



**YÜKLÜ NANOPARÇACIKLARIN BAZI MİKROORGANİZMA VE
HÜCRE TİPLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nebahat Aytuna ÇERÇİ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2021

ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nebahat Aytuna ÇERÇİ

29/12/2021

YÜKLÜ NANOPARÇACIKLARIN BAZI MİKROORGANİZMA VE HÜCRE TİPLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Nebahat Aytuna ÇERÇİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2021

ÖZET

Araştırmamızda; N-alkil-N'-2-piridilmetiletilendiaminler ile heksaklorosiklotrifosfazen reaksiyonlarından elde edilen tetrakloro-2-piridilmetilspiro-N/N-etilendiamino-siklotrifosfazenleri; pirolidin, morfolin ve 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekan (DASD) ile reaksiyona sokulması sonucu elde edilmiş tam substitüe tetraaminosiklotrifosfazen türevlerinin biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin ve iyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmiş bileşiklerin çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi, L929 fibroblast ve A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi ve plazmit DNA ile olan etkileşimi incelenmiştir. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon ve minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) yöntemleri ile incelenmiştir. Bileşiklerin L929 fibroblast ve A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesini belirleyebilmek için MTT yöntemi kullanılmıştır. Bileşiklerin DNA üzerine etkisi, pBR322 plazmit DNA ile bileşikler belirli süre etkileşime bırakılarak agaroz jel elektroforezi ile incelenmiş; bileşiklerin DNA üzerinde hangi nükleotitlere bağlandığını tespit etmek için ise bileşikler ile etkileştirilmiş plazmit DNA *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiştir. İyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen kitosan nanopartiküllerin; FT-IR analizi, boyut ve yük dağılımının belirlenmesi, SEM görüntülerinin alınması ve kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküller içine bileşiklerin enkapsüle edilmesi ile de etken madde verimliliğinin belirlenmesi ve etken madde salımının belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin *C. albicans* başta olmak üzere antimikrobiyal etkisinin ve potansiyelinin olduğu ve enkapsüle edilmiş bileşiklerde antimikrobiyal aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Bileşiklerin yüklü olduğu kitosan/TPP nanopartiküllerinde; 125µM ve daha düşük konsantrasyonlarda L929 fibroblast hücrelerinde toksisitenin serbest fosfazene göre azaldığı ve yüksek konsantrasyonlarda toksisitede fark olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, fosfazen yüklü kitosan partiküllerinin, serbest fosfazene kıyasla A549 kanser hücrelerine toksisiteyi arttırdığı gözlemlenmiştir.

Bilim Kodu : 20326
Anahtar Kelimeler : Nanopartikül, Sitotoksosite, Fosfazen, Antimikrobiyal aktivite
Sayfa Adedi : 135
Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK
İkinci Danışman : Prof. Dr. Mustafa TÜRK

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF LOADED NANOPARTICLES ON SOME MICROORGANISMS AND CELL TYPES

(Ph. D. Thesis)

Nebahat Aytuna ÇERÇİ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2021

ABSTRACT

In our research; tetrachloro-2-pyridylmethylspiro-N/N-ethylenediamino-cyclotriphosphazenes obtained from the reaction of N-alkyl-N'-2-pyridylmethylethylenediamines with hexachlorocyclotriphosphazenes; fully substituted tetraaminocyclotriphosphazenes obtained by the reaction of pyrrolidine, morpholine and DASD were synthesized. The biological activities of fully substituted tetraaminocyclotriphosphazenes derivatives were evaluated. Antimicrobial activity of synthesized compounds and compounds encapsulated into chitosan/TPP nanoparticles obtained by ionic gelation method on various microorganisms, cytotoxic activity on L929 fibroblast and A549 non-small cell lung cancer cell lines and interaction with plasmid DNA were investigated. The antimicrobial activity of the compounds was investigated by disk diffusion and minimal inhibitory concentration (MIC) methods. The MTT method was used to determine the cytotoxic activity of the compounds in L929 fibroblast and A549 non-small cell lung cancer cell lines. The effects of the compounds on DNA were examined by agarose gel electrophoresis by leaving the pBR322 plasmid DNA to interact with the compounds for a certain period of time; In order to determine which nucleotides the compounds bind to on the DNA, plasmid DNA interacted with the compounds was cut with BamHI and HindIII restriction endonuclease enzymes. Chitosan nanoparticles obtained by ionic gelation method; FT-IR analysis, determination of size and load distribution, taking SEM images and stability studies were carried out. By encapsulating the compounds into nanoparticles, the determination of the efficiency of the active substance and the determination of the release of the active substance were carried out. It has been determined that the compounds have antimicrobial effect and potential, especially in *C. albicans*, and that the antimicrobial activity of the encapsulated compounds increases. In chitosan/TPP nanoparticles loaded with compounds; It was determined that the toxicity of L929 fibroblast cells was reduced compared to free phosphazene at 125µM and lower concentrations, and there was no difference in toxicity at higher concentrations. In addition, phosphazene-loaded chitosan particles were observed to increase toxicity to A549 cancer cells compared to free phosphazene.

Science Code : 20326

Key Words : Nanoparticle, Cytotoxicity, Phosphazene, Antimicrobial activity

Page Number : 135

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

Co-Supervisor : Prof. Dr. Mustafa TÜRK

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, bilgisi, tecrübesi ve önerileri ile bana destek olan, çok kıymetli danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK'a ve Sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e;

Tez izleme komitesinde bulunarak bilgi ve deneyimlerini aktararak tezin değerlendirilmesinde çok önemli katkıları olan Sayın Prof. Dr. Zeynel KILIÇ ve Sayın Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN'a;

Tez çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen Aytuğ OKUMUŞ'a, KÜBTÜAM ailesine, Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarındaki ekip arkadaşlarıma, tüm dostlarıma ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Fosfazenler	5
2.2. Polimerik Biyomalzemeler.....	6
2.2.1. Kitosan.....	6
2.3. Enfeksiyon Hastalıkları ve Etkenleri	10
2.3.1. Bakteriler ve bazı önemli bakteriyel enfeksiyonlar	12
2.3.2. Mayalar ve bazı önemli maya enfeksiyonları.....	22
2.4. Antimikrobiyal Maddeler	24
2.4.1. Antibakteriyel maddeler	25
2.4.2. Antifungal maddeler	27
2.4.3. Antimikrobiyal direnç	28
2.4.4. Antifungal direnç.....	31
2.5. Biyofilm	32
2.5.1. Biyofilm oluşumu ve çeşitleri	33
2.5.2. Biyofilm bağlantılı enfeksiyon hastalıkları	35

	Sayfa
2.6. Türkiye’de ve Dünyada Enfeksiyon Hastalıkları	35
2.7. DNA’nın Genel Yapısı.....	36
2.7.1. DNA- ilaç etkileşim mekanizmaları	42
2.8. Kanser	48
2.8.1. Kanser biyolojisi.....	48
2.8.2. Akciğer kanseri.....	55
2.8.3. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar.....	59
2.8.4. Türkiye ve Dünya’da kanser	63
3. MATERYAL VE YÖNTEM	67
3.1. Materyal	67
3.1.1. Çalışmada kullanılan bileşikler	67
3.1.2. Kullanılan mikroorganizmalar ve gelişme ortamları.....	68
3.1.3. Kullanılan hücre hatları ve gelişme ortamları	69
3.1.4. Kullanılan besi ortamları ve malzemeler.....	70
3.1.5. Kullanılan alet ve cihazlar	70
3.1.6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	70
3.2. Yöntem.....	71
3.2.1. Nanopartikül sentezlenmesi.....	71
3.2.2. Sentezlenen nanoparçacığın FT-IR analizi.....	72
3.2.3. Sentezlenen nanoparçacığın boyut ve yük dağılımının belirlenmesi	72
3.2.4. SEM.....	72
3.2.5. Etken madde verimliliğinin belirlenmesi	72
3.2.6. Etken madde salımının belirlenmesi	73
3.2.7. Nanopartikül kararlılık çalışmaları.....	73
3.2.8. Antimikrobiyal aktivite	73
3.2.9. Anti-biyofilm aktivite.....	75

	Sayfa
3.2.10. Sitotoksosite	75
3.2.11. DNA etkileşimi.....	77
4. BULGULAR	79
4.1. Üretilen Nanoparçacığın FT-IR Analizi.....	79
4.2. Sentezlenen Nanopartikülün Boyut ve Yük Dağılımının Belirlenmesi	82
4.3. SEM.....	83
4.4. Etken Madde Yükleme Verimliliğinin Belirlenmesi	84
4.5. Etken Madde Salımının Belirlenmesi	88
4.6. Antimikrobiyal Aktivite	89
4.7. Anti-Biyofilm Aktivite.....	97
4.8. Sitotoksosite	100
4.9. Bileşiklerin DNA Üzerine Etkisi	103
5. TARTIŞMA	107
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	121
KAYNAKLAR	123
ÖZGEÇMİŞ	135

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Doğada kitin bulunma oranları.....	7
Çizelge 2.2. İnsan mikroflorası.....	12
Çizelge 2.3. Antibiyotiklerin sınıflandırılması.....	27
Çizelge 2.4. Antifungal madde sınıfları.....	28
Çizelge 2.5. Yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesi için DSÖ öncelikli patojenler listesi.....	31
Çizelge 2.6. Antifungal direnç mekanizmalarına örnekler.....	32
Çizelge 2.7. Karsinogenezde rol oynayan önemli sinyal yolları, hücrel mekanizmalar ve sorumlu genler	54
Çizelge 2.8. Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde (adenokarsinom) görülen bazı moleküler/genetik değişiklikler	59
Çizelge 2.9. IARCTürkiye kanser istatistikleri (2018).....	65
Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan mikroorganizmalar; gelişme ortam, süre ve sıcaklıkları	69
Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan hücre hatları; gelişme ortam, süre ve sıcaklıkları ...	69
Çizelge 3.3. Biyofilm derecelendirme kriterleri	75
Çizelge 4.1. Enkapsüle bileşiklerin IR spektrumu verileri.....	82
Çizelge 4.2. Sentezlenen nanopartiküllere bileşik enkapsülasyonuverimi.....	88
Çizelge 4.3. B1 maddesinin (%10 DMSO); <i>S. aureus</i> , MRSA ve <i>S. mutans</i> suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri.....	90
Çizelge 4.4. B2 maddesinin (%10 DMSO); <i>S. aureus</i> ve MRSA suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri.....	90
Çizelge 4.5. B3 maddesinin (%10 DMSO); <i>S. aureus</i> ve MRSA suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri.....	90
Çizelge 4.6. B5 maddesinin (%10 DMSO); <i>S. aureus</i> ve MRSA suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri.....	91
Çizelge 4.7. B6 maddesinin (%10 DMSO); <i>S. aureus</i> ve MRSA suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri.....	91

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.8. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri.....	98
Çizelge 4.9. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin MRSA (ATCC 43300) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri	98
Çizelge 4.10. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin VRE (ATCC 51299) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri	99
Çizelge 4.11. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri	99
Çizelge 4.12. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri	100

