

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**1,4-DİAZABİSİKLO[2.2.2]OKTAN ESASLI KATYONİK POLİMERLERİN HALKA
AÇILMA METATEZ POLİMERİZASYONU METODU İLE SENTEZİ VE
ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

AYLİN KAYMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
FİZİKOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. TARIK EREN**

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**1,4-Diazabisiklo[2.2.2]oktan ESASLI KATYONİK POLİMERLERİN HALKA
AÇILMA METATEZ POLİMERİZASYONU METODU İLE SENTEZİ VE
ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Aylin KAYMAZ tarafından hazırlanan tez çalışması 12.10.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Tarık EREN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Tarık EREN
Yıldız Teknik Üniversitesi

.....

.....



Bu çalışma, TÜBİTAK 215Z330 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm bilgi ve birikimini esirgemeyen, araştırmacı yönümü geliştirmem için beni yönlendiren çok sevgili hocam Prof. Dr. Tarık EREN' e eğitim hayatımda ve diğer tüm konularda bana destek olduğu için teşekkürü bir borç bilirim.

Her konuda yanımda olan, bana destek olan ve her zaman daha iyisine yönlendiren kıymetli arkadaşlarım Deniz YERLEŞTİ ve İmren ÇOTUK' a, çalışmalarım boyunca birlikte vakit geçirdiğim değerli grup arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmamı, hayatım boyunca elimden tutan, kararlarıma saygı duyan, her daim sevgilerini ve varlıklarını hissettiğim çok sevgili abim Murat PAK, ablam Çiğdem Demet PAK, yeğenim Ada PAK, babam Halil PAK, annem Hediye PAK ve hayat arkadaşım Doğan KAYMAZ' a ithaf ederim.

Ekim, 2017

Aylin KAYMAZ

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| SİMGE LİSTESİ..... | ix |
| KISALTMA LİSTESİ..... | x |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | xii |
| ÇİZELGE LİSTESİ | xiv |
| ÖZET | xv |
| ABSTRACT..... | xvii |
| BÖLÜM 1 | |
| GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1 Literatür Özeti | 4 |
| 1.2 Tezin Amacı | 17 |
| 1.3 Hipotez | 18 |
| BÖLÜM 2 | |
| BAKTERİLER | 19 |
| 2.1 Bakterilerin Tarihçesi..... | 19 |
| 2.2 Bakterilerin Sınıflandırılması | 21 |
| 2.2.1 Bakterilerin Mikroskopta Görünüşlerine Göre (Morfolojik) Sınıflandırılmaları . | 21 |
| 2.2.1.1 Yuvarlak bakteriler (Coccus) | 22 |
| 2.2.1.2 Çubuk bakteriler (Bacillus) | 23 |
| 2.2.1.3 Spiral bakteriler (Spirillum) | 23 |
| 2.2.2 Gram Boyadan Etkilenmelerine Göre Bakteriler | 23 |
| 2.2.2.1 Gram Pozitif Bakteriler..... | 25 |
| 2.2.2.2 Gram Negatif Bakteriler | 26 |

BÖLÜM 3

| | |
|--|----|
| POLİMERLER..... | 27 |
| 3.1 Polimerlerin Sınıflandırılması | 27 |
| 3.2 Polimerlerin Sentezi | 28 |
| 3.2.1 Kondenzasyon (Basamaklı) Polimerizasyonu | 28 |
| 3.2.2 Zincir (Katılma) Polimerizasyonu | 29 |
| 3.3 Kontrollü Polimerizasyon | 31 |
| 3.3.1 Olefin Metatezi | 31 |
| 3.3.1.1 Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu (ROMP)..... | 32 |
| 3.3.2 Olefin Metatez Katalistleri..... | 35 |

BÖLÜM 4

| | |
|--|----|
| ANTİMİKROBİYAL POLİMERLER | 37 |
| 4.1 Antimikrobiyal Doğal Peptitler | 37 |
| 4.1.1 Katyonik Antimikrobiyal Peptitlerin Yapısı | 37 |
| 4.1.2 Antimikrobiyal Peptitlerin Etki Mekanizmaları..... | 38 |
| 4.1.2.1 Fıçı Tahtası Modeli | 39 |
| 4.1.2.2 Kilim Modeli | 40 |
| 4.1.2.3 Miçel Agregat Modeli | 40 |
| 4.1.2.4 Toroidal Model..... | 40 |
| 4.1.3 Doğada Bulunan Bazı Antimikrobiyal Peptitler | 41 |
| 4.1.3.1 Magainin | 41 |
| 4.1.3.2 Melittin | 41 |
| 4.1.3.3 Defensinler | 42 |
| 4.1.3.4 Sekropin | 42 |
| 4.1.3.5 Bakterisinler | 43 |
| 4.1.3.6 Histatinler..... | 43 |
| 4.2 Antimikrobiyal Sentetik Polimerler | 43 |

BÖLÜM 5

| | |
|---|----|
| DENEYSEL ÇALIŞMA VE BULGULAR..... | 45 |
| 5.1 Materyal ve Yöntem | 45 |
| 5.1.1 Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler | 45 |
| 5.1.2 Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Gereçler..... | 45 |
| 5.2 Monomerlerin Sentezi..... | 46 |
| 5.2.1 Furan Maleik Anhidrit Diels Alder Ürününün (4,10-Dioxa-tricyclo [5.2.1.0 ^{2,6}] dec-8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 1)..... | 46 |
| 5.2.2 Bromookzanorbornen (4-(3-bromopropyl)-10-oxa-4- azatricyclo[5.2.1.0 ^{2,6}]dec8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 2)..... | 46 |
| 5.2.3 Pridin Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (Ürün 3)..... | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.4 DABCO Tek Katyonik Yük Tuzu İçeren Norbornen Sentezi (Ürün 4) | 47 |
| 5.2.5 DABCO Çift Katyonik Yük Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (Ürün 5) | 48 |
| 5.3 Grubbs 3 Katalistin Sentezi | 48 |
| 5.4 DABCO Çift Katyonik Yük İçeren Okzanorbornen Monomerinin ROMP ile Homopolimerizasyonu | 48 |
| 5.4.1 DABCO Çift Katyonik Yük Esaslı Homopolimerinin Sentezi (D_3)..... | 49 |
| 5.4.2 DABCO Çift Katyonik Yük Esaslı Homopolimerinin Sentezi (D_10) | 49 |
| 5.5 Pridin İçeren Okzanorbornen Monomerinin ROMP ile Polimerizasyonu | 49 |
| 5.5.1 Pridin İçeren Okzanorbornen Monomerinin ROMP ile Polimerizasyonu (P_3) | 49 |
| 5.5.2 Pridin İçeren Okzanorbornen Monomerinin ROMP ile Polimerizasyonu (P_10) | 50 |
| 5.6 DABCO ve Pridin Monomerlerinin ROMP Polimerizasyonu ile Kopolimerlerinin Sentezi | 50 |
| 5.6.1 Kopolimer 1'in ROMP ile Polimerizasyonu (D1_P1) | 50 |
| 5.6.2 Kopolimer 2'nin ROMP ile Polimerizasyonu (D1_P2) | 50 |
| 5.6.3 Kopolimer 3'ün ROMP ile Polimerizasyonu (D2_P1) | 51 |
| 5.7 Polimerlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Sıvı ve Katı Fazda İncelenmesi | 51 |
| 5.7.1 MIC Değerlerinin Belirlenmesi..... | 51 |
| 5.7.2 Katı Yüzeyde Antimikrobiyal Etkinlik | 52 |
| 5.8 Sitotoksite Çalışmaları | 52 |
| 5.8.1 Hemolitik Konsantrasyon (HC ₅₀) Tayini | 52 |
| 5.9 Katyonik Yük Yoğunluğu Tayini | 53 |
| 5.9.1 Polimerlerin Cam Yüzeyle Kaplanması | 53 |
| 5.9.2 Sodyum Floresein Metodu | 53 |
| 5.10 Biyofiziksel Çalışma | 54 |
| 5.10.1 Bakteri ve Polimer Etkileşmesinin Zeta Potansiyel ile Ölçülmesi..... | 54 |
| BÖLÜM 6 | |
| DENEYSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ..... | 55 |
| 6.1 Monomerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu | 55 |
| 6.1.1 Pridin Esaslı Monomerin Sentezi | 59 |
| 6.1.2 DABCO Esaslı Monomerin Sentezi..... | 60 |
| 6.2 Homopolimer Sentezi..... | 63 |
| 6.3 Kopolimer Sentezi | 68 |
| 6.4 Antimikrobiyal Etkinlik | 71 |
| 6.4.1 Polimerlerin Sıvı Fazdaki Antimikrobiyal Etkinliklerinin İncelenmesi..... | 71 |
| 6.4.2 Polimerlerin Katı Yüzeydeki Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi..... | 73 |
| 6.5 Sitotoksite Çalışmaları | 75 |
| 6.5.1 Hemolitik Konsantrasyon | 75 |
| 6.6 Katyonik Yük Yoğunluğu Tayini | 76 |
| 6.7 Polimerlerin Bakteriler ile Etkileşmesinin Biyofiziksel Teknikler ile İncelenmesi . | 77 |
| 6.7.1 Bakteri Polimer Etkileşiminin Zeta Potansiyel ile Ölçülmesi | 77 |
| BÖLÜM 7 | |
| SONUÇ VE ÖNERİLER | 80 |

| | |
|----------------|----|
| KAYNAKLAR..... | 82 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 88 |



SİMGE LİSTESİ

| | |
|------|---|
| °C | Derece santigrat |
| CFU | Koloni oluşturan birim (colony forming units) |
| cm | Santimetre |
| Da | Dalton |
| g | Gram |
| kcal | Kilokalori |
| kDa | Kilodalton |
| L | Litre |
| M | Molar |
| McF | Mcfarland |
| mg | Miligram |
| MHz | MegaHertz |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| mM | Milimolar |
| mmol | Milimol |
| mV | Milivolt |
| n | Mol |
| nm | Nanometre |
| ppm | Parts per million |
| rpm | Rounds per minute |
| µg | Mikrogram |
| µL | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| µM | Mikromolar |

KISALTMA LİSTESİ

| | |
|---------------------------------|--|
| Ac ₂ O | Asetik anhidrit |
| ADMET | Asiklik dien metatez |
| AMP | Antimikrobiyal peptit |
| ATRP | Atom transfer radikal polimerizasyonu |
| CDCl ₃ | Döterokloroform |
| CH ₃ I | Metil iyodat |
| CLSM | Confocal Laser Scanning Microscopy |
| CM | Çapraz metatez |
| CRP | Kontrollü radikalik polimerizasyon |
| d ₆ -DMSO | Dötero Dimetil sülfoksit |
| DABCO | 1,4-Diazabisiklo[2.2.2]oktan |
| DCM | Diklorometan |
| DMF | Dimetil formamid |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DP | Polimerizasyon derecesi |
| EVE | Etil vinil eter |
| GPC | Moleküler eleme kromatografisi (Gel permeation chromatography) |
| H ₂ O ₂ | Hidrojen peroksit |
| H ₂ SO ₄ | Sülfürik asit |
| HC | Hemolitik konsantrasyon |
| HCl | Hidroklorik asit |
| HIV | İnsan immün yetmezliği virüsü |
| HRBC | Taze kırmızı kan hücreleri |
| MeOH | Metanol |
| MIC | Minimum İnhibitör Konsantrasyonu |
| M _n | Sayica ortalama molekül ağırlığı |
| N ₂ | Azot gazı |
| Na ₂ SO ₄ | Sodyum sülfat |
| NaCl | Sodyum Klorür |
| NaHCO ₃ | Sodyum bikarbonat |
| NMP | Nitroksit aracılıklı polimerizasyon |
| NMR | Nükleer Manyetik Rezonans |
| PDI | Poli dispersite indeks |

| | |
|--------|---|
| PEG | Polietilenglikol |
| RAFT | Tersinir eklenme-parçalanma zincir transferi |
| RBC | Kırmızı kan hücreleri |
| ROMP | Halka açılma metatez polimerizasyonu |
| SEM | Taramalı elektron mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy) |
| SM | Self metatez |
| TFE | Trifloro etanol |
| THF | Tetrahidrofur |
| TMS | Tetrametilsilan |
| UV-Vis | Ultraviyole görünür bölge |
| WHO | The World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü) |



ŞEKİL LİSTESİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 1. 1 Hastanelerde yaygın olarak kullanılan kateterler | 3 |
| Şekil 1. 2 Literatürdeki bazı katyonik antimikrobiyal polimer | 5 |
| Şekil 1. 3 Farklı azot grubu içerikli kuaterner gruba sahip polimerlerin sentezi | 6 |
| Şekil 1. 4 RAFT metodu ile sentezlenen katyonik polimerler | 7 |
| Şekil 1. 5 (a) (AEMAH/MA) kopolimeri sentezi, (b) (AEMAH/MA/GMA- CPF) kopolimeri sentezi | 8 |
| Şekil 1. 6 Ciprofloxacın içeren kopolimerlerin E. coli' ye karşı MIC değerleri | 9 |
| Şekil 1. 7 ROMP esaslı katyonik homopolimerler | 9 |
| Şekil 1. 8 Trifloroasetik asit tuzu içeren çift amin tuzuna sahip ROMP tipi polimer ... | 10 |
| Şekil 1. 9 Hegzonat_3K ve Hegzil_3K homopolimerlerinin yapıları | 11 |
| Şekil 1. 10 Azalan moleküler yükün model polimer üzerinde gösterimi | 11 |
| Şekil 1. 11 Pridin içeren norbornen tipi polimerler | 12 |
| Şekil 1. 12 Poly(2)' nin gümüş yüklü filmlerinin oluşumunun şematik gösterimi | 13 |
| Şekil 1. 13 Farklı hidrofobik gruplara sahip homopolimerlerin sentezi | 13 |
| Şekil 1. 14 Poly3 ve farklı hidrofilik gruba sahip monomerlerin kopolimerleri | 14 |
| Şekil 1. 15 Poly3 _n _co_PolyP _m kopolimerlerinin HC ₅₀ ve MIC sonuçları | 15 |
| Şekil 1. 16 Çalışma kapsamında kullanılan polimerler | 15 |
| Şekil 1. 17 Antimikrobiyal polinorbornen türevleri | 16 |
| Şekil 1. 18 Okzanorbornen esaslı monomer ve polimerler | 17 |
| Şekil 2. 1 Yuvarlak bakterilerin SEM görüntüleri | 22 |
| Şekil 2. 2 Gram pozitif ve gram negatif bakteri duvarı | 24 |
| Şekil 2. 3 Gram boyama tekniğinin şematik gösterimi | 24 |
| Şekil 2. 4 Gram boyama sonrası gram pozitif ve gram negatif bakterilerin mikroskop görüntüleri | 25 |
| Şekil 3. 1 Polimerleşme şeması | 27 |
| Şekil 3. 2 Polimerlerin monomer dizilimine göre sınıflandırılması | 28 |
| Şekil 3. 3 PET sentezi | 29 |
| Şekil 3. 4 Katılma polimerizasyonu mekanizması | 30 |
| Şekil 3. 5 Poli (metil metakrilat) ayrı- ayrı ve birleşerek sonlanma basamaklarının gösterimi | 30 |
| Şekil 3. 6 Metatez reaksiyonunun şematik gösterimi | 32 |
| Şekil 3. 7 Halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) | 32 |
| Şekil 3. 8 Genel ROMP reaksiyon mekanizması | 34 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Şekil 3. 9 | Chauvin tarafından önerilen mekanizma..... | 35 |
| Şekil 3. 10 | Literatürdeki metatez aktif katalizörler örnekleri | 35 |
| Şekil 3. 11 | Rutenyum bazlı ilk metatez katalizörünün sentezi..... | 36 |
| Şekil 3. 12 | Grubbs 1., 2. ve 3. jenerasyon katalizörleri | 36 |
| Şekil 4. 1 | Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin sekonder yapıları (A: β - defensin, B: magainin, C: halka yapıdaki peptitler D: uzun peptitler)..... | 38 |
| Şekil 4. 2 | Katyonik peptitlerin dış membrandan geçişleri | 39 |
| Şekil 4. 3 | Etki mekanizmasında fiçı tahtası ve kilim modeli | 40 |
| Şekil 4. 4 | Magainin Yapısı | 41 |
| Şekil 4. 5 | Melittin Yapısı | 42 |
| Şekil 4. 6 | α , β , θ defesinlerin yapısı | 42 |
| Şekil 4. 7 | Sekropinin yapısı | 43 |
| Şekil 6. 1 | Çalışma kapsamında sentezlenen homopolimerlerin ve kopolimerlerin yapısı..... | 55 |
| Şekil 6. 2 | Çalışma kapsamında sentezlenen monomerlerin sentetik şeması..... | 56 |
| Şekil 6. 3 | Ürün 1 ^1H - NMR Spektrumu..... | 57 |
| Şekil 6. 4 | Ürün 2 ^{13}C - NMR Spektrumu..... | 57 |
| Şekil 6. 5 | Ürün 2 ^1H NMR Spektrumu | 58 |
| Şekil 6. 6 | Ürün 2 ^{13}C NMR Spektrumu | 58 |
| Şekil 6. 7 | Ürün 3 ^1H NMR Spektrumu | 59 |
| Şekil 6. 8 | Ürün 3 ^{13}C NMR Spektrumu | 60 |
| Şekil 6. 9 | ^1H -NMR Spektrumu..... | 61 |
| Şekil 6. 10 | Ürün 4 ^{13}C -NMR Spektrumu | 62 |
| Şekil 6. 11 | Ürün 5 ^1H NMR Spektrumu..... | 62 |
| Şekil 6. 12 | Ürün 5 ^{13}C NMR Spektrumu..... | 63 |
| Şekil 6. 13 | Çalışma kapsamında sentezlenen homopolimerlerin sentetik şeması | 64 |
| Şekil 6. 14 | P_3 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu | 66 |
| Şekil 6. 15 | P_10 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu | 66 |
| Şekil 6. 16 | D_3 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu..... | 67 |
| Şekil 6. 17 | D_10 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu..... | 67 |
| Şekil 6. 18 | D1_P1 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu..... | 69 |
| Şekil 6. 19 | D1_P2 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu..... | 69 |
| Şekil 6. 20 | D2_P1 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu..... | 70 |
| Şekil 6. 21 | Mikrodilüsyon yönteminin şekilsel gösterimi..... | 72 |
| Şekil 6. 22 | Antimikrobiyal aktivite incelemesinde kullanılan airborne testi ve disk difüzyon yönteminin gösterimi | 74 |
| Şekil 6. 23 | Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin yüzeydeki % antimikrobiyal etkinlikleri..... | 75 |

ÇİZELGE LİSTESİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Çizelge 1. 1 Enfeksiyon etkenlerinin gruplandırılması | 2 |
| Çizelge 3. 1 Bazı halkalı olefinlerin gerilme enerjileri | 33 |
| Çizelge 6. 1 Sentezlenen polimerlerin hedef, NMR, GPC Mn değerleri | 71 |
| Çizelge 6. 2 Polimerlerin mikrodilüsyon testi ile elde edilen MIC değerleri | 73 |
| Çizelge 6. 3 Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin antimikrobiyal aktivite ve toksisite değerleri..... | 76 |
| Çizelge 6. 4 Polimerlerin sodyum floresein testi ile bulunan yük yoğunlukları | 77 |
| Çizelge 6. 5 Polimer ve bakteri etkileşimi zeta potansiyel ölçüm sonuçları | 79 |

**1,4-DİAZABİSİKLO[2.2.2]OKTAN ESASLI KATYONİK POLİMERLERİN HALKA
AÇILMA METATEZ POLİMERİZASYONU METODU İLE SENTEZİ VE
ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Aylin KAYMAZ

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tarık EREN

Bakteri enfeksiyonu evrensel bir problemdir ve özellikle son 10 yılda artan ölüm oranı ile daha da önemli hale gelmiştir. Bakterilerin antibiyotiklere karşı kazandıkları direnç enfeksiyona bağlı hastalıkların temel nedenidir. Yeni jenerasyon antibiyotikler bakterilere karşı savaşta son derece önemlidir. Temel olarak yeni jenerasyon antibiyotiklerde; ana savunma peptitleri ve bunların sentetik taklitleri olmak üzere iki ana kategori vardır. Antimikrobiyal sentetik polimerler ana savunma peptitlerinin en önemli sentetik analoglarıdır. Bu polimerlerin fizyolojik ortamda kararlı oluşu, sentezleme kolaylıkları ve düşük maliyetli olmaları doğal antimikrobiyal peptitlere karşı önemli avantaj sağlamaktadır. Amfifilik yapıdaki polimerlerin bakteri hücre duvarını zedelediği ve bunun sonucunda bakteriyi öldürdüğü bilinmektedir. Bu sebeple bakterinin bu tip öldürme mekanizmasına karşı direnç geliştiremeyeceği öngörülmektedir.

Çalışma kapsamında halka açılma metatez polimerizasyonu ile iyi tasarlanmış polimerler sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerlerin katyonik yapıları anyonik bakteri yüzeyi ile yüksek etkileşim sağlamaktadır. DABCO ve pridin içeren norbornen türevi

monomerlerin; 3000 g/mol ve 10.000 g/mol molekül ağırlığına sahip homopolimerleri ve farklı mol oranlarında 5000 g/mol ağırlığındaki kopolimerleri sentezlenmiştir. Farklı hidrofobik gruba ve yük yoğunluğuna sahip monomerlerin homopolimerleri ve kopolimerleri için antimikrobiyal aktivite testleri *E.coli* ve *S.aureus'* a karşı hem solüsyonda hem de katı yüzeyde (cam) yapılmıştır. Sitotoksisite çalışmaları kapsamında hemolitik konsantrasyon (HC₅₀) değerleri tespit edilmiştir. Polimerlerle kaplı cam yüzeylere floresein testi yapılarak katyonik yük yoğunluğu belirlenmiştir. Katyonik yük yoğunluğu polimer ile kaplı cam yüzeylerin antimikrobiyal etki mekanizmalarının incelenmesinde kullanılmıştır. Ayrıca yapı- aktivite ilişkisini anlamak için zeta potansiyel testi yapılmıştır. Çalışma sonucunda DABCO esaslı homopolimerin (D_10) gram (+) bakteriye karşı en yüksek aktiviteye (*S. aureus*= 8 µg/mL) sahip polimer olduğu tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin *E. Coli'* ye karşı aktiviteleri zayıftır (>256 µg/mL). Polimerlerin hemolitik konsantrasyon değerleri ~2000 µg/mL bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: ROMP, DABCO, Hemolitik konsantrasyon, Antimikrobiyal etkinlik, Katyonik polimer

**SYNTHESIS OF 1,4-DIAZABICYCLO[2.2.2]OCTANE BASED CATIONIC
POLYMERS WITH RING OPENING METATHESIS POLYMERIZATION
TECHNIQUE AND EXAMINATION OF THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY**

Aylin KAYMAZ

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Tarik EREN

Bacterial infection, as a global problem, become more important especially in the last decades due to rising death rates. The new generation antibiotics are quite important for fighting against the bacteria. Basically, there are two main categories of new generation antibiotics: the host defense peptides and their synthetic analogues of host defense peptides. Antimicrobial synthetic polymers are one of the most important mimics for host defense peptides. The stable behavior of these polymers at physiological environments and their easy and cheap synthesization make them superior comparing to other natural peptide derivatives. It is also well known that amphiphilic polymers disrupt the cell membranes of the bacteria and can realize the cell death. It is suggested that the bacteria will not be resistant against this destruction mechanism.

This paper focuses on the synthesis of polymers with well defined architecture derived by Ring Opening Metathesis Polymerization technique. The synthesized polymers have a cationic structure with the advantage of having high interaction with the anionic surfaces of the bacteria. In the scope of this work, the monomers containing DABCO and pyridine have been used to synthesize homopolymers with molecular weights of 3000 g/mole and 10000 g/mole and their copolymers with molecular weights of 5000 g/mole. The effect of hydrophobicity and cationic charge density on the antimicrobial activity

was investigated. *E.coli* and *S.aureus* were used to determine antimicrobial activity of polymers on solid surface (glass) and solution phase. Cytotoxicity of the polymers were determined by hemolytic concentration (HC_{50}). Floresein test was used to calculate cationic charge density on coating glass with polymers. Cationic charge density was used to investigate mechanism of antimicrobial efficiency on coating glass surface with polymer. Also zeta potential studies was applied to understand structure- activity relationship. During the experiments, it has been observed that DABCO based homopolymer (D_10) has the highest activity (*S.aureus*= 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). All polymers show low antimicrobial activity against *E.coli* ($< 256 \mu\text{g}/\text{mL}$). Hemolytic concentration values of polymers were found $\sim 2000 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Key Words: ROMP, DABCO, Hemolytic concentration, Antimicrobial activity, Cationic polymer



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Enfeksiyon; mikroorganizmaların insan vücuduna girerek oluşturdukları enflamatuvar reaksiyonların sonucunda ortaya çıkan hastalıklardır. Enfeksiyon oluşumu için; enfeksiyon oluşturuu mikroorganizma, duyarlı konak ve enfeksiyon oluşumu için uygun ortam koşulları olmalıdır. Enfeksiyon oluşum faktörleri; mikroorganizmanın virülansı, enfeksiyon dozu ve konağın bağışıklık durumudur. Doğada ve konakta çoğalabilen enfeksiyon etken mikroorganizmaları Çizelge 1.1' de ana gruplar halinde verilmiştir. Enfeksiyona neden olan hastalık etkenin vücuda girdiği andan hastalık belirtilerinin saptandığı ana kadar geçen süre inkübasyon dönemidir. Enfeksiyon türüne göre bu dönemin süresi farklılık göstermektedir ve enfeksiyonun önlenmesi için en önemli dönemdir. Inkübasyon döneminin bitmesi ile klinik bulguların başlamasına kadar olan süreç ise prodrom dönemidir. Bu süreçte; baş ağrısı, ateş, iştahsızlık, halsizlik gibi şikayetler başlamaktadır [1].

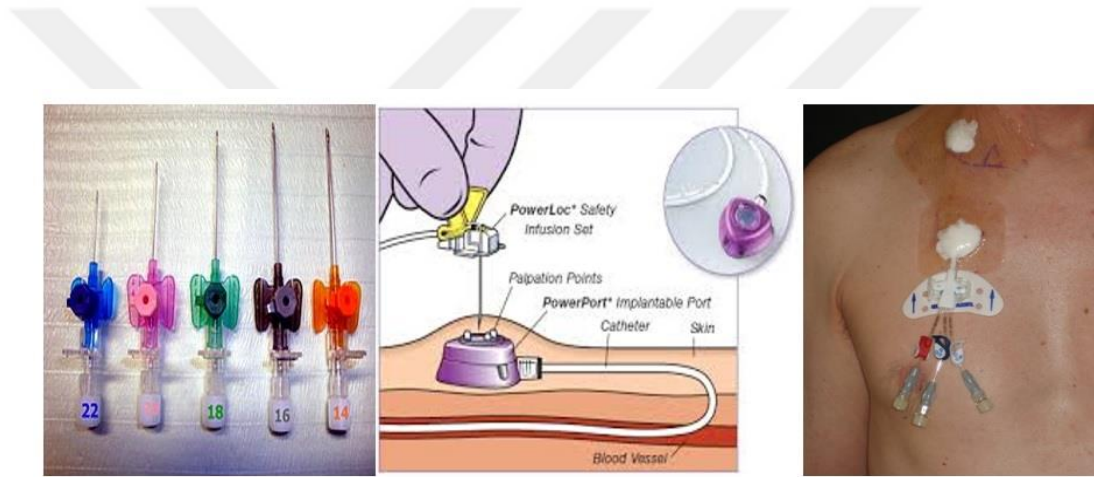
Çizelge 1. 1 Enfeksiyon etkenlerinin gruplandırılması

| |
|--------------------------------|
| Aselüler |
| Prionlar (< 5 nm) |
| Viroidler (< 5 nm) |
| Virüsler (20- 300 nm) |
| Tek hücreliler |
| Prokaryotikler (200 – 2000 nm) |
| Bakteriler |
| Klamidyalar |
| Mikoplazmalar |
| Riketsiyalar |
| Ökaryotikler (> 2000) |
| Mantarlar (maya) |
| Protozoonlar |
| Çok hücreliler |
| Mantarlar (küf mantarları) |
| Helmintler |
| Artropotlar |

Enfeksiyon unsurları genellikle organizmaya deri veya mukoza yolu ile bulaşır. Hastalık taşıyıcı insanların aksırık, öksürük gibi etrafa yayılan damlacıkların deri ve mukozaya direk ya da dolaylı olarak bulaşması, aerosollerin solunumu ile mikroorganizmanın vücuda girişi gerçekleşmektedir. Gıda ve su kaynaklı enfeksiyon; kontamine su veya gıdanın tüketilmesi sonucu gastrointestinal kanaldan alınır. Ayrıca hastalık taşıyıcı böceklerin deri üzerinden ısırması ve tıbbi müdahalelerde kullanılan enjektörler de enfeksiyona neden olmaktadır [1]. Enfeksiyon hastalıkları geliştikleri yere göre iki ana başlıkta ifade edilebilir. Bunların ilki toplum kaynaklı enfeksiyonlar iken ikincisi ise sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyonlardır. Sağlık hizmetleri kaynaklı enfeksiyonların başında hastane enfeksiyonları gelmektedir. Hastane enfeksiyonu evrensel bir problemdir. Hastaneye yatırılan hasta, enfeksiyon hastası veya inkübasyon evresinde olmadığı halde hastaneye yatışından 48- 72 saat sonraki süreçte hastada gelişen enfeksiyona hastane enfeksiyonu denir [1]. Hastane enfeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olan risk faktörlerinin başında tedavi uygulamaları gelmektedir. Özellikle ameliyat sırasında ve sonrasında uygulanan kateterizasyon, üretral enjeksiyon gibi işlemler hastane enfeksiyonlarının büyük bir kısmını oluşturmakta ve ölümcül sonuçlar doğurmaktadır. Diğer bir etken ise hastanelerin malzemelerine ve tekstil ürünlerine uygulanan yetersiz

sterilizasyon ve dezenfeksiyon işlemleridir. Ayrıca personelin bilinçli olmaması, hastane koşullarının uygun olmaması ve personel yetersizliği de diğer etkenleri oluşturmaktadır [2].

Kateterler son yıllarda tedavilerde vazgeçilmez hale gelmişlerdir. Damar içerisine yerleştirilen katater tüpler; sıvı tedavileri, hemodiyaliz, damar yolu açma, parenteral besleme gibi bir çok durumda kullanılmaktadırlar (Şekil 1.1). Özellikle kemoterapi tedavisi gören hastalara yerleştirilen kateterler, tedavi süreci boyunca hasta vücudundadır. Oldukça sık kullanılan kataterlerin en büyük dezavantajı enfeksiyona neden olmalıdır. Kateter enfeksiyonları bağışıklığı düşük durumdaki hastalar için ölümcül nitelik taşımaktadır [3].



Şekil 1. 1 Hastanelerde yaygın olarak kullanılan kateterler

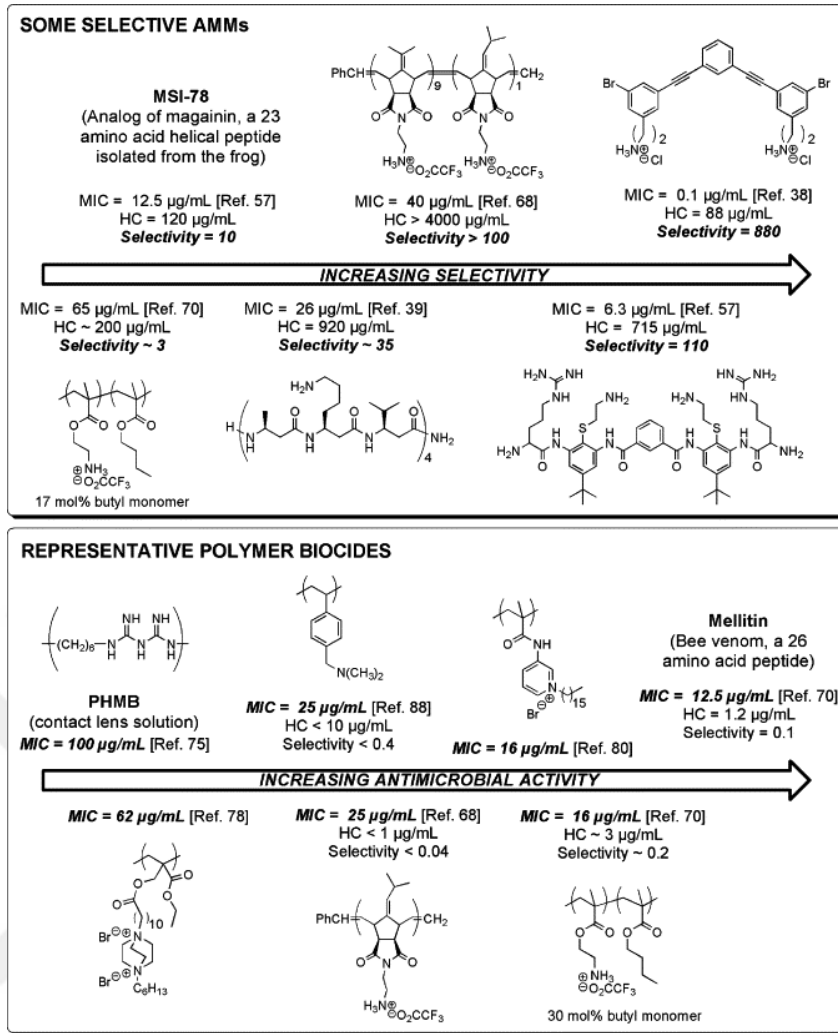
Hastane enfeksiyonlarını en modern yöntemlerin uygulandığı hastanelerde bile tamamen önleyebilmek mümkün değildir. Ancak gerekli önlemler alınarak, hastane personeli bilinçlendirilerek ve iyi bir denetleme ile en aza indirgemek mümkündür. Dünya sağlık örgütünün (WHO) yaptığı araştırmalara göre hastane enfeksiyonlarının gerekli önlemler alındığında, gelişmiş ülkelerde %40 oranında azaltılabileceği tespit edilmiştir. Hastanelerde alınan önlemler ne kadar pahalı ve etkili olursa olsun hastane personeli bilinçlendirilmediği ve iyi denetlenmediği sürece önlemlerin etkinliği olmayacaktır. El hijyeni hastane enfeksiyonlarının önlenmesindeki en önemli ve en basit yöntemdir. El yıkamak gibi basit bir işlemle bile enfeksiyonların %30 oranında azalacağı öngörülmektedir. Son zamanlarda hastane enfeksiyonlarını önlemek için antimikrobiyal

duvar boyaları, katater yüzeylerinin ilaç ile doldurulması ve yüzeylerinin antimikrobiyal polimerler ile kaplanması üzerine yapılan çalışmalar önem kazanmıştır [4,5].

Bakteri direnci, enfeksiyonlar ile mücadelede önemli bir sorun teşkil etmektedir. Mevcut antibiyotiklerin etki spektrumlarının dar olması, bakterilerin bunlara karşı kolayca direnç kazanabilmesi nedeniyle ve doğal antimikrobiyal peptit türevlerine göre eldeleri daha kolay ve ucuz olduğu için doğal peptitlerin sentetik olarak taklit edilmesi üzerine bilimsel çalışmalar yoğunlaştırılmıştır.

