarafından HEAA antibiyotiği için patent başvurusunda bulunulmuştur.

Tablo 5.3 : HEAA ve AMPICILLIN bakteri sayım sonuçları

Antibiyotik Konsantrasyonu (mg/mL)	HEAA 1. Deneme V-583 CFU/mL	HEAA 2. Deneme V-583 CFU/mL	Ampicillin1.Deneme V-583 CFU/mL	Ampicillin 2.Deneme V-583 CFU/mL
12.500000 mg/mL	Tüm bakteriler ölü	Tüm bakteriler ölü	4.0×10^5	6.0×10^5
6.250000 mg/mL	Tüm bakteriler ölü	Tüm bakteriler ölü	5.4×10^5	9.7×10^5
10.125000 mg/mL	Tüm bakteriler ölü	Tüm bakteriler ölü	9.7×10^5	15.8×10^5
1.125000 mg/mL	29.5×10^5	3.5×10^5	8.8×10^5	18.1×10^5
0.112500 mg/mL	15.5×10^5	7.3×10^5	16×10^5	7.9×10^5
0.011250 mg/mL	38.4×10^5	15.8×10^5	5.5×10^5	16.1×10^5
0.001125 mg/mL	13.6×10^5	21.5×10^5	12×10^5	45.5×10^5

Şekil 5.3: Birincil ve ikincil deney sonrası alınan sonuçların ortalaması alınarak, origin labda hazırlanan grafiği göstermektedir.

Sonuçlar, benzer şekilde HEAA antibiyotığının, V-583 bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkisini göstermektedir.