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Lineer (a) ve halkalı (b) fosfazen	6
Şekil 2.2. a) Kitin b) Kitosan	7
Şekil 2.3. Bakterilerin sınıflandırılması.....	13
Şekil 2.4. Bakterilerin morfolojik yapıları.....	13
Şekil 2.5. Gram pozitif (a) ve gram negatif (b) bakteri hücre duvarı yapısı.....	14
Şekil 2.6. Proteobacteria 16S rRNA gen ağacı.....	15
Şekil 2.7. Actinobacteria 16S rRNA gen ağacı	20
Şekil 2.8. <i>Candida albicans</i> hücre duvarı ve zarı	23
Şekil 2.9. Fungi 16S rRNA gen ağacı.....	24
Şekil 2.10. Antifungal tedavide ilerlemeler	28
Şekil 2.11. Antimikrobiyal direnç mekanizmaları	30
Şekil 2.12. Biyofilm oluşum aşamaları.....	35
Şekil 2.13. DNA super sarmalı yapısı ve hidrojen bağları	36
Şekil 2.14. Polinükleotid (a) ve nükleotid (b).....	37
Şekil 2.15. DNA replikasyonu	38
Şekil 2.16. Transkripsiyon ve translasyon	40
Şekil 2.17. Prokaryotik transkripsiyon basamakları	41
Şekil 2.18. Kovalent bağlanma mekanizmasına sahip olan bazı ilaçların moleküler formülleri	44
Şekil 2.19. Kovalent olmayan bağlanma mekanizmasına sahip olan bazı ilaçların moleküler formülleri	44
Şekil 2.20. İnterkalatör ajanın DNA'yı deforme etme mekanizması.....	45
Şekil 2.21. Bisinterkalatör ile DNA'nın şematik olarak etkileşimi	46
Şekil 2.22. Proflavin ve etidyum interkalatörlerinin kimyasal yapısı.....	47
Şekil 2.23. Kovalent olmayan DNA etkileşim ajanlarının DNA'ya bağlanma bölgeleri	48

Şekil	Sayfa
Şekil 2.24. Hücre döngüsü aşamaları.....	50
Şekil 2.25. Hücre siklusu, siklinler ve CDK'lar ile ilişkisi.....	53
Şekil 2.26. Platin analogları	61
Şekil 2.27. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), IARC 2018 dünya kanser görülme sıklığı verileri haritası; tüm kanser türleri, her iki cinsiyet ve tüm yaşlar için	63
Şekil 2.28. IARC 2018 yılı verilerine göre dünyadaki yeni kanser vakaları yüzdeleri, toplam 18 078 957 kişi; her iki cinsiyet ve tüm yaşlar için	64
Şekil 2.29. IARC 2018 yılı verilerine göre dünyadaki kanser sebebiyle ölüm yüzdeleri, toplam 9 555 027; her iki cinsiyet ve tüm yaşlar için	64
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bileşikler.....	67
Şekil 4.1. Sentezlenen nanopartikülün FT-IR spektroskopisi.....	79
Şekil 4.2. Enkapsülasyonu yapılmış B1 maddesinin IR spektrumu	80
Şekil 4.3. Enkapsülasyonu yapılmış B2 bileşiğinin IR spektrumu	80
Şekil 4.4. Enkapsülasyonu yapılmış B3 bileşiğinin IR spektrumu.....	81
Şekil 4.5. Enkapsülasyonu yapılmış B5 bileşiğinin IR spektrumu	81
Şekil 4.6. Enkapsülasyonu yapılmış B6 bileşiğinin IR spektrumu	82
Şekil 4.7. Zeta Sizer (Malware) cihazından alınan grafik ve veriler	83
Şekil 4.8. B1 bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.....	85
Şekil 4.9. B2 bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.....	85
Şekil 4.10. B3bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.....	86
Şekil 4.11. B5 bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.....	86
Şekil 4.12. B6 bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.....	87
Şekil 4.13. CSNP-B1, CSNP-B2, CSNP-B3, CSNP-B5 ve CSNP-B6 bileşiklerinin salım grafiği	89
Şekil 4.14. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) suşu üzerindeki %inhibisyon etkisi.....	92
Şekil 4.15. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin MRSA (ATCC 43300) suşu üzerindeki %inhibisyon etkisi.....	93

Şekil	Sayfa
Şekil 4.16. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin VRE (ATCC 51299) suşu üzerindeki %inhibisyon etkisi	93
Şekil 4.17. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) suşu üzerindeki %inhibisyon etkisi	94
Şekil 4.18. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) suşu üzerindeki %inhibisyon etkisi.....	95
Şekil 4.19. 1000 µM konsantrasyonunda B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin antimikrobiyal etkinlikleri	96
Şekil 4.20. Bileşiklerin 1000µM konsantrasyonunda enkapsüle edilmiş CSNP-B1-B6 bileşiklerinin antimikrobiyal etkinlikleri.	97
Şekil 4.21. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin (1000 µM-31,25 µM) ve Sisplatinin (1000 µM-31,25 µM) L929 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	101
Şekil 4.22. B1, B2, B3, B5, B6 bileşiklerinin (1000µM-31,25µM) ve Sisplatinin (1000µM-31,25µM) A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	102
Şekil 4.23. Enkapsüle B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin (1000µM-31,25µM) ve Sisplatinin (1000µM-31,25µM) L929 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri .	102
Şekil 4.24. Enkapsüle B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin (1000µM-31,25µM) ve Sisplatinin (1000µM-31,25µM) A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.	103

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Sentezlenen nanopartiküllerin SEM görüntüleri	84
Resim 4.2. Bileşiklerin 1000, 500, 250, 125 ve 62,5 μ M konsantrasyonlarının pBR322 plasmid DNA ile etkileşiminden elde edilen elektrofotogram.....	104
Resim 4.3. Enkapsüle bileşiklerin 1000, 500, 250, 125 ve 62,5 μ M konsantrasyonlarının pBR322 plasmid DNA ile etkileşiminden elde edilen elektrofotogram.....	105
Resim 4.4. Çalışmada kullanılan bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA'nın BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile kesimi (A), Çalışmada kullanılan enkapsüle bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA'nın BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile kesimi. (P): Bileşik ile muamele edilmemiş plazmit DNA; (P/B): BamHI ile kesilmiş plazmit DNA; (P/H): HindIII ile kesilmiş plazmit DNA.....	106

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

cfu

Koloni oluşturan birim

cm⁻¹

Santimetrenin bire bölünmesi

ml

Mililitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

DSÖ

Dünya Sağlık Örgütü

IARC

Ulusal Kanser Araştırmaları Enstitüsü

MHA

Mueller Hinton Agar

MHB

Mueller Hinton Broth

1. GİRİŞ

İnsanlığın gelişimi ile son yıllarda, insan yaşamını uzatmak ve yaşam kalitesini iyileştirmek için, makro yapılardan mikro ve nano düzeye kadar birçok farklı yapıda biyomateryalin araştırma ve geliştirme çalışmaları hızlanarak nanoteknoloji alanının genişlemesini sağlamıştır. Sürdürülebilir biyolojik bazlı ürünlerin, ticari uygulanabilirlik ve çevresel kabul edilebilirlik ile geri dönüştürülebilir ve biyobozunur olan yenilenebilir kaynaklardan elde edilmesi ile nanoteknoloji önemli bir yenilikçi, bilimsel ve ekonomik büyüme alanı olarak son yıllarda sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Nanoteknolojinin sağlık ve ilaç sektörlerinde uygulanmaya başlanması, vücutta hücresel düzeyde etkileşim gerçekleştirebilen yeni sistem ve cihazların tasarımını büyük ölçüde etkilemiştir. Nanometrik ölçekte malzemelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinden yararlanmak için yeni nanoterapötik sistemler geliştirilmiştir (Gopi, Thomas ve Pius, 2020; Shi, Kantoff, Wooster ve Farokhzad, 2016)

Kanserin, dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biri olması sebebiyle tedavisi, araştırmacılar ve doktorlar için büyük bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Öne çıkan antikanser ilaçların ciddi yan etkilerinin olması, araştırmacıları, özellikle kanser bölgesine ilaç iletimini sağlamak için dağıtım araçlarını keşfetmeye zorlamıştır. Bu araçlar arasında sentez nanopartiküllerin potansiyeli yüksek bulunmuştur. Tümöre özgü nano-yapılı ilaç salım sistemlerinin, tümör bölgelerinde birikim davranışı göstermelerinden dolayı kanser tedavisinde oldukça ilgi çekmektedir. Doğal veya sentetik polimerlerden hazırlanan polimerik nanopartiküller yüksek kararlılıkları, endüstriyel üretim için uygun olmaları ve ileri yüzey yapılandırılabilme gibi özelliklerinden dolayı bu amaçla kullanılmaktadır. Polimer özellikleri ve yüzey kimyası değiştirilerek bu nanopartiküller hem kontrollü ilaç salımı, hem de tümör hedeflemesi amacıyla kullanılabilir (Kumar, Gajbhiye, Paknikar ve Gajbhiye, 2019).

Benzer şekilde mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar ve buna bağlı ölümlerin fazlalığı da araştırmacıları yeni antimikrobiyal ajanları keşfetmeye zorlamaktadır (Fulaz, Vitale, Quinn ve Casey, 2019). Aynı zamanda bakteriyel enfeksiyonların % 65'inden fazlasının, tıbbi cihaz ve cihaz dışı ilişkili enfeksiyonlar dâhil olmak üzere biyofilm oluşturan bakteriler tarafından üretildiği tahmin edilmektedir (Robino ve Scavone, 2020). Bu nedenle antimikrobiyal maddelere alternatif olarak ve/veya etkilerini artırmaya yönelik

çalışmalarda nanopartiküller giderek daha büyük önem kazanmaktadır (L. Wang, Hu ve Shao, 2017).

Polimerler, aynı veya farklı yapısal birimler arasında kovalent bağın koordinasyonu ile oluşan makromoleküllerdir ve ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirmeden genel uygulamalara kadar çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar. Polimerin mevcut uygulama alanları; yapıştırıcı, kaplama, köpük ve ambalaj malzemelerinden, elektronik cihazlara, endüstriyel elyaf ve tekstillere, kompozitlere, biyomedikal ve optik cihazlara ve ilaç taşıma sistemlerinde yeni yaklaşımlara kadar uzanmaktadır (Dhote ve diğeri, 2018). İçeriğinde fosfor bulunduran polimerler, doğal ve sentetik polimerler olarak, organik ve inorganik makromoleküller içeren çok çeşitli bir malzeme sınıfı oluşturur. Sentetik grubun ana temsilcileri arasında polifosfoesterler ve polifosfazenler bulunur. Bu polimerler, biyoyumlulukları ve degrade olabilme özellikleriyle, biyomalzeme temel özelliklerini karşılar ve biyomedikal uygulamalar için potansiyel maddeler olarak karşımıza çıkar. Aynı zamanda fosfor atomunun reaktivitesi sayesinde, malzemelerinin işlevsellikleri ve özelliklerinin manipüle edilebildiğı çok yönlü bir polimer platformunun geliştirilmesini mümkün kılar (Koseva, Mitova, Todorova ve Tsacheva, 2019). Doğal grupta ise doğada yaygın olarak bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan, özellikle biyoyumlu olması ve antimikrobiyal karakteri ile biyomateryal olarak yüksek potansiyelini göstermiştir (Fan ve diğeri, 2018).