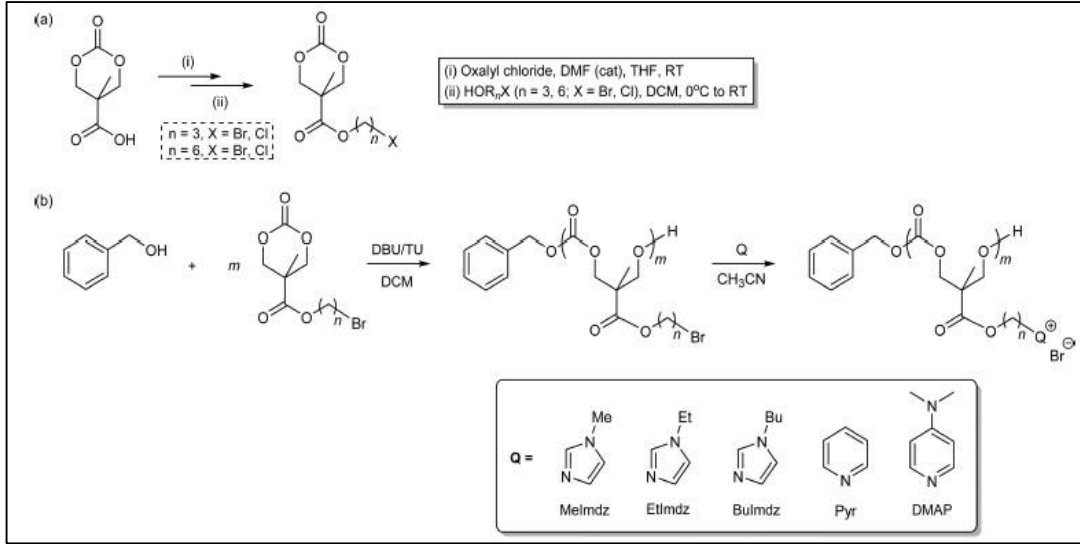
1.1 Literatür Özeti

Yeni antibiyotik çalışmalarındaki ana hedef doğal antimikrobiyal peptit türevlerinin sentetik olarak taklit edilmesidir. Doğal peptitlerin amfifilik yapılarından esinlenerek sentetik taklitlerinde; yüksek aktiviteye ve düşük toksisiteye sahip polimerlerin sentezi için çalışmalar yapılmaktadır. Doğal peptit türevlerine göre daha ucuz, kolay sentezlenebilen, düşük konsantrasyonda yüksek aktivite gösterebilen ve bakterilerin direnç oluşturmayaacağı sentetik polimerin sadece ilaç olarak değil; gıda ambalajı, antimikrobiyal boya, hastane tekstili gibi alanlarda da kullanımı hedeflenmektedir. Literatürde farklı polimerizasyon yöntemleriyle sentezlenmiş yüksek aktivite ve seçicilikte sentetik antimikrobiyal peptitler bulunmaktadır. Literatürdeki çalışmalarda ROMP mekanizmasına yüksek verim ile yanıt veren polinorbornen türevleri sıkça tercih edilmektedir. Literatürde bulunan bazı katyonik antimikrobiyal polimerlerin genel yapısı Şekil 1.2' de verilmiştir [6,7].



Şekil 1. 2 Literatürdeki bazı katyonik antimikrobiyal polimer [8]

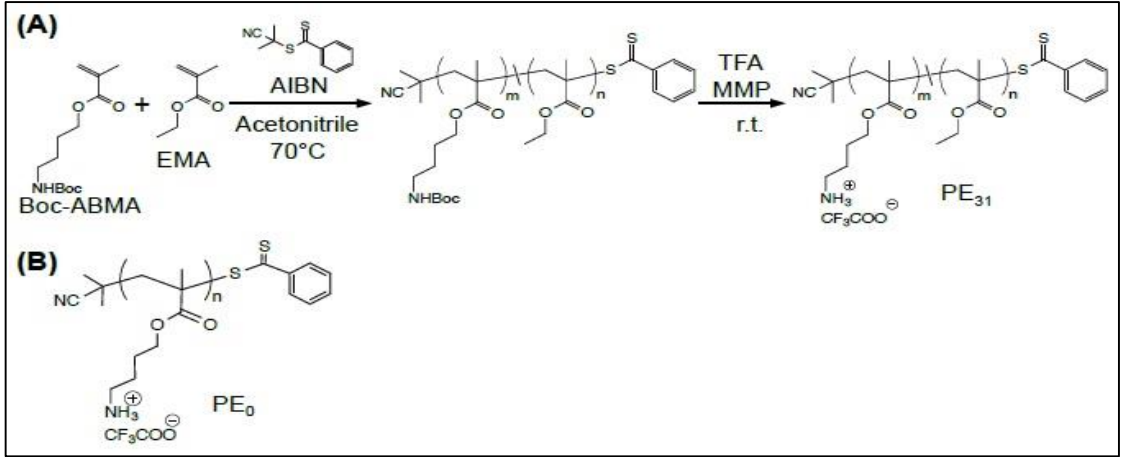
Yang ve grubu halka açılma polimerizasyonunu kullanarak; çeşitli azot bileşikleri ile kuaternize edilmiş amin grubuna sahip propil ve heksil yan grupları içeren biyobozunur katyonik antimikrobiyal polikarbonatları sentezlemişlerdir (Şekil 1.3) [9].



Şekil 1. 3 Farklı azot grubu içerikli kuaterner gruba sahip polimerlerin sentezi [9]

Antimikrobiyal aktivite ve toksisite çalışmalarında; kuaterner grubun hidrofobikliğinin artmasına bağlı olarak aktivitenin arttığı görülmüştür. PrBr(Bulmdz) polimeri *S. aureus'* a karşı yüksek aktivite ve seçicilik gösterirken (~125), HexBr(Bulmdz) *E. Coli'* ye karşı yüksek aktivite göstermiştir. Seçicilik; hemolitik konsantrasyon değerinin antibakteriyel aktivite testine oranı (HC_{50}/MIC_{90}) olarak ifade edilir. Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin hidrofobisiteleri kolay bir şekilde ayarlanmış ve etkinlik çalışmaları yapılmıştır. N- heterohalkaları ile kuaternize edilen polimerlerin bakteri ve mantara karşı yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Yapı- aktivite ilişkisi incelenmiş ve katyonik yük ve hidrofobisite dengesinin antimikrobiyal etkinlik için önemli parametre olduğu anlaşılmıştır. Çalışma kapsamında; kırmızı kan hücrelerine karşı bakteri ve mantara yüksek seçicilik gösteren polimerler literatüre kazandırılmıştır [9].

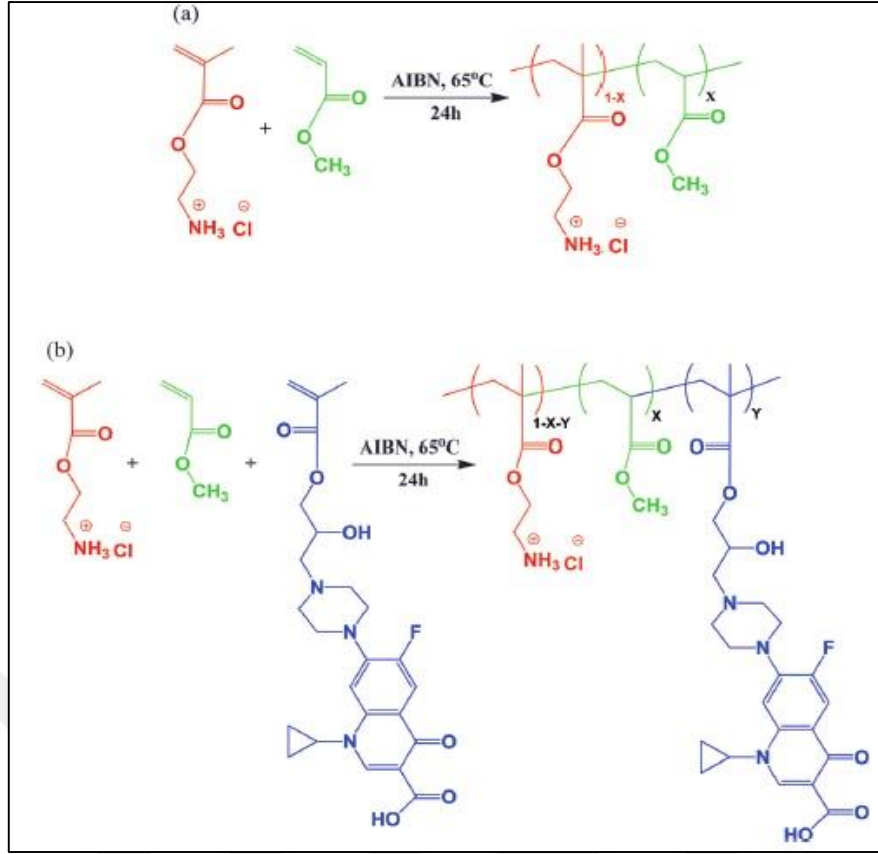
Kuroda ve çalışma arkadaşları; diş çürümesine neden olan *S. mutans* bakterisinin biyofilm oluşturmasını önlemek amacıyla RAFT polimerizasyonu ile katyonik amfifilik metakrilat homo ve kopolimerlerini sentezlemiştir (Şekil 1.4) [10].



Şekil 1. 4 RAFT metodu ile sentezlenen katyonik polimerler [10]

Antimikrobiyal metakrilat homo ve kopolimerlerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve toksisiteleri; gram pozitif bakterilere karşı yüksek aktivite gösteren, antiseptik antimikrobiyal ajan olan Chlorhexidine (CHX) ve antibiyotik olan Vancomycin (VAN) ile karşılaştırılmıştır. PE₃₁ kopolimeri yüksek aktivite (7.8 µg/mL) gösterirken PE₀ homopolimeri daha düşük aktivite (52.1 µg/mL) göstermiştir. Yani artan hidrofobisite ile aktivite artmıştır. Aktiviteleri VAN ve CHX' a göre düşük olmasına rağmen toksisiteleri de oldukça düşüktür. Çalışma kapsamında sentezlenen iki polimerde VAN ve CHX' e kıyasla kırmızı kan hücrelerine karşı *S.mutans* bakterisine yüksek seçicilik göstermektedir. Sentezlenen polimerlerin bakterisidal kinetikleri incelenmiş ve MIC değerlerinin üzerindeki bir konsantrasyonda; PE₃₁' in 120 dakikada PE₀' ın ise 180 dakikada bakterilerin %99.8' ini öldürdüğü görülmüştür. Çalışma kapsamında; *S.mutans* bakterilere karşı yüksek seçicilikte ve biyofilm oluşumunu önleyen antimikrobiyal metakrilat polimerleri sentezlenmiştir.

Zhou ve grubu; mevcut bir antibiyotik olan ciprofloxacin içeren amfililik katyonik kopolimerleri radikalik polimerizasyon mekanizması üzerinden sentezlemiş ve antimikrobiyal aktivitedeki değişiklikleri incelemiştir [11]. Çalışma kapsamında 2-aminoetil metakrilat hidroklorat- metakrilat (AEMA/MA) kopolimeri ve bu monomerlerin ciprofloxacin taşıyan glisidil metakrilat monomeri (GMA- CPF) ile farklı mol oranlarındaki kopolimerleri sentezlenmiştir (Şekil 1.5).



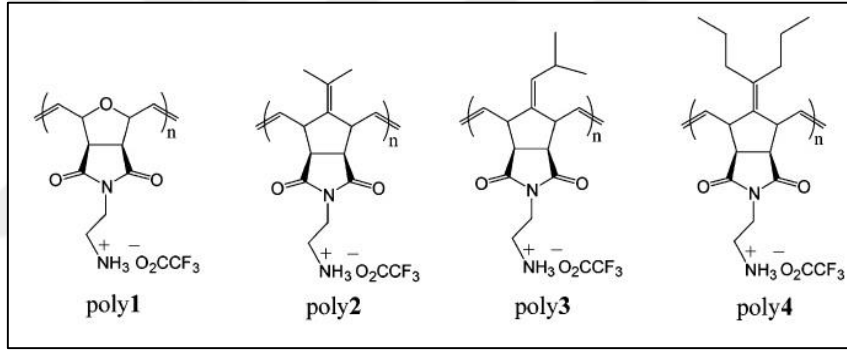
Şekil 1. 5 (a) (AEMA/MA) kopolimeri sentezi, (b) (AEMA/MA/GMA- CPF) kopolimeri sentezi [11]

Antimikrobiyal aktivite çalışmasında; AEMA/MA/GMA- CPF kopolimerinin A5 ve A6 ile gösterilen mol oranlarında CPF' ye göre daha yüksek aktivitede oldukları görülmüştür. Kopolimerlerde azalan metakrilat içeriği ile hidrofobisitedeki değişikliğe bağlı olarak aktivitede azalmıştır (Şekil 1.6). UV absorpsiyon ve CLSM tekniği ile sentezlenen kopolimerlerin membran aktif oldukları ve bakterileri dakikalar içerisinde öldürdükleri tespit edilmiştir. Ayrıca sentezlenen bu kopolimerler selüloz fiberlerde katkı maddesi olarak kullanılmış ve ağırlıkça %2 oranında bulunmaları bakterilerin tamamını deaktive etmeye yeterli olmuştur.

| Copolymer compositions | | | | |
|------------------------|----------------------|------------------------|-------------------|------------------|
| | AEMAH content (mol%) | GMA-CPF content (mol%) | MA content (mol%) | MIC (ppm) |
| A1 | 70.5 | 4.2 | 25.3 | 35.0 |
| A2 | 65.0 | 4.1 | 30.9 | 15.6 |
| A3 | 61.0 | 4.2 | 34.8 | 10.0 |
| A4 | 56.5 | 4.1 | 39.4 | 7.8 |
| A5 | 49.0 | 4.1 | 46.9 | 5.0 |
| A6 | 43.3 | 4.1 | 52.6 | 6.0 |
| A7 | 64.0 | — | 36.0 | 40.0 |
| CPF | — | — | — | 7.0 ^a |

Şekil 1. 6 Ciprofloxacin içeren kopolimerlerin *E. coli*' ye karşı MIC değerleri [11]

İlker ve grubu, sentezledikleri amfifilik karakterli suda çözülebilen antimikrobiyal polimerler için; farklı hidrofobik grupların ve molekül ağırlığının aktivite üzerine olan etkisini incelemişlerdir [12]. Bu çalışmada halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) ile dört farklı homopolimer sentezlenmiştir (Şekil 1.7).

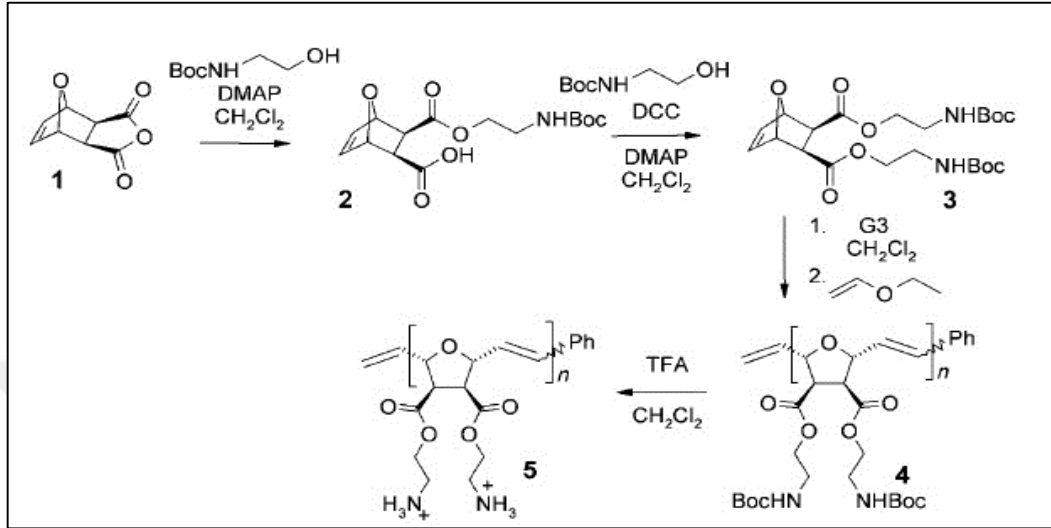


Şekil 1. 7 ROMP esaslı katyonik homopolimerler [12]

Farklı hidrofobik gruplara sahip olan homopolimerlerin aktiviteleri incelendiğinde; aktivitenin belirli bir değere kadar hidrofobikliğe bağlı olarak arttığı bu değerden sonra ise polimerin aktifliğini kaybettiği görülmüştür. Molekül ağırlığı etkisi incelendiğinde ise; poly3 için molekül ağırlığı azaldıkça aktivitenin arttığı fakat genel anlamda bu polimerler için molekül ağırlığının antimikrobiyal aktivite ve hemolitik konsantrasyona etkisinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Toksik olmayan poly2 ve aktif poly3 homopolimerlerinin monomerleri kullanılarak farklı oranlarda random kopolimerler sentezlenmiştir. Poly(2₉-co-3₁) ve poly(2₂-co-3₁) kopolimerlerinin sentezi ile homopolimerlerine göre daha yüksek seçicilikte olan ve toksik olmayan antimikrobiyal polimerler elde edilmiştir.

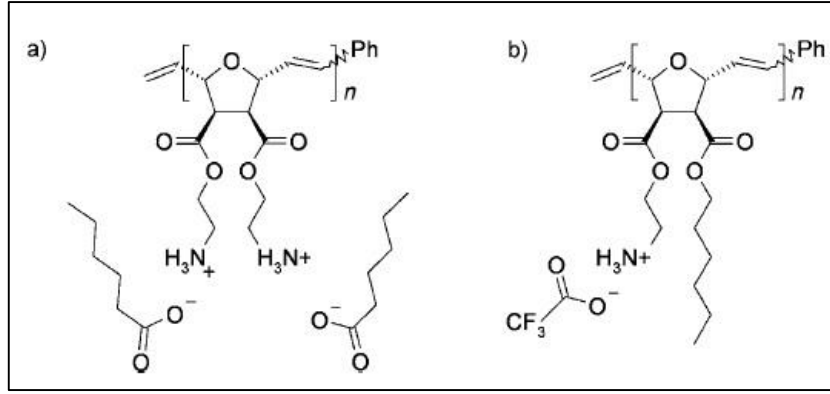
Tew ve çalışma arkadaşları; sentezledikleri norbornen esaslı antimikrobiyal homopolimerlerde farklı hidrofobisitedeki karşıt yüklerin ve kopolimerlerde farklı yük

yoğunluklarının aktiviteye etkisini incelemişlerdir. Diamin içeren homopolimer 3 kDa, 5 kDa, 10 kDa ve 50 kDa olacak şekilde ROMP mekanizması üzerinden sentezlenmiştir (Şekil 1.8). Molekül ağırlığı arttıkça *E.coli*' ye karşı aktivite değişmezken, *S.aureus* bakterisine karşı aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir [13].



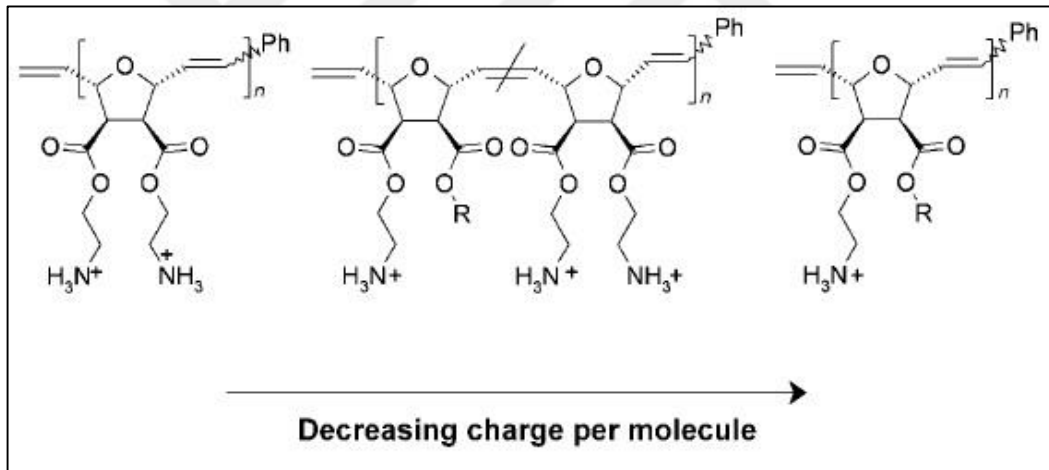
Şekil 1. 8 Trifloroasetik asit tuzu içeren çift amin tuzuna sahip ROMP tipi polimer [13]

Şekil 1.8' de görülen trifloroasetik asit tuzu içeren katyonik polimerde karşıt yük etkisini incelemek için tosilat, benzoat gibi farklı hidrofobisiteye sahip gruplar kullanılmış ve farklı bir zwitter iyonik polimer sentezlenerek antimikrobiyal aktivite incelenmiştir (Şekil 1.9). Çalışma sonunda elde edilen verilerde aktif diamin homopolimerinin inaktif hale geldiği görülmüştür. Bunun ile ilgili iki durum öngörülmüştür; iyon çifti oluşumunda etkileşim çok kuvvetli olmuş ve pozitif yük perdelenmiştir. Diğer bir öngörü ise hidrofobik gruplar çözünürlüğü azaltmış ve polimer aktifliğini kaybetmiştir. Mekanizmayı anlamak için sentetik lipid küreciklerinde calcein salınım testi yapılmıştır. Hegzil_3K ve Hegzonat_3K salınım sonuçları karşılaştırılmış ve Hegzil_3K %38 Hegzonat_3K ise %5 salınımına neden olmuştur (Şekil 1.9). Bu test sonucunda iyon çifti oluşumu ile pozitif yükün perdelenmesi ve aktifliğini kaybettiği anlaşılmıştır.



Şekil 1. 9 Hegzonat_3K ve Hegzil_3K homopolimerlerinin yapıları [13]

Aktivite üzerine yük yoğunluğunun etkisini anlamak için diamin monomeri ve yapısal olarak benzer monoamin- alkil monomerlerinin farklı oranlarda kopolimerleri sentezlenmiştir (Şekil 1.10). Antimikrobiyal etkinliklere bakıldığında yük yoğunluğu için belirli bir eşik değerin olduğu ve bu değerin üzerinde yük yoğunluğundaki artışın antimikrobiyal etkinliği değiştirmedığı tespit edilmiştir.

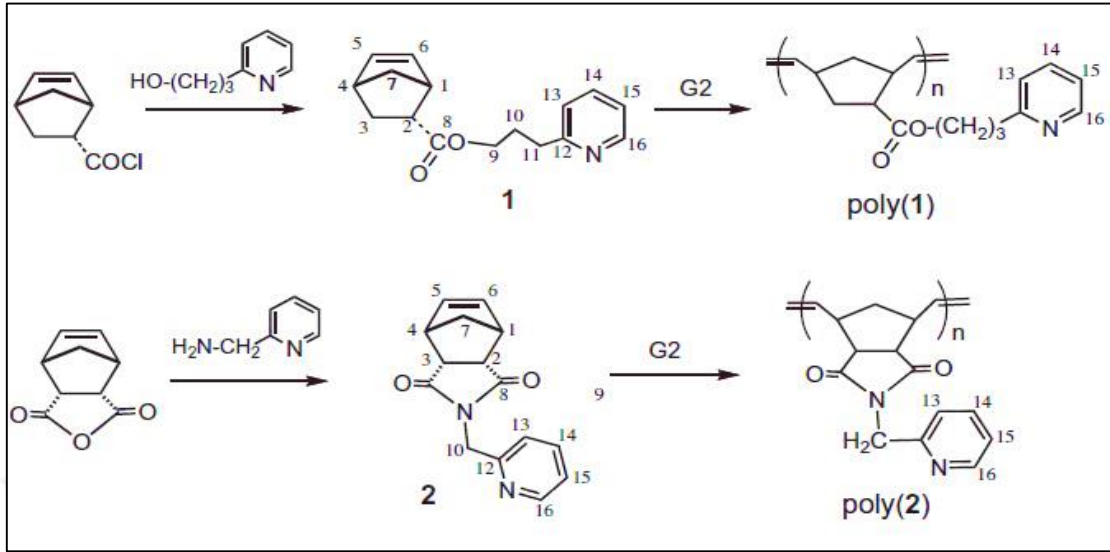


Şekil 1. 10 Azalan moleküler yükün model polimer üzerinde gösterimi [13]

Şekil 1.10' da gösterilen diamin tuzu içeren monomer ile metil monomerinin farklı oranlarda kopolimerleri sentezlenmiş ve antimikrobiyal etkinlikleri incelenmiştir. Bu çalışmada sentezlenen; 9:1 orandaki (Metil: Diamin) random kopolimeri ile *S.aureus*' a karşı yüksek aktivite ve seçicilik gösteren toksik olmayan kopolimer literatüre kazandırılmıştır [13].

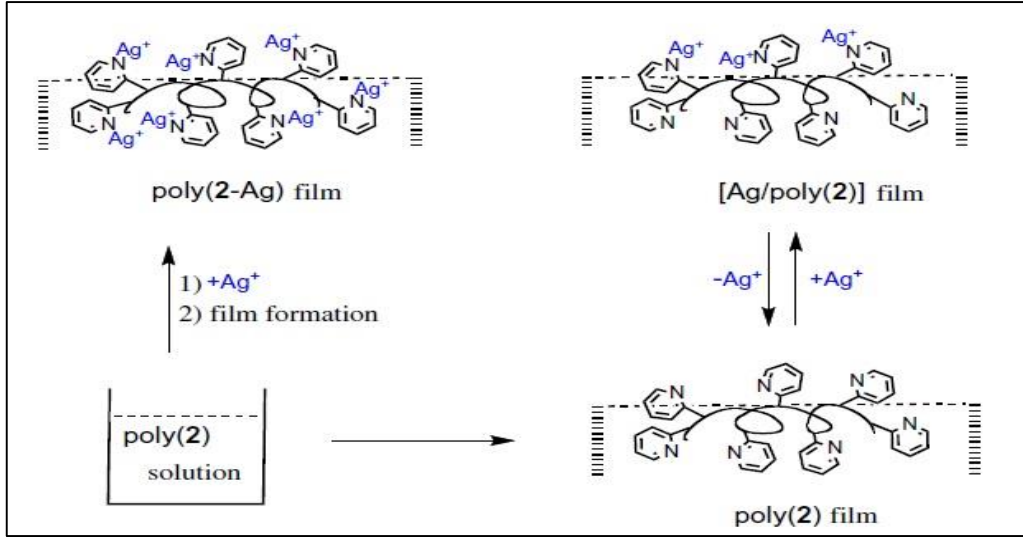
Wakatsuki ve grubu; gümüş iyonu ile tekrar yüklenebilir ROMP polimerlerini sentezlemiş ve bunların antimikrobiyal etkinliklerini film oluşturarak incelemiştir [14]. Pridin grubu

içeren norbornen türevi iki farklı monomer ve bunların homopolimerleri ROMP mekanizması üzerinden Grubbs 2 katalizörü ile sentezlenmiştir (Şekil 1.11).



Şekil 1. 11 Pridin içeren norbornen tipi polimerler [14]

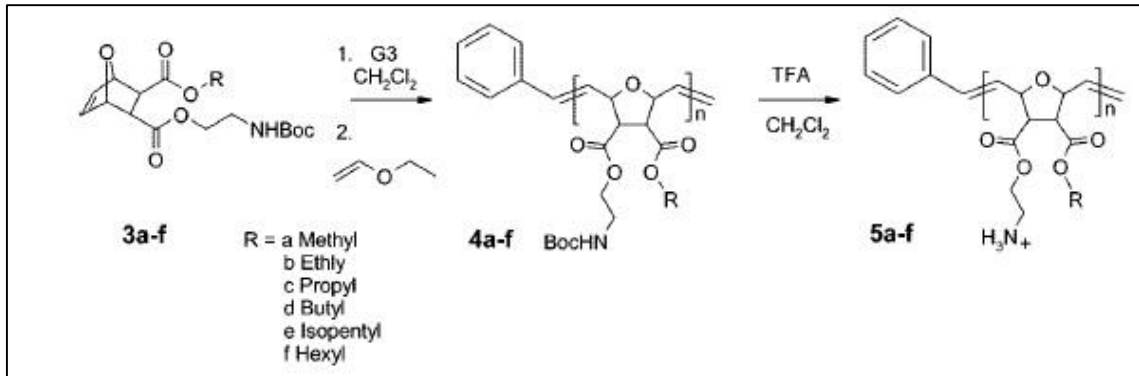
Ag^+ iyonu ve polimerin birlikte gösterdikleri antimikrobiyal ilişki; Ag^+ iyonu ile elektrostatik etkileşim ve kompleks oluşumu üzerinden incelenmiştir. Kompleks halindeki poly(Ag-1) ve poly(Ag-2); kantitatif olarak elde edilmiştir. Bu polimerlerin filmleri oluşturulurken DMF' in uzaklaştırılması ile poly(Ag-1) filmi yumuşak katı bir form almıştır. Bu nedenle çalışma poly(Ag-2) üzerinden yapılmıştır. Poly(2) filminin Ag^+ çözeltisine daldırılarak iyon yakalama kabiliyetinden yararlanılmış ve yüzeye elektrostatik etkileşimlerle tutunan Ag^+ iyonlarını içeren [Ag/poly(2)] filmi elde edilmiştir (Şekil 1.12). Antimikrobiyal etkinlikleri incelendiğinde iki filmde gram (+) ve gram (-) bakteriye karşı yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak gümüş iyonlarının zamanla kaybedilmesi nedeniyle, filmler aktivitelerini kaybetmiştir. Bu durumda daldırma ile elde edilen film tekrar Ag^+ çözeltisine daldırılmış ve tekrar Ag^+ iyonları ile yüklenerek eski aktivitesini kazandığı görülmüştür.



Şekil 1. 12 Poly(2)' nin gümüş yüklü filmlerinin oluşumunun şematik gösterimi [14]

Lienkamp ve çalışma arkadaşları; 'Moleküler yapı kiti' adını verdikleri çalışmalarında literatüre yüksek seçicilikte polimer kazandırmışlardır [15]. Hidrofilik ve hidrofobik grubun aynı anda bulunduğu monomer ile polimer sentezlenmiştir. Hidrofilik kısım sabit iken hidrofobik kısım değiştirilerek (metil, etil, bütil, hekzil vb.), polimerde hidrofobisitenin aktivite üzerine etkisi incelenmiştir.

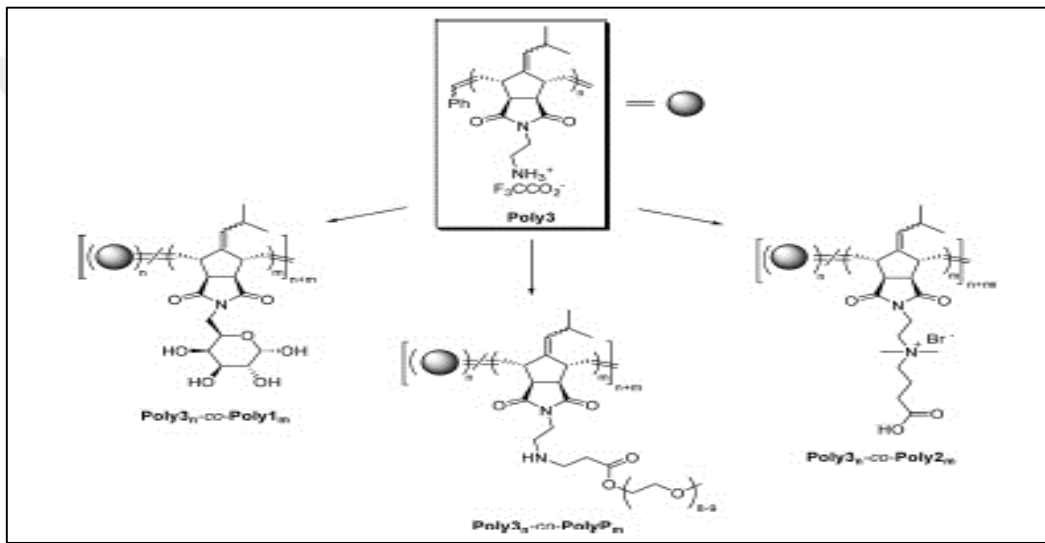
ROMP mekanizması üzerinden Grubbs 3 katalizörü kullanılarak 3 kDa ve 10 kDa' luk homopolimerleri sentezlenmiştir (Şekil 1.13). Homopolimerlerin antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde propil_3K' nın *E.coli* ve *S.aureus*'a karşı yüksek aktivite ve yüksek toksisite gösterdiği molekül ağırlığı arttıkça *E. coli*'ye karşı aktiflik artarken *S.aureus*' a karşı aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir. *S.aureus*' a karşı ise molekül ağırlığı 1529 g/mol Oligomer 1' in oldukça yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür.



Şekil 1. 13 Farklı hidrofobik gruplara sahip homopolimerlerin sentezi [15]

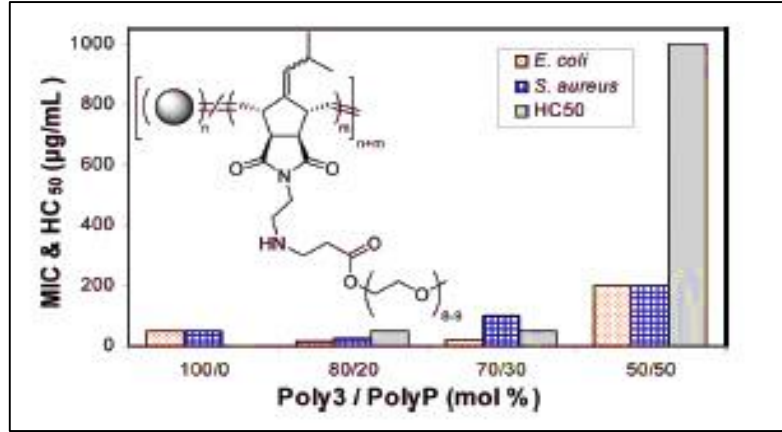
Aktif monomer ve toksik olmayan monomerler kullanılarak sentezlenen kopolimer ile *E.coli'* ye karşı 53 kat daha fazla *S. aureus'* a seçicilik gösteren, kan hücrelerine karşı ise 533 kat *S.aureus'* a seçicilik gösteren kopolimer literatüre kazandırılmıştır [15].

Çolak ve çalışma arkadaşları ise farklı biyobozunur hidrofilik grupların; benzer hidrofobik kısımlara sahip norbornen türü polimerlerde antimikrobiyal aktivite ve toksisiteye etkisini incelemişlerdir [16]. Biyobozunur yapı sağlayan şeker, zwitter iyonik ve PEG grubu kullanarak farklı monomerler sentezlenmiş ve bunların daha önceden çalışılmış olan Poly3 antimikrobiyal polimeri ile farklı oranlarda kopolimerleri sentezlenmiştir (Şekil 1.14).



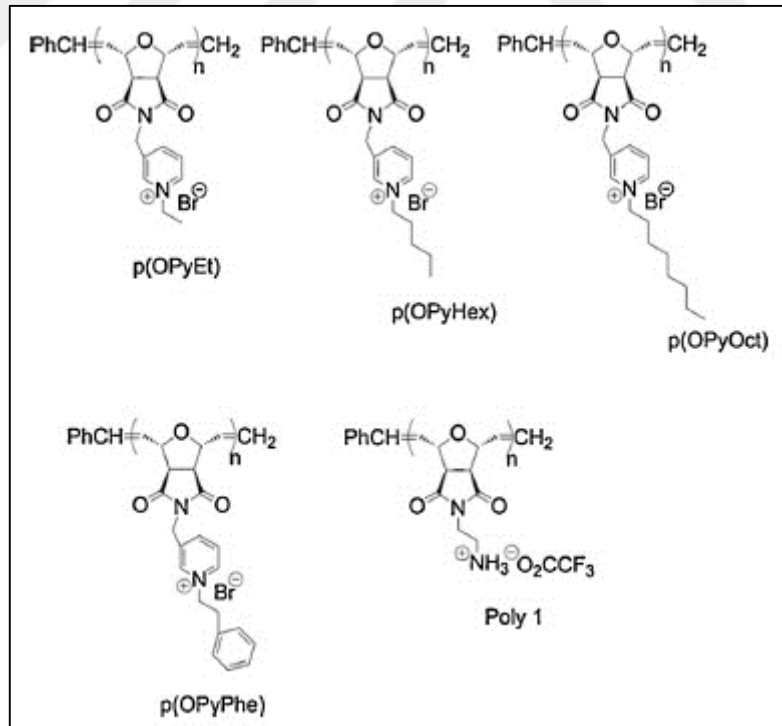
Şekil 1. 14 Poly3 ve farklı hidrofilik gruba sahip monomerlerin kopolimerleri [16]

Bu çalışma kapsamında farklı oranlarda sentezlenen kopolimerlerin antimikrobiyal çalışmaları sonucu; hidrofilik özelliğin artması ile aktivitenin azaldığı fakat aynı zamanda toksisitenin de azaldığı tespit edilmiştir. Poly3 oldukça toksik bir polimerken ($HC_{50} < 1$), Poly3_{0.5}_co_PolyP_{0.5} kopolimeri toksik olmadığı görülmüştür ($HC_{50} > 1000$) (Şekil 1.15) [16].