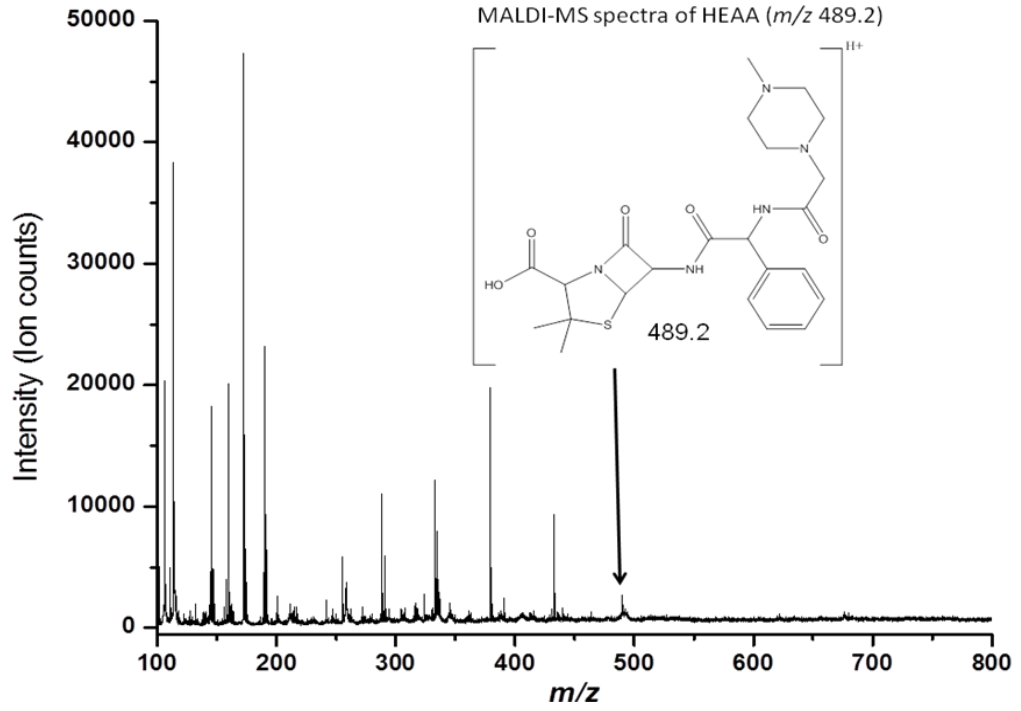


Şekil 5.3 : İlk ve ikinci deney sonrası ortalama sonuçların karşılaştırılması

5.4. HEAA 'NIN MALDI ve LDPI-MS ile ANALİZ SONUÇLARI

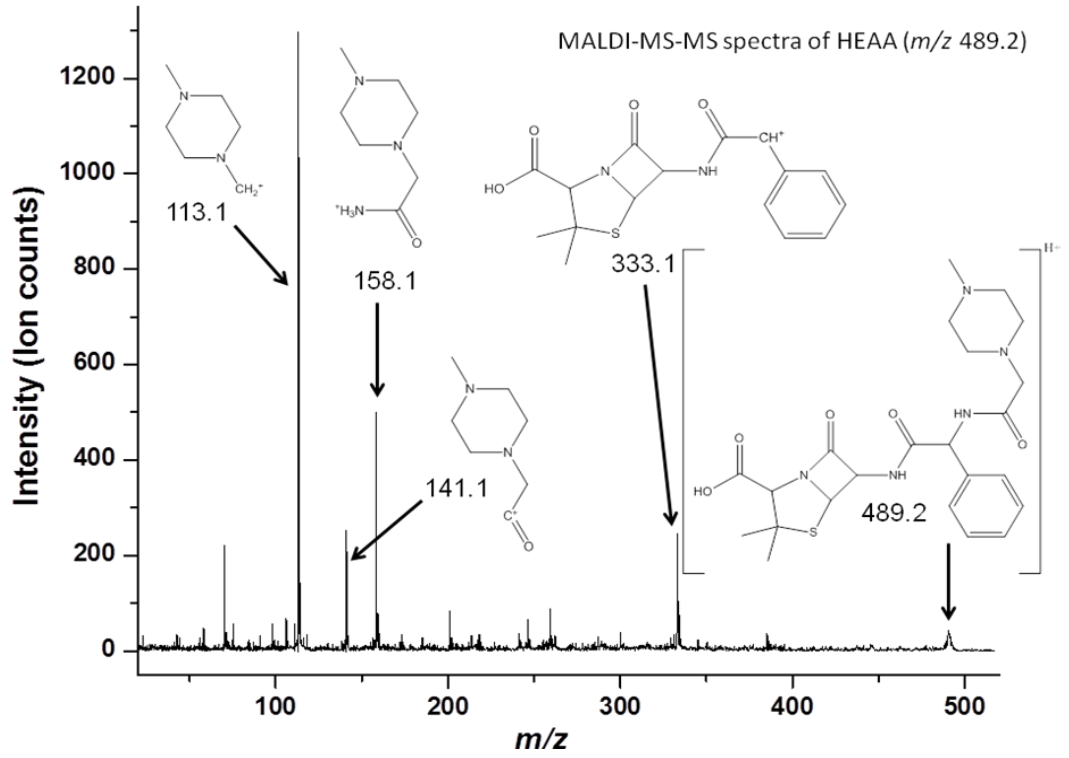
Yapılan çalışmalar sonucunda, HEAA maddesinin antibakteriyel olması, maddenin günümüzde antibiyotik olarak kullanılabilmesi imkanını sunmuştur. Bunun için, önce HEAA'nın yapısının aydınlatılması gerekiyordu. Bu nedenle, HEAA maddesi LDPI-MS ve MALDI analiz yöntemleri ile analiz edilmiş ve maddenin moleküler yapısı, formülü belirlenmiştir.

Şekil 5.4: HEAA maddesinin MALDI-MS'de alınan spektrumunu göstermektedir. HEAA maddesinin moleküler ağırlığı 489.2 olarak bulunmuştur. MALDI-MS kütle spektrumunda, 489.2'de HEAA maddesi gözlenmiştir.