Yapılan bu çalışmada, N-alkil-N'-2-piridilmetiletildiaminler ile heksaklorosiklotrifosfazen reaksiyonlarından elde edilen tetrakloro-2-piridilmetilspiro-N/N-etildiamino-siklotrifosfazenleri; pirolidin, morfolin ve 1,4-dioksa-8-azaspiro [4,5] dekan (DASD) ile reaksiyona sokulması sonucu elde edilmiş tam substitüe tetraaminosiklotrifosfazen türevlerinin biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin ve iyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmiş bileşiklerin çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi, L929 fibroblast ve A549küçük hücreli olmayan akciğeri kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi ve DNA üzerine etkisi incelenmiştir.

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarında sentezlenmiş olan fosfazen bileşiklerinin *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), MRSA (Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*) (ATCC 43300), VRE (Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*) (ATCC 51299), *Pseudomonas aeruginosa*

(ATCC 27853), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) *Bacillus cereus* (ATCC 13061) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon ve minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) yöntemleri ile incelenmiştir. Bileşiklerin L929 fibroblast ve A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesini belirleyebilmek için MTT yöntemi kullanılmıştır. Bileşiklerin DNA üzerine etkisi, agaroz jel elektroforezi ile incelenmiş; bileşiklerin DNA üzerinde nükleotitlere bağlanıp bağlanmadığı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimin inhibisyonuna göre belirlenmiştir. İyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen kitosan nanopartiküllerin; FT-IR analizi, boyut ve yük dağılımının belirlenmesi, SEM görüntülerinin alınması ve kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküller içine bileşiklerin enkapsüle edilmesi ile de etken madde verimliliğinin belirlenmesi ve etken madde salımının belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmanın verileri doğrultusunda önde gelen sağlık sorunlarından olan kanser ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde nanoteknolojik ilaç geliştirme ile özellikle tıbbi cihaz ve hastane ekipmanları yüzeylerinde oluşarak hastane enfeksiyonlarına sebep olan biyofilm oluşumunun giderilme ve önlenme çalışmalarının ilerlemesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fosfazenler

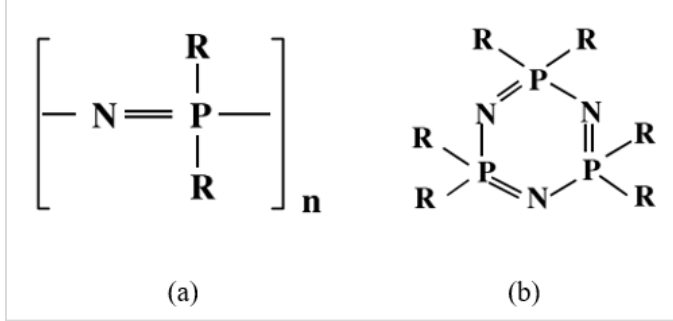
Fosfor (P), yaşam için kilit öneme sahip olan temel bir elementtir. Doğal P içeren polimerler, yani DNA ve RNA gibi biyo-polifosfoesterler, genetik bilgiyi depolar ve iletirken, pirofosfatlar organizmaların enerji döngüsünde yer alır (Allcock, 2006; Koseva ve diğerleri, 2019).

Fosfor içeren polimerler, doğaları (organik/inorganik), kökenleri (biyopolimerler/sentetik polimerler) ve fosfor atomunun oksidasyon/koordinasyon durumuna (polifosfitler, polifosfosfonatlar, polifosfatlar) göre farklılık gösteren çok yönlü bir malzeme grubu sunar (Canadell, Hunt, Cook, Mantecón ve Cádiz, 2007).

Fosfor içeren polimerlerden fosfazenler, $-P=N$ temel yapısından oluşan halkalı yada düz zincirli büyük veya küçük molekül kütleli inorganik bileşiklerdir. Alanında ilgileri üzerine çeken bağlar arasında bulunan fosfor-azot bağı bulunduran fosfazenler, inorganik makromoleküllerin en büyük sınıfını oluşturmaktadır (Allcock, 2006). Organik çözücülerde çözünebilmeleri sebebiyle organik karakter taşıyan siklofosfazenler, yapılarındaki $P=N$ zincirinden yani karbon bulundurmamalarından dolayı anorganik karakter de taşımaktadırlar. Fosfazen yapıları üç temel gruba ayrılmaktadır. Bunlar düz zincirli $((R)HN=PX_3$ veya $X_2P(Y)-N=PX_3$ (R:alkil; X:halojen, alkil, aril, alkoksi, amino; Y=O,S), halkalı $((-N=PX_2)_n$ (n= 3- 12)) ve polimerik $[(NPR_2)_n]$ fosfazenlerdir (Şekil 2.1). Halkalı ve düz zincirli fosfazen türevleri üzerine yapılan, 1800'lü yılların sonlarında başlamış ve 1900'lü yılların ilk yarısında ilerlemeye devam etmiş olan çalışmalar, kristal yapıları ile reaksiyon mekanizmalarının anlaşılması üzerine hızlanmıştır. Halkalı fosfazenlerden $N_3P_3Cl_6$ (trimer) ile başlayan bu gelişmeler 20. yüzyılın son yarısında birçok polimer sentezlenmesiyle oldukça ilerlemiştir (Allcock, 2006).

Fosfazenler, fosfor atomuna bağlanan süstitüentlere göre çeşitlendirilip özelleştirilebilir fiziksel ve kimyasal özellikler sergilemektedir. Böylece, yanmaz fiberler, yarı iletken maddeler, membranlar, şarj edilebilir piller, biyomalzemeler, cam, seramik ve metal yapıştırıcıları, sıvı kristaller, antikanser ve antimikrobiyal ajanlar gibi çeşitli alanlarda geniş uygulama alanı bulmuşlardır. Günümüzde fosfazen bileşikleri üzerine yapılan çalışmalar gün geçtikçe hız kazanarak devam etmektedir (Brandt, Kruszynski, Bartczak ve Porwolik-

Czomperlik, 2001; Elmas ve diğerleri, 2017; Singh ve diğerleri, 2006; Sun, Yu, Wang ve Wu, 2014; Xu, Lu, Yu ve Wen, 2006; Yahaya ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.1. Lineer (a) ve halkalı (b) fosfazen (Dhote ve diğerleri, 2018)

2.2. Polimerik Biyomalzemeler

Önceleri polimerlerin çoğu, tıbbi olmayan endüstriyel uygulamalar için plastik, elastomer ve elyaf olarak geliştirilmiştir. Fakat daha sonra biyomedikal alanda kullanılmak üzere modern biyolojideki hızlı büyüme ve disiplinler arası iş birliği ile polimerik biyomalzemeler; biyoyumlu, biyoaktif ve biyomimetik malzemeler haline getirilmiştir. Böylece biyomalzemeler, artık insan sağlığı ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesinde önemli bir yer edinmişlerdir (Modjarrad ve Ebnesajjad, 2014).

Biyomalzemelerin uygulamaları arasında tanı ve teşhis teknolojileri (gen dizileri ve biyosensörler gibi), tıbbi malzemeler (kan torbaları ve cerrahi aletler), tedaviler (tıbbi cihazlar) ve yeni ortaya çıkan rejeneratif tıp (doku mühendisliği yapılmış deri ve kıkırdak) bulunmaktadır. Polimerlerin fiziksel, mekanik ve kimyasal özelliklerinin çok çeşitli olması, polimerik biyomateryallerin kapsamlı araştırma, geliştirme ve uygulamalarını beslemiştir (Madni, Kousar, Naeem ve Wahid, 2021).

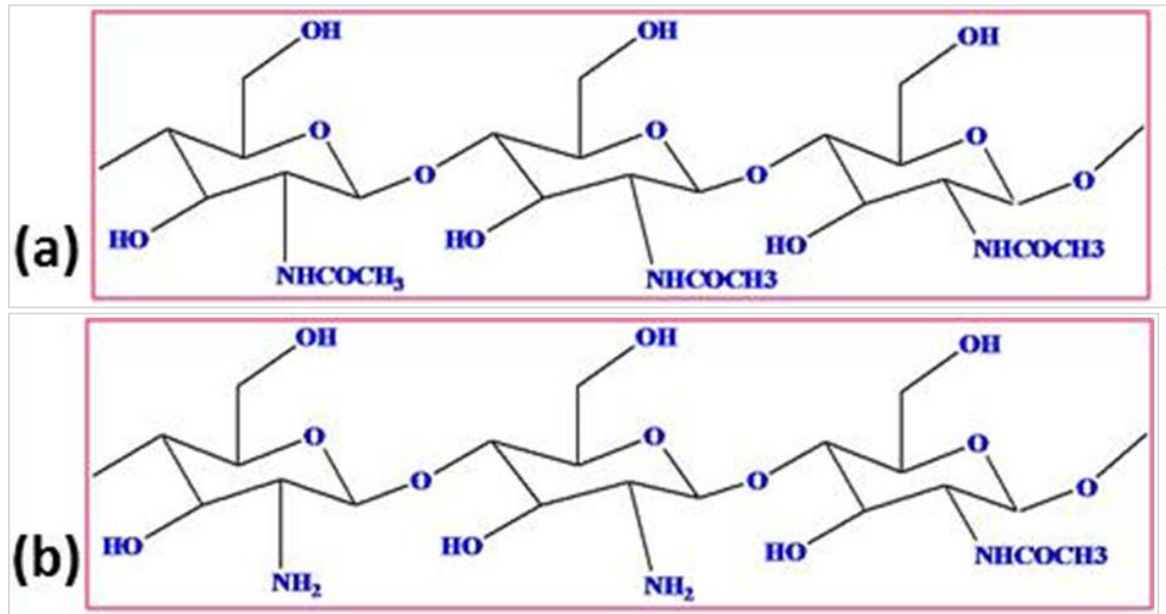
2.2.1. Kitosan

Kitosan, kabuklu hayvanlardan, bazı böcek ve mantarlardan elde edilen (Çizelge 2.1), selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci bileşik olan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir (Mackay ve Tait, 2011; Bakshi et al., 2020).

Kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosan, farklı oranlarda ve sayıda 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoz ve 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoz moleküllerinin β -(1,4) bağı ile bağlanması sonucu oluşan düz zincirli bir kopolimerdir (Şekil 2.2). Bu iki molekülün oranları ve dizi içerisindeki sırası ile sayısı kitosanın fiziko-kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirler (Harish Prashanth ve Tharanathan, 2007).