Şekil 1. 15 Poly3_n_co_PolyP_m kopolimerlerinin HC₅₀ ve MIC sonuçları [16]

Altay ve çalışma arkadaşları; pridin içeren okzonorbornen türevi ROMP polimerlerinin yüzeydeki aktivitelerini incelemiştir. Çalışma kapsamında farklı molekül ağırlığına ve değişen alkil zincir uzunluğuna sahip polimerler cam yüzeye kaplanarak aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir (Şekil 1.16) [17]. Yüzeylerin katyonik yük yoğunluğu ve hidrofobitesini belirlemek için; florasan boyama tekniği ve temas açısı ölçümü yapılmıştır.

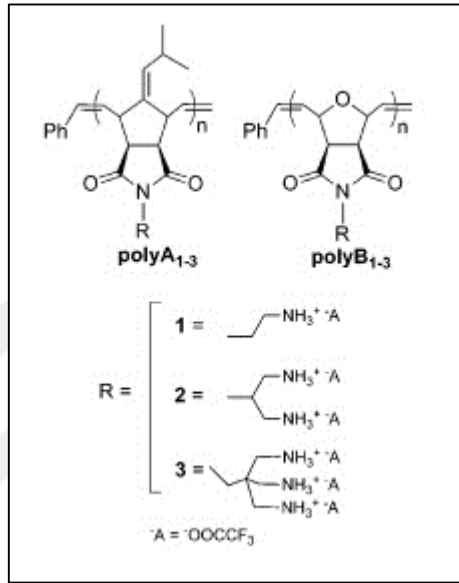


Şekil 1. 16 Çalışma kapsamında kullanılan polimerler [17]

Polimerlerin yük yoğunlukları 3000 g/mol ve 10.000 g/mol ağırlıktaki polimerler için 2,3-28,5 nmol/cm² olarak belirlenmiştir. Aktivite çalışması sıvı faz ve katı yüzey için

yapılmıştır ve oktil içeren polimer (p(OPyOct)) sıvı fazda en yüksek aktiviteye sahipken katı fazda 3 kDa' luk heksil polimeri olduğu tespit edilmiştir. Molekül ağırlığının aktivite üzerinde önemli bir etki göstermemiştir. Katı fazda heksil polimeri bakteri ile etkileştirilmiş ve 5 dakikada bakterilerin %99' unun öldüğü görülmüştür.

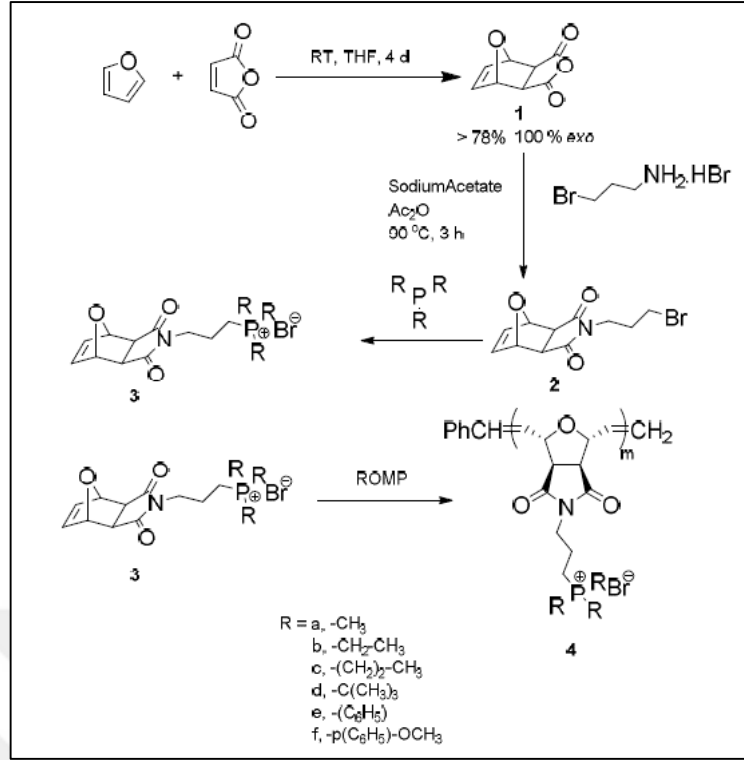
Zoha ve grubu; ROMP metodu ile artan amin grubuna sahip üç farklı norbornen monomerini polimerleştirerek yük yoğunluğunun aktivite ve toksisiteye etkisini incelemiştir (Şekil 1.17) [18].



Şekil 1. 17 Antimikrobiyal polinorbornen türevleri [18]

PolyA₁₋₃ serisinde; amin içeriği arttıkça toksisite azalırken *E.coli*' ye karşı aktivitede bir değişim olmamıştır. PolyB₁₋₃ serisi incelendiğinde; toksisitede değişim olmazken *S.aureus*' a karşı aktivite önemli ölçüde yükselmiştir. PolyB₁' in *S.aureus* için MIC değeri >200 µg/mL iken; PolyB₂ MIC değeri 25 µg/mL, PolyB₃ MIC değeri ise 15 µg/mL bulunmuştur. Toksisite değerleri de yüksek olan PolyB serisi polimerler yüksek seçicilik göstermiştir.

Eren ve çalışma arkadaşları; farklı alkil ve aromatik fosfonyum yan zincirlere sahip poliokzonorbornenleri ROMP metodu ile sentezlemiştirlerdir. 3000 g/mol ve 10.000 g/mol molekül ağırlıklarında sentezlenen homopolimerlerin aktiflikleri ve toksisiteleri incelenmiştir (Şekil 1.18) [19].



Şekil 1. 18 Okzanorbornen esaslı monomer ve polimerler [19]

Aktivite çalışması; *E.coli*, *C.albicans*, *S.aureus* ve *M.tuberculosis* mikroorganizmalarına karşı yapılmıştır. Antimikrobiyal aktivite değerleri incelendiğinde; aromatik gruba sahip homopolimerlerin diğerlerine göre çok daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Polimer 4e_3k *S.aureus*'a karşı MIC değeri 8 µg/ mL iken *E.coli*' ye karşı 16 µg/ mL' dir. Molekül ağırlığının artmasına bağlı olarak 4e_3k polimerinin aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Çalışma kapsamında sentezlenen polimerler mantara karşı düşük aktivite göstermiştir.

1.2 Tezin Amacı

Günümüzde bakterilerin antibiyotiklere karşı kazandıkları direnç büyük bir sorun haline gelmiştir. Amerika Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi tarafından yapılan bir çalışmada; 2 milyon hastada antibiyotik direnci geliştiği ve buna bağlı olarak 23 bin hastanın öldüğü tespit edilmiştir [20]. Hastalık yapıcı bakterilerin etkisiz hale getirilmesi ve antibiyotiklere karşı direnç kazanmasını önlemek amacı ile geliştirilen antimikrobiyal peptitlerde; doğal peptitler ve sentetik taklitleri olmak üzere iki farklı hedef bulunmaktadır. Doğal peptitlerin; amfifilik yapıda olmaları ve hidrofilik/hidrofobik kısımlarının dengesi ve diziliminin yüksek aktivite ve düşük toksisite sağladığı bilinmektedir. Bu nedenle katyonik

polimerler geliştirilirken yapıları doğal peptitlerden yola çıkılarak tasarlanmaktadır. Polimerlerin laboratuvar ortamında sentezlenmeleri; düşük maliyetli, kolay ve hızlı elde edilmelerinin yanısıra; yapılarında uygulanabilecek değişikliklerle aktivitelerinin ayarlanabilmesi için de avantaj sağlamaktadır. Ayrıca bu polimerler fizyolojik ortamda daha kararlıdır. Farklı polimerizasyon yöntemleri ile sentezlenebilen antimikrobiyal katyonik polimerlerin halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) ile sentezi yaygın olarak kullanılmaktadır. Kontrollü bir yöntem olan ROMP istenilen molekül ağırlığında, eşit zincir uzunluklarına ve hidrofilik/ hidrofobik grupları bulunan polimerlerin eldesini sağlamaktadır. Yapısında norbornen halkası içeren monomerlerin ROMP mekanizması ile hızlı ve verimli bir şekilde polimerleştiği görülmüştür. Bu bilgiler ışığında çalışmamız kapsamında; DABCO ve pridin içeren katyonik yapıdaki monomerlerin; homopolimerleri ve farklı oranlardaki kopolimerleri sentezlenmiştir. 3000 g/mol, 10.000 g/mol molekül ağırlığındaki homopolimerlerin ve 5000 g/mol ağırlığındaki kopolimerlerin antimikrobiyal etkinlikleri sıvı ve katı fazda incelenmiştir ve sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca yapı- aktivite ilişkisini incelemek için zeta potansiyel çalışması yapılmıştır.

1.3 Hipotez

Kullanılan antibiyotiklere karşı kazanılan direnci önlemek ve geniş etki spektrumu sağlayabilmek amacı ile yeni nesil sentetik antibiyotikler geliştirilmektedir. Yapılan yeni çalışmalarda sentezlenen antimikrobiyal polimerin; ucuz ve hızlı bir şekilde laboratuvar ortamında sentezlenebilirliği, düşük konsantrasyonda yüksek etki göstermesi, geniş etki spektrumlu olması ve toksik olmaması amaçlanmaktadır. Özellikle hastane enfeksiyonları; ciddi maddi ve manevi kayıplara neden olmaktadır ve ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle bu antimikrobiyal polimerlerin ilaç olarak kullanımının yanı sıra; hastane tekstil malzemelerinde, implantlarda, katater yüzeylerinin kaplanmasında da kullanılması bakterilerle savaşta önemli bir yer tutmaktadır. Bu unsurlar göz önünde bulundurularak proje kapsamında, amfifilik karakterli polimerlerin hidrofobik/ hidrofilik oranı ve yapı- aktivite ilişkileri incelenerek toksisiteye ve antimikrobiyal aktiviteye etki eden faktörler yapısal olarak değerlendirilecektir.

BÖLÜM 2

BAKTERİLER

Bakteriler prokaryotik hücre yapısına sahip olan ve bağımsız olarak yaşayabilen en küçük hücrelerdir (1-5 μm). Sadece mikroskop ile görülebilirler. Protein, karbonhidrat, lipid ve nükleik asit gibi organik maddeler, inorganik maddeler ve su içerirler. Hastalık yapıcı 'patojen' olarak bilinenler ve yararlı bakteriler olarak iki farklı sınıf oluştururlar [21].

2.1 Bakterilerin Tarihçesi

Bakteriyoloji, Yunanca çubuk veya kamış anlamına gelen “βακτήριου” kelimesinden köken alan ve bakteri olarak adlandırılan mikroorganizmaları inceleyen bilim dalıdır. Bakteriler, ilk kez Antonie van Leeuwenhoek tarafından, 1676 yılında kendi tasarımı olan tek mercekli bir mikroskop ile gözlemlenmiştir. Leeuwenhoek, iki metal arasına yerleştirdiği, bikonveks mercekten oluşan mikroskobuyla, kanal ve ark sularında ilk kez protozoaları görmüştür. Ayrıca yağmur sularında bakterileri incelemiş, diş kiri, biber dekoksyonu, mantar gibi pek çok materyal üzerinde çalışmıştır.

Bacterium adı Christian Gottfried Ehrenberg tarafından 1838 yılında kullanıma girmiştir. Latince Bacteria, bakteri sözcüğünün çoğulu, bacterium tekil halidir. 19. yüzyılda hastalıkların çoğuna bakterilerin neden olduğu bilinsede antibakteriyel bir tedavi bulunmamaktaydı. Tıp öğrenimini tamamlayan Ehrlich hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde kimyasal maddelerden yararlanabilmek için çalıştı. Bakterilerin vücut dokularına yerleşerek kolera, tifo, verem, tetanos, kangren gibi birçok hastalığa yol açtıklarını biliyordu ve deneyleriyle bu bilgileri daha da zenginleştirerek bazı bakterilerin

doğrudan dokuları yıkıma uğrattığını, bazılarının da toksin denen zehirli salgılarıyla vücuda zarar verdiğini saptadı. Bunun üzerine bütün ilgisini antitoksinlere yöneltti.

1906' da başlayarak Frankfurt'taki Speyer Deneysel Tedavi Enstitüsü'nde Ehrlich'in yönetiminde sürdürülen araştırmalarda, difteriye karşı bağışıklık yaratmak için at serumu kullanıldı ve Ehrlich difteri antitoksini için gereken dozu belirledi. Aynı enstitüde, başka hastalıkların antitoksinlerini üretebilmek için başka hayvanlar üzerinde de araştırmalar yapıldı. 1908 Nobel Tıp Ödülü, bağışıklık konusundaki çalışmaları nedeniyle Paul Ehrlich ile İlya İliç Meçnikov' ye verildi. 1910 yılında Paul Ehrlich Treponema pallidum' u seçici olarak boyamaya yarayan boyaları değiştirerek bu patojeni seçici olarak öldüren bileşikler elde etti. Böylece de ilk antibiyotiği geliştirmiş oldu [22], [23].

Antonie van Leeuwenhoek (Hollanda, 1632- 1723): Mikrobiyolojinin babası olarak bilinir. Bakteriler ilk defa 1676' da Antonie van Leeuwenhoek tarafından, kendi tasarımı olan tek mercekli bir mikroskopla gözlemlenmiştir. Onlara "animalcules" (hayvancık) adını takmıştır. Christian Gottfried Ehrenberg (Almanya, 1795-1876) ise bizleri 1838' de "Bacterium" adıyla tanıştıran önemli bilim insanlarından.

Louis Pasteur (Fransa, 1822- 1895): 1885' te kuduz için ilk aşığı geliştirmiştir olan önemli bir bilim adamıdır. 1859' da fermantasyon olayının, mikroorganizmaların üremesiyle olduğunu söylemiştir.

Robert Koch (Almanya, 1843- 1910): 1905' te Mikrop Teorisi' ni kanıtladıktan sonra Nobel Ödülü' ne layık görülmüştür.

Joseph Lister (İngiltere, 1827- 1912): Antiseptik tekniğini cerrahiye girmesini sağlamış ve ameliyat sonrası iltihaplardan dolayı oluşan hastalık risklerini antiseptik maddeyle batırılmış sargılar kullanarak azaltmıştır.

Hans Christian Joachim Gram (Danimarka, 1853-1938) Gram boyama tekniğini geliştirmiş ve bakterileri, gram pozitif ve gram negatif olarak sınıflandırmıştır. Bu yöntem günümüzde de bakterileri tanımda kullanılmaktadır.

Paul Ehrlich (Almanya, 1854-1915): İmmunoloji için önemli bir bilim adamı olan Paul Ehrlich Kemoterapi terimini ve Frengiyi tedavi etmek için ilk antibiyotik olan Salvarsan'ı geliştirmiştir. 1908 yılında Nobel Ödülü kazanmıştır.

Dmitri Iosifovich Ivanovsky (Rusya, 1864-1920): Virüslerin bakterilerden ayrılmasını sağlamıştır. Bakterilerin geçemediği filtrelerden geçen ve tütün mozaik hastalığına sebep olan küçük canlıları bulmuştur. Félix d'Herelle ise (Fransa, 1873-1949): 1915-1917 yıllarında bakterileri enfekte eden ve özel filtrelerden geçebilen virüsleri (bakteriyofaj) bulmuştur [24].

2.2 Bakterilerin Sınıflandırılması

Bakteriler temel olarak yararlı ve zararlı bakteriler olarak ayrılabilirler. Bakteri denince akla ilk gelen hastalık yapıcı "patojen" mikroorganizmalardır. Oysa ki hastalık yapıcı bakteriler; bakteriler aleminin küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Yararlı bakteriler temelde; mayalanma ve sindirimde görevlidirler. Mayalandırmaya bağlı sanayide, hayvanların bağırsaklarında besinlerin sindirilmesinde önemli rol oynarlar. İnsan vücudunda ise bazı bakterilerin bulunması sağlık açısından zorunludur. Örneğin kalın bağırsakta yaşayan yararlı bakteriler besinlerin sindirilmesine yardımcı olur ve besinlerin bağırsaktan emilmesini sağlar. Havadaki gazları kendilerine bağlayabilir, böylece toprağı azotça zenginleştirir ve bitkilere, gelişmek için ihtiyaç duydukları inorganik besinlerin bir kısmını sağlamış olurlar. Bakteriler biyosferdeki çevrimlerde, parçalayıcı ya da mineralleştirici olarak çok önemli rol oynarlar.

Hastalık yapan bakterilerin oluşturduğu zararlı olaylara verem, tifo, kolera, frengi, belsoğukluğu, tetanos, boğmaca, malta humması, şarbon, veba, botulizm, difteri hastalıkları ve çeşitli organlardaki iltihaplar örnek gösterilebilir. Bir başka zararları da yiyeceklerin bozulmasına neden olmalarıdır [25].

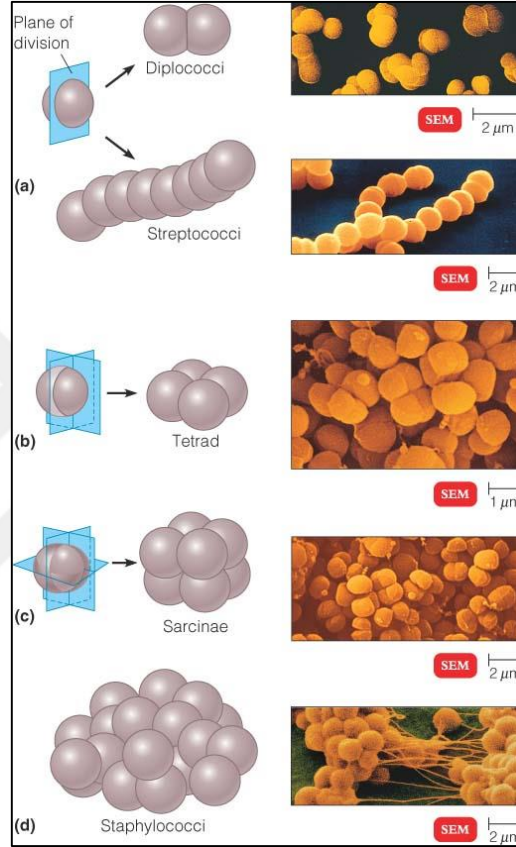
Bakterileri çeşitli özelliklerine göre sınıflandırmak mümkündür. Tıp alanındaki temel sınıflandırma; gram boyadan etkilenmelerine göre yapılmaktadır.

2.2.1 Bakterilerin Mikroskopta Görünüşlerine Göre (Morfolojik) Sınıflandırılmaları

Mikroorganizmaların boyutları mikron ile ifade edilir. Bir mikron mm'nin 1/1000' ni ifade eder. Hücre içi organelleri çok daha küçüktür ve bunların boyutları milimikron= mμ veya nanometre= nm ile belirlenir. Bu ölçü birimi ise mikronun 1/1000' dir. Bakteri hücreleri genellikle yuvarlak (kok), çubuk (basil) ve sarmal (spirillum veya spiroket) olmak üzere üç farklı şekilde bulunur [26].

2.2.1.1 Yuvarlak bakteriler (Coccus)

Tek tek veya koloni şeklinde bulunabilirler. Tek olanlarına coccus, ikili gruplar şeklinde olanlara diplococcus, uzun zincir oluşturanlar streptococcus, üzüm salkımı şeklinde olanlara staphylococcus denir. Kokların hücre çapı 0.5 mikrometre (μm) veya altına inerken bazılarında 1.2 mikrometreye (μm) kadar çıkabilmektedir [26]. Şekil 2.1' de yuvarlak bakterilerin SEM görüntüleri görülebilir.



Şekil 2. 1 Yuvarlak bakterilerin SEM görüntüleri

Zatürre bakterileri ve bel soğukluğu bakterileri bunlara örnektir. Yuvarlak bakteriler grubundaki Pnömonokok; bakterisi ise ilk olarak 1881 yılında Pasteur tarafından, kuduzdan ölmüş bir çocuğun tükürüğünden izole edilmiştir [27].

Streptococcus pneumonia (pnömonokok), bakteriyel menenjit, sepsis, pnömoni gibi invaziv (yayılmacı) hastalıklara neden olan gram pozitif bir diplokoktur. Dünya Sağlık Örgütü 2005 raporlarına göre aşı ile korunabilir hastalıklara arasında pnömonokok hastalığı yılda 1.600.000 ölümlle birinci sırayı almaktadır ve yaklaşık 1.000.000 kadarı 5 yaş altı çocukları kapsamaktadır. Dünyada her yıl 10 milyon çocuk ölmektedir ve ölümlerin 1/5' i pnömoni nedeniyle olmaktadır [28-30].

2.2.1.2 Çubuk bakteriler (Bacillus)

Boyları enlerinden daha uzundur. Düz veya hafif bükülmüş olabilirler. Kalınlıkları her yerde aynı olmayabilir. Uzun iplik şeklinde olanları da vardır. Çomak hücrelerinin kalınlığı 0.4 -1.0 μ , boyları ise 1.5 – 5 μ arasında değişirse de bazı türlerde 30 – 40 μ hatta 100 μ 'a kadar varan hücrelere de rastlanabilir.

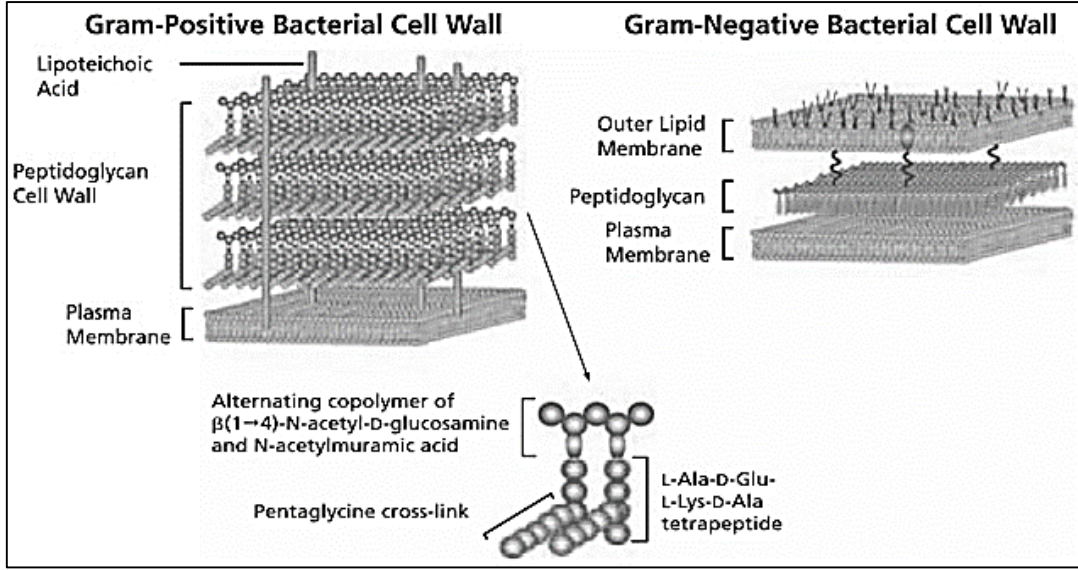
Tifo, tüberkuloz ve şarbon hastalığı bakterileri bu şekildedir. *Coccobacillus*; *Escherichia pestis*, *Escherichia coli* insanda vebaya neden olmaktadır [29].

2.2.1.3 Spiral bakteriler (Spirillum)

Çok kıvrımlı, burgumsu bakterilerdir. Bakterinin bir veya iki ucu kamçılı olabilir. Çoğu saprofitir. Firengi bakterileri ve dişlere yerleşen spiroketler spiral bakterilere örnektir. *Vibrio cholerae* kolera hastalığını yapan patojen bakteridir [31].

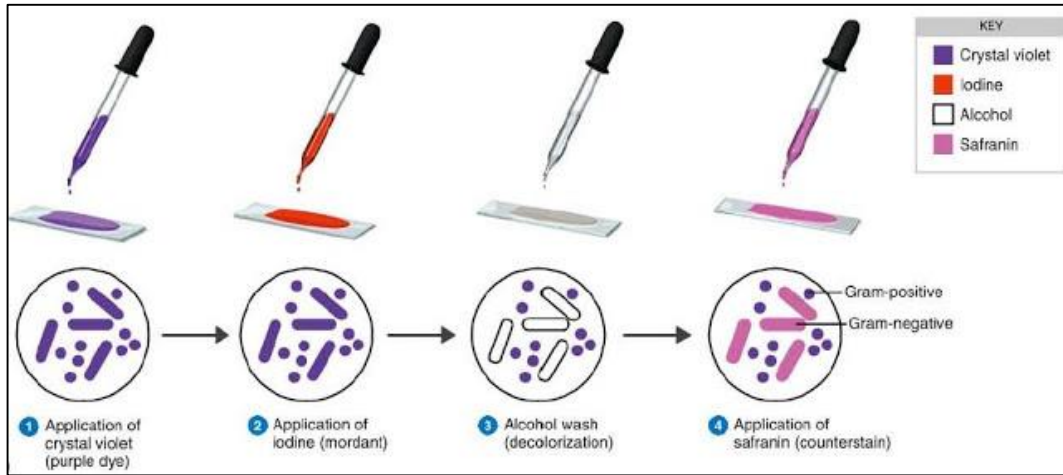
2.2.2 Gram Boyadan Etkilenmelerine Göre Bakteriler

Tıp alanında bakteriler temel olarak gram pozitif ve gram negatif bakteriler olmak üzere 2 gruba ayrılır. Bakterilerin hangi grupta oldukları gram boyama yöntemi ile belirlenir. Gram boyama metodu, Hans Christian Gram tarafından geliştirilip 1884 te yayınlanmıştır. Gram boyamada iki bakteri grubunun farklı peptidoglikan tabakasına sahip olmasından yararlanır. Gram boyama yöntemi kullanılarak iki bakteri grubu hücre duvarına göre ayırt edilir ve gram-pozitif bakteriler mor, gram-negatif bakteriler de pembe boyanır [32]. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin ayrılmasında gram boyama yönteminden yararlanır. Gram-pozitif bakterilerde kalın bir peptidoglikan tabaka vardır ayrıca Gram-negatif bakterilerde, Gram-pozitif bakterilerde olmayan lipopolisakkarit (lipid ve polisakkarit) tabaka vardır (Şekil 2.2). Buna bağlı olarak gram pozitif bakteriler mor, gram negatif bakteriler ise pembe-kırmızı renge boyanırlar [33].



Şekil 2. 2 Gram pozitif ve gram negatif bakteri duvarı

Gram boyama; bakterileri hücre duvarının kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak sınıflandırılmasını sağlayan yöntemdir. Gram boyama yöntemi Danimarkalı bilim adamı Hans Christian Gram tarafından bulunmuştur. Şekil 2.3' de gram boyama tekniğinin şematik gösterimi verilmiştir.

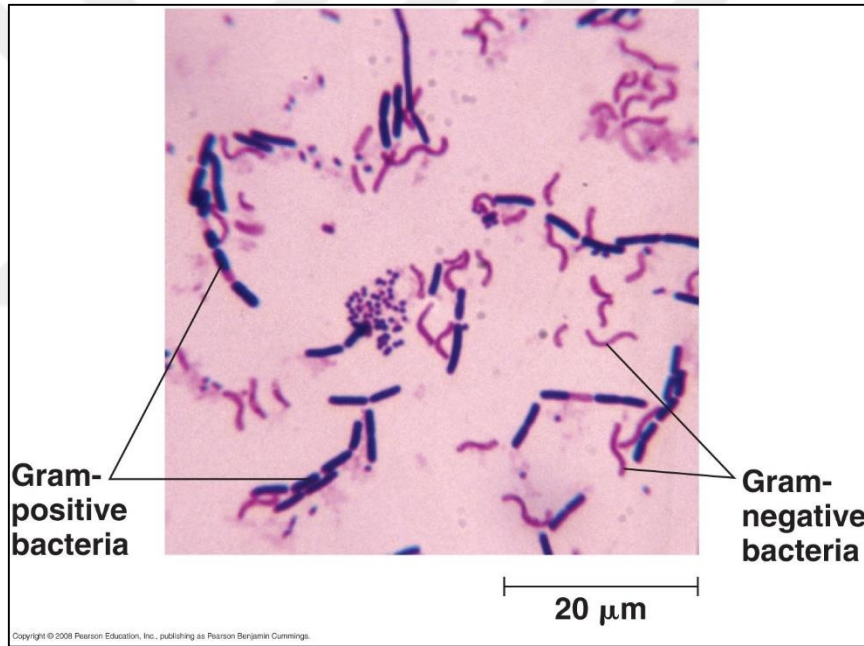


Şekil 2. 3 Gram boyama tekniğinin şematik gösterimi [34]

Gram boyama için 18-24 saatlik bir kültürden preparat hazırlanır. Hazırlanan preparat kristal violet ile kaplanır ve 1 dakika beklendikten sonra bol damıtılmış su ile yıkanır. Bu işlemden sonra preparat üzeri lugol (gram iyot çözeltisi) ile kaplanıp 1 dakika bekletildikten sonra saf alkol içerisinde daldırılarak bir süre beklenir. Damıtılmış su ile preparat yıkandıktan sonra karşıt boya olarak kullanılan fuksin ya da safranin ile kaplanır ve 30 saniye beklenir. Bol su ile durulanan preparat hava ortamında kurutulur. Hücre

duvarı yapısına bağılı olarak farklı renk almış bakteri grupları mikroskopta immersiyon objektifi ile incelenir.

Gram pozitif bakteriler lugol uygulamasından sonra hücrede oluşan kristal violet- iyot kompleksini, alkol ile dekolorizasyon sonrası hücre dışına bırakamazlar. Alkol hücre çeperindeki suyu alarak uzaklaştırır ve çeperi kurutur bakterilerin mor renkli görünmesine neden olur. Gram negatif bakterilerin hücre zarındaki yağ oranı yüksek olduğu için bazı bölgelerdeki yağlar alkol yardımı ile çözülür. Böylece hücre zarında boşluklar oluşur ve kristal violet- iyot kompleksi bu boşluklardan dışarı çıkarak hücrenin tekrar şeffaf hale gelmesini sağlar. Karşıt boya uygulaması ile pembe- kırmızı renge dönüşürler [35]. Şekil 2.4' de gram boyama tekniğı ile bakterinin mikroskop görüntüleri verilmiştir.



Şekil 2. 4 Gram boyama sonrası gram pozitif ve gram negatif bakterilerin mikroskop görüntüleri [35]

2.2.2.1 Gram Pozitif Bakteriler

Gram pozitif bakteriler; gram boyama prosedüründen geçtikten sonra, mikroskop altında mavi- siyah, mor renk alan bakterilerdir. Bu rengin sebebi gram-pozitif bakterilerin hücre duvarlarının kristal viyole/iyot karışımını tutmasıdır. Gram negatif bakterilerin aksine gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarının dışında dış zar bulunmaz. Peptidoglikan hücre duvarı daha kalın olan gram

pozitiflerin boyaları tutma kuvvetleri fazladır. Gram pozitif bakterilerde kalın ve çok katmanlı peptidoglikan tabakası bulunur (%80-85). Bu tabaka, teikoik asit, lipoteikoik asit ve kompleks yapıdaki polisakaritleri de içerir. Protein yapıda olan teikoik asit ve lipoteikoik asit antijeniktir ve önemli virulans faktörlerinden biridir. Gram pozitif bakterilere; *S.aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *M. tuberculosis* mikroorganizmaları örnek olarak gösterilebilir [33,36].

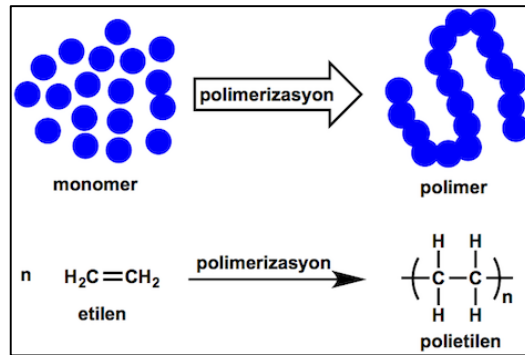
2.2.2.2 Gram Negatif Bakteriler

Gram boyası ile pembe renkte boyanan, ince hücre duvarına sahip bakterilerdir. Gram- pozitif bakterilerin aksine, gram-negatif bakterilerin hücre duvarının sadece %10'u peptidoglikan maddesinden oluşur. Gram negatif bakterilerin dış yüzeylerinde lipopolisakkarid adı verilen hücre yapısı maddesi yoğun olarak bulunur, hücre yüzeyini bir kapsülün örttüğü bakteriler de gram negatif yapıdadırlar. Lipopolisakkarid maddesi toksin yapısında olduğundan, özellikle çocuklarda gram negatif bakteriler kolaylıkla kana karışabilmekte ve sepsis hastalığına yol açabilmektedirler. Gram negatif bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlarda penisilin grubu antibiyotikler etkili olamayabilmekte, sefalosporin grubu antibiyotikler etkili olabilmektedirler *E.coli*, *S.maltophilia*, *K.pneumoniae* gram negatif bakteriler örnek olarak mikroorganizmalardır [37].

BÖLÜM 3

POLİMERLER

Günümüzde birçok alanda yaygın olarak kullanılan polimerler; monomerlerin polimerizasyon reaksiyonları ile birbirlerine kovalent bağlanarak oluşturdukları makromoleküllerdir (Şekil 3.1). İlk sentetik polimer 1838 yılında vinil klorürün kaza ile polimerleştirilmesi üzerine elde edilmiştir. Daha sonra, 1839 yılında da plastik endüstrisinde çokça kullanılan polistiren sentezlenmiştir [38]. Kimya sektörü başta olmak üzere; tekstil, makine, fizik gibi farklı alanlarda da polimerler yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimerlerin kolay şekil alabilmeleri, hafif olmaları, yapısal özelliklerinin ayarlanabilmesi, daha düşük maliyetli olmaları seramik ve metale göre daha fazla tercih edilmelerini sağlar [39].



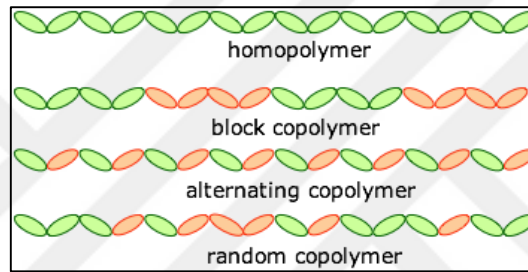
Şekil 3. 1 Polimerleşme şeması

3.1 Polimerlerin Sınıflandırılması

Polimerleri çok çeşitli sınıflandırmak mümkündür. Polimeri oluşturan monomer bileşimine göre polimerler; homopolimer ve kopolimer olmak üzere 2 sınıfa ayrılır.

Homopolimerler; tek tip monomerin polimerizasyon reaksiyonu sonucu kovalent olarak bağlanmasıyla elde edilir. Kopolimerler ise iki veya daha fazla farklı monomerin polimerleşmesi sonucu elde edilmektedirler. Kopolimerler Şekil 3.2' de gösterildiği gibi polimerin yapısındaki monomer dizilimine göre; blok kopolimer, rastgele kopolimer ve alternatif kopolimer olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır.