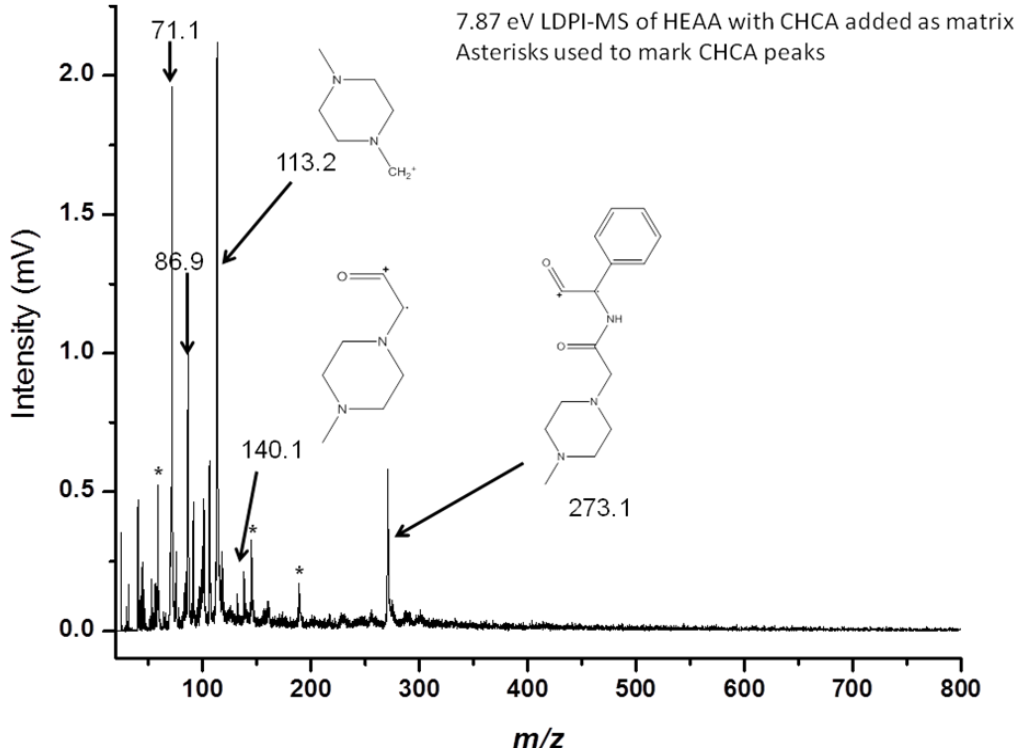
Şekil 5.4: HEAA maddesinin MALDI-MS spektrumu

Bir maddenin elementel kompozisyonunun belirlenmesi için fragman piklerin incelenmesi gerekir. Bu nedenle, HEAA maddesi MALDI-MS/MS modu ile fragmanlarına parçalanmıştır. Şekil 5.5: MALDI-MS/MS ile 489.2'de HEAA moleküler pikini göstermektedir. 333.1, 141.1, 158.1 ve 113.1 m/z oranlarında HEAA fragmanları gözlenmektedir.