Çizelge 2.1. Doğada kitin bulunma oranları (Bakshi, Selvakumar, Kadirvelu ve Kumar, 2020)

Filum	Sınıf	Bulunduğu oluşumlar	Fraksiyon
Arthropoda	Crustacea (Karides, ıstakoz, yengeç, midye), Insecta	Tırnak etleri, bölümler arası zarlar	%20–85
Mollusca	Polyplacophora, Bivalvia (Yumuşakçalar), Gastropoda (Salyangoz, sümüklü böcek), Cephalopoda (Kalamar, ahtapot)	Kabuk plakaları, manto kılları, kabuk, çeneler, karın plakaları	%0,1–36,8
Annelida	Polychaeta (Kıl kurtları)	Chaetae, jaws, tubes	%0,28–38
Fungi	Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Deuteromycota	Miselyum saplarının ve sporlarının hücre duvarları ve yapısal zarları	%0,1 – 45
Algae	Chlorophyceae (Yeşil alg)	Hücre duvarı bileşenleri	
Protozoa	Rhizopoda (Amoeba)	Kist duvarı, kabuk, perisark, könostem, iskelet, podokist	%3,2–30,3
Cnidaria	Hydrozoa, Anthozoa, Scyphozoa (Denizanası)		
Ciliophora	(ciliates)		



Şekil 2.2. a) Kitin b) Kitosan (Bakshi ve diğerleri, 2020)

Kitosan; biyouyumlu, biyoparçalanabilir, antimikrobiyal, hidrofilik, toksik olmama, yüksek biyoyararlanım, modifikasyon basitliği, su geçirgenliği, yüksek kimyasal direnç, filmler, jeller, nanopartiküller, mikropartiküller ve boncuklar oluşturma yeteneği ve ayrıca metallere, proteinlere ve boyalara afinite gibi birçok özelliğe sahiptir (Nagpal, Singh ve Mishra, 2010).

Kitosan bazlı bileşikler; ilaç dağıtımı ve salımı, gen dağıtımı, hücre kapsüllenmesi, protein bağlama, doku mühendisliği, implantların ve kontakt lenslerin hazırlanması, yara iyileşmesi, biyo-görüntüleme, antimikrobiyal gıda katkı maddeleri, antibakteriyel gıda paketleme malzemeleri gibi alanlarda sayısız uygulama çeşitliliği sunmaktadır (Shariatnia, 2019).

Kitosan nanopartiküller

Nanopartiküller, doku hedefleme, moleküler düzeyde hedef erişimi ve ilaç salımını kontrol etme konusundaki çok yönlülüğü nedeniyle ilaç dağıtım sistemlerinde bilim dünyasının büyük ilgisini çekmiştir. Nanopartiküller, çapı 10-1000 nm arasında değişen yapılardır ve ilaç molekülünü içine alan/hapseden sentetik, doğal veya yarı sentetik polimerlerden oluşurlar. Biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu, kolay formülasyon teknikleri ve düşük toksisiteye sahip olmaları ile uygulamadaki çok yönlülüğü ve doğada bulunma sıklığı nedeniyle kitosan, nanopartikül ilaç üretimi için polimerik taşıyıcılar arasında diğerlerine göre belirli avantajlar sunmaktadır (Nagpal ve diğerleri, 2010).

Kitosan nanopartiküllerin sentezi için; iyonik jelasyon, ters misel, emülsiyon damlacık birleşmesi, emülsifikasyon çapraz bağlama, sprey kurutma ve nanoçöktürme gibi yöntemler kullanılmaktadır (Naskar, Sharma ve Kuotsu, 2019).

İyonik jelasyon

Kimyasalların olası toksik özellikleri ve diğer istenmeyen etkilerinden kaçınmak için kimyasal çapraz-bağlayıcılar yerine, kitosan ile elektrostatik etkileşimler sonucu tersinir fiziksel bağlanan çapraz bağlayıcıların kullanıldığı oldukça basit bir yöntemdir. Çapraz bağlayıcı olarak genellikle tripolifosfat (TPP) kullanılır. Bu yöntemde öncelikle kitosan asetik asit çözeltisinde çözünür. Daha sonra tripolifosfat çözeltisi, sürekli karıştırma altında kitosan-asetik asit çözeltisine eklenir. Bu eklenme ile kitosan nanopartiküller kendiliğinden oluşur. Oluşan bu partiküller küresel yapıdadır ve zayıf mekanik kuvvete sahiptirler.

Yöntem, kitosanın amin grubu ile tripolifosfat gibi negatif yüklü polianyon grubu arasındaki elektrostatik etkileşime dayanmaktadır. Nanopartiküllerin boyutu ve yüzey yükü, kitosan ve stabilizatör oranı değiştirilerek değiştirilebilir. Yüksek bir nanopartikül verimi için kritik işleme parametresi kitosan : TPP ağırlık oranı kontrol edilmelidir (Rampino, Borgogna, Blasi, Bellich ve Cesàro, 2013).

Ters misel

Ters miseller termodinamik olarak kararlı su, yağ ve yüzey aktif maddelerin sıvı karışımıdır. Homojen ve izotropiktirler. En önemli yönlerinden biri dinamik davranışlarıdır. Ters misel damlacıklarının sulu çekirdeği parçacıkların oluşumunda nanoreaktör görevi görmektedir. Ters misel yöntemi kullanılarak 1-10 nm aralığında damlacıklar üretilebilir ve bu damlacıklar iyi dağılmış durumdadırlar. Bu yöntemde yüzey aktif maddesi organik bir çözücüde çözünerek ters misel ortamı hazırlanır. Sürekli karıştırılan ortama kitosan çözeltisi ve çapraz-bağlayıcı eklenir. Oluşan şeffaf çözeltiden çözücü buharlaştırılır ve geride yüzey aktif maddesini ve nanoparçacıkları içeren katı kütle kalır. Saflaştırma işlemi ile yüzey aktif maddesi de uzaklaştırılır ve daha sonra nanoparçacıklar elde edilir (Nagpal ve diğerleri, 2010).

Emülsiyon damlacık birleşmesi

Emülsiyon ve çöktürme yöntemlerinin özelliklerinden yararlanarak uygulanan bir yöntemdir, ancak; kararlı damlacıkların çapraz-bağlanması yerine, kitosan damlacıkları ile NaOH damlacıkları birleştirilip çökme olayı azaltılır. Yöntemde, önce parafin içerisinde kitosan çözeltisini içeren bir emülsiyon hazırlanır, sonra da kitosan çözeltisi içeren NaOH çözeltisinin emülsiyonu aynı şekilde hazırlanır. Yüksek karıştırma hızında her iki emülsiyon birleştirilir; böylelikle, her iki taraftaki damlacıklar rastgele bir şekilde şiddetle çarpışırlar. Sonuç olarak, ufak parçacıklar elde edilmiş olur (Bakshi ve diğerleri, 2020; Nagpal ve diğerleri, 2010).

Emülsifikasyon çapraz bağlanma

Yöntem, kitosanın reaktif fonksiyonel amino gruplarının çapraz-bağlama ajanının aldehit gruplarıyla çapraz-bağlanması etkileşimine dayanır. Bu yöntemde, kitosan çözeltisi yağ fazda emülsiyeye edilerek w/o (water-in-oil) emülsiyonu hazırlanır. Sulu damlacıklar uygun

bir yüzey aktif madde kullanılarak kararlılaştırılırlar. Kararlı emülsiyon, parçacıkları katılaştırmak için glutaraldehit gibi bir çapraz-bağlayıcı kullanılarak çapraz-bağlanarak kurutulur (Naskar ve diğerleri, 2019).

Sprey kurutma

Yöntem, damlacıkların püskürtülerek sıcak hava akımında kurutulmasına dayanır. Bu yöntemde genellikle, ilaç yüklü kitosan parçacıklarının sentezi gerçekleştirilir. Önce kitosan asetik asit çözeltisinde çözünür. Hazırlanan çözeltiye ilaç eklenerek çözünür veya dağıtılır. Daha sonra ise uygun bir çapraz-bağlayıcı eklenir. Bu çözelti bir hava akımında atomize edilir. Atomizasyon küçük damlacıkların oluşmasını ve çözücünün uzaklaşmasını sağlar. Çözücünün uzaklaşması ile serbest hareket edebilen parçacıklar oluşur (Nagpal ve diğerleri, 2010).

Nanoçöktürme

Yöntem kitosanın fizikokimyasal özeliğine dayanmaktadır. Kitosan bazik ortamda çözünmez, ancak bazik çözelti ile temas ederse çöker ve toplanır. Parçacıklar, toplanmış damlacıklar oluşturmak için bir nozzle kullanılarak sodium hidroksit, NaOH-metanol veya etandiamin gibi bazik bir çözeltiye kitosan çözeltisinin püskürtülmesi ile üretilir. Parçacıkların ayrılıp saflaştırılması, sıcak ve soğuk suyla yıkama işleminden sonra gerçekleştirilen filtreleme ve santrifüjleme ile yapılır. Sıkıştırılmış hava basıncının değişimi ve sprej-nozzle çapı parçacık boyutunu kontrol eder. Bu yöntem kullanılarak genellikle kitosan-DNA nanoparçacıkları hazırlanmaktadır (Nagpal ve diğerleri, 2010).

2.3. Enfeksiyon Hastalıkları ve Etkenleri

İnsan vücudunda, vücudu oluşturan hücrelerin 100 katından fazla, yaklaşık 10^{14} mikrobiyal hücre bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar vücudun normal florasıdır (mikroflora) ve insan sağlığı için genellikle faydalı mikroorganizmalardır (Çizelge 2.2) (Bender, Madigan, Buckley, Sattley ve Stahl, 2019; Greenwood, Barer, Slack ve Irving, 2012). Bu faydalı mikroorganizmalar dışında, vücuda yerleşip çoğalarak zarara sebep olan mikroorganizmalar patojen mikroorganizmalardır. Benzer şekilde vücut florasındaki mikroorganizmalar da bulundukları denge halindeki durumu kaybettiklerinde patojen olarak nitelendirilebilirler.

Bu patojen mikroorganizmaların yarattığı etkiye ise enfeksiyon adı verilmektedir (Török, Moran ve Cooke, 2017).

Geçmişten günümüze, dünya birçok salgınla mücadele etmiştir. Günümüzde ise içinde bulunduğumuz Covid-19 salgınıyla beraber, tarihte; veba, ebola, kolera, çiçek, tüberküloz, sifiliz, sıtma, grip ve AIDS gibi farklı ve pek çok bulaşıcı hastalığın pandemilere yol açtığı görülmüştür (Parıldar, 2020).

Milattan önce Atina’da tifüs olabileceği tahmin edilen salgın 75 bin ila 100 bin kişinin ölümüne sebep olarak ilk salgın kayıtlarını oluşturmuştur. Ardından yine milattan öncesine dayanan kayıtlara göre, Avrupa’da çiçek hastalığı (*Variola vera*), kızamık benzeri salgınlar görülmüş ve yaklaşık 25 milyon kişinin öldüğü kayıtlara geçilmiştir.