Diğer bir temel sınıflandırma ise doğada bulunuş şekillerine göre yapılabilir. Kauçuk, reçine, selüloz, kitin, protein gibi doğada var olan polimerlere 'doğal polimerler' denir. Polimerizasyon yöntemleri ile sentezlenen polimerler ise 'sentetik polimerler' sınıfını oluştururlar. Polistiren, polivinil klorür, polietilen gibi çok kullanılan polimerler sentetik polimerlere örnektirler [40].



Şekil 3. 2 Polimerlerin monomer dizilimine göre sınıflandırılması

3.2 Polimerlerin Sentezi

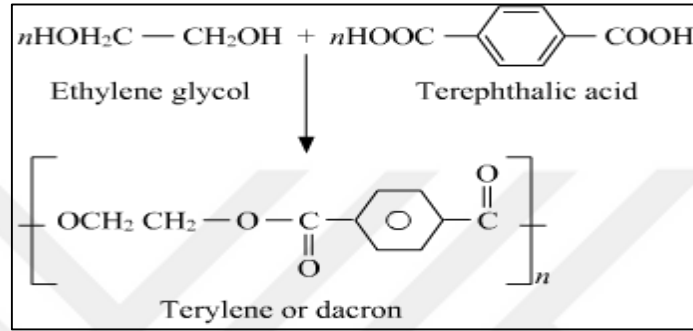
Sentetik polimerler çeşitli yollarla sentezlenebilmektedir. Sentez mekanizmaları göz önüne alındığında Kondenzasyon (Basamaklı) Polimerizasyonu ve Zincir (Katılma) Polimerizasyonu olmak üzere iki farklı polimerleşme yolu vardır. Uygun ortam koşulları sağlanarak, uygun katalizör yardımıyla bu iki mekanizma üzerinden monomerlerden polimer sentezi gerçekleştirilmektedir.

3.2.1 Kondenzasyon (Basamaklı) Polimerizasyonu

Günümüzde doğal polimerlerin aksine sentetik polimerlerin az bir kısmı kondenzasyon ürünüdür. Bunun nedeni kondenzasyon polimerizasyonu için uygun koşulların (yüksek basınç, yüksek sıcaklık gibi) sağlanmasının daha maliyetli oluşudur. Basamaklı polimerizasyonda; polimerleşme boyunca polimerin molekül ağırlığı devamlı artmaktadır. Monomer dimeri, dimer trimeri oluşturur bu şekilde polimer zinciri büyür

ve yüksek molekül ağırlıklı makromoleküller elde edilir. Temelde; poliamid, poliester, polikarbonat ve poliüretanlar kondenzasyon mekanizması üzerinden sentezlenirler.

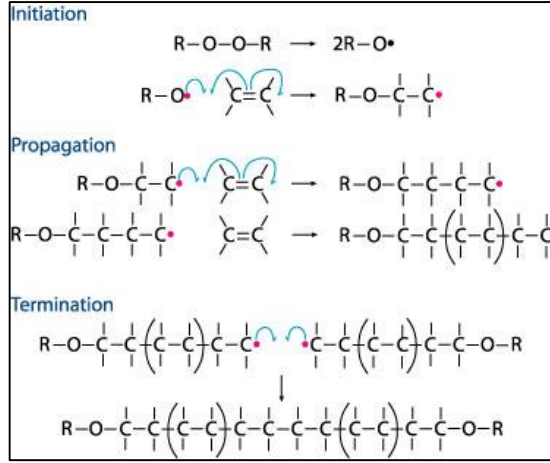
Bir ticari adı Dacron olan PET elyafı bir kondenzasyon polimeridir. Etilen glikol ve tereftalik asidin reaksiyonu sonucu elde edilen polietilen tereftalatlar; hafif, uzun ömürlü ve dayanıklıdır. Ancak tereftalik asidi uzaklaştırmak zor olduğu için aynı polimer dimetil tereftalat kullanılarak da sentezlenmektedir. Bu sentez sonunda elde edilen PET ise Terylene olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.3) [38,39,41].



Şekil 3. 3 PET sentezi

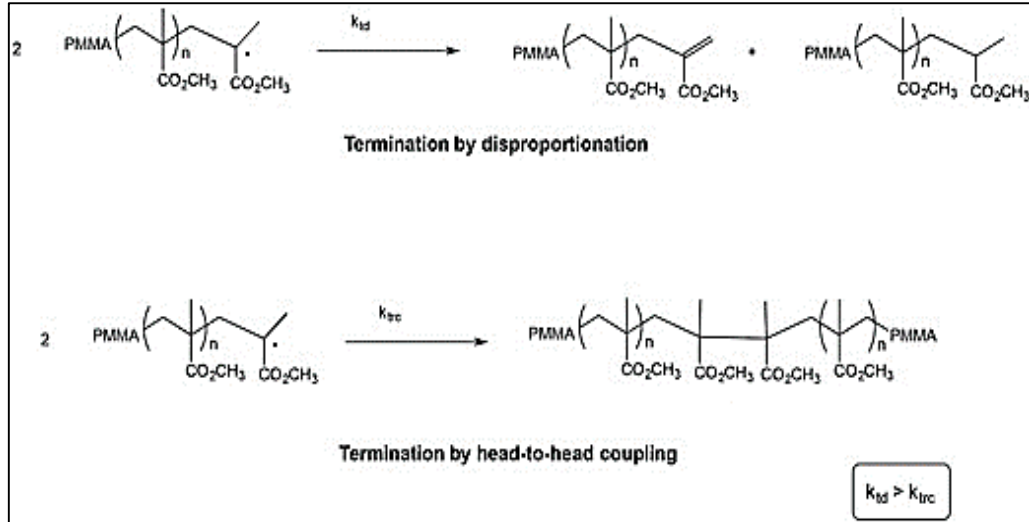
3.2.2 Zincir (Katılma) Polimerizasyonu

Katılma polimerizasyonu başlığı altında; serbest radikal polimerizasyonu, anyonik polimerizasyon ve katyonik polimerizasyon mekanizmaları incelenmektedir [38]. Polimerizasyondaki monomere ve başlatıcıya bağlı olarak; serbest radikal, karbokatyon ya da karboanyon oluşmaktadır. Katılma polimerizasyonu; başlama, çoğalma ve sonlanma basamaklarını izler (Şekil 3.4). Mekanizmada, oluşan reaktif son grup, monomerin çifte bağına saldırır ve polimer zincirinin büyümesi gerçekleşir. Polietilen, polivinil klorür, poliakrilonitril, polistiren gibi ticari olarak kullanılan bir çok ürün katılma polimerizasyonu ürünüdür [38,41].



Şekil 3. 4 Katılma polimerizasyonu mekanizması

Serbest radikal polimerizasyonunda çoğalma basamağındaki canlı polimer; birleşme ile ya da ayrı- ayrı sonlanma yollarını izleyerek aktifliğini yitirir ve polimerizasyon sonlandırılır. Birleşerek sonlanmada iki aktif polimer ucu birleşir, molekül ağırlığı artar ve reaktif uçların birleşmesi sonucu polimerizasyon sonlanır. Ayrı- ayrı sonlanma ise; polimer zincirine diğer polimer zincirinin protonunu aktarması ile gerçekleşir. Molekül ağırlığı korunurken iki farklı yapıda polimer zinciri elde edilir. Sonlanma yolu polimerin yapısına bağlıdır. Örneğin; poli(metil metakrilat) 60°C' ye kadar birleşerek sonlanırken, daha yüksek sıcaklıklarda ayrı- ayrı sonlanma yoluna eğilimlidir (Şekil 3.5) [41].



Şekil 3. 5 Poli(metil metakrilat) ayrı- ayrı ve birleşerek sonlanma basamaklarının gösterimi

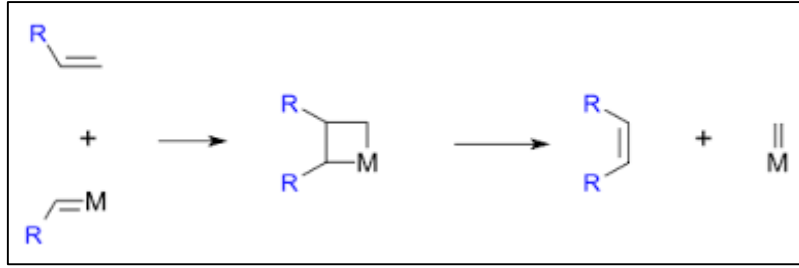
3.3 Kontrollü Polimerizasyon

Polimerlerin mekanik özellikleri kullanım alanları açısından oldukça önemlidir. Mekanik özellikler polimerin proses (işleme) yönteminin değişimi ile değiştirilebildiği gibi polimerin sentezlenme yolu yardımıyla da değiştirilebilir. Polimerler ilk olarak Carothers tarafından mekanizmalarına göre kondenzasyon ve katılma polimeri olarak sınıflandırılmıştır. 1956 yılında ise Swarcz, zincir transferi ya da sonlandırma olmadan ilerleyen bir polimerizasyon yöntemi olarak “yaşayan polimerizasyon”u tanımlamıştır. Kontrollü/yaşayan polimerizasyon yöntemi polimerizasyon derecesinin önceden belirlenebilmesini ve dar bir molekül ağırlığı elde edilmesini sağlamaktadır. Bu yöntem ile eşit zincir uzunluklarına sahip, monodispers polimerler elde edilmektedir [42-44].

Kontrollü polimerizasyon reaksiyon ortamındaki tüm monomer tükenene kadar devam ettiği için molekül ağırlığı polimerleşme ile doğru orantılıdır. Bu da polimerin istenilen molekül ağırlığında olmasına olanak sağlar. Kontrollü radikalik polimerizasyon (CRP), nitroksit vasıtalı polimerizasyon (NMP), tersinir katılma/ayırılma transfer polimerizasyonu (RAFT), atomik transfer radikal polimerizasyonu (ATRP), metatez polimerizasyonları kontrollü/yaşayan polimerizasyon yöntemlerine örnek olarak gösterilebilir. Çalışmamız kapsamında kullanılan metatez polimerizasyon yöntemi; halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) hakkında bir sonraki bölümde bilgi verilecektir.

3.3.1 Olefin Metatezi

Metatez; Yunancada yer değiştirme anlamına gelir. Olefin metatez reaksiyonları özellikle polimerik yapıların sentezinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Metatez mekanizmasında; karbon- karbon çift bağı kırılarak yerine yeni bir karbon bağı oluşur (Şekil 3.6) [45]. Olefin metatezi, sentezi zor olan olefinlerin kolay ve hızlı bir şekilde elde edilebilmesini sağlar. Reaksiyon sonunda açığa çıkabilecek etilen gibi yan ürünlerin uzaklaştırılmasının kolay oluşu, ana ürünü yüksek verim ile elde etmeye olanak sağlar [46].



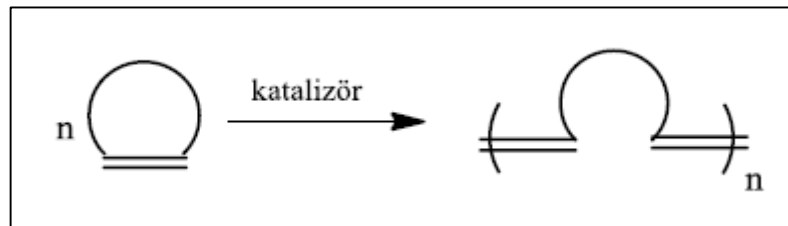
Şekil 3. 6 Metatez reaksiyonunun şematik gösterimi

Chauvin tarafından aydınlatılan metatez mekanizması için uygun Ru ve Mo içeren katalistler Grubbs ve Schrock tarafından geliştirilmiştir. Daha önce kullanılan katalizörler havaya ve neme karşı oldukça hassas ve kısa ömürlüydü. Grubbs ve Schrock tarafından sentezlenen yeni katalistler; yüksek stabilite ve olefinlere karşı seçicilik göstermektedir. Grubbs ve Schrock bu çalışmaları ile 2005 Kimya Nobel Ödülünü almışlardır [47].

Çift bağ içeren moleküllerin sentezinde kullanılan farklı metatez reaksiyonları vardır. Bunların başında; Self Metatez (SM), Çapraz Metatez (CM), Asiklik Dien Metatez (ADMET), Halka Kapanma Metatez (RCM), Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu (ROMP) gelmektedir.

3.3.1.1 Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu (ROMP)

Halka açılma metatez polimerizasyonu polimer kimyası için önemli bir yere sahiptir. Doymamış bağ içeren gergin halkaya sahip monomerin, çift bağı kırılarak halka açılır ve yeni bir çift bağ oluşumu ile polimer zinciri uzar. Halkalı yapıdaki olefinler doymamış polimerlere dönüşürken, monomerin çifte bağ sayısında korunur (Şekil 3.7) [45].









Şekil 3. 7 Halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP)

Halka açılma metatez polimerizasyonu da diğer olefin metatez reaksiyonlarında olduğu gibi geçiş metali yardımı ile karbon- karbon çifte bağının değişimine dayanır. Polimerizasyon için çok çeşitli geçiş metal katalizörleri kullanılmaktadır [48]. ROMP ile ilgili yapılan eski çalışmalar genellikle monosiklik olefinlerin polimerizasyonu üzerinedir.

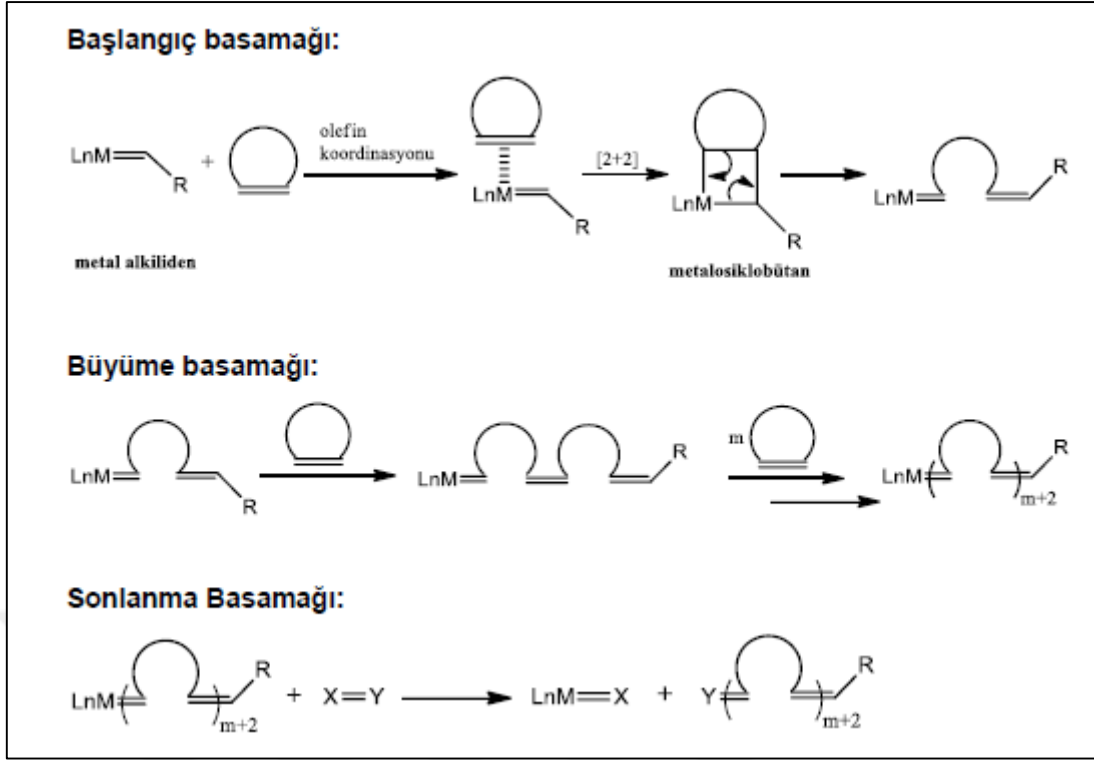
Daha sonraki çalışmalar özellikle yüksek halka gerginliğine sahip norbornen türevleri gibi bisiklik ve polisiklik olefinler üzerine yapılmıştır. Yüksek halka gerginliği; yüksek polimerleşme miktarı ve yumuşak reaksiyon koşulları sağlamaktadır [49]. Bazı halkalı olefinlerin gerilme enerjileri Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Bazı halkalı olefinlerin gerilme enerjileri

| Olefin | Gerginlik enerjisi $\Delta H^0_{f 298}$ (kkal/mol) | Olefin | Gerginlik enerjisi $\Delta H^0_{f 298}$ (kkal/mol) |
|---|---|--|---|
|  | 53.7 |  | 1.4 |
|  | 29.8 |  | 6 |
|  | 5.9 |  | 27.2 |

Halka gerginliği düşük olan sikloheksene göre norbornen birçok metal katalizörü ile hızlı ve kolay bir şekilde polimerleşebilmektedir [49]. Monomer cis yapıya sahip olduğu halde ROMP reaksiyonu sonunda tamamen cis, tamamen trans- ya da cis, trans karışımına sahip polimer oluşturabilir. Örneğin ReCl_5 başlatıcısı ile 5,5- dimetilnorbornen tamamen cis yapıda polimer oluştururken, RuCl_5 başlatıcısı ile tamamen trans yapıda polimer elde edilir.

ROMP mekanizması Chauvin tarafından önerilmiştir (Şekil 3.8). Mekanizmanın başlama basamağında; halkalı olefinler geçiş metali içeren alkiliden yapılarına koordine olur. Polimer zincirinin büyüme basamağı [2+2] siklokatalımı ile oluşan metalsiklobütan ara ürün oluşumu ile başlar. Metalsiklobütan siklotersinme reaksiyonuna uğrar ve yeni bir metal alkiliden oluşur. Monomerin bu yapıya koordine olması ile kompleksin boyutu artar fakat halkalı olefinlere olan aktifliği başlatıcıyla aynıdır. Bu da tüm monomer bitene kadar reaksiyonun tekrarlanmasını ve yaşayan polimerin eldesini sağlar. Polimerleşme özel reaktifin dışarıdan eklenmesi ile sonlandırılmaktadır. Bu reaktif, polimerin sonunda bulunan reaktif metal ucu kaldırır ve yerine bilinen bir fonksiyonel grubun geçişini sağlar [50].



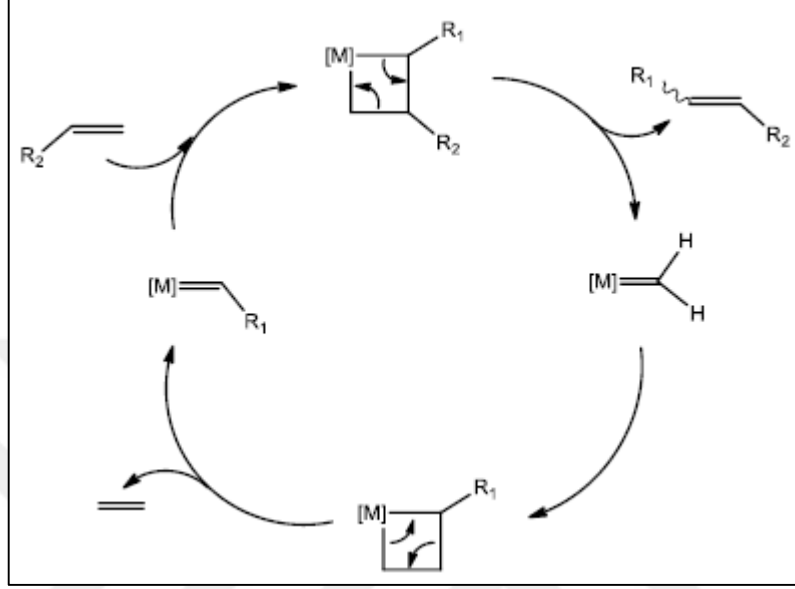
Şekil 3. 8 Genel ROMP reaksiyon mekanizması

ROMP reaksiyonlarında dikkat edilmesi gereken üç farklı durum vardır. Büyüyen polimer zincirindeki metal merkez; kullanılan katalizördeki geçiş metaline ve reaksiyon ortamına bağlı olarak metalosiklobütan ya da metal alkilidin formunda olabilir. İkinci önemli unsur ise ROMP da metatez reaksiyonları gibi tersinir özellik göstermektedir. Bu nedenle Şekil 3.8' de gösterilen reaksiyon mekanizması ters yönde de ilerleyebilmektedir. Reaksiyonun denge kontrolü polimerizasyon termodinamiği ile sağlanmaktadır.

ROMP reaksiyonlarında genellikle siklobüten, siklopenten, norbornen gibi gergin halkaya sahip monomerler tercih edilmektedir (Çizelge 3.1). Gergin halkalar entropik özellikleri nedeni ile daha kolay açılmakta ve reaksiyonun sürdürülebilirliğini sağlamaktadır. Ayrıca sıcaklık ve konsantrasyonda reaksiyonu etkileyen önemli parametrelerdir. Verimli bir ROMP reaksiyonu için; yüksek monomer konsantrasyonu ve düşük sıcaklık tercih edilmektedir [51].

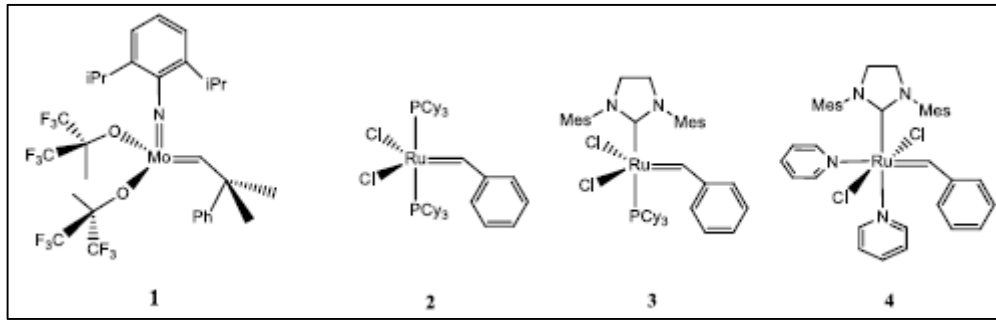
3.3.2 Olefin Metatez Katalistleri

Olefin metatez reaksiyonları, geçiş metali kompleksleri ile katalizlenmektedirler. Chauvin yaptığı çalışmalarda belirlediği mekanizma ile metatez reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için bir metal kompleksine ihtiyaç olduğunu kanıtlamıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3. 9 Chauvin tarafından önerilen mekanizma

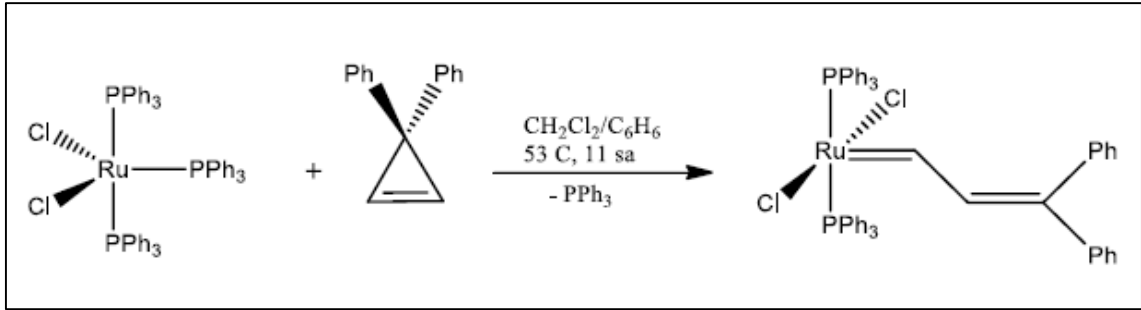
Mekanizma belirlendikten sonra katalizör üzerine yapılan çalışmalar arttırılmıştır. Literatürde bilinen etkili katalizörler; Schrock ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş molibden kompleksleri ve Grubbs ve arkadaşları tarafından geliştirilen rutenyum bazlı komplekslerdir (Şekil 3.10) [52].



Şekil 3. 10 Literatürdeki metatez aktif katalizörler örnekleri

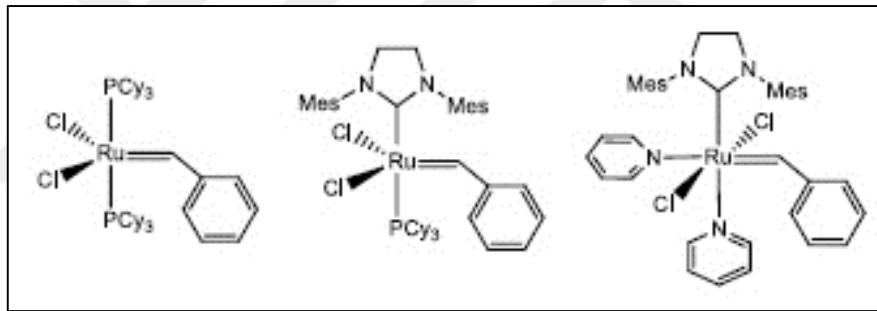
Molibden, tungsten ve rutenyum geçiş metallerini içeren katalistler olefin metatezinde kullanılmaktadır. Grubbs katalistleri olefinik gruba olan seçiciliği, hava, nem gibi ortam koşullarına daha dayanıklı olması ve çeşitli solventlere uyumlu olması nedeni ile daha fazla tercih edilmektedirler. $RuCl_2(PPh_3)_3$ yapısından yola çıkarak ilk rutenyum geçiş

metali içeren metatez katalizörü sentezlenmiştir. Ru (II) alkiliden kompleksi olan bu katalizör; havaya, suya, aside, birçok fonksiyonel gruba karşı kararlıdır ve norbornen bileşiklerinin ROMP reaksiyonlarını katalistlemektedir (Şekil 3.11) [53].



Şekil 3. 11 Rutenyum bazlı ilk metatez katalizörünün sentezi

Trifenilfosfin ligandı içeren rutenyum kompleksinden yola çıkılarak ligand değişim reaksiyonu ile Grubbs birinci nesil katalizörü sentezlenmiştir. Grubbs 1 katalizörü geliştirilerek 2. ve 3. Jenerasyon katalizörler geliştirilmiştir (Şekil 3.12) [45].



Şekil 3. 12 Grubbs 1., 2. ve 3. jenerasyon katalizörleri

ANTİMİKROBİYAL POLİMERLER

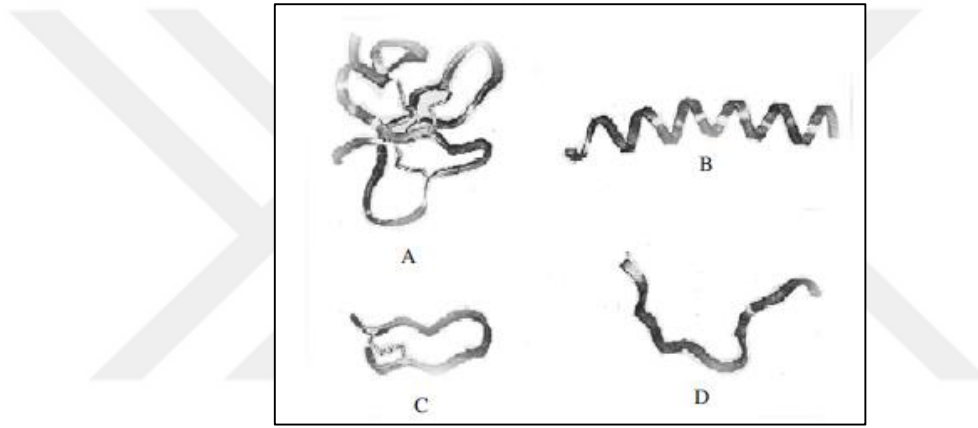
4.1 Antimikrobiyal Doğal Peptitler

Antimikrobiyal peptikler (AMP); doğal antibiyotiklerdir. Hayvanlarda, bitkilerde, böceklerde bulunan antimikrobiyal etkinlik gösteren doğal peptidler immün sistemin bir parçasıdır ve gram negatif ve gram pozitif bakterilere, mantarlara, HIV, herpes simplex ve influenza gibi bazı zarflı virüsleri ve ökaryotik parazitlere karşı aktivite gösterirler. Bu peptidler genellikle; 12- 50 aminoasit sahip kısa yapıda, amfifilik (hem hidrofobik hem hidrofilik yüzeye sahip) ve fizyolojik pH'da katyonik yüklüdürler. Geleneksel antibiyotiklerin aksine bu peptidler bakteriyosidaldir, geniş etki spektrumuna sahip olduğu gibi bakteri direncine neden olmazlar. Bugüne kadar yüzlerce antimikrobiyal peptid doğal organizmalardan izole edilmiştir ve sentetik taklitleri laboratuvar ortamında sentezlenmektedir. Kurbağa gibi hem suda hem karada yaşayabilen (amfibiyan) hayvanların derilerinde bulunan magainin gibi peptitler derinin koruyucularıdır. Birçok mikroorganizmayla karşılaşmalarına rağmen kolay enfekte olmazlar. İnsanlarda da bulunan katyonik yapıdaki defensinler invaziv patojenlere karşı savunmada oldukça etkilidirler [54].

4.1.1 Katyonik Antimikrobiyal Peptitlerin Yapısı

Antimikrobiyal etkinliğe sahip doğal peptitlerin yapıları primer ve sekonder olarak iki grupta incelenmektedir. Primer yapılar genellikle; 12- 50 aminoasit uzunluğundadır ve %50 hidrofobik aminoasit içeriğine sahiptirler. Ayrıca yapılarında arjinin ve lizin

aminoasidi taşıdıkları için genellikle +2 değerlikli olup bazen de +4, +6 ya da +7 yüke sahip olabilmektedirler. Sekonder yapı ise; disülfid bağının yardımı ile ya da bakteri membranıyla temas sonucu, peptitlerin kendi üzerine katlanmaları ile meydana gelen üç boyutlu amfipatik yapıdır. Sekonder yapıda; polar pozitif yüklü aminoasitlerden oluşan bir hidrofilik kısım ve apolar nötral aminoasit yan zincirlerini içeren bir hidrofobik kısımdan oluşur. Bu yapı negatif yüklü bakteri membranı ile peptit arasında iyi bir ilişki kurulmasını sağlamaktadır. Antimikrobiyal katyonik peptitlerin sekonder yapıları; β -şeridi içeren peptitler (A, ; β - defensin), α - helezonal peptitler (B, magainin), halka yapıdaki peptitler (C) ve uzun peptitler (D) olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (Şekil 4.1) [55].



Şekil 4. 1 Antimikrobiyal etkili katyonik peptitlerin sekonder yapıları (A: β - defensin, B: magainin, C: halka yapıdaki peptitler D: uzun peptitler)

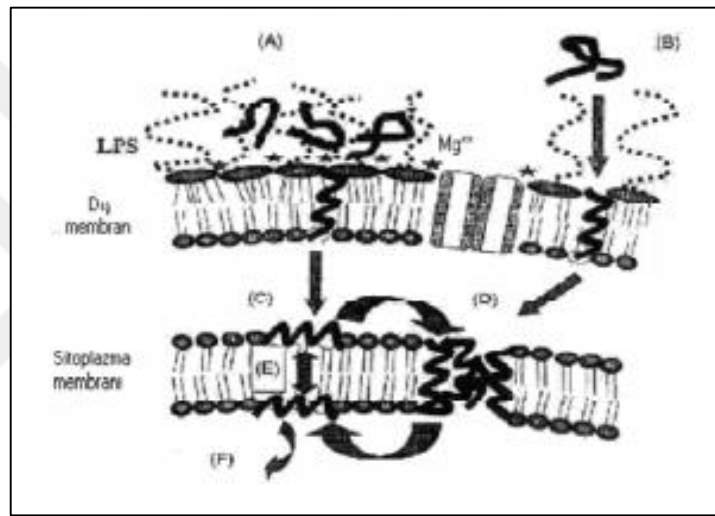
4.1.2 Antimikrobiyal Peptitlerin Etki Mekanizmaları

Antimikrobiyal peptitlerin pozitif yüklü ve hidrofobik yapıda olması bakterilerle etkileşimi açısından oldukça önemlidir. Birçok katyonik peptit, negatif yüklü bakteri membranı ile doğrudan pozitif yük sayesinde etkileşebilmektedir. Katyonik peptitidin bağlanabilmesi için gerekli olan negatif yük; gram (-) bakterilerin dış membranındaki lipopolisakkaritlerden, gram (+) bakterilerde ise lipoteikoik asitten ileri gelmektedir. Ayrıca fosfolipid yapılı iç membranda antimikrobiyal etkileşimi kolaylaştırmaktadır [56].

Antimikrobiyal etkinlik kadar toksisite de peptitler için önemli bir parametredir. Memelilerdeki ökaryotik hücrelerin dış membranları, fosfatidilkolin ve sfingomiyelin gibi elektriksel olarak nötral, zwitteriyonik fosfolipitlerden oluşur. Bakteri dış membranı ise negatif fosfatidilgliserol ve kardiyolipin içermektedir. Ayrıca bakteri dış membranı

kolestrol içermezken memeli hücrelerinde kolestrol bulunmaktadır. Antimikrobik katyonik peptitlerin bakteri hücresi seçicilikleri bu farklılıklardan dolayı yüksektir ve insan hücreleri üzerine toksik etki göstermezler [57].

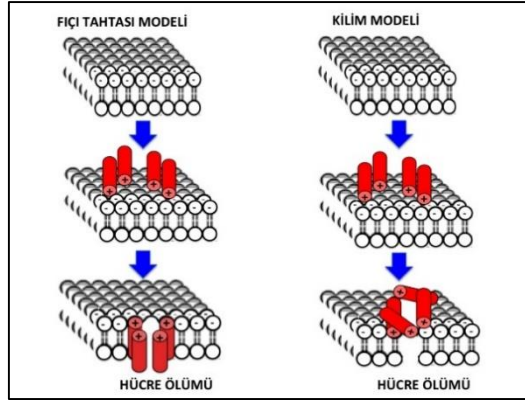
Gram negatif ve gram pozitif bakterilerin hücre membranı ile peptit arasındaki elektrostatik etkileşim asıl öldürücü etkiyi sağlamaktadır. Bu etkileşim sırasında katyonik peptitlerin hidrofilik grupları ile membran fosfolipidlerinin hidrofobik zincirleri karşı karşıya gelir, peptitler membrana paralel bir pozisyona gelir ve membran bütünlüğünü bozan kanalların oluşumuna neden olurlar (Şekil 4.2). Bu olayı açıklamak üzere yapılan çalışmalar sonucu çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır [58].



Şekil 4. 2 Katyonik peptitlerin dış membrandan geçişleri [55]

4.1.2.1 Fıçı Tahtası Modeli

Bu modelde peptitler membranın içerisine halka görünümü verecek şekilde konumlanırlar. Bu şekilde konumlanan peptit moleküllerinin fıçıyı oluşturan tahtalara benzemesi nedeni ile bu modele fıçı tahtası modeli denmiştir. Bu model α -helezon yapısındaki katyonik peptit yığını tarafından gerçekleşmektedir (Şekil 4.3) [59].



Şekil 4. 3 Etki mekanizmasında fıçı tahtası ve kilim modeli [60]

4.1.2.2 Kilim Modeli

Bu modele göre bakteri- peptit arasındaki ilk etkileşim elektrostatik olarak gerçekleşir. Peptit moleküllerinin hidrofilik yüzeyleri ile bakteri çeperindeki fosfolipid gruplar örtüşür ve hücre peptit tarafından bir kilim gibi örtülür. Bu nedenle bu modele kilim modeli denmektedir. Bu yapıya göre; membrana nüfus eden peptitler belirli bir yapıda olmak zorunda değildir. Farklı sekonder yapıda, büyüklükte, lineer ya da siklik olabilirler (Şekil 4.3) [61].

4.1.2.3 Miçel Agregat Modeli

Farklı sayıdaki peptit molekül toplulukları membranda normalde bulunmayan kanalları miçellere benzeyen bölgesel agregasyonlar sonucu açar. Kurbağadan izole edilen buforin II antimikrobiyal peptidinin membrandan geçişini bu yolla sağladığı tespit edilmiştir [62].