Şekil 5.5 : HEAA maddesinin MALDI-MS-MS spektrumu ve fragman spektrumları

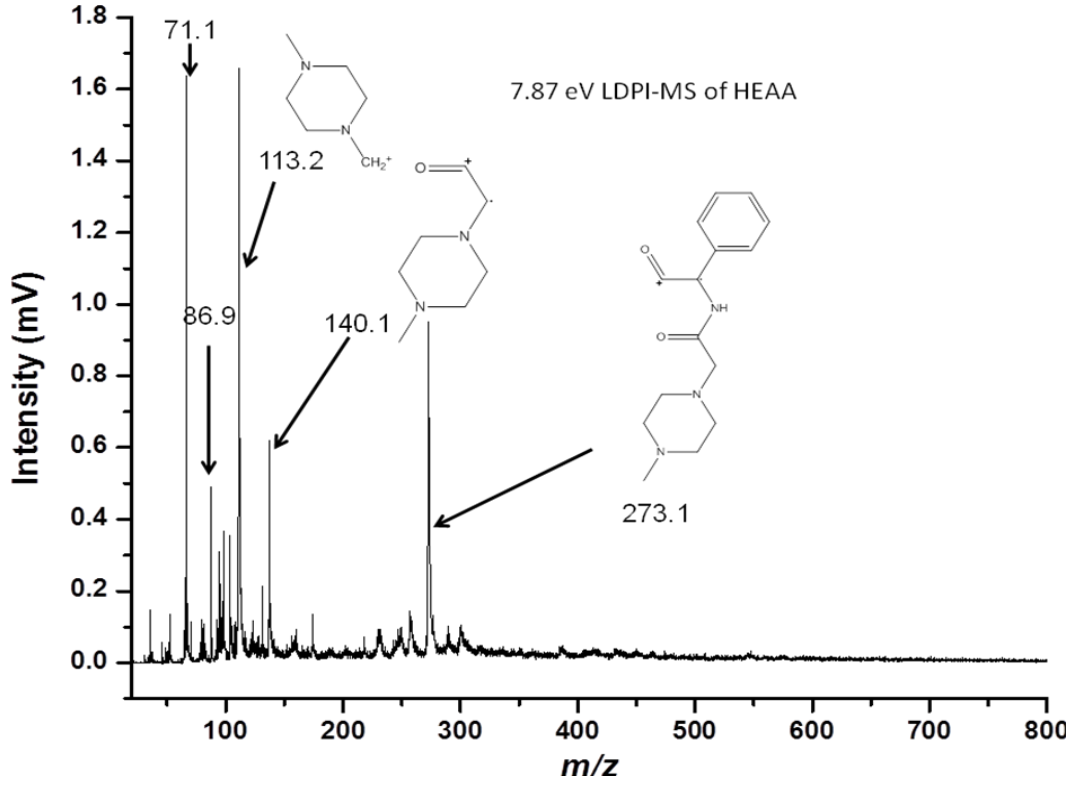
HEAA maddesi, LDPI-MS ile benzer şekilde analiz edilmiştir. Sonuçların MALDI-MS ile kıyaslanabilmesi için öncelikle CHCA matrisi kullanılarak HEAA örneği hazırlanmış ve LDPI-MS spektrumu alınmıştır. Şekil 5.6: 7.87 CHCA matrisi maddesi ile birlikte hazırlanan HEAA maddesinin LDPI-MS kütle spektrumunu göstermektedir. LDPI-MS ile moleküler pik gözlenmemiştir. 71.1, 86.9, 113.2, 140.1, 273.1 m/z değerlerinde fragman pikleri gözlenmiştir.



Şekil 5.6: 7.87 CHCA matriks maddesi ile birlikte hazırlanan HEAA maddesinin LDPI-MS kütle spektrumu

Sonuçların kesin olabilmesi için aynı analiz LDPI-MS’de matriks maddesi kullanılmadan gerçekleştirilmiştir.

Şekil 5.7: 7.87 eV LDPI-MS ile HEAA maddesinin kütle spektrumunu göstermektedir. Önceden LDPI-MS’de matriks ile yapılan çalışmaya paralel olarak aynı m/z değerlerinde fragman pikleri bulunmuştur. Bu da HEAA’nın LDPI-MS ile yapılan analizini kesinleştirmektedir.



Şekil 5.7: 7.87 eV LDPI-MS ile HEAA maddesinin kütle spektrumu

Yapılan çalışmalar sonucunda, HEAA maddesinin antibakteriyel etkisinin olduğu ispatlanmıştır. HEAA maddesi, Ampicillin ile piperacillin antibiyotiklerinin derivatizasyonu (türevlendirilmesi) sonucunda sentezlenen yeni bir maddedir.

Bu madde, önce HEAA olarak isimlendirilmiştir, patent alımı sonrası HEAA maddesi MPA-Ampicillin olarak adlandırılmıştır. MPA-Ampicillin, Ampicillin antibiyotiğine kıyasla, *E.faecalis* biofilm tabakalarında daha etkili bir antibakteriyel etki göstermektedir.