Kara ölüm olarak adlandırılan ve 1346-1353 yılları arasında Avrupa nüfusunun %30 ila %60’ını etkileyen *Yersinia pestis* bakterisinin sebep olduğu Bubonik vebasısı, dünyada 75-200 milyon insanı enfekte ederek çok büyük bir kitleyi etkisi altına almış ve yüksek oranda mortaliteye sebep olmuştur.

İspanyol gribi olarak adlandırılan ve Influenza A/H1N1 enfeksiyonu olan salgın 1918’de ortaya çıkarak 2 yıl boyunca devam etmiş ve 17-100 milyon kişiyi etkileyerek tüm dünyayı etkisi altına almıştır. *Vibrio cholerae* bakterisinin sebep olduğu kolera; 1800’lü yılların başında Japonya’da görülmüş ardından; Moskova’da, Berlin’de, Paris’te ve Londra’da, Kanada’da ve 1912-1913 yıllarında ülkemizde Balkan Savaşları sırasında kolera salgınları yaşanmış, ülkeden ülkeye dolaşan salgınlar binlerce insanın ölümüne neden olmuştur.

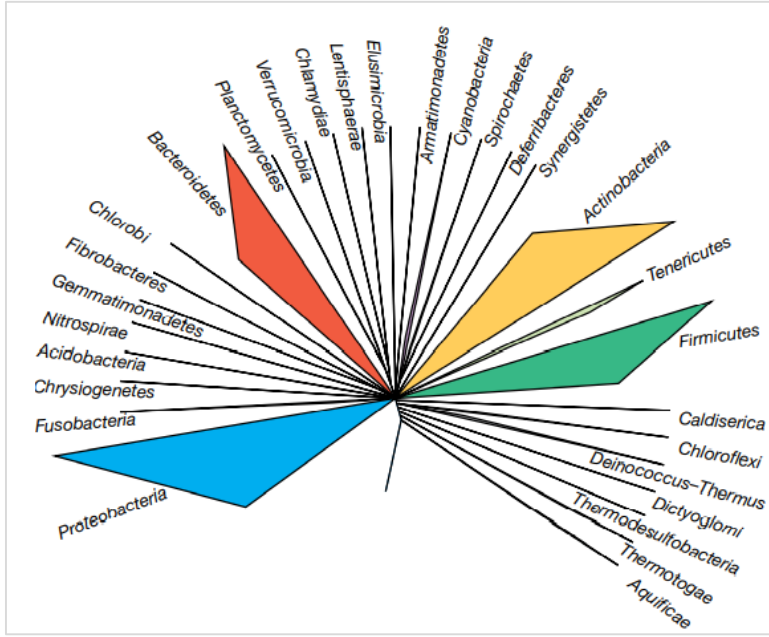
Tüberküloz (*Mycobacterium tuberculosis*) ise 18. ve 19. yüzyılda Avrupa’da görülen bir salgın olarak başlamış ve günümüzde hala dünya çapında devam etmektedir. Her yıl yaklaşık 10 milyon yeni tüberküloz vakası bildirilmekte ve 1,5 milyon insan hayatın kaybetmektedir (DSÖ).

Çizelge 2.2. İnsan mikroflorası (Bender ve diğerleri, 2019)

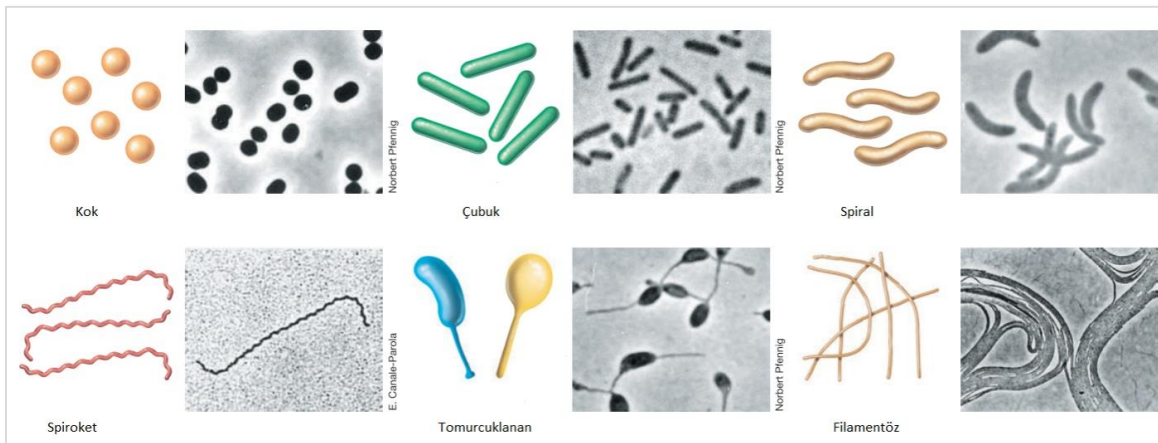
Bulunduğu bölge	Cins Adı
Ağız	Streptococcus, Lactobacillus, Fusobacterium, Veillonella, Corynebacterium, Neisseria, Actinomyces, Geotrichum, Candida, Capnocytophaga, Eikenella, Prevotella, spiroketler (pek çok cinsi)
Solunum sistemi	Streptococcus, Staphylococcus, Corynebacterium, Neisseria, Haemophilus
Sindirim sistemi	Lactobacillus, Streptococcus, Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Clostridium, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Enterococcus, Staphylococcus, Methanobrevibacter, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria
Ürogenital sistem	Escherichia, Klebsiella, Proteus, Neisseria, Lactobacillus, Corynebacterium, Staphylococcus, Candida, Prevotella, Clostridium, Peptostreptococcus, Ureaplasma, Mycoplasma, Mycobacterium, Streptococcus, Torulopsis
Deri	Acinetobacter, Corynebacterium, Enterobacter, Klebsiella, Malassezia, Micrococcus, Pityrosporum, Propionibacterium, Proteus, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus

2.3.1. Bakteriler ve bazı önemli bakteriyel enfeksiyonlar

Bakteriler, prokaryotik hücre yapısına sahip boyları 0,15µm ile 700 µm arasında değişen tek hücreli canlılardır. Ribozomal RNA filogenisine göre sınıflandırılmışlardır. Filogenik sınıflandırmaya göre 80 filum olarak ayrılmış olan bakterilerde önemli 4 büyük grup vardır. Bunlar *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, ve *Bacteroidetes* gruplarıdır (Şekil 2.3). Bakteriler morfolojik olarak kok (küresel), çubuk, spiral, spiroket, tomurcuklanarak uzayan veya filamentöz yapıda olabilirler (Şekil 2.4) (Madigan, Bender, Buchley, Sattley ve Stahl, 2021; Struthers, 2017).

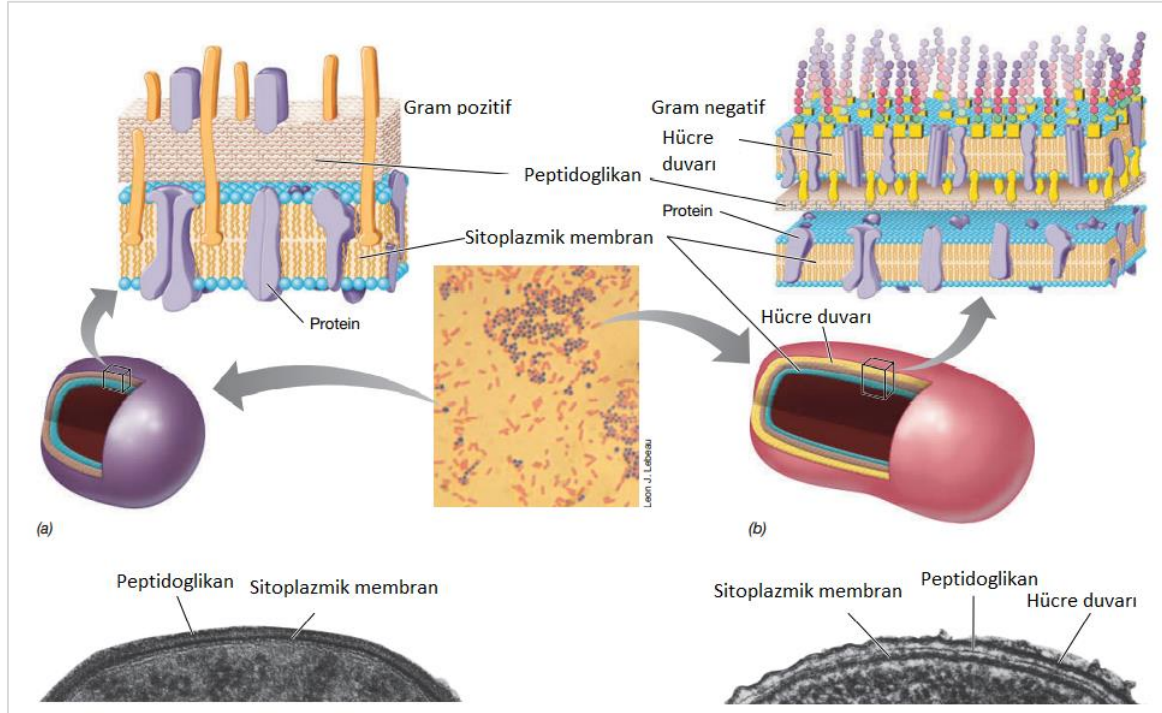


Şekil 2.3. Bakterilerin sınıflandırılması (Bender ve diğerleri, 2019)



Şekil 2.4. Bakterilerin morfolojik yapıları (Madigan ve diğerleri, 2021)