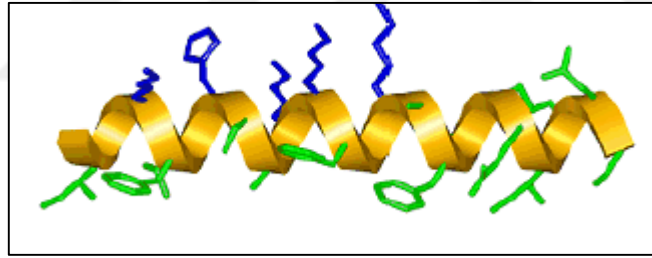
4.1.2.4 Toroidal Model

Fıçı tahtası modelinden farkı peptitlerin dikey olarak bulunmasıdır. Bu modele göre α -helezon yapıdaki peptitler paralel yerlerini alırlar ve peptitlerin hidrofobik amino asit grupları membranın polar grupları ile yer değiştirir. Bu da membranda dik yarıkların oluşmasına neden olmaktadır. Magainin ve mellitin bu modele göre etki gösterdiği tespit edilmiştir [63].

4.1.3 Doğada Bulunan Bazı Antimikrobiyal Peptitler

4.1.3.1 Magainin

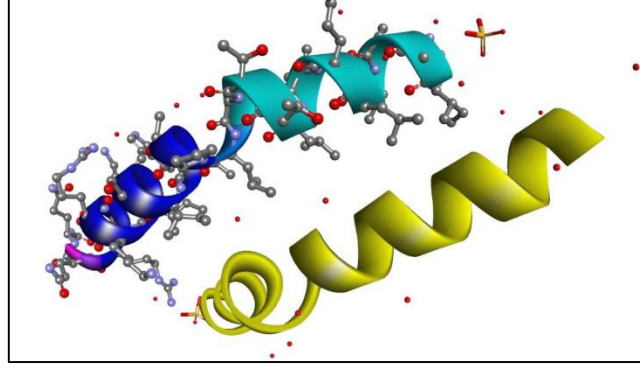
Magainin ilk olarak 1987 yılında Güney Afrika kara kurbağası derisinden izole edilmiştir. *Xenopus laevis* cinsi bu kurbağanın karın kasları kesilerek koyulduğu patojen dolu bir su içerisinde bile infekte olmadığı gözlenmiştir. Gram negatif ve gram pozitif bakterilere aynı zamanda mantarlara karşıda etki göstermektedir. Bakterilerin magainine karşı direnç gösterememesi; magainin yapısının, sentetik antimikrobiyal peptitler için yol gösterici olmasını sağlamıştır. Şekil 4.4' te gösterilen magainin yapısında yeşil renkli kısımlar hidrofobik, mavi renkli kısımlar ise hidrofilik aminoasitleri göstermektedir. Amfifilik yapıdaki magainin bakteri zarında delikler açarak bakteri ölümünü gerçekleştirir. Ayrıca yapıdaki hidrofobik ve hidrofilik grupların oranı ve dağılımı magainine yüksek aktivite, düşük toksisite sağlamaktadır. Magaininin bazı analogları başta cilt kanseri olmak üzere kanser tedavisinde de etkilidir [64]. Şekil 4.4' de magaininin yapısı görülebilir.



Şekil 4. 4 Magainin Yapısı [65]

4.1.3.2 Melittin

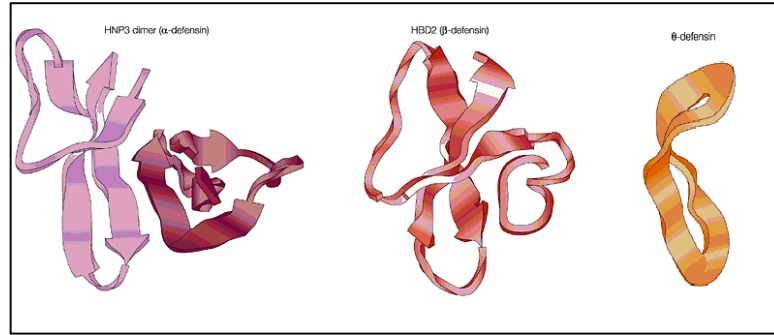
26 farklı aminoasitten oluşan melittin; *Apis mellifera* adında bir bal arısının zehirinden izole edilmektedir. Karakteristik etki mekanizması hemoliz olan melittin, kullanıldığı doza bağlı olarak iyonik geçirgenliğin artışından hücre lizisine kadar farklı etki mekanizmaları vardır. Melittin sara hastalığı tedavisinde ve HIV virüsü üzerinde oldukça etkilidir [66]. Şekil 4.5' te melittinin yapısı görülebilir.



Şekil 4. 5 Melittin Yapısı [67]

4.1.3.3 Defensinler

Memelilerin immün sisteminde aktif bir role sahiptirler. Defensinler küçük molekül ağırlıklıdır ve sistein açısından zengindirler. Üç disülfid bağına, bir arjinin ve 1 glisin rezidüsüne sahiptirler. Alfa (α), beta (β) ve teta (θ) defensinler olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Şekil 4.6). Teta defensinler insanda tanımlanamamıştır. Katyonik yüklü ve amfifilik yapıdaki defensinler membranın negatif yükü ile etkileşmektedir. Gram pozitif ve gram negatif bakteriler başta olmak üzere; mantarlar, zarflı virüsler ve memeli tümör hücreleri üzerine etkilidirler [68,69]. Şekil 4.6' da α , β , θ defesinlerin yapısı görülebilir.



Şekil 4. 6 α , β , θ defesinlerin yapısı [70]

4.1.3.4 Sekropin

Böceklerden izole edilen sekropinler, bakteri hücre zarı üzerine doğrudan etki ederler. Bakterilerin hücre zarını eritirler. Bakteriyel etkinlikleri azdır ve bazı bakteriler sekropine karşı direnç gösterebilmektedirler (Şekil 4.7) [71]. Şekil 4.7' de sekropinin yapısı görülebilir.



Şekil 4. 7 Sekropinin yapısı [72]

4.1.3.5 Baktenisinler

Baktenisinler temelde pronin ve arjininden oluşurlar. Ayrıca hidrofobik özellikteki izolösin, lösin ve fenilalanin içerirler. Baktenisinin iki formu (bac 5 ve bac 7) kemik iliğinin immatür miyeloid hücrelerinde sentezlenmektedir. Gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Klebsiella pneumoniae*) güçlü bir öldürücü etkisi vardır. Defensinlerle analog olan baktenisinlerin hem antibakteriyel hemde antiviral etkisi vardır [73].

4.1.3.6 Histatinler

İnsan tükürüğünde bulunan histatinler histidin bakımından zengindirler. Histatin tabakası diş yüzeyinde biyofilm oluşturur ve bakterilerin yüzey adezyonunu engeller. Gram negatif bakterilerde bulunan Lipit A' yı inhibe eder. İmmün sisteminin daha çabuk etkinlik göstermesine yardımcı olur [74].

4.2 Antimikrobiyal Sentetik Polimerler

Doğal antimikrobiyal peptitlerden esinlenerek daha aktif ve düşük toksisitede antimikrobiyal sentetik polimerler elde edilmektedir. Laboratuvar ortamında sentezlenen bu antimikrobiyal peptitlerin tedavi edici olarak kullanılmasının yanında mikroplardan korunma amacı ile gıda ambalajlarında, katater yüzeylerin kaplanmasında, hastane boyalarında, tekstil malzemelerinde, ilk yardım gereçlerinde (sargı bezi, yara bandı, vb.) kullanımlarında son zamanlarda oldukça artmıştır. Özellikle kateter yüzeylerinin antimikrobiyal polimerler ile kaplanması hastane enfeksiyonları ile mücadelede önemli bir yere sahiptir. Polimer yapılarının sentezinin kolay ve daha ucuz

olması, yapının beklenen özelliklere göre fonksiyonlandırılabilmesi ve ortam koşulların olan dayanıklılıkları peptitlere göre daha avantajlı olduklarını göstermektedir [75,76]. Literatürde bulunan sentetik antimikrobiyal özellikteki polimerler ile ilgili çalışmalar Bölüm 1' de ayrıntılı olarak verilmiştir.



DENEYSEL ÇALIŞMA VE BULGULAR

5.1 Materyal ve Yöntem

5.1.1 Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Furan, tetrahidrofuran, dietil eter, kloroform, etil asetat, hekzan, petrolyum eter, metanol, metil iyodür, asetonitril, pridin, pentan, N,N-dimetil formamid, diklorometan, etil vinil eter, trifloroetanol, dimetilsülfoksit Sigma-Aldrich'ten alındı. Maleik anhidrit, 3-bromopropilamin hidrobromür, sodyum sülfat, sodyum klorür, sodyum bikarbonat, DABCO, Grubbs katalist 2. Jenerasyon, 3-bromopridin, silika jel Sigma Aldrich'ten temin edildi. Hekzan ve etil asetat destillenerek kullanılmıştır.

5.1.2 Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Gereçler

Nükleer manyetik rezonans spektrumları (^1H NMR (500 MHz) ve ^{13}C NMR (75 MHz) spektrumları) "Bruker-500 MHz NMR" cihazı kullanılarak Yıldız Teknik Üniversitesi NMR laboratuvarında alındı. Standart olarak TMS, çözücü olarak ise; d_6 - DMSO ve CDCl_3 kullanıldı. Cam yüzeylerin kaplanmasında Yıldız Teknik Üniversitesi Fizikokimya Laboratuvarındaki 'Spincoat G3-8 Spin Coating System' cihazı kullanıldı. Katyonik yük tayini Yıldız Teknik Üniversitesi Enstrümantel Analiz Laboratuvarındaki UV-Vis Spektrofotometresi ile yapıldı. Moleküler ağırlık ve PDI hesaplamaları Viscotek TDA 302 GPC (Kolon: Eprogen Catsec 300, Akış Hızı: 0,4 mL/dak, Mobil faz: 0,1 M asetik asit, 0,15 M NaCl) ile Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde yapılmıştır. Zeta

çalışması; Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümündeki “Malvern Zetasizer nano zs (633 nm dalga boyu, 175° yayılma açısı-scattering angle, -172,2 toluen sayım oranı -toluene count rate)” cihazı ile yapılmıştır.

5.2 Monomerlerin Sentezi

5.2.1 Furan Maleik Anhidrit Diels Alder Ürününün (4,10-Dioxa-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}] dec8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 1)

63 gram (0,66 mol) maleik anhidrit 200 mL THF ile erlen içerisinde çözüldü. Erlene 49 mL (0,63 mol) furan eklendi ve ortama 5 dakika boyunca azot verildi. Ürün ışığa karşı hassas olduğu için erlen alüminyum folyo ile sarıldı ve karanlık oda da 4 gün boyunca reaksiyona girmesi sağlandı. 4 gün sonunda kristal yapılı ürün elde edildi. Saflaştırma işlemi için yıkama; 200 mL soğuk THF ile (100 mL × 2) tromptan süzülerek yapıldı. Vakum etüvünde kurutuldu. % 78 verim ile saf beyaz kristal ürün 1 elde edildi.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 6.6, 5.5, 3,2.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): δ 172, 137, 82, 48.

5.2.2 Bromookzanorbornen (4-(3-bromopropyl)-10-oxa-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 2)

Sentez işlemi literatüre göre revize edilerek yapılmıştır [77]. 5,44 gram (0,065 mol) NaHCO₃, 50 mL su içerisinde çözülür. 14,24 gram (0,065 mol) 3-bromo propilamin hidrojenbromür spatül ile beherin içerisine eklendi. Oda koşullarında hızlı bir şekilde karıştırıldıktan sonra havanda toz haline getirilen Ürün 1 den 10 gram (0,06 mol) beher içerisine spatül ile eklendi. Hızlı bir şekilde karıştırılan reaksiyonda köpürme gözlemlendi. 45 dakika sonunda elde edilen ürün tromptan süzüldü. Su (1 × 20 mL) ve dietil eter (3 × 20 mL) ile yıkandı. Vakumda kurutuldu. % 74 verim ile saf beyaz katı ürün elde edildi. İkinci aşama için yağ banyosu 90 °C ye getirdi. Geri soğutucu yardımı ile azot ortamında reaksiyon iki boyunlu balonda gerçekleştirildi. 0,72 gram (0,0082 mol) sodyum asetat 16 mL asit anhidrit ile 15 dakika boyunca karıştırıldı. Yan boyundan; 4 gram (0,013 mol) ilk aşamada elde edilen ürün eklendi. Solüsyon 4 saat 90 °C de karıştırıldı. Sonlandırılan reaksiyon beher içerisindeki 20 gram buz üzerine döküldü. 50 mL kloroform yardımı ile

ekstraksiyon yapıldı. %10'luk NaHCO₃ (3 × 50 mL) ve %10'luk NaOH (1 × 50 mL) ile ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen madde fazına Na₂SO₄ ilave edilerek kurutuldu. Süzildükten sonra ortamda kalan çözücü vakum etüvünde uçuruldu. Saflaştırma işlemi kolon kromatografisi ile yapıldı. Hareketli faz olarak Etilasetat: Hegzan (1:1 v/v) kullanıldı. Çözücü rotary ile uzaklaştırıldı ve saf beyaz katı ürün 2 % 46 verim ile elde edildi.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 6.5, 5.25, 3.62, 3.33, 2.85.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): δ 177.23, 137.14, 81.05, 47.87, 37.3, 32.0, 31.15.

5.2.3 Pridin Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (Ürün 3)

0,6 gram (0,002mol) ürün 2, 5 mL asetonitril içerisinde çözüldü. 60°C, azot altındaki reaksiyon ortamına 0,40 mL (0,005 mol) pridin damla damla eklendi ve 1 gece karıştırıldı. Elde edilen ürün THF (4 × 20 mL) ile yıkandı. Vakum altında kurutuldu. Saf açık pembe katı ürün % 84 verim ile elde edildi.

¹H NMR (500 MHz, d₆- DMSO, ppm): δ 9.05, 8.61, 8.16, 6.52, 5.14, 4.56, 3.43, 2.96, 2.15.

¹³C NMR (75 MHz, d₆- DMSO, ppm): δ 176.67, 145.55, 144.9, 135.18, 128.09, 80.38, 58.48, 47.27, 34.51, 28.9.

5.2.4 DABCO Tek Katyonik Yük Tuzu İçeren Norbornen Sentezi (Ürün 4)

0,85 gram (0,003 mol) Ürün 2, 8 mL etilasetat ile vialde çözüldü. 10 mL etilasetat içerisinde çözülmüş 0,46 gram (0.004 mol) DABCO vial içerisine damla damla eklendi. Alüminyum folyo ile sarılı vial içerisinde azot altında reaksiyon 2 gün boyunca devam etti. 2 gün sonunda çöken ürün; etilasetat (3 × 20 mL) ve dietil eter (1 × 20 mL) ile yıkandı. Vakum altında kurutuldu. Saf beyaz katı ürün 3 % 87 verim ile elde edildi.

¹H NMR (500 MHz, d₆- DMSO , ppm): δ 6.58, 5.16, 3.46, 3.25, 3.17, 2.97, 1.94.

¹³C NMR (75 MHz, d₆- DMSO, ppm): δ 176.67, 136.18, 80.38, 60.52, 51.66, 47.27, 35.21, 20.05.

5.2.5 DABCO Çift Katyonik Yük Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (Ürün 5)

0,1 gram (0,00025 mol) ürün 3, MeOH: THF (10:3 v/v) karışımında çözüldü. 1,83 gram (0,014 mol) CH₃I 1 mL MeOH de çözüldükten sonra azot altında vial içerisindeki reaksiyon ortamına damla damla 10 dakikada eklendi. 2 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. 2 gün sonunda çöken katı madde MeOH: THF karışımında (12:8 v/v ve 7:3 v/v) 6 kez ve dietil eter ile 2 kez yıkandı. Vakum altında kurutuldu. Saf katı sarı Ürün 5, %79 verim ile elde edildi.

¹H NMR (500 MHz, d₆- DMSO, ppm): δ 6.58, 5.16, 3.83, 3.49, 3.26, 2.97, 1.94.

¹³C NMR (75 MHz, d₆- DMSO, ppm): δ 178.45, 136.34, 80.52, 60.87, 52.58, 51.55, 50.42, 47.54, 34.79, 20.38.

5.3 Grubbs 3 Katalistin Sentezi

Grubbs 3 katalisti, Grubbs 2 katalistinden sentezlenmiştir [78]. 0,2 gram Grubbs 2, 0,5 mL 3- bromopridin ile azot altında, alüminyum folyo ile sarılı vial içerisinde 10 dakika karıştırıldı. Pentan ile çöktürüldü. Pentan ile yıkandı ve vakum etüvünde kurutuldu. Işıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile sarılı vial içerisinde +4 °C de saklandı. (M_A= 884.48 g/mol)

5.4 DABCO Çift Katyonik Yük İçeren Okzonorbornen Monomerinin ROMP ile Homopolimerizasyonu

Çalışmada homopolimerler 3000 g/mol ve 10.000 g/mol olmak üzere iki farklı molekül ağırlığında sentezlendi. ROMP polimerizasyonunda molekül ağırlığı Grubbs katalist miktarı ile ayarlanmaktadır. DABCO double charge monomerinin teorik olarak 3000 g/mol olacak şekilde homopolimer sentezi için gerekli katalizör miktarı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. Aynı formül 10.000' g/mol lük polimer içinde kullanılmıştır.

$$[monomer]= \frac{0,1}{539,94}$$

$$[monomer]= 0,0001852 \text{ mol}$$

$$DP= \frac{3000}{539,94}$$

$$DP= 5,55$$

$$5,55 = \frac{0,0001852}{[\text{katalizör}]}$$

$$[\text{katalizör}] = 0,000033 \text{ mol} \times 884,48 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$(\text{katalizör}) = 0,0295 \text{ g}$$

DP= Polimerizasyon Derecesi

5.4.1 DABCO Çift Katyonik Yük Esaslı Homopolimerinin Sentezi (D_3)

0,1 gram monomer 2 mL DMF içerisinde çözüldü. 0,0295 gram Grubbs 3 katalizörü 0,5 mL DCM içerisinde çözüldü ve viala tek seferde hızlıca eklendi. Alüminyum folyo ile sarılı azot altında gerçekleşen polimerizasyon reaksiyonu 1 gece oda koşullarında karıştırıldı. Ertesi gün katalistin etkinliğini durdurmak amacı ile reaksiyon ortamına 0,5 mL EVE: MeOH (1:1 v/v) karışımı eklendi. 1 gece oda koşullarında karıştırıldı. Dietil eter ile çöktürülen polimer; 3 kez THF 3 kez dietil eter ile yıkandı. N₂ ile kurutularak saf polimer elde edildi.

5.4.2 DABCO Çift Katyonik Yük Esaslı Homopolimerinin Sentezi (D_10)

0,1 gram monomer 4 mL trifloroetanol (TFE) içerisinde çözüldü. 0,0088 gram Grubbs 3 katalisti 0,5 mL DCM içerisinde çözüldü ve tek seferde viala eklendi. Bir gece karıştırdıktan sonra katalizörü etkisiz hale getirmek için 0,5 mL %30 EVE (DCM içerisinde) viala eklendi. Ertesi gün dietil eter ile çöktürüldü. 3 kez THF 3 kez dietil eter ile yıkandıktan sonra N₂ ile kurutularak saf polimer elde edildi.

5.5 Pridin İçeren Okzanorbornen Monomerinin ROMP ile Polimerizasyonu

DABCO monomerlerinin polimerizasyonu için gerekli olan katalizör miktarı hesaplaması pridin içeren monomerlerin polimerizasyonu içinde yapıldı. 3000 g/mol ve 10.000 g/mol ağırlıklı iki farklı molekül ağırlığına sahip pridin homopolimerleri sentezlendi.

5.5.1 Pridin İçeren Okzanorbornen Monomerinin ROMP ile Polimerizasyonu (P_3)

0,1 gram monomer 2,5 mL DMF: MeOH (2: 0,5 v/v) karışımında çözüldü. 0,0294 gram Grubbs 3 katalizörü 0,5 mL DCM içerisinde çözüldü ve viala tek seferde eklendi. 1 gece karıştırdıktan sonra ortama 0,5 mL %30 etil vinil eter (DCM içerisinde) eklendi, bir gece

daha karıştırıldı. Dietil eter ile çöktürüldü. 3 kez THF 3 kez dietil eter ile yıkandı. N₂ ile kurutularak saf polimer elde edildi.

5.5.2 Pridin İçeren Okzanorbornen Monomerinin ROMP ile Polimerizasyonu (P_10)

0,1 gram monomer 2,5 mL DMF: MeOH (2:0,5 v/v) karışımında çözüldü. 0,5 mL DCM içerisinde çözülmüş 0,0088 gram Grubbs 3 viale hızlıca eklendi. Ertesi gün 0,5 mL %30 etil vinil eter (DCM içerisinde) viale eklenerek bir gece karıştırıldı. Dietil eter ile çöktürüldü. 3 kez THF 3 kez dietil eter ile yıkandı. N₂ ile kurutularak saf polimer elde edildi.

5.6 DABCO ve Pridin Monomerlerinin ROMP Polimerizasyonu ile Kopolimerlerinin Sentezi

DABCO double charge monomeri ve pridin monomeri kullanılarak, 5000 g/mol hedef molekül ağırlıklı 3 farklı monomer oranına sahip random kopolimerler sentezlenmiştir. Kopolimerizasyon için gerekli olan monomer miktarları ve grubbs katalist miktarı; ayrı ayrı polimerizasyon dereceleri hesaplanarak homopolimerizasyon için kullanılan eşitlik yardımı ile bulunmuştur.

5.6.1 Kopolimer 1'in ROMP ile Polimerizasyonu (D1_P1)

1:1 oranında kopolimer sentezi için; 0,1 gram Ürün 5 ve 0,099 gram Ürün 4 viale vial içerisinde 3 mL TFE de çözüldü. 0,0353 gram Grubbs 3, 0,5 mL DCM da çözüldükten sonra tek seferde viale hızlıca eklendi. N₂ altında bir gece karıştırıldı. Ertesi gün 0,5 mL %30 etil vinil eter (DCM içerisinde) viale eklendi. Bir gece karıştırıldıktan sonra dietil eter ile çöktürüldü. 3 kez THF 3 kez dietil eter yıkandı. N₂ ile kurutularak saf polimer elde edildi.

5.6.2 Kopolimer 2'nin ROMP ile Polimerizasyonu (D1_P2)

Ağırlıkça 1:2 oranında kopolimer sentezi için; 0,049 gram Ürün 5 ve 0,1 gram Ürün 4 viale vial içerisinde 3 mL TFE de çözüldü. 0,0265 gram Grubbs 3, 0,5 mL DCM da çözüldükten sonra tek seferde viale hızlıca eklendi. N₂ altında bir gece karıştırıldı. Ertesi gün 0,5 mL %30 etil vinil eter (DCM içerisinde) viale eklendi. Bir gece karıştırıldıktan sonra dietil eter

ile çöktürüldü. 3 kez THF 3 kez dietil eter yıkandı. N₂ ile kurutularak saf polimer elde edildi.

5.6.3 Kopolimer 3'ün ROMP ile Polimerizasyonu (D2_P1)

2:1 oranında kopolimer sentezi için; 0,1 gram Ürün 5 ve 0,049 gram Ürün 4 vial vial içerisinde 3 mL TFE de çözüldü. 0,0265 gram Grubbs 3, 0,5 mL DCM da çözüldükten sonra tek seferde vial hızlıca eklendi. N₂ altında bir gece karıştırıldı. Ertesi gün 0,5 mL %30 etil vinil eter (DCM içerisinde) vial eklendi. Bir gece karıştırıldıktan sonra dietil eter ile çöktürüldü. 3 kez THF 3 kez dietil eter yıkandı. N₂ ile kurutularak saf polimer elde edildi.

5.7 Polimerlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Sıvı ve Katı Fazda İncelenmesi

5.7.1 MIC Değerlerinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal polimerlerin MIC değerleri, antimikrobiyal duyarlılık testleri için referans olan dilüsyon yöntemleri kullanılarak belirlenmektedir. Bu testlerde, antimikrobiyal polimeri içeren mikropak kuyucuklarında veya agar yüzeyinde oluşan gözle görülebilir üremeden yararlanılır. Analiz edilen mikroorganizma için gözle görülebilen üremenin olmadığı minimum antimikrobiyal ajan konsantrasyonu 'Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MIC)' olarak belirlenir [79].

Her polimer 2 mg/mL olacak şekilde uygun çözücüde çözüldü. 37°C de besiyeri içerisinde bir gece üremiş mikroorganizmalardan 0.5 McFarland (1×10^8 CFU/mL) süspansiyonlar hazırlandı ve 1: 200 oranında seyreltildi (5×10^5 CFU/ mL). 0,1 mL sıvı besiyeri (LB broth) ve 0,01 mL bakteri süspansiyonu 96 kuyucuklu platelere eklendi. Kuyucuklardan birine sadece besiyeri koyularak negatif kontrol belirlendi. 10 adet kuyucuğa ise sırayla ½ oranında MIC analizi yapılan maddenin seri dilüsyonları yapıldı. Geri kalan tüpe ise sadece mikroorganizma konularak pozitif kontrol belirlendi. Plate vorteksledikten sonra 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün üreme olmayan, bulanıklık görülmeyen konsantrasyon belirlenerek minimum inhibitör konsantrasyonu saptandı.

5.7.2 Katı Yüzeyde Antimikrobiyal Etkinlik

Polimer kaplanmış yüzeyin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için airborne testi uygulandı. Doymuş bir *E.coli* süspansiyonu oda sıcaklığında, 4000 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Hücreler saf su ile süspansiyon edilerek 10⁶ CFU/ mL'lik konsantrasyon elde edildi. 10⁶ CFU/mL konsantrasyondaki *E.Coli* süspansiyonu, test yapılan cam yüzeylerin üzerine püskürtüldü. Püskürtülen yüzeyler steril polistiren petri kaplarına (VWR 100 mm × 15 mm) yerleştirildi. Petrilerin içerisine besin agarı koyularak katılaşmaya bırakıldı. 37°C'de bir gece yüzeyler inkübe edildi ve ertesi gün yüzeydeki koloniler sayıldı. Kontrol amaçlı kullanılan, polimer kaplanmamış bir cam yüzeyden yararlanarak denklem 5.1' e göre sonuçlar ifade edildi.

$$\text{Etkinlik Değeri} = \frac{\text{kontrol üzerindeki koloni sayısı} - \text{test yüzeydeki koloni sayısı}}{\text{kontrol koloni sayısı}} \quad (5.1)$$

Disk difüzyon çalışması için; bakteri solüsyonu (10⁶ CFU/mL) 100 µL nutrient agar dökülmüş petri kabına yerleştirildi. 37°C' de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün bakteri kolonileri ve zone inhibasyonu incelendi.

5.8 Sitotoksosite Çalışmaları

5.8.1 Hemolitik Konsantrasyon (HC₅₀) Tayini

Hemolitik konsantrasyon antimikrobiyal polimerin toksisite değerini gösterir. Donörlerden alınmış taze kırmızı kan hücrelerine (HRBC, 30 µL), 10 mL TRIS saline (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.2, 0,22 µm por çapına sahip polietersülfon membran ile süzölmüştür) eklendi. TRIS salin ile 3 kez 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Konsantrasyonu 8 mg/mL olacak şekilde TRIS salinde (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.2) polimerler hazırlandı. Polimerlerin çözünürlüklerine göre pH 6.5- 7 arasına ayarlandı ve polietersülfon membranlarından (por çapı 0,45 µm) süzöldü. Hazırlanmış olan HRBC süspansiyonundan 100 µL alındı. Farklı konsantrasyonlardaki polimer çözeltileri 96 kuyucuklu mikropaklarda HRBC süspansiyonuna son hacim 200 µL olacak şekilde eklendi. 37°C'de 30 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra plaka 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Kuyucuklardaki süpernatantlar yeni plakaya alındı. Hemoliz sonuçları

serbest hemoglobinin 414 nm'de absorpsansı ölçülerek incelendi. %100 hemoliz elde etmek için kuvvetli bir yüzey aktif madde olan TRITON-X (% 20 DMSO (v/v) içerisinde) 10 µL yukarıda hazırlanmış olan HRBC süspansiyonlarına eklendi.

Polimer içermeyen TRIS salin çözeltisinden gelen absorpsans %0 hemoliz olarak kabul edilir. %50 hemolize neden olan polimer konsantrasyonunun bir üst limiti prosedüre göre, HC₅₀ olarak belirlenir.

5.9 Katyonik Yük Yoğunluğu Tayini

5.9.1 Polimerlerin Cam Yüzeylere Kaplanması

Katyonik yük tayini için 2 mg/ mL konsantrasyondaki polimer çözeltileri cam yüzeylere kaplanmıştır. 2,5 cm × 2,5 cm boyutlarındaki mikroskop lamelleri kaplama işlemi için kullanılmıştır. Cam yüzeyler Piranha çözeltisi (%30 H₂O₂, %70 H₂SO₄) içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra su ve izopropil alkol ile yıkanarak temizlenmiştir. Yıkama işleminden sonra 40°C' de vakum etüvünde kurutulmuştur [80]. DMSO ve TFE kullanılarak, 2 mg/ mL konsantrasyonda hazırlanmış olan polimer çözeltileri cam yüzeylere eşit damla sayısı ile damlatıldıktan sonra 30 saniye 2000 rpm'de (1000 devir/ s hızlanma) spin kaplama tekniği ile kaplandı. Kaplanan lameller 1 saat boyunca vakum etüvünde kurutuldu.

5.9.2 Sodyum Floresein Metodu

Yüzeydeki katyonik yük yoğunluğunun belirlenmesinde Tiller ve arkadaşları tarafından rapor edildiği gibi floresan kompleksleşmesi ve UV-VIS spektrofotometresine dayanan yöntem kullanıldı [81,82].

Analiz için polimerler yukarıda anlatılan yöntem ve konsantrasyon ile cam yüzeylere kaplandı. Polimer kaplanmamış cam yüzeyler referans olarak kullanıldı. Camlar (2,5 cm × 2,5 cm) destile suda hazırlanmış %1 floresein tuzunda 10 dakika bekletildi. Bu işlem sonucunda floresan işaretleyiciler sahip oldukları negatif yükler ile polimerin katyonik bölgelerine kuvvetlice bağlandı. Reaksiyona girmeyen moleküller, 10 dakika bekletme sonunda bol distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra camlara distile su ile hazırlanmış 4 mL %0.5'lik heksadesiltrimetilamonyum klorür CH₃(CH₂)₁₅N⁺Cl⁻(CH₃)₃ çözeltisi içerisinde 30 dakika sonikasyon uygulanmıştır. Floresein moleküllerinin

çözeltiye geçmesi sağlandıktan sonra içerisine 0,6 mL doymuş NaHCO₃ (pH= 8.3) eklendi. Her çözeltinin floresan şiddeti 450 nm'de ölçüldü. Floresein sodyum tuzunun farklı konsantrasyonları için spektrum alınarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu işlem ile polimer kaplı cam yüzeylerde kantitatif katyonik yük tayini yapıldı.

5.10 Biyofiziksel Çalışma

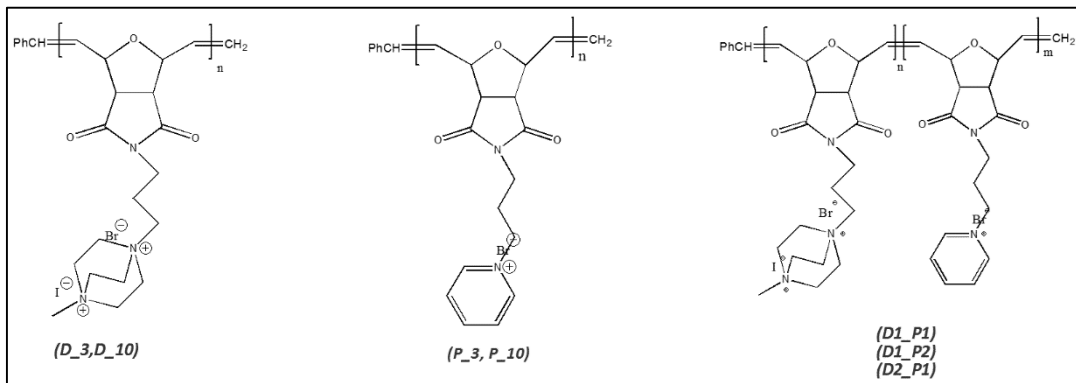
5.10.1 Bakteri ve Polimer Etkileşmesinin Zeta Potansiyel ile Ölçülmesi

Zeta çalışması için *S. aureus'* a yüksek aktivite gösteren DABCO esaslı polimer (D_10) ve düşük aktivite gösteren Pridin esaslı (P_3) polimer seçilmiştir. 900 µL Polimerlerin 2 mg/mL konsantrasyonundan 100 µL alındı ve üzerlerine 900 µL' şer *S.aureus* eklenerek zeta potansiyelleri ölçüldü.

DENEYSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kontrollü bir polimerizasyon metodu ROMP; istenilen molekül ağırlığı ve eşit zincir uzunluklarına sahip polimerlerin elde edilmesini sağlar. ROMP mekanizmasına yüksek hız ve verimde cevap veren norbornen halkalarını içeren polinorbornen türevi antimikrobiyal polimerlerdir.

Çalışmamız kapsamında Şekil 6.1’de gösterilen DABCO ve pridin esaslı katyonik ROMP polimerleri sentezlenmiştir. Bu polimerlerin antimikrobiyel etkinleri ve hemolitik özellikleri incelenmiştir.