MPA-Ampicillin maddesi; LDPI-MS, MALDI-MS ve MALDI-MS/MS yöntemleri ile analiz edilerek moleküler yapısı aydınlatılmıştır. Tüm sonuçlar, patent alımı için kullanılmıştır.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu yüksek lisans tezinde, Prof. Hanley ve araştırma grubu tarafından sentezlenen yeni bir antibiyotik olan HEAA'nın antibakteriyel özelliği yüzey kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmiştir.

Yüzey kütle spektrometrelerinden, Lazer desorpsiyon post iyonizasyon kütle spektrometresi (LDPI-MS) ve Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma kütle spektrometresi (MALDI-MS) en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Temelde birbirlerine benzeyen yöntemler olmasına karşın LDPI-MS, iki farklı enerjide iyonlaştırıcı lazer ile çalışılabilmektedir. Burada, 7.87 eV enerjili F₂ lazeri ve 10.5 eV enerjili YAG lazeri iyonlaştırıcı lazerler olarak kullanılmaktadır. LDPI-MS'i diğer kütle spektrometrelerinden farklı kılan özelliği, desorpsiyonun ve iyonizasyonun farklı lazerlerle gerçekleştirilmesidir.

Bu çalışmada, her iki yüzey kütle spektrometresi kullanılarak, E.faecalis biyofilm tabakaları üzerine HEAA maddesi ve onun sentezinde kullanılan Ampicillin maddesinin etkisi karşılaştırılmıştır. Deneysel sonuçlara göre, HEAA maddesinin Ampicillin'e göre, E.faecalis biyofilm bakterileri üzerinde daha etkili olduğu saptanmıştır. Bulunan bu sonuç, iki sebepten ötürü önemlidir. Birincisi, yeni bulunan bir antibiyotiğin (HEAA), Ampicillin gibi etkin bir antibiyotiğe kıyasla, daha güçlü etkiye sahip olduğunun yüzey kütle spektrometresi kullanılarak ispatlanmasıdır.

Bakteriler yüzeylere bağlanıp biyofilm denen yoğun kümeler oluştururlar. Bu filmler birkaç mikrometre kalınlıktan yarım metre derinliğe kadar değişebilir ve birden çok bakteri protista ve arke türü içerebilir. Biyofilmlerde yaşayan bakteriler, hücre ve hücre dışı bileşenler ile karmaşık bir düzen oluştururlar. Antibiyotiklere karşı da yüksek direnç gösterirler.

Ampicillin, penisilinler olarak adlandırılan antibiyotik sınıfına ait olup, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu ve kuvvetli bir antibiyotiktir. Ampicillin *H. influenzae*, *N. gonore*, *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, streptokok ve stafilokok türleri dahil birçok bakterilere karşı etkili olup aynı zamanda, *Enterococcus-faecalis* V-583 biyofilm bakteri tabakaları üzerinde de etkilidir.

HEAA maddesi 12.5, 10.25 ve 6.25 mg/mL konsantrasyonlarında tüm bakteriler üzerinde antibakteriyel etki göstermektedir. Ampicillin, 12.5 mg/mL'den daha yüksek konsantrasyonlarda tüm bakterileri öldürebilmektedir. Sonuçların kesinleştirilebilmesi için aynı deney tekrarlanmıştır. İkincil deney sonuçları, birincil deneyle uyuşmaktadır. HEAA maddesi, Ampicillin'e göre daha etkili bir şekilde bakterileri öldürmektedir. Birincil deney sonuçlarına paralel olarak, HEAA maddesinin 10.125 mg/mL ve daha yüksek konsantrasyonlarda tüplerdeki tüm bakterileri öldürdüğü gözlenmiştir. Bunun yanında, Ampicillin maddesinin en yüksek konsantrasyonlu tüplerinde bile bakterileri öldüremediği gözlenmiştir.