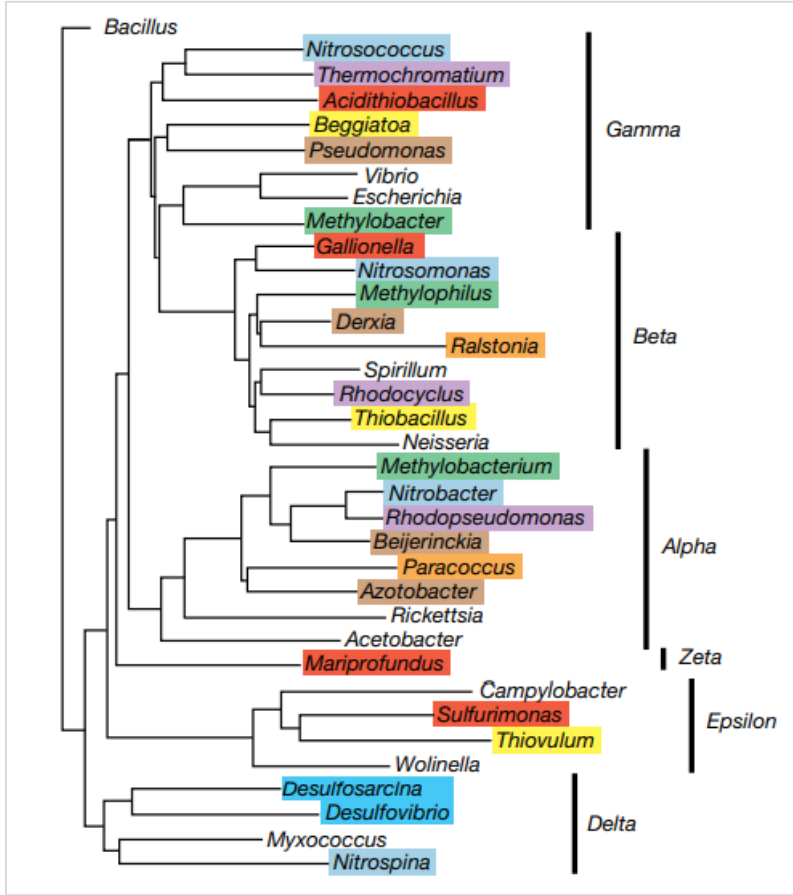
Bakteriler hücre duvarı yapılarına göre Gram pozitif ve Gram negatif olarak iki büyük grupta incelenmektedirler. Hücre duvarını oluşturan ana yapı peptidoglikan tabakasıdır. Peptidoglikan; l-alanin, d-alanin, d-glutamik asit ve l-lizin veya diaminopimelik asit (DAP) amino asitleri ile birlikte N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitin β -1,4 glikozit bağı ile bir araya gelerek değişen tekrarların birleşmesinden oluşur. Peptidoglikan tabakanın yanında Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında teikoik asit de bulunmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Gram pozitif (a) ve gram negatif (b) bakteri hücre duvarı yapısı (Bender ve diğerleri, 2019)

Proteobacteria, bakteri grupları arasında en büyük ve metabolik olarak en çok çeşitlilik gösteren filumdur. Günümüzde tanımlanmış bakteri türlerinin %30'undan fazlası bu gruptan gelmektedir ve tıbbi, endüstriyel ve tarımsal alanda kullanılmakta olan bakterilerin çoğunluğunu oluşturmaktadır. Bu filumu Gram negatif bakteriler oluşturmaktadır (Şekil 2.6) (Bender ve diğerleri, 2019).

Gammaproteobacteria, *Proteobacteria*'nın en büyük ve en çeşitli sınıfıdır. Filumdaki, 15 ordo arasında karakterize edilen türlerin neredeyse yarısını ve 1500'den fazla karakterize türü içerir. Sınıf içerisinde bulunan en büyük ordo *Enterobacteriales*, enterik bakteriler olarak adlandırılır ve *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Enterobacter* ve *Klebsiella* gibi klinik öneme sahip olan cinsleri içerir. Aynı sınıf içerisinde yer alan *Pseudomonales*, yine önemli türlerden *Pseudomonas*, *Vibrio* ve *Aliivibrio* cinslerini içerir (Bender ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.6. Proteobacteria 16S rRNA gen ağacı (Bender ve diğerleri, 2019)

Escherichia coli (E.coli)

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Escherichia coli*, Gram-negatif, kısa basil formunda bakterilerdir. *Escherichia coli*, omurgalıların bağırsak mikrobiyotasının ortak bir üyesi olduğu gibi memeliler ve kuşlar için de fırsatçı bir patojendir. *E. coli*, anaerobik bakterilerden fazla olmasına rağmen, bağırsak mikrobiyotasının baskın aerobik bakterisi olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsanlarda, gram dışkı başına 10^7 ila 10^9 koloni oluşturan birim konsantrasyonla prevalansı %90'dan fazla olarak görülmektedir (Bonten ve diğerleri, 2021). İnsan bağırsak florasında zararsız bir şekilde kolonize olabilen veya bakteriyemi ve sepsis gibi hastalıklar da dahil olmak üzere bağırsak veya ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olabilen *E. coli* kommensal organizmalardan oldukça patojenik varyantlara kadar çeşitli suşlar içerir. Kendilerine kompleks bir antijenik yapı kazandıran O (somatik), H (flagellar) ve K (yüzey/kapsül) antijenlerine sahiptir (Török et al. 2017).

E.coli, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* gibi bakteriyemiye neden olmakta olan diğer patojenleri geride bırakarak özellikle yüksek gelirli ülkelerde bakteriyeminin en yaygın nedeni ve yenidoğanlarda menenjitin önde gelen nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Bonten ve diğerleri, 2021).

İnsanlar için biyolojik öneme sahip olan *E. coli* suşları genel olarak kommensal suşlar, bağırsak patojeni olan (yani enterik veya diyarejenik) suşlar ve ekstraintestinal patojenik *E. coli* suşları olarak incelenmektedir (Russo ve Johnson, 2003). Çoğu insanda ve diğer memelilerde normal fakültatif bağırsak florasının büyük bölümünü oluşturan kommensal *E. coli* varyantları, çoğunlukla konakçılarına kolonizasyon direnci gibi faydalar sağlar. Bu suşlar genellikle bağırsak ve ekstraintestinal suşlardaki gibi hastalığa neden olan virülans faktörlerinden yoksundur. Bununla birlikte, kommensal *E. coli*, yabancı cisim (ör. üriner kateter), konakçı uyumsuzluğu (ör. idrar veya safra yolu tıkanıklığı gibi lokal anatomik veya fonksiyonel anormallikler veya immün yetmezlik) gibi stres faktörleri görüldüğünde ekstraintestinal enfeksiyonlara dahil olabilirler (Denamur, Clermont, Bonacorsi ve Gordon, 2021). *E. coli*'nin bağırsak patojenik suşları, enterit, enterokolit ve kolit dâhil olmak üzere gastrointestinal hastalığa neden olmaktadır. Bu patojenlerin konakçı tarafından yalnızca vücuda alınması, hastalığın ortaya çıkması için genellikle yeterlidir (Gomes, Dobrindt, Farfan ve Piazza, 2021). Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC), idrar yolu enfeksiyonları, menenjit ve sepsis dâhil olmak üzere hem insanlarda hem de hayvanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olan patojenik *E. coli*'nin bir başka önemli grubudur. Üropatojenik *E. coli* (UPEC) idrar yolunu kolonize edebilir ve ürosepsise yol açabilen sistit ve piyelonefrite neden olabilir. Aynı zamanda neonatal menenjitte ilişkili birincil Gram negatif bakteriyel patojendir ve grup B streptokoklardan sonra hastalığa sebep olan ikinci neden olarak görülmektedir. Menenjitte ilişkili *E. coli* (MNEC) ciddi nörolojik lezyonlara neden olabilmekte ve enfekte yenidoğanın ölümüne yol açabilmektedir. Ekstraintestinal patojenik *E. coli*, bakım evlerinde ve hastanelerde kan dolaşımı enfeksiyonlarının ana nedenlerinden birini oluşturmaktadır. Yatan hastalarda pnömoni, nozokomiyal bakteriyemi veya prostatit gelişebilir (Bélangier ve diğerleri, 2011). Tüm patojenik mikroorganizmalarda olduğu gibi *E. coli*'de de suşlar antimikrobiyal dirençli olduğunda bu enfeksiyonlarla mücadele etmek çok daha zor bir hale gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı son antimikrobiyal direnç raporunda enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan üçüncü-nesil sefalosporinler ve florokinolanlara karşı *E. coli*'nin direnç geliştirdiği rapor edilmiştir. Bu raporda Türkiye için; *E. coli*'nin üçüncü nesil sefalosporinlere olan direnci % 43,3;

florokinolonlara olan direnci ise %46,3 olarak bildirilmiştir (World Health Organization, 2014). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2017 yılında yayınladığı ve acilen yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi gerekliliğini bildirdiği listede; mikroorganizmaları 3 kategoriye ayırmıştır. Karbapenem dirençli ve geniş spektrumlu beta laktamaz aktivitesi olan Enterobacteriaceae familyası üyeleri listede 1. öncelikli ve kritik grup içinde yer almıştır (Çizelge 2.5).

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*)

Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alan *P. aeruginosa*; Gram negatif, aerobik ve basil formunda bir bakteridir. Sarı-yeşil floresan bir pigment olan pyoverdine ve mavi-yeşil bir pigment olan piyosyanin gibi suda çözünür pigmentleri üretir. Toprak ve su ekosisteminde bulunan bu tür ayrıca bitki, hayvan ve insan enfeksiyonları ile yakından ilişkilidir. *P. aeruginosa* genellikle sırasıyla karbon ve nitrojen kaynağı olarak yalnızca asetat ve amonyağa ihtiyaç duyar. Ayrıca *P. aeruginosa* anaerobik olarak büyüebilir ve fermantasyon gerçekleştirmez, bunun yerine şekerlerin oksidasyonundan enerji elde eder (Behzadi, Baráth ve Gajdács, 2021). Bu minimum beslenme gereksinimi, hastane ameliyathanelerinin, hastane odalarının, kliniklerin ve tıbbi ekipmanların yanı sıra lavabolar, duşlar, hatta kirli su gibi ortamlarda büyümesine imkân verir ve bu nedenle de önemli bir hastane enfeksiyonu kaynağı olduğu kanıtlanmıştır. Doğası ve yüksek hayatta kalma kabiliyeti nedeniyle, hastane ortamlarındaki cansız yüzeylerde 6 saat ile 6 ay gibi geniş bir zaman aralığında hayatta kalabilir. Bundan dolayı sıklıkla monitörler, ventilatör düğmeleri, yatak korkulukları, solunum cihazları, diyaliz boruları gibi sağlık ekipman ve yüzeylerini kontamine eder. Hastane kaynaklı pnömoni, en yaygın ve tehlikeli hastane kaynaklı enfeksiyonlardan biridir ve enfeksiyon vakalarının çoğu mekanik ventilasyon ile ilişkilidir. Yoğun bakım ünitesinde en sık görülen ikinci hastane enfeksiyonu ve mekanik ventilasyon hastalarında en yaygın olanıdır. Ventilatör ilişkili pnömoni, 48 saat ve üzerindeki sürelerde ventilatör kullanılan hastaların yaklaşık %10-20'sinde görülür ve hastanede kalış süresi, mortalitede artışlarla ilişkilendirilmiştir. Bu ventilatör ilişkili hastane enfeksiyonlarında diğer mikroorganizmalara oranla en sık görülen mikroorganizma *P. aeruginosa* olarak bildirilmiştir (Pachori, Gothwal ve Gandhi, 2019). *P. aeruginosa*, biyofilm oluşturma ile enfeksiyonlara neden olduğu bilinen en önemli bakterilerden biridir. *P. aeruginosa* karbon kalp kapakçıkları ve pilleri, kontakt lensler, üriner ve santral venöz kateterler gibi tıbbi cihazların iç ve dış yüzeylerinde biyofilm geliştirebilir. Bu ayrıca endoftalmi, septisemi,

malign dış kulak iltihabı, menenjit, endokardit gibi ciddi kronik enfeksiyonlara da neden olabilir. *P. aeruginosa*'nın kistik fibrozis, yanık yaraları, intravenöz ilaç zorunluluğu ve organ nakilleri olan hastalarda büyük bir enfeksiyon kaynağı olduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa*'nın doğal ve sonradan oluşturmuş olduğu antimikrobiyal direnç ve biyofilm oluşturma özellikleri nedeniyle hastane enfeksiyonlarında gün geçtikçe daha da büyük bir sorun haline gelmektedir. Dünya sağlık örgütü'nün 2017 yılında yayınladığı acil yeni antimikrobiyal ajan geliştirilmesi gereken mikroorganizmalar listesinde ise, *P. aeruginosa*'nın kritik ve birinci öncelikli grupta yer aldığı görülmektedir (Çizelge 2.5). Bu nedenle; fitokimyasallar, nanopartiküller, metal şelatörler, enzimler, antimikrobiyal peptidler, antikorların ve bakteriyofaj kokteylleri gibi antimikrobiyal etkili ajan ve yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç halen devam etmektedir (Yadav, Kumari, Verma ve Nimesh, 2021).