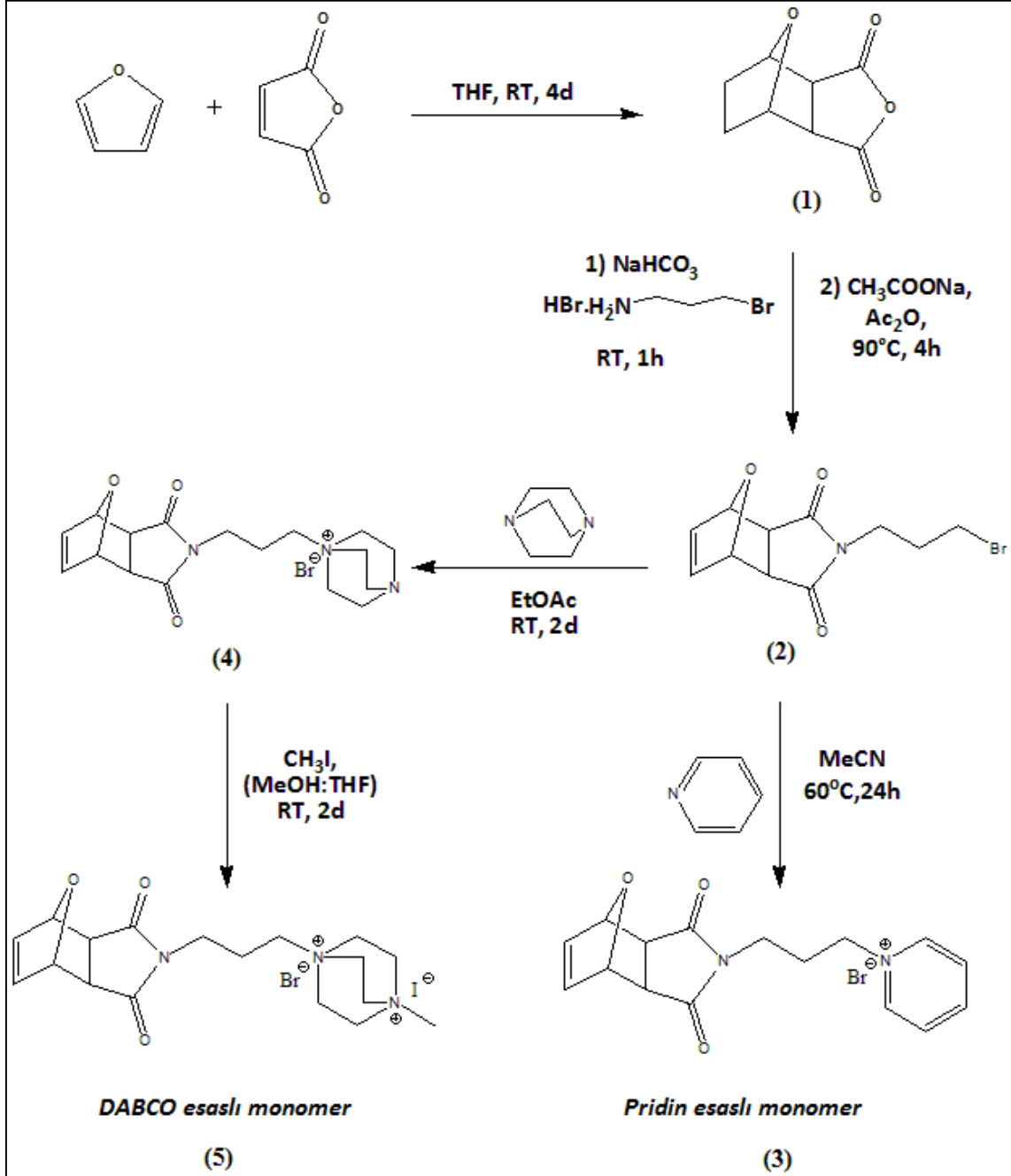


Şekil 6. 1 Çalışma kapsamında sentezlenen homopolimerlerin ve kopolimerlerin yapısı

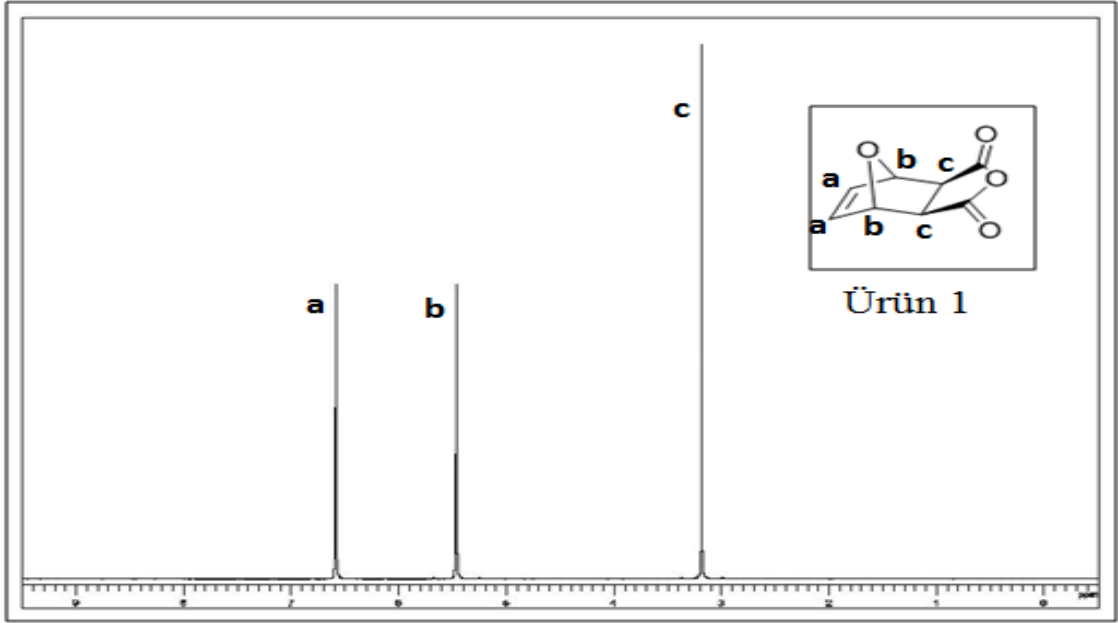
6.1 Monomerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Polimerlerin sentezinde kullanılan monomerlerin sentez basamakları Şekil 6.2’de gösterilmiştir. Monomerlerin eldesi için ilk basamak; furan ve maleik anhidritin Diels-Alder reaksiyonu ile elde edilen 4,10-Dioxa-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}] dec-8-ene-3,5-dione

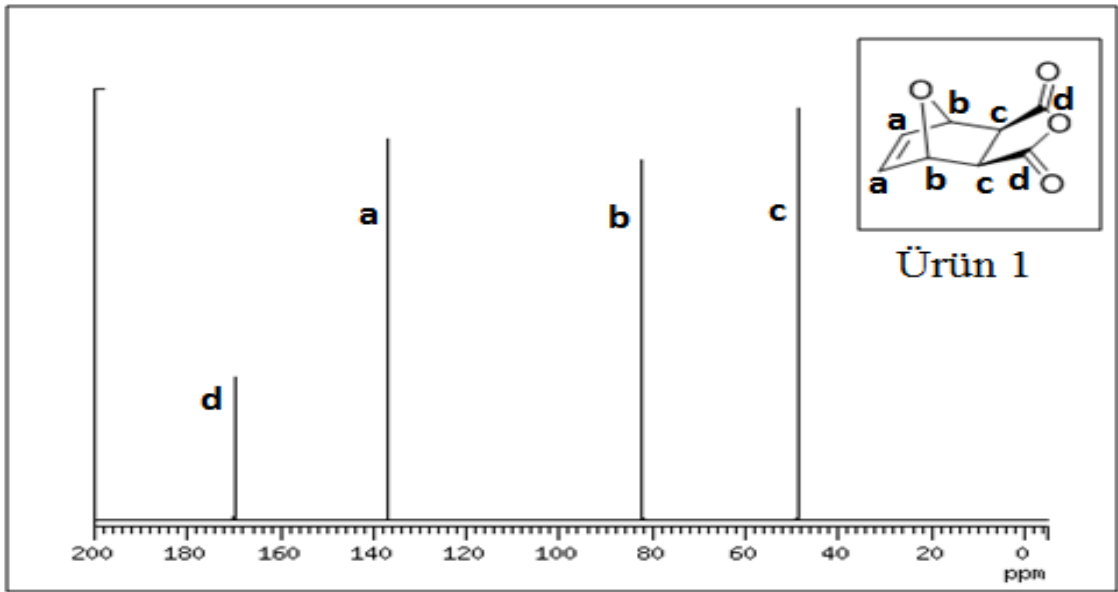
(Ürün 1) sentezidir. Elde edilen ürünün % 100 ekzo yapıda olduğu ^1H NMR ve ^{13}C NMR çalışmaları ile belirlenmiştir. ^1H NMR için karakteristik olan okzonorboren halkasının çift bağ protonları 6.5 ppm civarında, ^{13}C NMR'ında ise çift bağ karbon pikleri 137 ppm de görülmektedir (Şekil 6.3, Şekil 6.4).



Şekil 6. 2 Çalışma kapsamında sentezlenen monomerlerin sentetik şeması



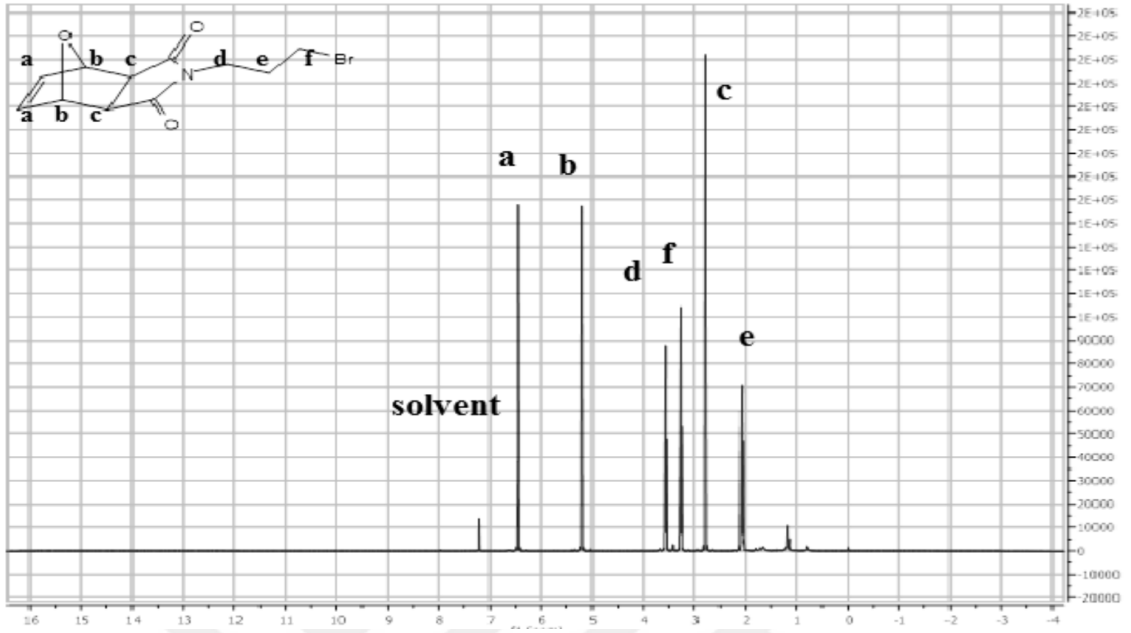
Şekil 6. 3 Ürün 1 ¹H- NMR Spektrumu



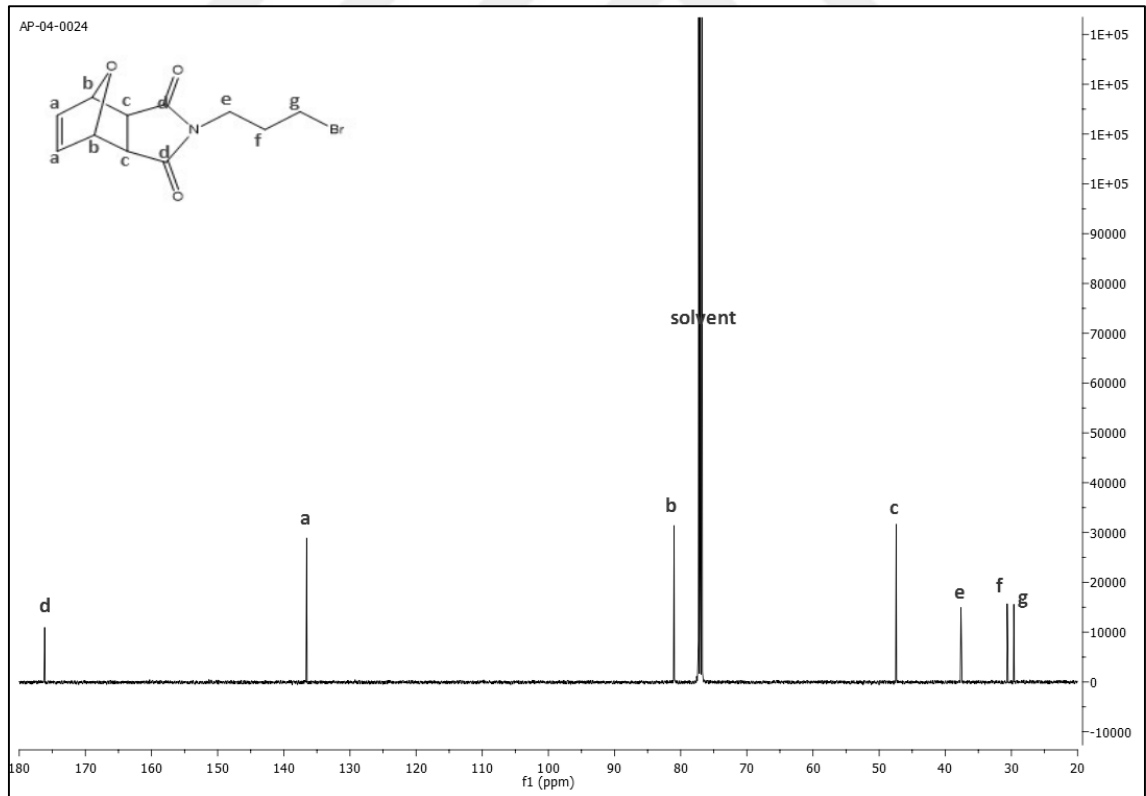
Şekil 6. 4 Ürün 2 ¹³C- NMR Spektrumu

Ürün 2 imid mekanizması ile elde edilmiştir. Ürün 1 ile 3-bromo propilamin hidrojen bromürün sodyum asetat katalistliğinde gerçekleştirdiği reaksiyon sonucu Ürün 2 elde edilmiştir. Safaştırma işlemi için kolon kromatografisi kullanılmıştır. Etil asetat: hegzan (1:1 v/v) hareketli fazı ile gerçekleştirilen saflaştırma işlemi sonucunda % 46 verim ile beyaz katı haldeki saf ürün elde edilmiştir. ¹H ve ¹³C NMR ile ürün karakterize edilmiştir. Ürün 2 için karakteristik olan N-CH₂ protonu 3.5 ppm civarında, CH₂-Br protonu ise 3.2

ppm de görülmüştür (Şekil 6.5). N-CH₂ grubunun C piki ise 137 ppm civarında görülmektedir (Şekil 6.6).



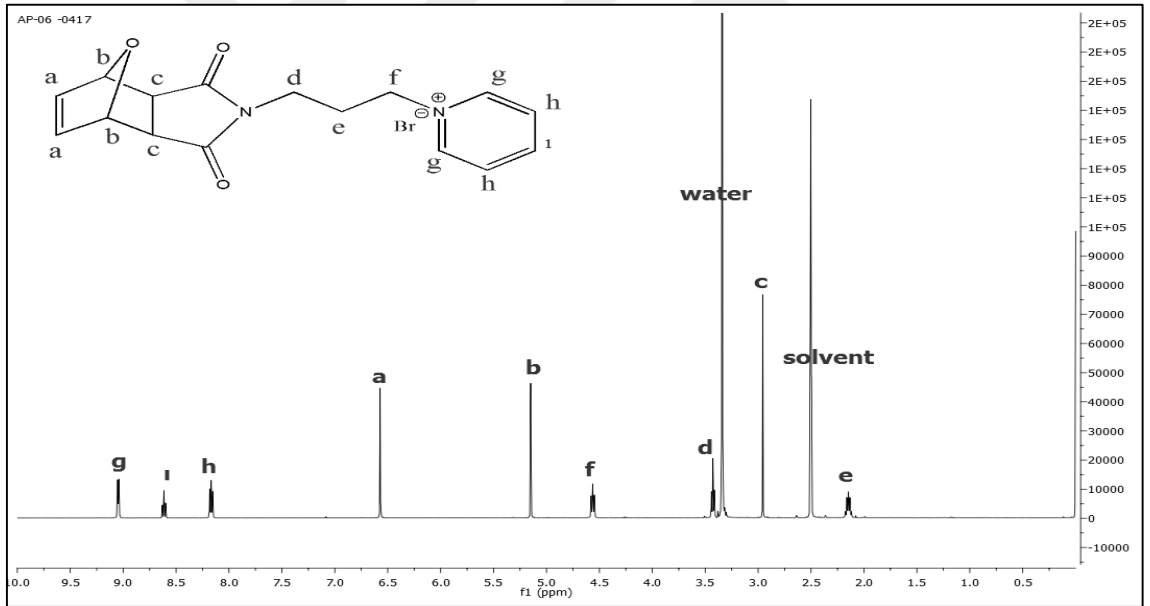
Şekil 6. 5 Ürün 2 ¹H NMR Spektrumu



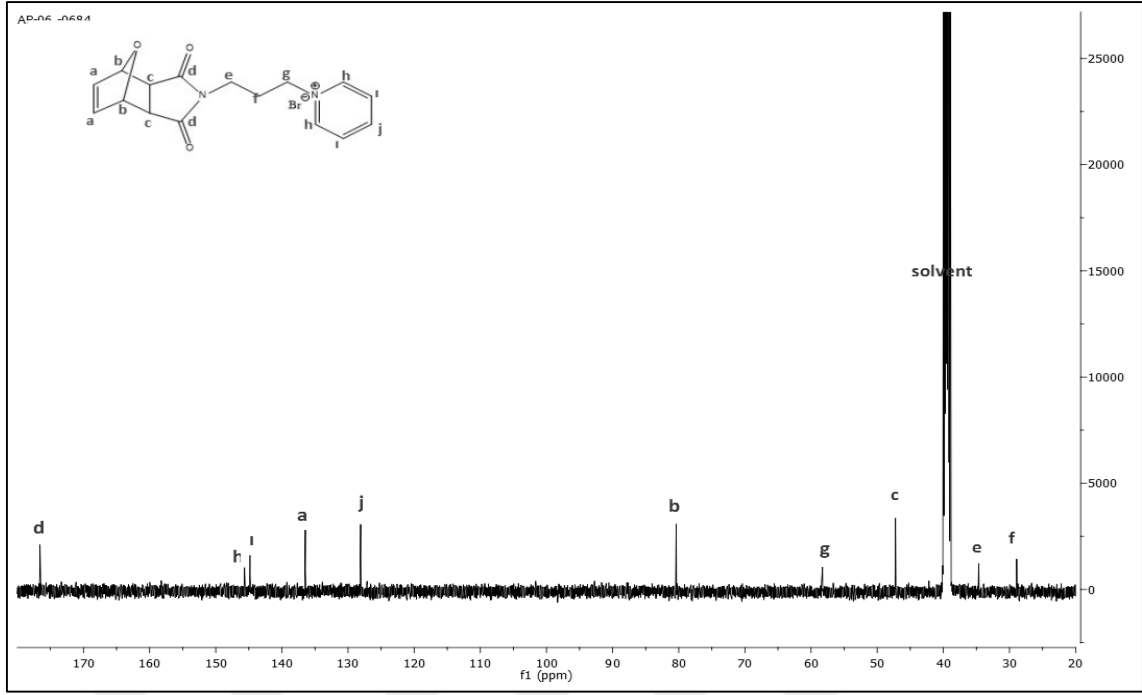
Şekil 6. 6 Ürün 2 ¹³C NMR Spektrumu

6.1.1 Pridin Esaslı Monomerin Sentezi

Çalışmalarda kullanılmak üzere sentezlenen diğer monomer; 4-(3bromopropil)-10-okza-4-azatrisiklo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (Ürün 2) ile pridinin S_N2 mekanizması ile elde edilmiştir. Asetonitrilde çözülen Ürün 2'nin üzerine pridin damla damla eklenmiştir. Azot ortamında bir gün boyunca 60°C de reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürün; 4 kez THF ile yıkandıktan sonra vakum altında kurutulmuştur. Saf, katı, açık pembe ürün %85 verim ile elde edilmiştir. Pridin monomerinin ¹H NMR ve ¹³C NMR'ları Şekil 6.7 ve Şekil 6.8' de gösterilmiştir. Pridin halkasının yapıya bağlanması ile Ürün 2' nin ¹H NMR' ında görülen CH₂-Br protonuna ait pik 3.33 ppm' de gelirken CH₂-N piki 4.56 ppm civarındadır. Ayrıca pridin halkasına ait protonlar 8.0- 9.5 ppm aralığında görülmüştür. C- NMR' da ise pridin grubuna ait pikler 125- 150 ppm arasında görülmüştür.



Şekil 6. 7 Ürün 3 ¹H NMR Spektrumu



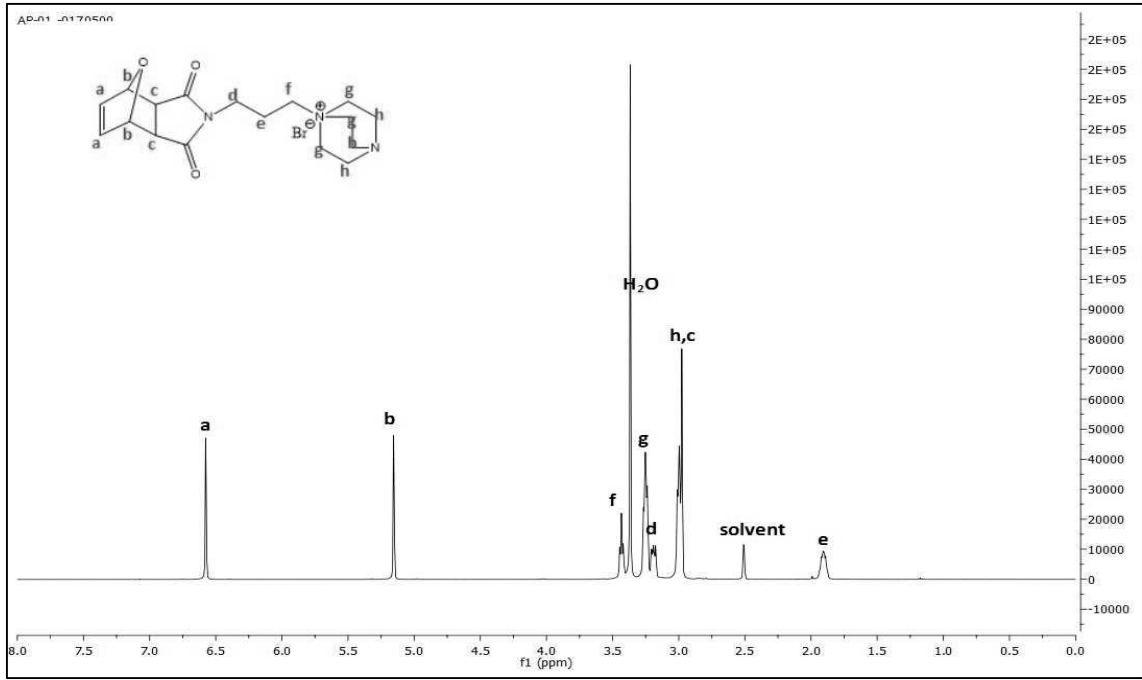
Şekil 6. 8 Ürün 3 ^{13}C NMR Spektrumu

6.1.2 DABCO Esaslı Monomerin Sentezi

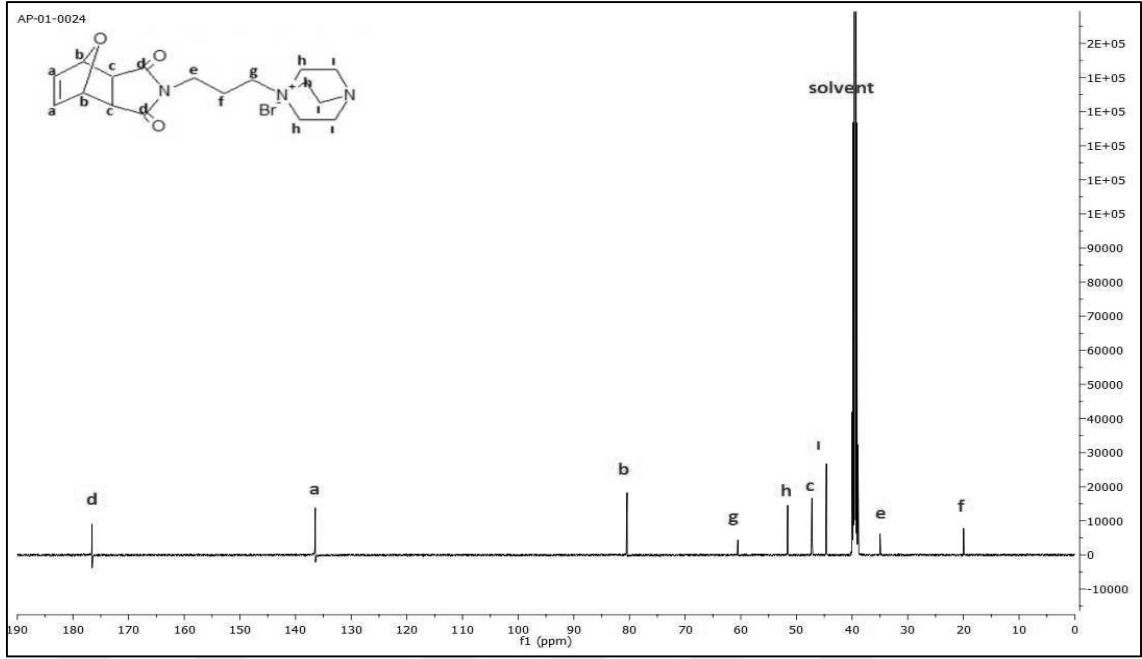
DABCO esaslı monomerin sentezi iki aşamalıdır. 4-(3bromopropil)-10-okza-4-azatrisiklo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (Ürün 2) ile 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octane (DABCO)'nun $\text{S}_{\text{N}}2$ mekanizması üzerinden gerçekleştirdiği reaksiyon sonucunda ilk pozitif yükü taşıyan ürün (Ürün 4) elde edilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında iki günde gerçekleşmiştir ve ilk basamak ürünü etil asetatta çökelti oluşturmuştur. Ürün etil asetat ve dietil eter ile yıkama yapıldıktan sonra NMR teknikleri ile karakterize edilmiştir. Higroskopik özellikteki Ürün 3 desikatörde saklanmıştır. Yapısal analiz, ^1H NMR ve ^{13}C NMR ile yapılmıştır. ^1H NMR' a bakıldığında; Ürün 2' nin 3.33 ppm' de görülen karakteristik piki $\text{CH}_2\text{-Br}$ kaybolmuş ve $\text{CH}_2\text{-N}$ piki 3.44 ppm' de görülmüştür. Ayrıca DABCO' ya ait pikler ise 3.0- 3.26 ppm' de görülmüştür. ^{13}C NMR' a bakıldığında ise DABCO tek tip protona sahiptir ve bu protonlar 47 ppm civarında gelmektedir. Ürün 3' te ise DABCO' ya ait iki farklı karbon piki vardır ve bunlar 44.6 ile 60.5 ppm' de görülmektedirler (Şekil 6.9, Şekil 6.10).

İkinci pozitif yükü sağlayan basamak; Ürün 3 ile metil iyodatın $\text{S}_{\text{N}}2$ reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında iki gün süren reaksiyon için çözücü olarak (10:3 v/v) MeOH: THF karışımı kullanılmıştır. İki gün sonunda reaksiyon ortamında beyaz (bazen

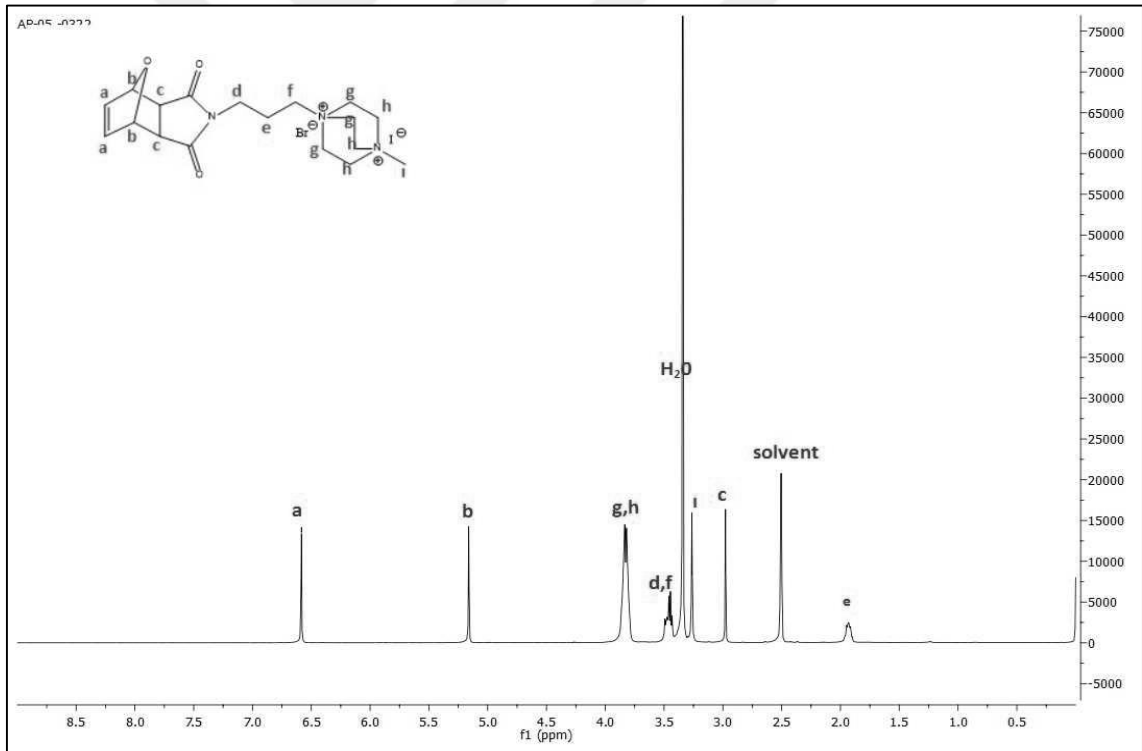
sarımsı) çöktelti oluşmuştur. Saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra yapısal analiz NMR teknikleri ile yapılmıştır. Yapısal analiz; ^1H NMR ve ^{13}C NMR ile yapılmıştır (Şekil 6.11, Şekil 6.12). İkinci pozitif yükü sağlayan metil grubuna ait protonun ^1H NMR' da yerini belirleyebilmek için DABCO ve metil iyodat kullanılarak model bir bileşik sentezlenmiştir ve 3.26 ppm' de N-CH₃ piki görülmüştür. ^{13}C NMR' da ise 50.42 ppm' de N-CH₃ gruba ait karbon piki görülmektedir.



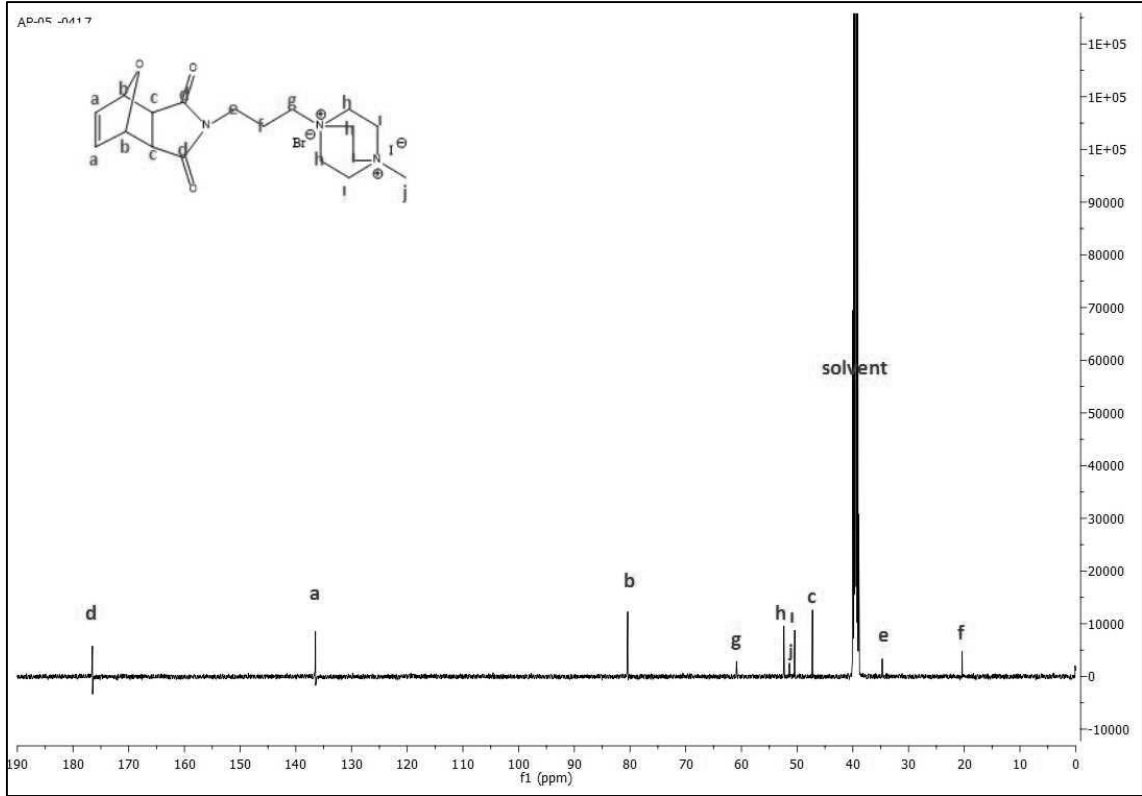
Şekil 6. 9 ^1H -NMR Spektrumu



Şekil 6. 10 Ürün 4 ¹³C-NMR Spektrumu



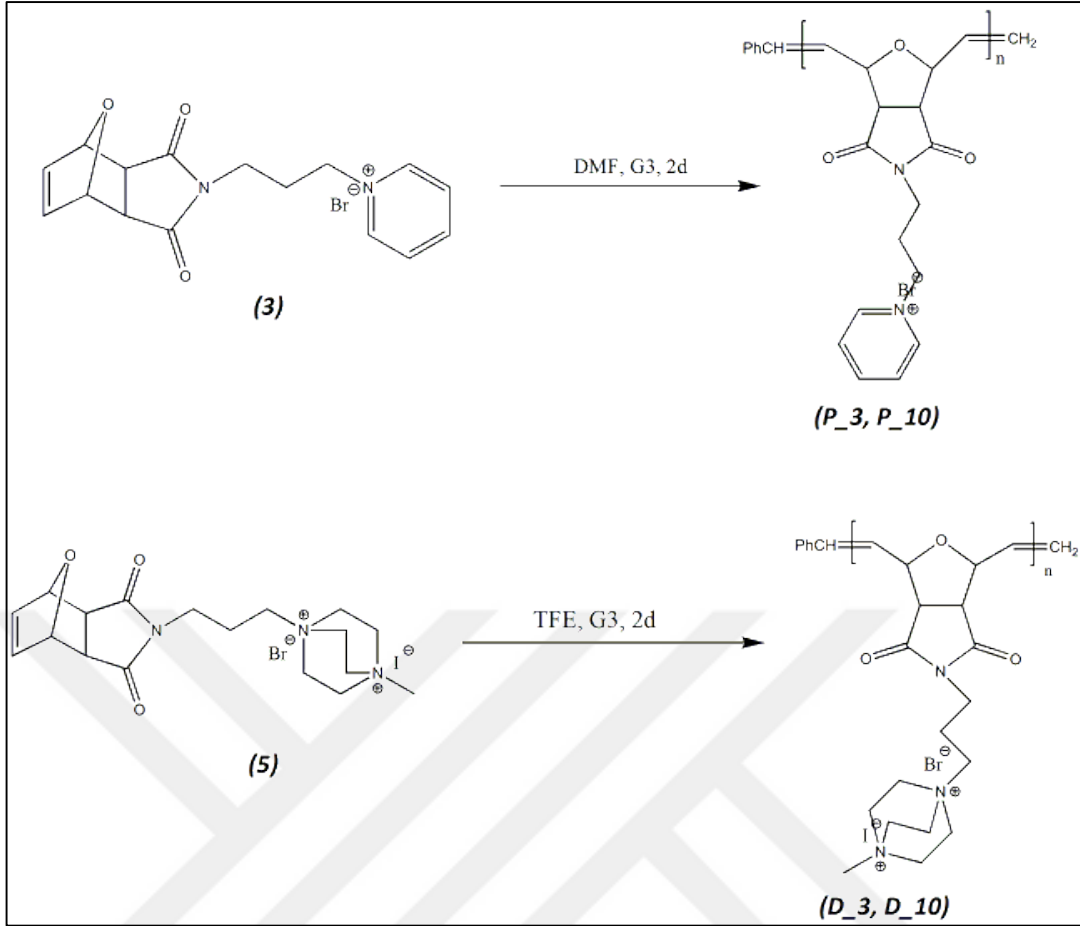
Şekil 6. 11 Ürün 5 ¹H NMR Spektrumu



Şekil 6. 12 Ürün 5 ^{13}C NMR Spektrumu

6.2 Homopolimer Sentezi

Farklı basamaklar ile sentezlenmiş olan okzonorbornen halkasına sahip monomerlerin polimerleşmesi için halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) etkili bir yöntemdir. ROMP polimerizasyonunda gerçekleşen olefin metatezi için etkili olan Grubbs katalistlerinin; hava, su ve fonksiyonel gruplara karşı tolerans göstermesi verimi arttırmaktadır. Halka açılma polimerizasyonunda kullanılan Grubbs katalistlerin başında; 2nd Grubbs ve 3rd jenerasyon Grubbs katalistleri gelmektedir. Çalışma kapsamında sentezlenen iki farklı homopolimerin sentez basamakları Şekil 6.13' te görülmektedir. Monomer çözünürlüğüne ve çözücünün polimerleşme üzerindeki etkisine göre monomer; dimetilformamid (DMF) veya trifloroetanol (TFE) ile çözüldükten sonra polimerleşme Grubbs 3 katalizörü ile yapılmıştır.