Deney sonuçlarının önemli olduğu ikinci durum ise, HEAA maddesinin moleküler yapısının; MALDI-MS, MALDI-MS/MS ve LDPI-MS kütle spektrometreleri ile analiz edilmiş olmasıdır. Daha önce belirttiğimiz gibi, bu madde, önce HEAA olarak isimlendirilmiştir, patent alımı sonrası HEAA maddesi MPA-Ampicillin olarak adlandırılmıştır. MPA-Ampicillin, Ampicillin antibiyotiğine kıyasla, *E.faecalis* biyofilm tabakalarında daha etkili bir antibakteriyel etki göstermektedir. Yüzey kütle spektrometreleri, yüzeyden moleküllerin desorpsiyonu ve sonrasında da, iyonizasyonu aşamalarını içerir. İşte bunlar gerçekleştirilirken, molekülün içerisinde bulunduğu karmaşık yapıdan ötürü (organizma), analizin oldukça hassas gerçekleştirilmesi gerekir. LDPI-MS yönteminde, yüzeyden desorplanan moleküller % 90 oranında nötral yapılardır ve bunları iyonlaştırmak için, ikinci bir lazer kullanılır. Bu durum MALDI-MS'ten farklıdır. MALDI-MS'te ise LDPI-MS'te olmayan matriks kullanılır. Yani hedef iyon, matriks denilen bir çözelti tarafından adeta zırh şeklinde sarılır. Bu zırhın görevi enerji fazlasını soğurmaktır. Bu çalışmada her iki yöntem de uygulandı ve HEAA maddesi hem LDPI-MS hem de MALDI analiz yöntemleri ile analiz edilerek, maddenin moleküler formülü belirlendi.

HEAA maddesinin MALDI-MS'de alınan spektrumundan, HEAA maddesinin moleküler ağırlığı 489.2 olarak bulunmuştur yani, MALDI-MS kütle spektrumunda, 489.2'de HEAA maddesi gözlenmiştir. Bir maddenin elementel kompozisyonunun belirlenmesi için fragman piklerinin incelenmesi gerekir. Bu nedenle, HEAA maddesi MALDI-MS/MS modu ile fragmanlarına parçalanmıştır. 333.1, 141.1, 158.1 ve 113.1 m/z oranlarında HEAA fragmanları gözlenmektedir.

HEAA maddesi, LDPI-MS ile benzer şekilde analiz edilmiştir. Sonuçların MALDI-MS ile kıyaslanabilmesi için öncelikle CHCA matriks kullanılarak HEAA örneği hazırlanmış ve LDPI-MS spektrumu alınmıştır. LDPI-MS ile moleküler pik gözlenememiştir. Ancak, 71.1, 86.9, 113.2, 140.1, 273.1 m/z değerlerinde fragman pikleri gözlenmiştir. Sonuçların kesin olabilmesi için aynı analiz LDPI-MS'de matriks maddesi kullanılmadan gerçekleştirilmiştir. 7.87 eV LDPI-MS ile HEAA maddesinin kütle spektrumuna göre, önceden LDPI-MS'de matriks ile yapılan çalışmaya paralel olarak aynı m/z değerlerinde fragman pikleri bulunmuştur. Bu da HEAA'nın LDPI-MS ile yapılan analizini kesinleştirmektedir.

KAYNAKLAR

AAKRA, A., VEBO, H., SNIPEN, L., HIRT, H., AASTVEIT, A., KAPUR, V., DUNNY, G., MURRAY, B., NES, F. I., 2005, *Transcriptional Response of Enterococcus faecalis V583 to Erythromycin*, American Society for Microbiology, Vol 49, 2246-2259.

AKHMETOV, A., MOORE, J., GASPER, G., KOIN, P., HANLEY L., 2010, *Laser Desorption Postionization for Imaging MS of Biological Material*, *Journal of Mass Spectrometry*, 45, 137-145.

BRANDA, S., VIK, S., FRIEDMAN, L., KOLTER, R., 2005, *Biofilms: The Matrix Revisited*, *Trends Microbiol* 13 (1): 20–26. doi:10.1016/j.tim.2004.11.006. PMID 15639628.

CHUGHTAI, K., HEEREN RON, A., 2010, *Mass Spectrometric Imaging for Biomedical Tissue Analysis*, FOM-Institute for Atomic and Molecular Physics, Science Park 104, 110, 3237–3277, 1098 XG Amsterdam, The Netherlands, Chem. Rev.