Gram pozitif bakterileri barındıran ve tanımlanmış bakteri cinslerinin yaklaşık %50'sini içeren filumlar *Actinobacteria*, *Firmicutes* ve *Tenericutes*'tir. Bu filumlar arasında *Actinobacteria*; *Lactobacillales* ve *Bacillales* ordolarını kapsamaktadır. *Lactobacillales* ordosu; *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Lactobacillus* gibi önemli cinsleri barındırırken, *Bacillales* ordosu; *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* ve *Sarcina* gibi önemli cinsleri içermektedir (Şekil 2.7) (Bender ve diğerleri, 2019).

Streptococcus mutans (S. mutans)

Streptococcaceae familyası içinde yer alan *Streptococcus* türleri, zincirler veya tetradlar halinde bulunan karakteristik bir hücre morfolojisine sahiptir, bu çubuk şeklindeki laktobasillerden kolayca ayırt edilmelerini sağlamaktadır. Laktik asit üreticileri olarak diğer streptokoklar ayran, silaj ve diğer fermente ürünlerin üretiminde önemli roller oynarlar.

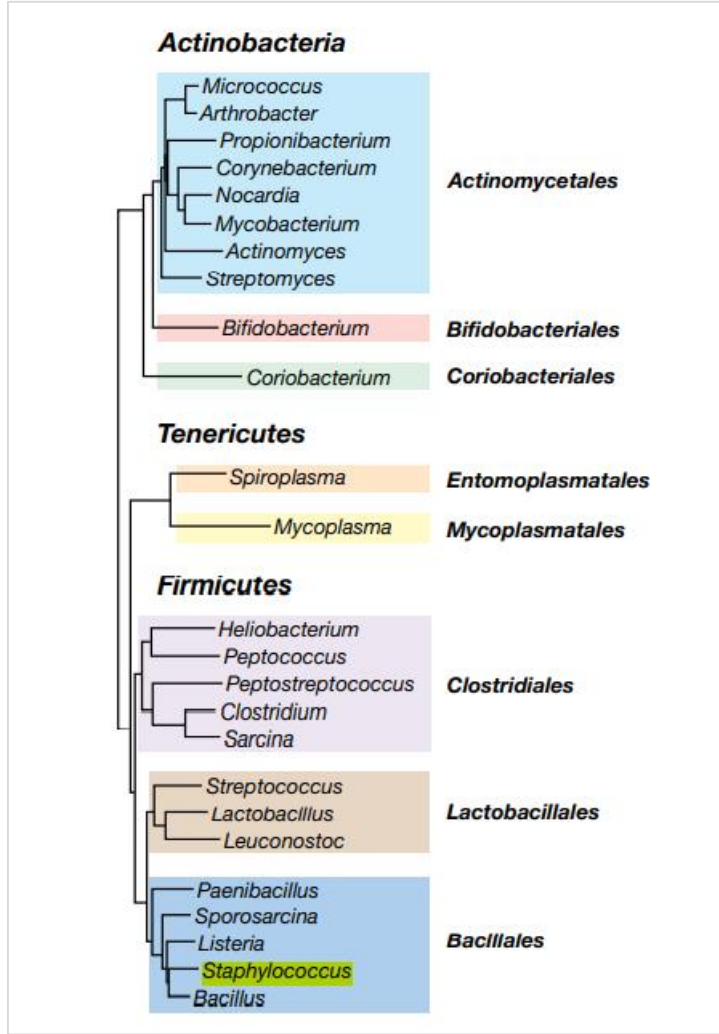
Streptokoklar, *Streptococcus pyogenes* boğaz ağrısının nedeni ile karakterize olan pyogenes alt grubu ve diş çürüğünün başlıca nedeni olan *Streptococcus mutans* ile karakterize edilen viridans alt grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Streptolizin O veya S virülans faktörlerini üreten türleri vardır. Streptokoklar ayrıca spesifik karbonhidrat antijenlerinin varlığına göre immünolojik gruplara (A, B, C, F, G) ayrılır. İnsanlarda bulunan bu β -hemolitik streptokoklar genellikle A grubu antijeni içerirken enterokoklar D grubu antijeni içerir (Bender ve diğerleri, 2019).

S. mutans doğal olarak insan ağız boşluğunda ve spesifik olarak diş plağında, dişin sert yüzeylerinde oluşan çok türlü bir biyofilm oluşturunucudur. *S. mutans*'ın çürüklere sebebiyet verme (karyojenik) potansiyelinin; sert yüzeylerde kalıcı kolonizasyonuna ve sakarozdan büyük miktarlarda hücre dışı glukan polimerleri sentezleme yeteneğine, çeşitli karbonhidratları organik asitlere dönüştürüp metabolize etme yeteneğine (asidojenite) ve özellikle düşük pH koşulları altında gelişme yeteneğine bağlı olduğu gösterilmiştir. Diş çürüğünün gelişiminde tek başına rol almasa da, yapılan araştırmalar, *S. mutans*'ın eksopolisakkarit açısından zengin ve düşük pH ortamı oluşturarak bulunduğu ortamı değiştirebileceğini ve böylece diğer asidojenik ve asidik türler için uygun bir yaşama ortamı oluşturabileceğini göstermiştir. Diş çürüklerine ek olarak *S. mutans*, kalp kapakçıklarının iltihaplanması olan bakteriyel endokarditte de rol oynamaktadır ve serebral mikro kanamalar, IgA nefropatisi ve ateroskleroz gibi diğer ağız dışı patolojilerle bağlantılı olduğu bildirilmiştir. (Lemos ve diğerleri, 2019).

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*)

Enterococcaceae familyasında yer alan enterokoklar Gram-pozitif, kok, sporsuz ve fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Enterokoklar, gastrointestinal sistemin flora üyeleridir. Enterokoklar, geniş bir direnç geni çeşitliliğine sahiptir ve direnç genlerini değiştirebilme potansiyelindedirler. Enterokoklar, hastane enfeksiyonlarının ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının üçüncü yaygın nedenidir ve hastanede yatan hastalar arasındaki ölüm oranının %25-50'sinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, çoklu direnç mekanizmaları ile tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirme durumunun ortaya çıkmasına neden olur (Jabbari, Shiadeh, Pormohammad, Hashemi ve Lak, 2019).

Enterococcus türleri arasında, iki ana tür (*Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*) insanlar için özellikle patojeniktir: Enterococci enfeksiyonlarının %85-90'ına *E. faecalis*, %5-10'una ise *E. faecium* neden olmaktadır; bununla birlikte, *E. faecium* kan dolaşımı enfeksiyonları, *E. faecalis* kan dolaşımı enfeksiyonlarına göre daha yüksek antibiyotik direnci ve mortalite oranlarına sahiptir. Sağlık kuruluşlarında ortaya çıkan önemli enfeksiyonların bir kısmı ise vankomisine dirençli Enterokok (VRE) türleri nedeniyle kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır (Ayobami, Willrich, Reuss, Eckmanns ve Markwart, 2020).



Şekil 2.7. *Actinobacteria* 16S rRNA gen ağacı (Bender ve diğerleri, 2019)

Staphylococcus aureus (*S. aureus*)

Staphylococcaceae familyası içerisinde yer alan ve Gram pozitif, kok formunda olan *Staphylococcus* sp. yaygın olarak kommensal ve patojenlerdir. İnsanlar ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olurlar. İnsanlarda iki ana tür vardır; *Staphylococcus epidermidis*, genellikle pigmentsiz, patojenik olmayan bir tür olup organizmada cilt veya mukoza zarlarında bulunurken, *Staphylococcus aureus* ise sarı pigmentli ve çıban, sivilce, pnömoni, osteomyelit, menenjit, artrit de dâhil olmak üzere klinik enfeksiyonlara sebep olan mikroorganizmalar arasında üst sıralarda yer almaktadır (Bender ve diğerleri, 2019).

S. aureus'ta, bakteri hücrelerinin çevresinde koruyucu bir matris oluşumuna katkıda bulunan ve enfeksiyon bölgelerinde fagositoz aktivitelerini inhibe ederek kan plazma bileşenlerinin çökmesine neden olan, iki protein olan koagülaz ve topaklanma (clumping) faktörü virülans

faktörleri olarak bulunmaktadır. Bu virülans faktörlerinin yanında protein A yüzey proteini, patojenin immün sistem tarafından fark edilmesini engelleyen bir yüzey proteini olarak karşımıza çıkmaktadır. *S. aureus* ayrıca α -hemolizin (kan hücrelerini lize eder), enterotoksin B (gıda zehirlenmesine neden olur) ve toksik şok sendromu toksini-1 gibi birçok güçlü ekzotoksin üretir (Bender ve diğerleri, 2019). *S. aureus*, neredeyse tüm konak dokularını enfekte edebilen, ciddi morbidite ve mortaliteye neden olabilen bir bakteridir. Kullanılan antibiyotiklere dirençli patojenler arasında hastane enfeksiyonunun en sık nedenlerinden biri olan *S. aureus*, yaygın bir antimikrobiyal direnç göstermektedir (Ford, Hurford ve Cassat, 2021). Popülasyonun %60'ı geçici olarak, %30'u ise kalıcı olarak kolonizedir. Hem MSSA (metisiline duyarlı *S. aureus*) hem de MRSA (metisiline dirençli *S. aureus*), hastane enfeksiyonlarıyla ilişkili bir patojendir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteoartiküler enfeksiyonlar, tıbbi cihaz ilişkili enfeksiyonlar, pnömoni, endokardit ve bakteriyemiye sebep olan önemli bir patojendir. MRSA, tüm β -laktam antibiyotiklere (beşinci kuşak sefalosporinler hariç) dirençlidir (Tahaei ve diğerleri, 2021).

MRSA enfeksiyonunun küresel insidansı yüksek seviyelerdedir. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 80.000 vaka bildirilmekte ve dünyanın çeşitli bölgelerinde son yıllarda, özellikle Hindistan'da MRSA görülme sıklığında artışlar rapor edilmiştir. Prevalansı ve çoklu antimikrobiyal direnci göz önüne alındığında, MRSA kontrol edilmesi zor bir patojen olmaya devam edebilir. Dünya sağlık örgütü'nün 2017 yılında yayınladığı acil yeni antimikrobiyal ajan geliştirilmesi gereken mikroorganizmalar listesinde ise, MRSA'nın yüksek önemde ve 2. öncelikli grupta yer aldığı görülmektedir (Çizelge 2.5). Dünya Sağlık Örgütü'nün son yayınladığı küresel antimikrobiyal direnç raporunda ise Türkiye'de tespit edilen *S. aureus* suşlarında, metisiline olan direnç %31,5 olarak bildirilmiştir.