Şekil 6. 13 Çalışma kapsamında sentezlenen homopolimerlerin sentetik şeması

ROMP polimerizasyonunda kullanılacak katalist miktarı istenilen molekül ağırlığını elde etmek için önemlidir. Çalışma kapsamında iki farklı monomerin, 3000 g.mol^{-1} ve $10.000 \text{ g.mol}^{-1}$ olmak üzere iki farklı moleküler ağırlıktaki homopolimerleri sentezlenmiştir. Katalist miktarını belirlemek için kullanılan formül Denklem 6.1 ve 6.2 'de gösterilmiştir.

$$\text{Polimerizasyon Derecesi (PD)} = \frac{\text{Polimerin Molekül Ağırlığı } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{\text{Monomerin Molekül Ağırlığı } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} \quad (6.1)$$

$$\text{Polimerizasyon Derecesi} = \frac{[\text{monomer}]}{[\text{katalist}]} \quad (6.2)$$

Katalist miktarını belirlemek için ilk basamak polimerizasyon derecesini hesaplamaktır. Polimerizasyon derecesi; hedeflenen molekül ağırlığının monomerin molekül ağırlığına bölünmesi ile bulunur. Aynı zamanda polimerizasyon derecesi; monomerin mol

değerinin katalistin mol değerine oranına da eşittir. Bu eşitlikten yararlanarak elde edilen katalizör mol miktarının; katalizör molekül ağırlığı ile çarpılması sonucu gerekli Grubbs katalist gram cinsinden elde edilmektedir. İki farklı monomerden sentez için 0,1 gram kullanılmıştır. Aşağıda DABCO 3000 g/mol (D_3) polimeri için katalizör miktarı hesaplanmıştır. Tüm polimerler için gerekli katalizör miktarı benzer şekilde hesaplanmıştır.

DABCO 3000 g.mol⁻¹

$$[monomer]= \frac{0.1}{539.94}$$

$$[monomer]= 0.0001852 \text{ mol}$$

$$DP= \frac{3000}{539.94}$$

$$DP= 5.55$$

$$5.55= \frac{0.0001852}{[katalizör]}$$

$$[katalizör]= 0.000033 \text{ mol} \times 884.48 \text{ g.mol}^{-1}$$

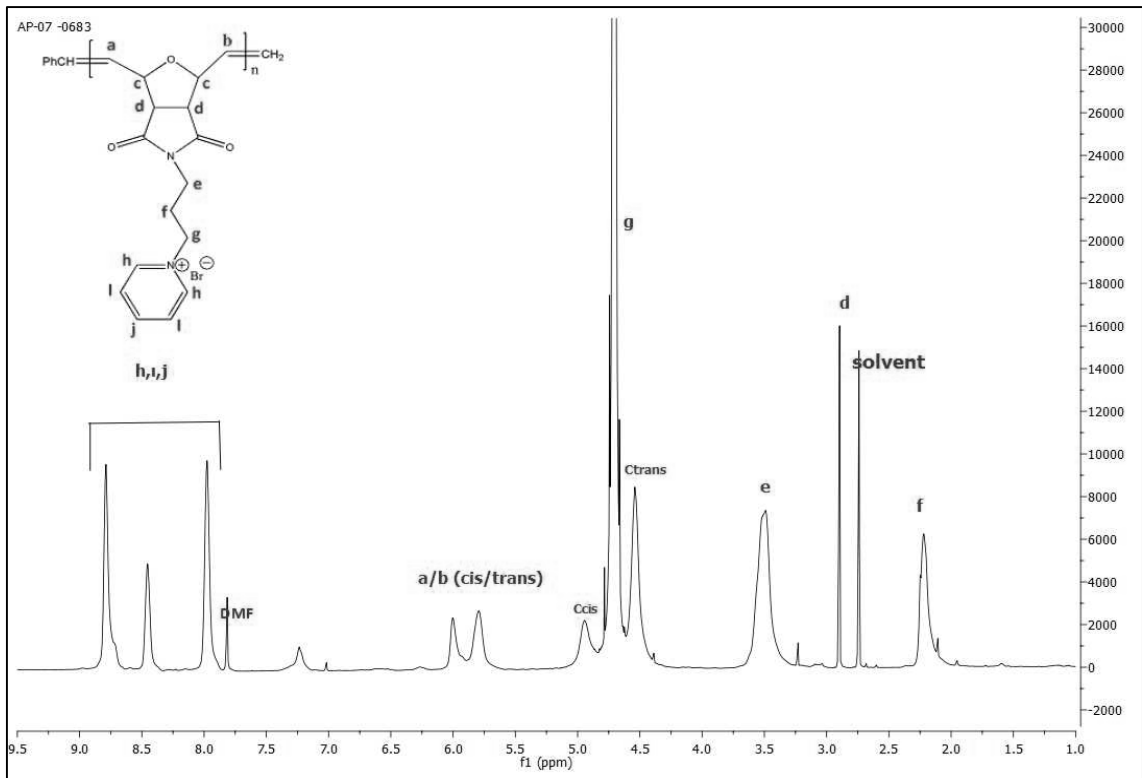
$$(katalizör)= 0.0295 \text{ g}$$

$$Grubbs 3= 884,48 \text{ g.mol}^{-1}$$

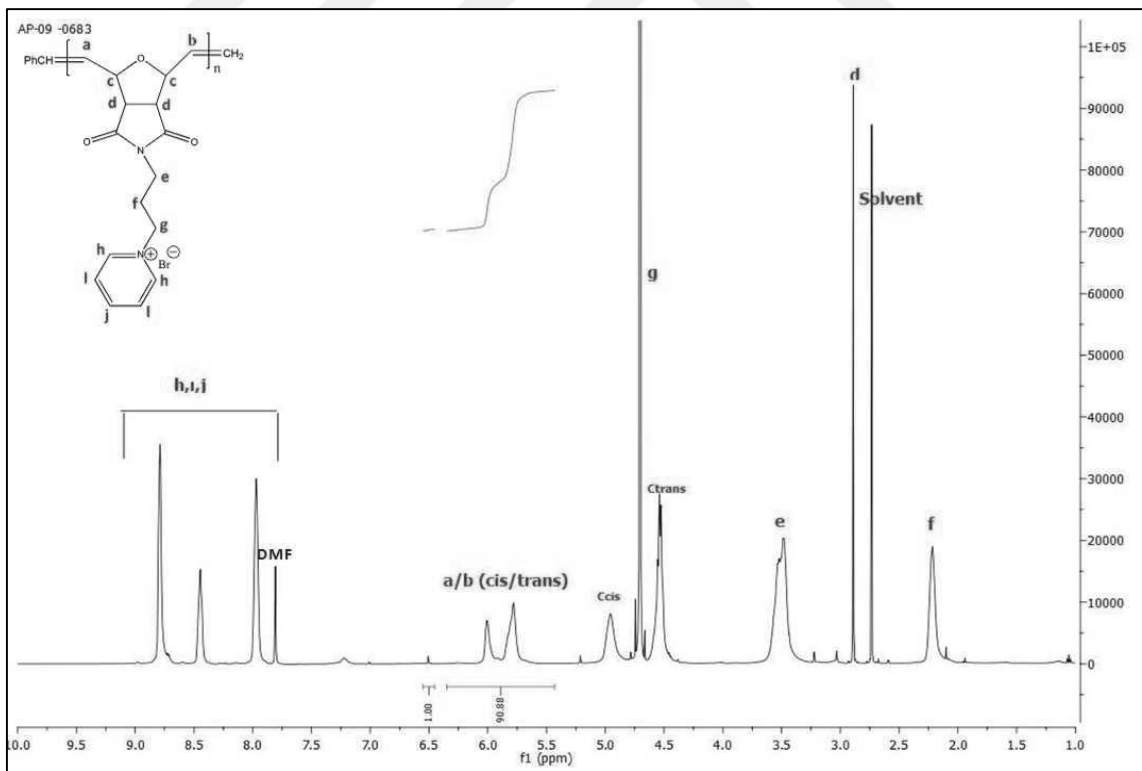
$$DABCO Monomeri= 539,94 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$Pridin Monomeri= 365,1 \text{ g.mol}^{-1}$$

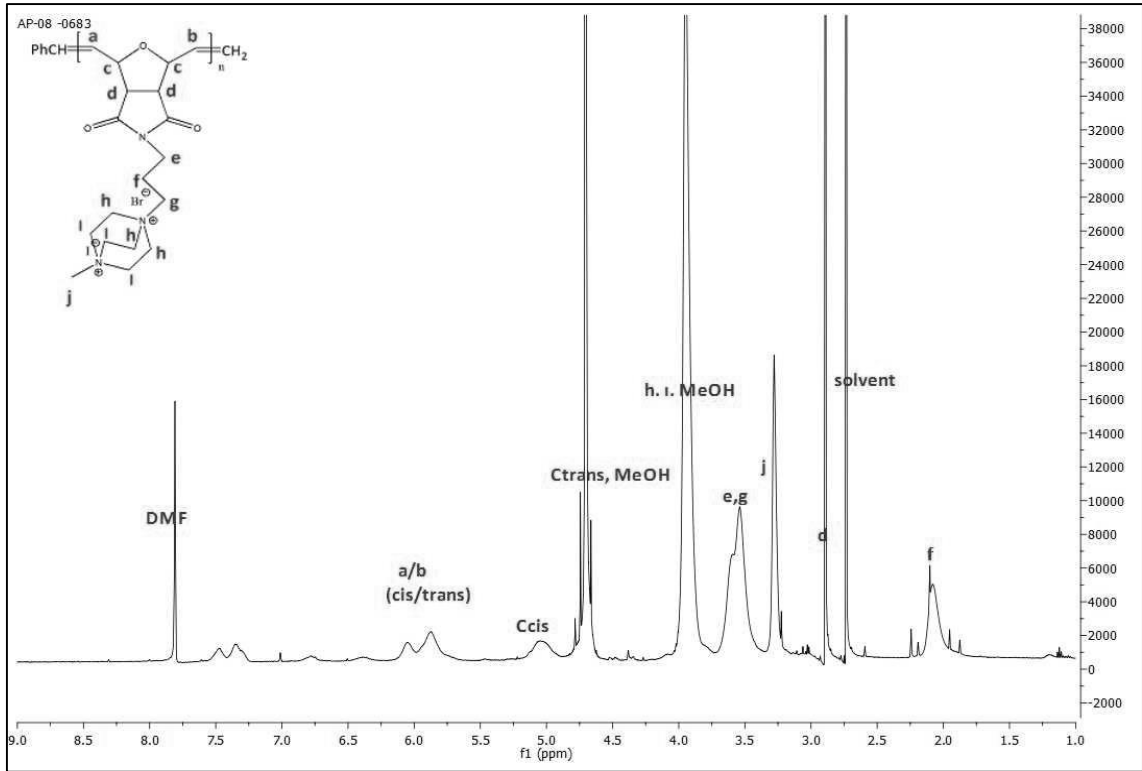
Polimerler Grubbs katalist miktarları hesaplanarak sentezlenmiştir. Polimerizasyon sonucu elde edilen ürünler ¹H NMR ile karakterize edilmiştir. Halka açılma polimerizasyonu sonucu; monomerde bulunan norbornen halkasının 6.5 ppm'de gelen çift bağ protonlarına ait pik kaybolmuş ve polimer oluşturan bölgenin protonları (cis/trans) 6 ppm civarında görülmüştür. Halka açılma polimerizasyonu sonrasında cis protonları yaklaşık olarak 5.6 ppm de (C_{cis}), trans protonları ise 6 ppm civarında gelmektedir (C_{trans}). Polimerlerdeki cis ve trans protonlarının integrasyonları alındığında cis/trans oranı %58/42 olarak bulunmuştur. Homopolimerlere ait ¹H NMR spektrumları Şekil 6.14, Şekil 6.15, Şekil 6.16, Şekil 6.17' de gösterilmiştir.



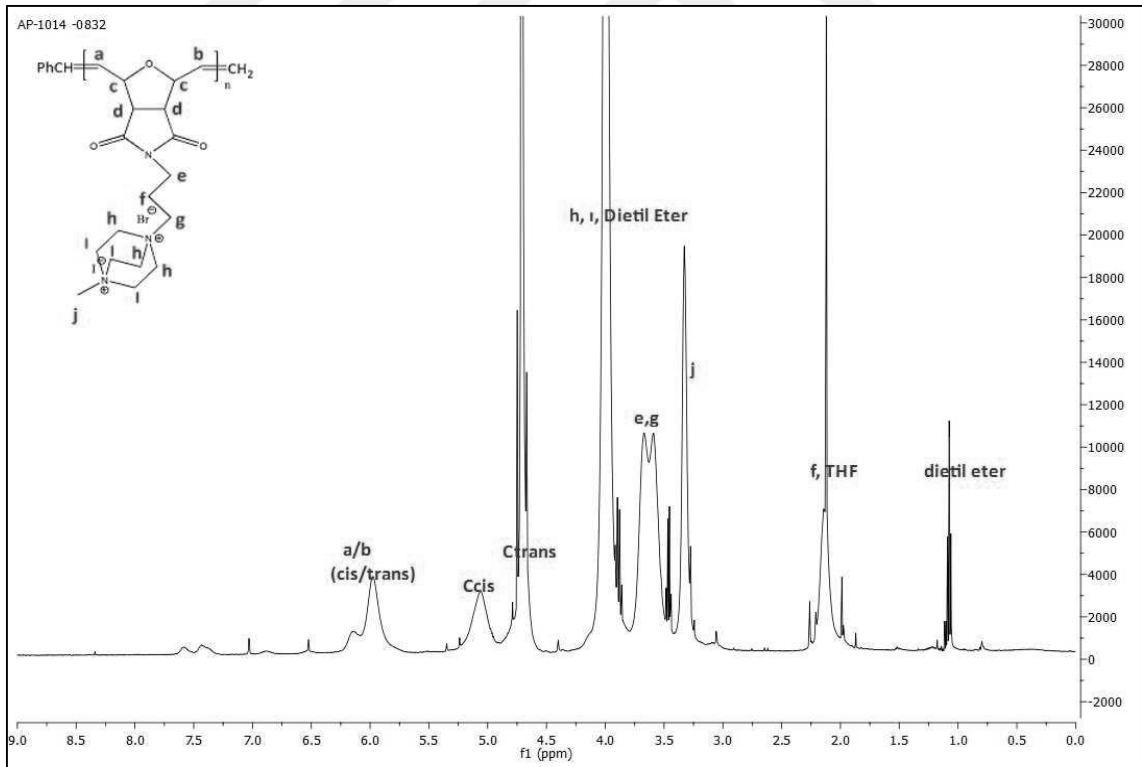
Şekil 6. 14 P_3 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu



Şekil 6. 15 P_10 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu



Şekil 6. 16 D_3 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu

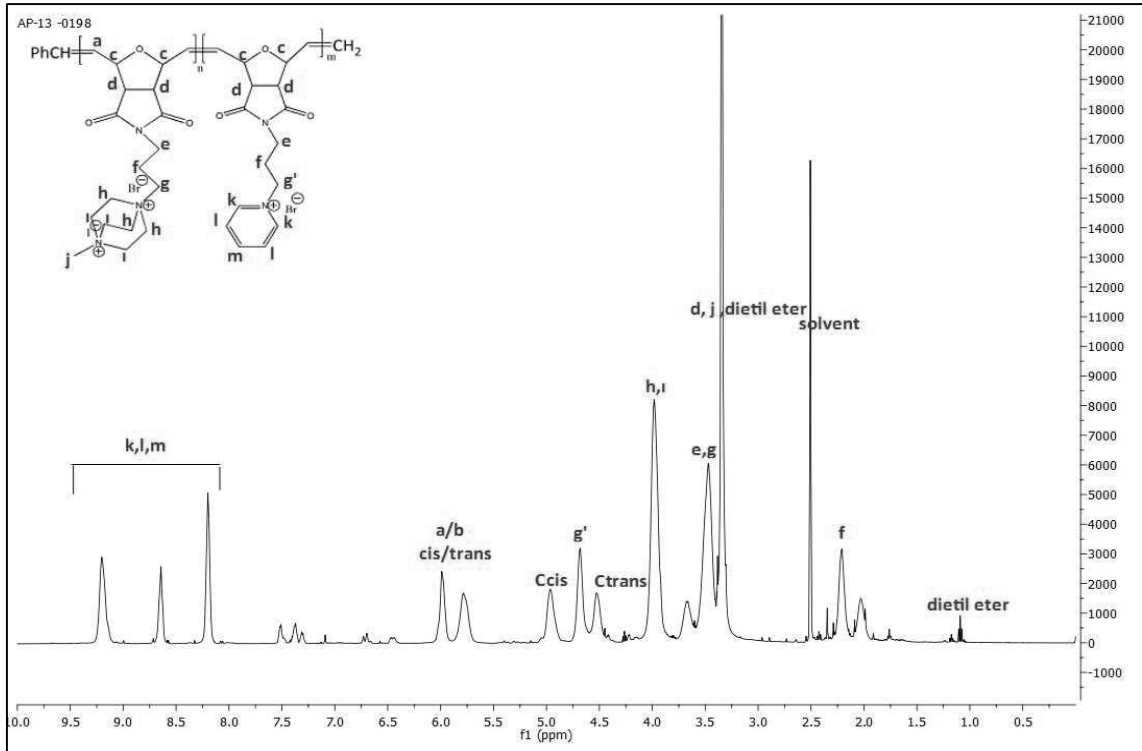


Şekil 6. 17 D_10 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu

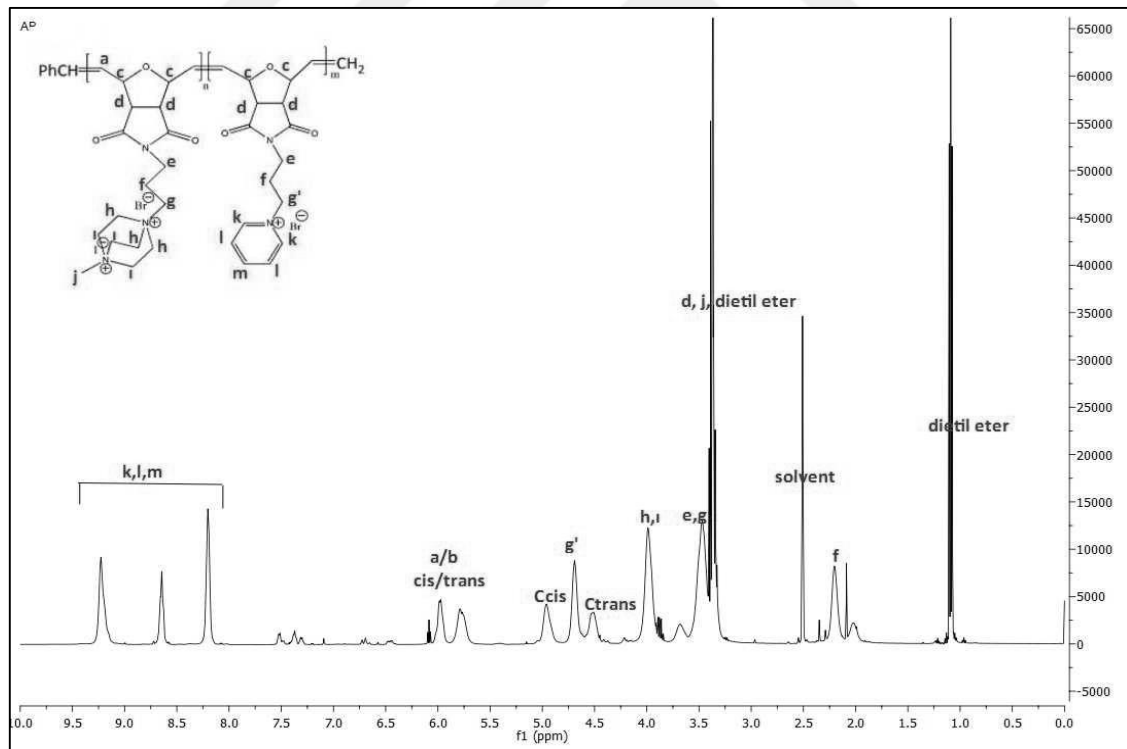
6.3 Kopolimer Sentezi

Çalışma kapsamında sentezlenen iki monomer (Ürün 3 ve Ürün 5) farklı oranlarda kullanılarak 5000 g/mol hedef moleküler ağırlıklı kopolimerler sentezlenmiştir. Ağırlıkça 1:1, 1:2, 2:1 oranlarında sentezlenen kopolimerlerin Grubbs 3rd jenerasyon katalist miktarları yukarıdaki eşitlikten yararlanarak ayrı ayrı hesaplanmıştır. Polimerizasyonlarda çözücü olarak TFE, polimerizasyonu sonlandırmak için ise EVE (%30 DCM içerisinde) kullanılmıştır.

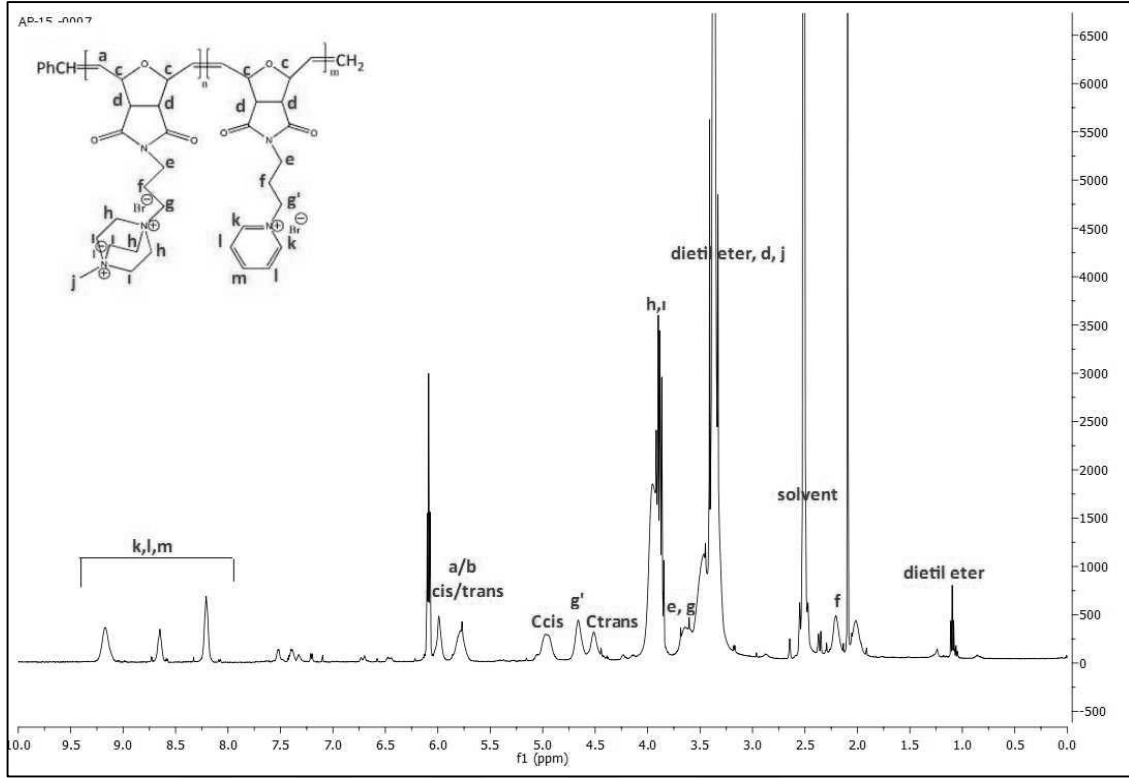
Kopolimerler ^1H NMR ile karakterize edilmiştir. Halka açılma polimerizasyonu sonucu; norbornen halkasının 6.5 ppmde ki çift bağ protonları kaybolmuş ve polimerleşme bölgesinin protonları (cis/trans) 6 ppm civarında görülmüştür. Halka açılma polimerizasyonu sonrasında cis protonları yaklaşık olarak 5.6 ppm de (C_{cis}), trans protonları ise 6 ppm civarında gelmektedir (C_{trans}). Kopolimerlere ait ^1H NMR spektrumları Şekil 6.18, Şekil 6.19, Şekil 6.20' de gösterilmiştir. Teorik katılma oranları: 1:1, 1:2, 2:1 olana kopolimerlerin deneysel katılma oranları karakteristik NMR piklerinin integrasyonu ile hesaplanmıştır. Örneğin pridin esaslı monomerin 8- 9 ppm aralığında gelen karakteristik piklerinin 5 protona karşılık gelen integrali ile DABCO esaslı monomerin 4 ppm civarındaki karakteristik pikinin 6 protona karşılık gelen integrasyon değerleri kullanılarak deneysel katılma oranları: 1.08: 0.92, 1.14: 1.86, 1.89: 1.11 olarak bulunmuştur.



Şekil 6. 18 D1_P1 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu



Şekil 6. 19 D1_P2 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu



Şekil 6. 20 D2_P1 Homopolimerinin ^1H NMR Spektrumu

Polimerlerin ^1H NMR spektrumlarından yararlanarak M_n hesabı yapılmıştır. Grubbs katalistinden gelen polimerin son grubu olan fenil halkaları 7.3 ppm civarındadır ve 5 protona sahiptir. a_{cis} protonuna ait pik ise 6.0 ppm civarında gelmektedir ve 2 protonu vardır. İki farklı protonun integrali alınarak proton başına düşen integrallerinin birbirine oranını, monomerin molekül ağırlığıyla çarpılarak polimerin molekül ağırlığı (M_n) hesaplanır. P_3 polimeri için örnek bir hesaplama yapacak olursak; polimerin fenil halkası integrali referans olarak 1 alınmıştır. Fenil halkasında bulunan 5 protona ait integrasyon değeri 5' e bölünerek proton başına düşen değer hesaplanır. Bu referansa göre 2 proton içeren a_{cis} integrali 3.81' e karşılık gelmiştir. a_{cis} protonlarının proton başına düşen değerinin fenil protonuna oran, monomerin molekül ağırlığı ile çarpılarak M_n hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 6.1' de gösterilmiştir.

M_n hesabı için diğer bir çalışmada su bazlı GPC ile yapılmıştır. PDI indekslerine bakılacak olursa; sonuçların 1' e yakın olduğu görülmektedir. Böylece sentezlenen polimerlerin zincir uzunlukları birbirine yakındır ve homojen bir uzunluk dağılımı göstermektedir.

Çizelge 6. 1 Sentezlenen polimerlerin hedef, NMR, GPC M_n değerleri

| Polimer | M_n (hedef) (g/mol) | M_n (NMR) (g/mol) | M_n (GPC) (g/mol) | PDI (g/mol) |
|---------|--------------------------|------------------------|------------------------|----------------|
| P_3 | 3000 | 4280 | 11.330 | 1.071 |
| D_3 | 3000 | 2956 | 15.148 | 1.101 |
| P_10 | 10000 | 10.277 | 10.581 | 1.085 |
| D_10 | 10000 | 10.985 | 22.035 | 1.110 |
| D1_P1 | 5000 | - * | 11.135 | 1.071 |
| D1_P2 | 5000 | - * | 12.610 | 1.083 |
| D2_P1 | 5000 | - * | 12.437 | 1.115 |

$M_{n,teorik}$: Teorik olarak hesaplanan sayı ortalama molekül ağırlığı (Da)

$M_{n,NMR}$: 1H NMR ile hesaplanan sayı ortalama molekül ağırlığı (Da)

$M_{n,GPC}$: Su bazlı GPC ile hesaplanan sayı ortalama molekül ağırlığı (Da)

PDI: GPC ile hesaplanan Poli dispersite indeksi (M_w/M_n)

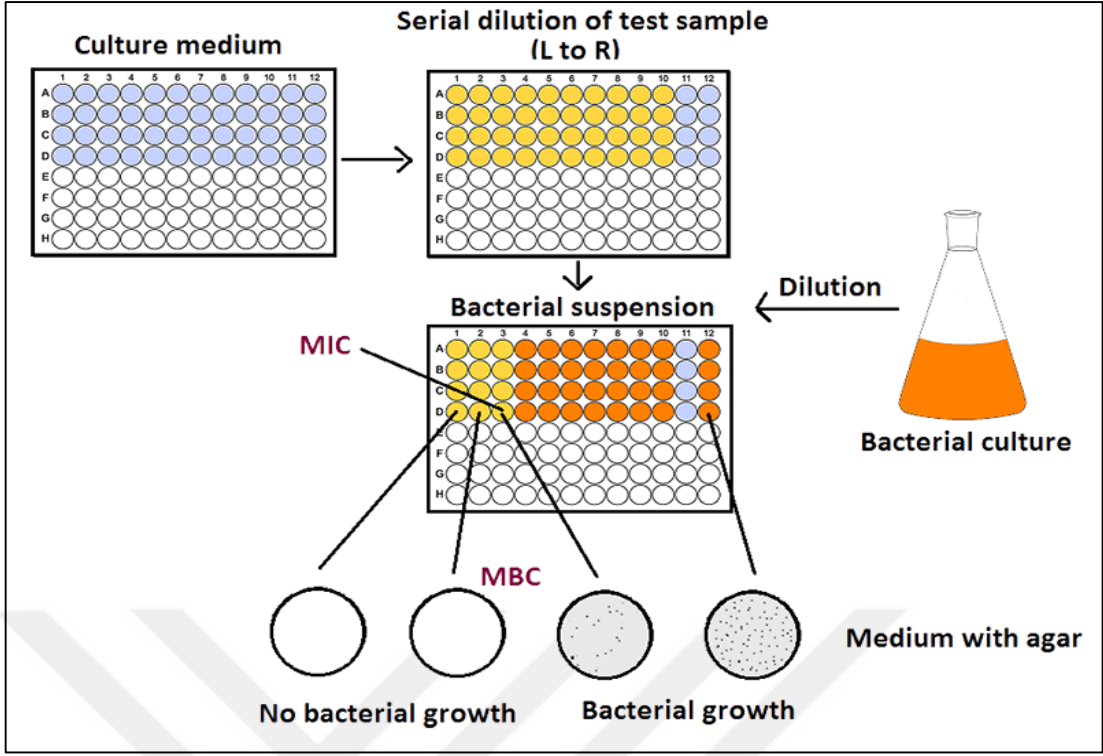
*: 1H NMR M_n hesabında kullanılacak pikler iç içe olduğu için hesaplama yapılamamıştır.

GPC sonuçlarındaki molekül ağırlığının teorikte hesaplanandan sapmasının en önemli nedeni; sentezlenen polimerlerin hidrodinamik hacimleri ile polietilen glikolün (PEG) hidrodinamik hacmi arasındaki farktan olduğu öngörülmektedir.

6.4 Antimikrobiyal Etkinlik

6.4.1 Polimerlerin Sıvı Fazdaki Antimikrobiyal Etkinliklerinin İncelenmesi

Antimikrobiyal etkinliği gösteren MIC değerlerinin saptanmasında dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Mikroorganizmalarda gözle görülebilen üremenin olmadığı minimum antimikrobiyal ajan konsantrasyonuna 'Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MIC) ' denir. Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin MIC değerlerinin belirlenmesinde 96 kuyucuklu plaka kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır (Şekil 6.21).



Şekil 6. 21 Mikrodilüsyon yönteminin şekilsel gösterimi

Sentezlenen polimerler konsantrasyonları 2 mg/mL olacak şekilde DMSO' da çözüldü. 37° C'de bir gece besiyerinde üremiş olan mikroorganizmalardan, 0.5 McF (1×10^6 CFU/mL) bulanık süspansiyonlar hazırlandı. 0,1 mL sıvı besiyeri (LB broth) ve 0.01 mL bakteri süspansiyonu 96 kuyucuklu platalere eklendi. Kuyucuklardan birine sadece besiyeri koyularak negatif kontrol belirlendi. 10 adet kuyucuğa ise sırayla ½ oranında MIC analizi yapılan maddenin seri dilüsyonları yapıldı. Geri kalan tüpe ise sadece mikroorganizma konularak pozitif kontrol belirlendi. Plate vorteksledikten sonra 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Üremenin görülmediği minimum konsantrasyon MIC olarak belirlenir. Çizelge 6.2'de sentezlenen polimerlerin mikrodilüsyon testi sonucu elde edilen MIC değerleri görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde homopolimerler için DABCO polimerlerinin antimikrobiyal etkinliğinin pridin polimerlerine göre daha fazla olduğu saptanmıştır. *S.aureus* (gram (+)) bakterisine karşı en etkili polimerin, 10.000 g/mol moleküler ağırlıklı DABCO polimeri (D_10) olduğu ve MIC değerinin 8 µg/mL olduğu görülmüştür. Polimerin genelde *E.coli'* ye karşı etkinlikleri zayıf bulunmuştur.

Çizelge 6. 2 Polimerlerin mikrodilüsyon testi ile elde edilen MIC^a değerleri

| Polimer | $M_{n(teorik)}^b$ (g/mol) | <i>S.aureus</i> ^a | <i>E.coli</i> ^a |
|---------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| P_3 | 3.000 | >256 | >256 |
| P_10 | 10.000 | 128 | 128 |
| D_3 | 3.000 | 16 | 128 |
| D_10 | 10.000 | 8 | 128 |
| D1_P1 | 5.000 | 32 | >256 |
| D1_P2 | 5.000 | 16 | >256 |
| D2_P1 | 5.000 | 16 | >256 |

^a MIC; çözültideki bakterilerin %90- 100 oranında inhibe edilebildiği minimum polimer konsantrasyonudur.

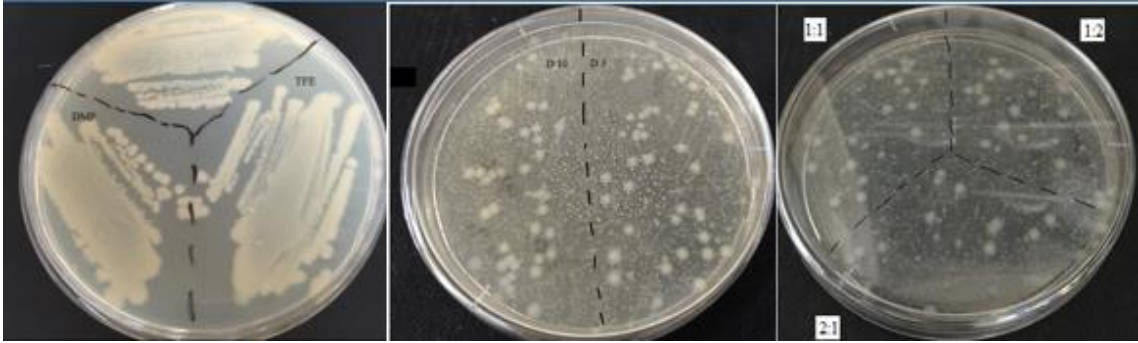
^b $M_{n,teorik}$; polimerlerin hedeflenen sayıcı ortalama molekül ağırlığıdır.

Test sonuçlarına bakıldığında; DABCO esaslı homopolimerlerin pridin homopolimerlerine göre; Gram (+) bakteriye karşı daha aktif olduğu görülmektedir. DABCO esaslı homopolimerlerde moleküler ağırlık arttığında aktivitede artmıştır. Çalışma kapsamında sentezlenen polimerler *E.coli*' ye karşı aktivite göstermemiştir. Gram (-) bakterilerin (*E.coli*), Gram (+) bakterilerden (*S.aureus*) farklı olarak sahip oldukları dış zar; polimerlerin Gram (-) bakterilerin fosfolipit tabakaları ile etkileşimi zorlaştırır. Bu nedenle MIC değerleri Gram (-) bakteriler için yüksektir. Yük yoğunluğunun artmasına bağlı olarak polimer- bakteri etkileşiminin güçlendiği ve Gram (+) bakterilere karşı aktivitenin arttığı görülmektedir. *E.coli* bakterisi (gram (-)) asıl plazma membranını saran bir dış membrana sahipken, *S.aureus*' un yapısında (gram (+)) sadece plazma membranı bulunur. Bu nedenle *E.coli* bakterisini öldürebilmek için iki membranın parçalanması ve yüksek polimer konsantrasyonu gerekir. *S.aureus*' un membranı daha düşük polimer konsantrasyonu ile *E.coli*' ye göre daha kolay parçalanabilmektedir [15].