DAVEY, M., O'TOOLE, G., 2000, *Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics*, *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (4): 847–67. doi:10.1128/MMBR. 64.4.847-867.2000. PMID 11104821.

DONLAN, R., COSTERTON, J.,W., 2002, *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*, *Clin Microbiol Rev* 15 (2): 167–93. doi: 10.1128/CMR. 15.2.167-193.2002. PMID 11932229.

DONLAN, R., 2002, *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*, *Emerg Infect Dis* 8 (9): 881–90. PMID 12194761.

EDIRISINGHE, D., P., 2003, *Derivatization 7.87 eV Postionization Mass Spectrometry and Its Application to Biofilm Characterzation*, M.Sc., University of Illinois at Chicago.

ERSÖZ, A., 2010, *Aletli Analiz Kitabı*, Anadolu Üniversitesi, <http://ue.anadolu.edu.tr/eKitap/KIM202U.pdf>[Eylül,2012]

HANLEY, L.,2012, *Chemical and Electron Ionization, MALDI*, Chem 522, Lecture Notes, Chapter 5,7,9.

HOFFMANNDE, E., STROOBANT, V.,2001,*Mass Spectrometry Principles and Applications*,Wiley,Second Edition

http://www.vias.org/glazebrook_practphys/glazebrook_practical_physics_008.html
[Eylül,2012]

<http://www.medicinenet.com/ampicillin/article.htm>[Eylül,2012]

http://www.uzaktanegitimplatformu.com/UEP/uep_ylisans/ey2/ey2_download/Enstrumantal_Yontemler_II_Yansilar.pdf[Eylül,2012]

<http://www.e-kimya.com/kutle-spektrometresi.html> [Eylül,2012]

<http://www.chem.uic.edu/hanley/publications/CMSDG%20LHanley%20LDPI%20Talk%209oct12.pdf> [Eylül,2012]

http://www.eurogentec.com/EGT/Images/madi_tof.jpg [Eylül,2012]

M. T. BLAZE, M., AKHMETOV, A., AYDIN, B., EDIRISINGHE D., P., UYGUR, G., HANLEY L., 2012, *Quantification of Antibiotic in Biofilm-Inhibiting Multilayers by 7.87 eV Laser Desorption Postionization MS Imaging*, Analytical Chemistry, 84 (21), 9410–9415, Department of Chemistry, MC 111, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60607.

M.T.BLAZE, M., AYDIN, B., CARLSON, ROSE., HANLEY, L., 2011, *Protein Identification and Imaging of Enterococcus faecalis Biofilms by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry*, MT 59717, Department of Chemistry, MC 111, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60607-7061, Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman.

ÖNER, E., 2001, *Enstürmantal Yöntemler – II*, Marmara Üniversitesi, Teknik Eğitim Fakültesi, Tekstil Eğitimi Bölümü, İstanbul.

YAMAN, M., 2010, *Enstrümantal Analiz Ders Notları*, Malatya. http://www.profdrmehmetyaman.com/ders_notlari/ens.pdf[Eylül,2012]

SPARKMAN, D. ,WATSON, T. ,*Introduction to Mass Spectrometry*, 2007, Wiley, 4.th edition

ÖZGEÇMİŞ

Gülşah Uygur, 22.08.1987 tarihinde İstanbul'da doğdu. Kadıköy Anadolu Lisesi, Fen bilimleri bölümünü bitirdikten sonra İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya bölümünden 2010 ve Endüstri Mühendisliği bölümünden 2011 yılında mezun oldu. 2010 yılında, İstanbul Üniversitesi, Kimya bölümü, Prof. Dr. Ayben Kilislioğlu ile Fiziksel Kimya anabilim dalında yüksek lisans çalışmalarına başladı. Tez bilimsel kısmı çalışmalarına paralel olarak, 2012 Ocak ayından itibaren, University of Illinois, Chicago'da Prof. Luke Hanley ile doktora çalışmalarına halen devam etmektedir.