6.4.2 Polimerlerin Katı Yüzeydeki Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi

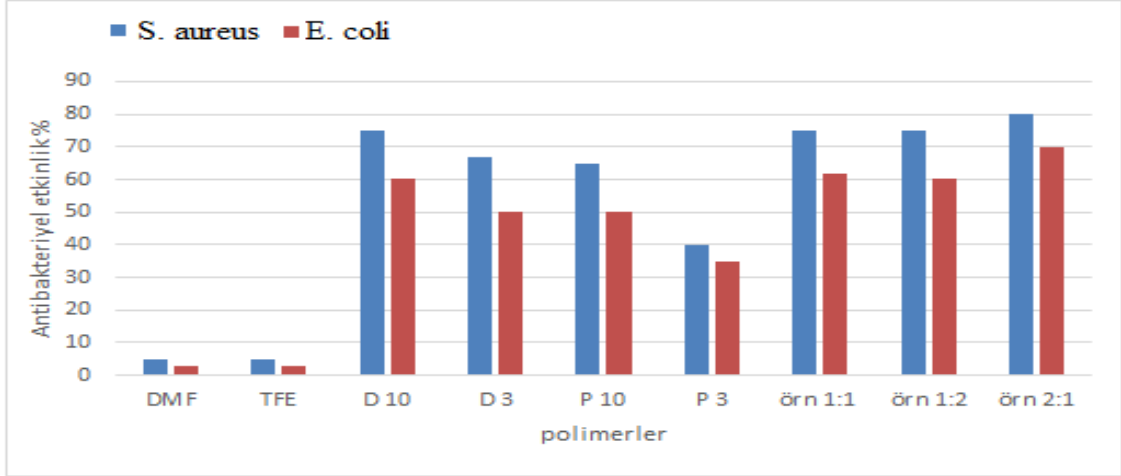
Sentezlenen polimerlerin katı yüzeydeki antimikrobiyal özellikleri airborne testi ile incelenmiştir. Bu çalışma için polimerler uygun çözücüde (DMSO ya da TFE) 2 mg/mL

konsantrasyonda hazırlanmıştır. Piranha ile yıkaması yapılmış olan cam lamellerin (2,5 × 2,5 cm) üzerine eşit miktarda polimer çözeltisi damlatıldı ve 2000 rpm hız ile spin kaplama cihazında cam yüzeyler kaplandı. Antimikrobiyal test için *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri kullanılmıştır ve ATCC25922 metoduna göre çalışma yapılmıştır. *E.coli* ve *S.aureus* bakterilerinin doymuş birer çözeltileri oda sıcaklığında, 5 dakika 4000 rpm’ de santrifüjlendi. Hücreler saf su ile tekrar süspansiyon edilerek konsantrasyon 10^6 CFU/mL olarak ayarlandı. Bu bakteri süspansiyonları (10^6 hücre / mL) cam yüzeylerin üzerine püskürtüldü ve yüzeyler 5 dakika kurumaya bırakıldı. Kuru cam yüzeyler steril polistiren petri kaplarına yerleştirildi. Besin agarı petrilerin içerisine döküldü ve katılaşmaya bırakıldı. 37 °C’ de bir gece inkübasyona bırakılan petrilerde oluşan koloniler sayıldı. Şekil 6.22’ de DMF, TFE, D_10, D_3 ve (1:1), (1:2), (2:1) polimerlerinin 24 saat bakteri ile inkübasyonu sonucu oluşan koloniler görülmektedir. Polimerlerin disk difüzyon yöntemi ile salınım yapıp yapmadığı test edildi. Bu çalışma sonucunda polimerlerde disk difüzyon oluşmadığı ve salınım yapmadıkları tespit edildi.



Şekil 6. 22 Antimikrobiyal aktivite incelemesinde kullanılan airborne testi

Şekil 6.23’ te polimerlerin yüzeydeki aktiviteleri % olarak ifade edilmiştir. Bu sonuçlar sıvı fazdaki aktivitesi en yüksek olan polimer D_10’ a göre kopolimer D2_P1’ in yüzeyde *S.aureus* bakterisine daha aktif olduğunu göstermektedir.



Şekil 6. 23 Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin yüzeydeki % antimikrobiyal etkinlikleri

6.5 Sitotoksosite Çalışmaları

6.5.1 Hemolitik Konsantrasyon

Polimerlerde antimikrobiyal aktivite kadar toksisitede önemlidir. Kırmızı kan hücrelerinin hücre zarındaki lipit tabakalarının parçalanmasına hemoliz denir. Polimerlerin toksik özelliklerini incelerken hemolitik konsantrasyon (HC_{50}) değerlerinden yararlanır. Literatüre göre yapılan çalışmalarda, gönörden alınan kırmızı kan hücresi farklı konsantrasyonlardaki polimer çözeltileri ile incelenmiştir. Hemoliz 414 nm’de serbest hemoglobinin absorban değeri ölçülerek incelendi. Güçlü bir yüzey aktif madde olan TRITON-X (%20 DMSO içerisinde v/v)’ den 10 µL alınarak HRBC (taze kırmızı kan hücresi) süspansiyonuna eklendi ve %100 hemoliz sağlandı. HC_{50} değeri, %50 hemolize neden olan polimer konsantrasyonunun bir üst limiti olarak belirlenir. Kontrol olarak kullanılan TRIS salin içeren polimersiz çözeltinin absorbanı % 0 hemoliz kabul edilir. Polimer çözeltisi hazırlamada çözücü olarak bazı polimerler için DMSO kullanılmıştır. Fakat seyreltme yöntemi ile konsantrasyon azaldığı için DMSO’ nun hemolize etkisi olmamıştır. Çalışma kapsamında sentezlenen tüm polimerler (P_3, D_3, P_10, D_10, P1_D1, P2_D1, P1_D2) için hemolitik konsantrasyon belirlenmiştir. Çizelge 6.3’ te hemolitik konsantrasyon değerleri görülebilir.

Çizelge 6. 3 Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin antimikrobiyal aktivite ve toksisite değerleri

| Polimer | $M_n(\text{teorik})$ (g/mol) | S.aureus | E.coli | HC ₅₀ | Seçicilik (HC ₅₀ / MIC) | |
|---------|---------------------------------|----------|--------|------------------|------------------------------------|--------|
| | | | | | S.aureus | E.coli |
| P_3 | 3.000 | >256 | >256 | >2000 | 7,81 | 7,81 |
| P_10 | 10.000 | 128 | 128 | >2000 | 15,62 | 15,62 |
| D_3 | 3.000 | 16 | 128 | 1000 | 62,5 | 7,81 |
| D_10 | 10.000 | 8 | 128 | >2000 | 250 | 15,62 |
| D1_P1 | 5.000 | 32 | >256 | >2000 | 62,5 | 7,81 |
| D1_P2 | 5.000 | 16 | >256 | 2000 | 125 | 7,81 |
| D2_P1 | 5.000 | 16 | >256 | 1000 | 62,5 | 3,9 |

Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin HC₅₀ değerlerinin oldukça yüksek olduğu ve polimerlerin toksisite göstermediği görülmüştür. Ayrıca seçiciliklerine bakıldığında D_10 polimeri kırmızı kan hücrelerine karşı *S.aureus* bakterisine 250 kat daha fazla seçicilik göstermektedir.

6.6 Katyonik Yük Yoğunluğu Tayini

Katyonik yük yoğunluğu tayini, sodyum floresein metodu (katı yüzey) ile yapılmıştır. Bu işlem için 2 mg/mL konsantrasyondaki polimer çözeltileri her polimer için 3' er tekrar olacak şekilde eşit damla sayısı ile temiz cam yüzeylere (2,5 cm × 2,5 cm) kaplanmıştır. Polimerle kaplanmış ve kaplanmamış camlar %1 floresein sodyum tuzunda 10 dakika bekletildikten sonra destile su ve izopropil alkolle yıkandı. Destile su ile hazırlanmış %0,5'lik heksadesiltrimetilamonyum klorür ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+\text{Cl}^-(\text{CH}_3)_3$) çözeltisinden 4 mL alınarak camlar içerisine koyuldu. 30 dakika boyunca sonikatörde bekletilerek bağlanmış floresein moleküllerinin çözelti içerisine geçmesi sağlandı. İşlem sonrasında 0,6 mL NaHCO_3 ortama eklendi ve 450 nm'de absorbans ölçüldü (Çizelge 6.4). Kalibrasyon eğrisi çizimi için floresein sodyum tuzu çözeltisi farklı konsantrasyonlarda hazırlandı.

Çizelge 6. 4 Polimerlerin sodyum floresein testi ile bulunan yük yoğunlukları

| Polimer | Katyonik Yük Yoğunluğu (yük. cm ⁻²) |
|-------------|--|
| Kontrol Cam | 0 |
| P_3 | 1,69 x 10 ¹⁸ |
| P_10 | 2,88 x 10 ¹⁸ |
| D_3 | 1,51 x 10 ¹⁸ |
| D_10 | 2,53 x 10 ¹⁸ |
| D1_P1 | 2,42 x 10 ¹⁸ |
| D1_P2 | 3,01 x 10 ¹⁸ |
| D2_P1 | 3,88 x 10 ¹⁸ |

Floresein bağlanması sonucu polimer içerikleri farklı olan kaplanmış camların katyonik yük yoğunlukları $1,51 \times 10^{18}$ - $3,8 \times 10^{18}$ aralığında bulunmuştur. Bu çalışma kapsamında yüzeydeki antimikrobiyal etkinliği en yüksek olan D2_P1 kopolimerinin en yüksek katyonik yük yoğunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Homopolimerlere bakıldığında yük yoğunluğu ve molekül ağırlığı arasında bir ilişki olduğu görülmektedir. Yük yoğunluğu P_3 için $1,69 \times 10^{18}$ iken P_10 için $2,88 \times 10^{18}$, D_3 için $1,51 \times 10^{18}$ iken D_10 için $2,53 \times 10^{18}$ dir.

Floresein metodu ile yüzeydeki tüm yükler belirlenemeyebilir. Polimerin yapısı, hidrofobikliği ve molekül ağırlığındaki artışa bağlı olarak zincirlerin etkileşim sarmalının artması nedeniyle floresein problemlerinin polimer içerisine nüfuz etmesi engellenebilmektedir.

6.7 Polimerlerin Bakteriler ile Etkileşmesinin Biyofiziksel Teknikler ile İncelenmesi

6.7.1 Bakteri Polimer Etkileşiminin Zeta Potansiyel ile Ölçülmesi

S.aureus' a aktif (D_10) ve inaktif (P_3) polimerler seçildi ve DMSO ile 2 mg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltileri hazırlandı. İlk olarak 2 mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltiden 100 µL alındı ve üzerine 900 µL fosfat tamponu (pH= 7) eklenerek

polimerlerin zeta potansiyelleri ölçüldü. Polimer ve bakteri etkileşimini incelemek için 900 µL 10⁶ CFU/ mL konsantrasyondaki *S.aureus* üzerine stok polimer çözeltisinden 100 µL eklenerek zeta potansiyel ölçümü yapıldı. Zeta potansiyel çalışmasında elde edilen sonuçlar Çizelge 6.5' te gösterilmektedir. Bakteriler (-) yüklü hücre çeperine sahiptir. Çalışma kapsamında incelenen *S.aureus'* un zeta potansiyel değeri -15.5 mV bulunmuştur. Bu sonucun literatüre uygun olduğu görülmektedir[83]. *S.aureus'* a karşı aktivite gösteren D_10 (MIC= 8 µg/ml) polimerinin zeta potansiyeli +10.9 mV iken bakteri eklendikten sonra +1.58 mV değer göstermiştir. Buna karşın inaktif polimer P_3 (MIC> 256 µg/ml) polimerinin potansiyeli +0.43 mV iken bakteri eklendikten sonra +4.83 mV olmuştur. Aktif polimerin bakteri ile etkileşimi sonucu zeta potansiyel değeri +10.9 mV' den +1.58 mV' ye düşmüştür. Polimerin bakteri çeperini parçaladığı (Carpet Mekanizması) ve (-) yüklü fosfolipid hücre çeperinin (+) yüklü polimer ile elektrostatik etkileşme yaptığı öngörülmektedir. MIC değeri 8 µg/ml olan D_10, zeta kuvvet içerisinde 200 µg/ml olarak kullanılmıştır. Ortamdaki toplam (+) yük, bakteri konsantrasyonundaki toplam (-) yükten fazla gelmektedir. İnaktif polimerin zeta potansiyel değerinin (+0.437 mV) bakteri eklendikten sonra artması (+4.83 mV) iki şekilde açıklanabilir. Kullanılan fosfat tamponu inaktif polimerin yapısındaki pridin tuzunu (pozitif yükü) maskeleyerek (karşı anyon etkisi) daha düşük değerde görmemize sebep olabilir. Bu maskeleme (karşı anyon etkisi) bakteri eklendiği zaman ortadan kalkar. Diğer bir neden ise; polimerin 3 boyutlu yapısı bakteri eklendiğinde değişerek polimer- polimer etkileşmesi artar. Polimer zincirinin (+) yük yoğunluğuna sahip bir dış kabuk gibi davrandığı öngörülmektedir. Bu yapının bakterideki (-) yüklü fosfolipidleri de perdelediği öngörülmektedir. Teorik olarak; polimer ve bakteri hücre membranı etkileşerek bakteri ölümü gerçekleştiğinde fosfolipitler serbest hale geçmektedir. Fosfolipitlerin negatif yükleri nedeniyle zeta potansiyel değerinde fark edilir bir düşüş beklenmektedir. Ayrıca DMSO ile bakteri etkileşimi incelenmiş ve DMSO' nun *S.aureus* hücre çeperinde deformasyona sebep olmadığı görülmüştür.

Çizelge 6. 5 Polimer ve bakteri etkileşimi zeta potansiyel ölçüm sonuçları

| | Zeta Potansiyel (mV) |
|------------------------|----------------------|
| <i>S.aureus</i> | -15.5 |
| <i>S.aureus</i> + DMSO | -16.1 |
| P_3 | +0.437 |
| <i>S.aureus</i> + P_3 | +4.83 |
| D_10 | +10.9 |
| <i>S.aureus</i> + D_10 | +1.58 |

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında; DABCO ve pridin gruplarını içeren farklı yük yoğunluğuna, hidrofobisiteye ve molekül ağırlığına sahip ROMP homopolimerleri ve kopolimerleri sentezlenmiştir. Homopolimerlerin molekül ağırlıkları 3.000 g/mol ve 10.000 g/mol, kopolimerlerin molekül ağırlıkları ise 5.000 g/ mol olarak belirlendi. Monomerlerin ve polimerlerin karakterizasyonu ¹H NMR ve ¹³C NMR teknikleri ile yapıldı. Antimikrobiyal etkinlik çalışmaları kapsamında aktivite; sıvı faz ve katı faz için belirlendi ve DABCO esaslı 10.000 g/ mol molekül ağırlığındaki polimerin (D_10) *S.aureus'* a karşı yüksek aktivite (MIC= 8 µg/mL) gösterdiği görüldü. Sitotoksikite çalışması kapsamında hemolitik konsantrasyonları belirlenen polimerlerin toksik olmadıkları ve D_10 polimerinin kırmızı kan hücrelerine karşı *S.aureus* bakterisine 250 kat daha fazla seçicilik gösterdiği tespit edilmiştir.

Polimerlerin katı fazdaki antimikrobiyal etkinlikleri airborne testi ile belirlenmiştir. Polimer kaplı cam yüzeylerin aktiviteleri incelendiğinde; sıvı fazda *S.aureus'* a karşı yüksek aktiviteye sahip olan D_10 polimerine kıyasla D2_P1 kopolimerinin daha etkili olduğu görülmüştür.

Katyonik yapıdaki polimerlerin (+) yük tayini sodyum floresein yöntemi ile yapılmıştır. Polimerlerin yük yoğunlukları $1,51 \times 10^{18}$ - $3,8 \times 10^{18}$ aralığında bulunmuştur. Katı yüzeyde en yüksek aktiviteye sahip D2_P1 polimerinin katyonik yük yoğunluğu $3,88 \times 10^{18}$ bulunmuştur. Zeta potansiyel çalışmasında aktif polimerin (D_10) *S.aureus* membranına kuvvetli bir şekilde bağlandığı ve membranı parçaladığı ancak inaktif polimerin ise (P_3) yüzey ile etkileşim göstermediği görülmüştür.

Çalışma kapsamında sentezlenen polimerler antimikrobiyal katyonik polimer çalışmaları için bir yol olabileceği gibi Gram (+) bakteriye karşı yüksek aktivite ve seçicilik gösterdiği için katater yüzeylerin kaplanmasında, implant malzemelerde (yara bandı, sargı bezi v.b.) kullanılabileceği öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

-
- [1] Doğanay, M., Enfeksiyon Hastalıkları Ders Notları, <http://www.nevoku.com/ViewDeck.aspx?deckID=1bc0b475-fb32-40ce-b19b-1d0d7649dd9c>, 3 Ağustos 2017.
- [2] Naharcı, H., (2006). "Adana İlindeki Çeşitli Hastanelerin Yoğun Bakım Ünitelerinde Çalışan Hemşirelerin Hastane Enfeksiyonlarının Önlenmesinde Etkili Olan Önlemlere İlişkin Bilgi Düzeylerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [3] Aygün, G., (2008). "Damar İçi Kateter Enfeksiyonlarının Önlenmesi ve Kontrolü", İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Hastane Enfeksiyonları Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi: 79-88.
- [4] Üçüncü Basamak Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde Çalışan Sağlık Personelinin El Hijyeni İle İlgili Görüşleri, <http://www.das.org.tr/kitaplar/SAD2016-kitap-Web.pdf> , 3 Ağustos 2017.
- [5] Gencer, S., Hastane Enfeksiyonlarının Önlenmesi Ve Kontrolün Olmazsa Olmazı :El Yıkama, <http://194.27.141.99/dosya-depo/stek/pdfs/60/6008.pdf>, 3 Ağustos 2017.
- [6] Tashiro, T., (2001). "Antibacterial And Bacterium Adsorbing Macromolecules", *Macromolecular Materials and Engineering*, 286: 63-87.
- [7] Stiriba, S.E., Frey, H. ve Haag, R., (2002). "Dendritic Polymers In Biomedical Applications: From Potential To Clinical Use In Diagnostics And Therapy", *Angewandte Chemie International Edition*, 41: 1329-1334.
- [8] Gabriel, G.J., Som, A., Madkour, A.E., Eren, T. ve Tew, G.N., (2007). "Infectious Disease: Connecting Innate Immunity To Biocidal Polymers", *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 57: 28-64.
- [9] Wee, V., Tan, P. J., Leong J., Voo, X. Z., Hedrick L. J. ve Yang, Y., (2014). "Antimicrobial Polycarbonates: Investigating the Impact of Nitrogen-Containing Heterocycles as Quaternizing Agents", *Macromolecules*, 47: 1285–1291.

- [10] Takahashi, H., Nadres, T. E., ve Kuroda, K., (2017). "Cationic Amphiphilic Polymers with Antimicrobial Activity for Oral Care Applications: Eradication of *S. mutans* Biofilm", *Biomacromolecules*, 18: 257–265.
- [11] He, M., Zhou, Y., Xiao H. ve Lu P., (2016). "Amphiphilic Cationic Copolymers With Ciprofloxacin: Preparation And Antimicrobial Activities", *New J. Chem.*, 40: 1354-1364.
- [12] Ilker, M.F., Nüsslein, K., Tew, G.N. ve Coughlin, E.B., (2004). "Tuning The Hemolytic And Antibacterial Activities Of Amphiphilic Polynorbornene Derivatives", *Journal of the American Chemical Society*, 126: 15870-15875.
- [13] Lienkamp, K., Madkour, E. A., Kumar, K., Nüsslein, K. ve Tew G. N., (2009). "Antimicrobial Polymers Prepared by Ring-Opening Metathesis Polymerization: Manipulating Antimicrobial Properties by Organic Counterion and Charge Density Variation", *Chemistry - A European Journal*, 43: 11715–11722.
- [14] Takano, S., Tamegai, H., Itoh, T., Ogata, S., Fujimori, H., Ogawa, S., Iida, T. ve Wakatsuki, Y., (2011). "ROMP Polymer-Based Antimicrobial Films Repeatedly Chargeable With Silver Ions", *Reactive and Functional Polymers*, 71: 195-203.
- [15] Lienkamp, K., Madkour, A. E., Musante, A., Nelson, C. F., ve Tew, G. N., (2008). "Antimicrobial Polymers Prepared By ROMP With Unprecedented Selectivity: A Molecular Construction Kit Approach", *Journal of the American Chemical Society*, 130: 9836-9843.
- [16] Colak, S., Nelson, C. F., Nüsslein, K. ve Tew, G. N. (2009). "Hydrophilic Modifications of an Amphiphilic Polynorbornene and the Effects on its Hemolytic and Antibacterial Activity", *Biomacromolecules*, 10: 353–359.
- [17] Altay, E., Altıkatoğlu Yapaöz, M., Keskin, B., Yücesan, G. ve Eren, T., (2015). "Influence Of Alkyl Chain Length On The Surface Activity Of Antibacterial Polymers Derived From ROMP", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 127: 73-78.
- [18] Al-Badri, Z.M., Som, A., Lyon, S., Nelson, C. F., Nüsslein, K. ve Tew, G. N., (2008). "Investigating The Effect of Increasing Charge Density On The Hemolytic Activity of Synthetic Antimicrobial Polymers", *Biomacromolecules*, 9: 2805-2810.
- [19] Suer C. N., Demir, C., Unubol, N. A., Yalçın, Ö., Kocagöz, T. ve Eren, T., (2016). "Antimicrobial Activities of Phosphonium Containing Polynorbornenes", *Royal Society of Chemistry*, 89: 85675- 86761.
- [20] Antibiotic Resistance Threats in the US, <https://www.cdc.gov/features/antibioticresistancethreats/index.html>, 3 Ağustos 2017.
- [21] Alışkan, E.H., Bakterilerin Yapısı, Üreme Özellikleri ve Genetiği, http://www.baskent_adn.edu.tr/dokumanlar/bakteri%20ders.pdf, 3 Ağustos 2017.
- [22] Paul Ehrlich Kimdir?, <https://www.msxlabs.org/forum/bilim-ww/200461-paul-ehrich.html#ixzz4VGIxzSMt>, 3 Ağustos 2017.

- [23] Paul Ehrlich – Biographical, https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/ehrllich-bio.html, 3 Ağustos 2017.
- [24] Sayar, A., Mikrobiyoloji Tarihçesi, <http://www.doktorlar.de/makaleler/63-mikrobiyolojinin-tarihcesi.html>, 3 Ağustos 2017
- [25] Bakteriler Hakkında Genel Bilgi, <http://www.nkfu.com/bakteriler-hakkinda-bilgi>, 3 Ağustos 2017.
- [26] Bacterial Morphology, <https://www.slideshare.net/sakshisaxena9256/bacterial-morphology-46863703>, 3 Ağustos 2017.
- [27] Butler, J.C., Breiman, R.F., Campbell, J.F., Lipman, H.B., Broome, C.V. ve Facklam, R.R., (1993). "Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Efficacy. An Evaluation Of Current Recommendations", JAMA, 270: 1826- 1831.
- [28] Arvas, A., Konjuge Pnömonokok Aşısı, <http://194.27.141.99/dosya-depo/stek/pdfs/59/5907.pdf>, 3 Ağustos 2017.
- [29] Gök, S., Yakın Çevremizdeki Mikroorganizmalar, <http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok9.pdf>, 3 Ağustos 2017.
- [30] Temel Mikrobiyoloji, http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/79053/29633/temel_mikrobiyoloji_3_hafta.pdf, 3 Ağustos 2017.
- [31] Spiral Bakteriler, <https://tr.wikipedia.org/wiki/Pn%C3%B6mokok>, 14 Aralık 2017.
- [32] Çevre Mikrobiyolojisi, [http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/49231/46034/%C3%B6rnekleme_raporu_\(1\).pdf](http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/49231/46034/%C3%B6rnekleme_raporu_(1).pdf), 3 Ağustos 2017.
- [33] Gram staining- Procedure, Mechanism, Explanation, <http://www.medicinehack.com/2012/02/gram-staining-procedure-mechanism.html>, 3 Ağustos 2017.
- [34] Güven, S., (2016). Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Klavuzu: Nobel Kitapevi.
- [35] Gram Staining, <http://aasciencelab.blogspot.com.tr/2015/04/l15-gram-staining.html>, 3 Ağustos 2017.
- [36] Gram Pozitif Bakteri Nedir?, <http://www.ansiklopediatri.com/goster.asp?dil=tr&terim=803>, 3 Ağustos 2017
- [37] Gram Negatif Bakteri Nedir?, <http://www.ansiklopediatri.com/goster.asp?dil=tr&terim=804>, 3 Ağustos 2017
- [38] Wade, L.G., (2012). Organic Chemistry: Pearson.
- [39] Eren, T., Makromoleküler Kimya Ders Notları, <http://yabis.yildiz.edu.tr/teren/course/viewCourse/id/4197>, 20 Ağustos 2017.
- [40] Balta., D., Polimer Karakterizasyonu Ders Notları, http://www.yabis1.yildiz.edu.tr/dkaraca/thesis_advisorship, 20 Ağustos 2017.
- [41] Saçak, M., (2008). Polimer Kimyası: Gazi kitapevi.

- [42] Szwarc, M., (1956). "Living Polymers Their Discovery, Characterization and Properties", *Journal of Polymer Science*, 36: IX–XV.
- [43] Yeşilyurt., N., (2007). Fırça Tipi Poli(3-Hidroksialkanoat)-*g*-Polimetilmetakrilat Graft Kopolimerlerin Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu Yöntemi İle Sentezi Ve Karakterizasyonu, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Zonguldak.
- [44] Bielawski, C.W. ve Grubbs, R.H., (2007). "Living Ring-Opening Metathesis Polymerization", *Progress in Polymer Science*, 32: 1-29.
- [45] Grubbs, R. H., (2003). *Handbook of Metathesis Volume 1: Wiley-VCH*.
- [46] Trost, B. M., (1991). "The Atom Economy- A Search For Synthetic Efficiency", *Science*, 254: 1471–1478.
- [47] Development Of The Metathesis Method In Organic Synthesis, https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2005/advanced-chemistryprize2005.pdf, 3 Ağustos 2017.
- [48] Hérisson, J.L. ve Chauvin, Y., (1971). "Catalyse de Transformation des Oléfines Par Les Complexes du Tungstène. II. Télomérisation des Oléfines Cycliques en Présence D'oléfines Acycliques", *Macromolecular Chemistry and Physics*, 141: 161-176.
- [49] Şahin, V., (2011). Mo- Bazlı Aktif Parçacıklar Varlığında Silisyum İçeren Norbornen Türevlerinin Halka Açılımı Metatez Polimerizasyonu, Hacettepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- [50] Benson, S.W., Cruickshank, F., Golden, D., Haugen, G.R., O'neal, H., Rodgers, A., Shaw, R. ve Walsh, R., (1969). "Additivity Rules For The Estimation Of Thermochemical Properties", *Chemical Reviews*, 69: 279-324.
- [51] Odian, G., (2004). *Principles of Polymerization*, 4th Edition: Wiley.
- [52] Schwab, P., Grubbs, R.H. ve Ziller, J.W., (1996). "Synthesis and Applications of $RuCl_2(CHR')(PR_3)_2$: The Influence of the Alkylidene Moiety on Metathesis Activity", *Journal of the American Chemical Society*, 118: 100–110.
- [53] Wu, Z., Nguyen, S.T., Grubbs, R.H. ve Ziller, J.W., (1995). " Reactions of Ruthenium Carbenes of the Type $(PPh_3)_2(X)_2Ru:CH-CH:CPh_2$ (X = Cl and CF_3COO) with Strained Acyclic Olefins and Functionalized Olefins", *Journal of the American Chemical Society*, 117: 5503-5511.
- [54] Hancock, R., (1997). "Peptide Antibiotics", *Lancet*, 349: 418-422.
- [55] Döşler, S., Gürler., B. ve Gerçeker, A., (2006). "Geleceğin Antibiyotikleri: Antimikrobiyal Etkili Katyonik Peptitler", *ANKEM*, 20: 44- 54.
- [56] Scott, M.G., Gold, M.R. ve Hancock, R.E., (1999). "Interaction Of Cationic Peptides with Lipoteichoic Acid and Gram-Positive Bacteria", *Infect Immun*, 67: 6445- 6453.
- [57] Matsuzaki, K., (1999). "Why and How are Peptide-Lipid Interactions Utilized for Self-Defense? Magainins and Tachyplesins as Archetypes", *Biochim Biophys Acta*, 1462: 1-10.

- [58] Rocca, P., Biggin, P.C., Tieleman, D.P. ve Sansom, M.S.P., (1999). "Simulation Studies of the Interaction of Antimicrobial Peptides and Lipid Bilayers", *Biochim Biophys Acta*, 1462: 185- 200.
- [59] Yeaman, M.R. ve Yount, N.Y., (2003). "Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance", *Pharmacol*, 55: 27- 55.
- [60] Kapancı, S., Kanser Hücrelerini Yok Eden Mikrop Öldürücü Peptitler, <http://bilimvebilimadami.com/kanser-hucreleri-kendini-ele-veriyor>, 3 Ağustos 2017.
- [61] Shai, Y. ve Oren, Z., (2001). "From "Carpet" Mechanism to De-Novo Designed Diastereometric Cell-Selective Antimicrobial Peptides", *Peptides*, 22: 1629-1641.
- [62] Park, C.B., Kim, H.S. ve Kim, S.C., (1998). "Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating The Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions", *Biochem Biophys Res*, 244: 253- 257.
- [63] Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L. ve Huang, H.W., (2001). "Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Mellitin Pores", *Biophys J*, 81: 1475- 1485.
- [64] Chen, H.C., Brown, J.H. ve Morell, J.L., (1988). "Synthetic Magainin Analogues with Improved Antimicrobial Activity", *FEBS Lett*, 236:462-466.
- [65] Tew, G.N., Liu, D., Chen, B., Doerksen, R.J., Kaplan, J., Carroll, P.J., Klein, M.L., ve DeGrado, W.F., (2002). "De Novo Design Of Biomimetic Antimicrobial Polymers", *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 99: 5110-5114.
- [66] Vogel, H. ve Jahnig, F., (1986). "The Structure of Mellitin in Membranes", *Biophys J*, 50: 573- 582.
- [67] Mellitin 3D Structure, <https://www.youtube.com/watch?v=nqeJy4XICiY>, 3 Ağustos 2017.
- [68] Skerlavaj, B., Romeo, D. ve Gennaro, R., (1990). "Rapid Membrane Permeabilization and Inhibition of Vital Functions of Gram Negative Bacteria by Bactenecins", *Infect Immun*, 58: 3724-3730.
- [69] Soylu, Ö. ve Öztürk, Y., Defensinler ve H. pylori Enfeksiyonundaki Rollerini, <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/deutip/article/view/5000137323/5000126274>, 3 Ağustos 2017.
- [70] Ganz, T., Cartoon Structures of Representative Mammalian Defensins and an Insect Defensin, http://www.nature.com/nri/journal/v3/n9/fig_tab/nri1180_F2.html?foxtrotcallback=true, 3 Ağustos 2017.
- [71] Steiner, H. ve Merrifield, R. B., (1988). "Binding and Action of Cecropin and Cecropin Analogues: Antibacterial Peptides from Insects", *Biophysica Acta*, 939: 260- 266.
- [72] Structure of Cecropin, <https://en.wikipedia.org/wiki/Cecropin>, 14 Aralık 2017.

- [73] Gennaro, R., Skerlavaj, B. ve Romeo, D., (1989). "Purification, Composition and Activity of Two Bactenecins, Antibacterial Peptides of Bovine Neutrophils", *Infect Immun*, 57: 3142-3146.
- [74] Cengiz, T., Mısırlıgil, A. ve Aydın, M., (2005). *Tıp ve Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji: Güneş Yayınevi*.
- [75] Tashiro, T., (2001). "Antibacterial and Bacterium Adsorbing Macromolecules", *Macromolecular Materials and Engineering*, 286: 63-87.
- [76] Worley, S. ve Sun, G., (1996). "Biocidal Polymers", *Trends in Polymer Science*, 4: 364-370.
- [77] Bazzi, H. S. ve Sleiman H. F., (2002). "Adenine- Containing Block Copolymers via Ring- Opening Metathesis Polymerization: Synthesis and Self- Assembly into Rod Morphologies", *Macromolecules*, 26: 9617–9620.
- [78] Love A. J., Morgan, P. J., Trnka, M. T. ve Grubbs H. R., (2002). "A Practical and Highly Active Ruthenium-Based Catalyst that Effects The Cross Metathesis of Acrylonitrile," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 21: 4035–4037.
- [79] Çoban, A.Y., MİK Mikrodilüsyon ve Makrodilüsyon Hazırlanması ve Ekimi, <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf>, 3 Ağustos 2017.
- [80] Sambhy V., Peterson, B. R., ve Sen, A., (2008). "Multifunctional Silane Polymers for Persistent Surface Derivatization and Their Antimicrobial Properties", *Langmuir*, 14: 7549– 7558.
- [81] Tiller J. C., Liao J. C., Lewis K. ve Klibanov M., (2001). "Designing Surfaces That Kill Bacteria on Contact", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 11: 5981–5985.
- [82] Kügler, R., Bouloussa, O. ve Rondelez, F., (2005). "Evidence of A Charge-Density Threshold for Optimum Efficiency of Biocidal Cationic Surfaces", *Microbiology*, 5: 1341–1348.
- [83] Alves, S. C., Melo, N. M., Franquelim, G. H., Ferre, R., Planas, M., Feliu, L., Bardaji, E., Kowalczyk, W., Andreu, D., Santos, C. N., Fernandes, X. M. ve Castanho, M., (2010). "*Escherichia coli* Cell Surface Perturbation and Disruption Induced by Antimicrobial Peptides BP100 and pepR", *The Journal of Biological Chemistry*, 36: 27536- 27544.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Aylin KAYMAZ
Doğum Tarihi ve Yeri : 01.08.1992- KIRKLARELİ
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : aylinpak39@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

| Derece | Alan | Okul/Üniversite | Mezuniyet Yılı |
|-----------|---------------|----------------------------|----------------|
| Y. Lisans | Fizikokimya | Yıldız Teknik Üniversitesi | 2017 |
| Lisans | Kimya | Yıldız Teknik Üniversitesi | 2015 |
| Lise | Fen Bilimleri | Lüleburgaz Anadolu Lisesi | 2010 |

İŞ TECRÜBESİ

| Yıl | Firma/Kurum | Görevi |
|-----------|-----------------------------|----------------|
| 2013 | Lüleburgaz Devlet Hastanesi | Stajyer |
| 2013 | Tübitak MAM | Stajyer |
| 2015 | Erca Grup | Arge Mühendisi |
| 2016-2017 | Tübitak 215Z330 Projesi | Bursiyer |

YAYINLARI

Bildiri

1. Kaymaz, A., Aksu B., Eren T.,(2016). " Synthesis of DABCO Based Cationic Polymers with ROMP Technique and Examination of Their Antibacterial Activity", 17th Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, 21- 25 May 2017, Ghent.

Proje

1. 215Z330, "Vankomisin ile antibakteriyel polimerlerin konjugasyonu ile sinerjistik antibakteriyel etkinliğinin incelenmesi" (TÜBİTAK), Yüksek Lisans Öğrencisi Bursiyer.