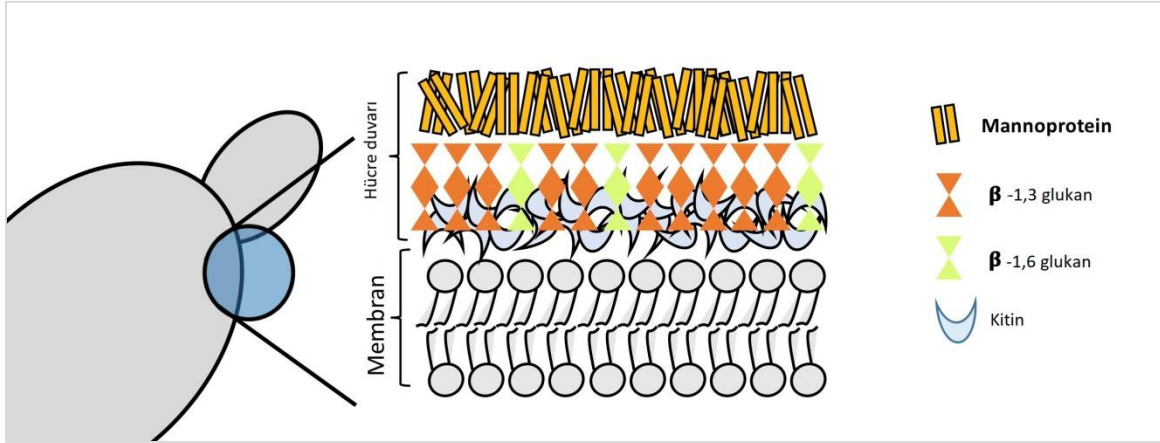
Bacillus cereus (B. cereus)

Bacillaceae familyasında yer alan ve spor oluşturma özelliği gösteren önemli iki türden biri olan *B. cereus*; Gram pozitif, aerobik veya fakültatif bir mikroorganizmadır. (Bender ve diğerleri, 2019). *B. cereus*, *B. cereus sensu lato* olarak bilinen ve *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus sitotoksikus* ve *Bacillus toyonensis* ile birlikte yeni tanımlanmış birkaç bakteriyi de içeren bir gruba aittir. *B. cereus* bakterileri, endospor

oluşturma kabiliyetleri ile zorlu ve normal şartlarda vejetatif formların yaşayamayacağı koşullarda varlıklarını sürdürerek hayatta kalabilme yeteneğindeki mikroorganizmalardır. Bakteri sporlarında metabolik aktivite yoktur ve ısıya, soğuğa, kuruluğa, gama ışınlarına ve ultraviyole radyasyona karşı dirençlidir. Bu sporlar, ayrıca insan epitel hücrelerine yapışmayı da kolaylaştırırlar. *B. cereus* biyofilmleri ise abiyotik/biyotik yüzey ve dokularda oluşurken aynı zamanda yüzen zarlar olarak da görülmektedir. *B. cereus*, hemolizin BL (Hbl), non-hemolitik enterotoksin (Nhe), sitotoksin K, enterotoksin T (BcET), enterotoksin FM ve emetik toksin olmak üzere çeşitli toksinler ile proteazlar ve fosfolipazlar dahil olmak üzere birçok virülans faktörü üretir (Dietrich, Jessberger, Ehling-Schulz, Märklbauer ve Granum, 2021). *B. cereus*, gastrointestinal ve gastrointestinal olmayan hastalıklara sebebiyet vermektedir. Çoğunlukla gıda zehirlenmesi vakalarından sorumlu olan *B. cereus*, az pişmiş veya kontamine gıdaların tüketilmesi yoluyla bulaşabilir. *B. cereus* biyofilmlerinin katater ve hastane tekstilleri yüzeylerinde oluşması nedeniyle hastane kaynaklı bulaşmanın meydana geldiği de bildirilmiştir (Enosi Tuipulotu, Mathur, Ngo ve Man, 2021).

2.3.2. Mayalar ve bazı önemli maya enfeksiyonları

Mikroorganizmalar topluluğu içinde bakterilerle karşılaştırıldığında daha kompleks bir yapıda ve daha büyük olan, algler ve protistler ile birlikte Funguslar içerisinde yer alan mayalar, yine tek hücreli fakat ökaryotik mikroorganizmalardır (Madigan ve diğerleri, 2021). Fungal hücre duvarı, hücresel bütünlüğü ve canlılığı korumak için çok önemli bir role sahip temel bir yapıdır. Hücre duvarı, hücresel geçirgenliği kontrol ederek hücreyi ozmotik basınç ve mekanik stresten korumak gibi farklı biyolojik işlevlere sahiptir (Agustinho, Miller, Li ve Doering, 2018). Hücre duvarı, polisakkarit, protein, lipid ve pigmentlerden oluşur. Ayrıca, bazı duvar bileşenleri immünojeniktir yani enfeksiyon sırasında hücresel ve humoral tepkiyi uyarır. Hücre duvarı, glukanlar, kitin, kitosan ve glikosile edilmiş proteinlerden oluşan bir hücresel organeldir (Şekil 2.8) (Garcia-Rubio, de Oliveira, Rivera ve Trevijano-Contador, 2020).

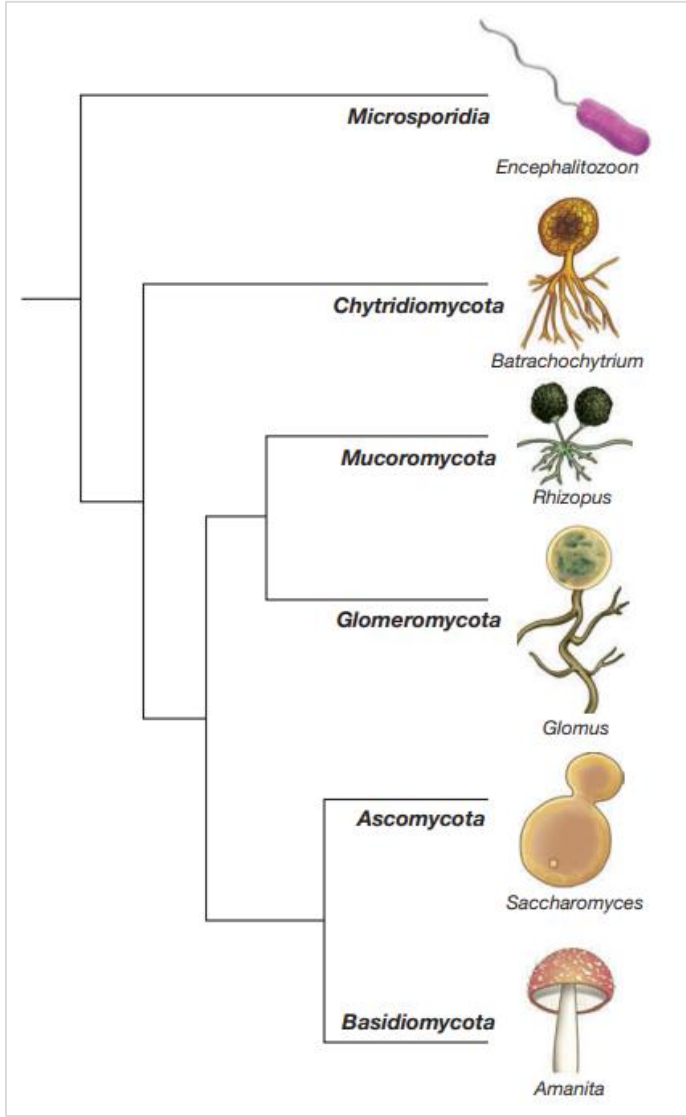


Şekil 2.8. *Candida albicans* hücre duvarı ve zarı (Garcia-Rubio ve diğerleri, 2020)

Ascomycetes olarak da adlandırılan *Ascomycota*, mantarların en büyük ve en çeşitli grubudur ve *Candida*, *Saccharomyces* gibi mayalardan, *Aspergillus* gibi filamentler halinde büyüyen küflere kadar uzanır (Şekil 2.9) (Madigan ve diğerleri, 2021).

Candida albicans (C. albicans)

Debaryomycetaceae familyasında bulunan *C. albicans*, insanlarla kommensal olarak yaşayabilmektedir (Madigan ve diğerleri, 2021). Patojen olarak kabul edilmekle birlikte insanların %80'i asemptomatik taşıyıcı olarak karşımıza çıkmaktadır (Vila, Sultan, Montelongo-Jauregui ve Jabra-Rizk, 2020). Patojen olarak, ciddi ve sıklıkla ölümcül kandidiyasis enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. *C. albicans* doku ve implantlar gibi yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneği ile de karakterize edilmektedir (Lohse, Gulati, Johnson ve Nobile, 2018). *C. albicans*, AIDS hastaları, kanser hastaları ve organ nakli hastaları gibi özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde yüzeysel ve mukozal enfeksiyonlardan ciddi yaygın ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına kadar çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Kandidiyasis genellikle ergosterol biyosentezini engelleyen azol ilaçları ile tedavi edilir. Flukonazol, geniş bir antifungal spektrum ve düşük toksisite özelliklerinden dolayı *C. albicans* enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte flukonazol, büyümeyi inhibe eden fakat öldürmeyen bir etkiye sahiptir, bu nedenle flukonazol direncinin gelişmesine neden olabilen fungistatik bir ilaçtır (Lu, Shrivastava, Whiteway ve Jiang, 2021).



Şekil 2.9. Fungi 16S rRNA gen ağacı (Madigan ve diğerleri, 2021)

2.4. Antimikrobiyal Maddeler

Antimikrobiyal ajanlar bakteriyel hastalıklarının yanı sıra, virüs, mantar, protozoa ve helmintler sebebiyle ortaya çıkan enfeksiyonları tedavi etmek için de kullanılır (Abushaheen ve diğerleri, 2020). Antibiyotikler, doğal olarak oluşan mikrobiyal ürünlerdir; Sülfonamidler, kinolonlar, nitrofuranlar ve imidazoller gibi sentetik bileşikler ise kemoterapötik ajanlar olarak anılmaktadır. Bununla birlikte, bazı antibiyotikler sentetik olarak üretilebilirken diğerleri doğal olarak oluşan bileşiklerin (yarı sentetik antibiyotikler) kimyasal manipülasyonunun ürünleri olduğundan, ayırım tam olarak tanımlanmamıştır (Török ve diğerleri, 2017). Günümüzde antibiyotik terimi, sistemik enfeksiyonu tedavi etmek için kullanılan ajanları (esas olarak antibakteriyel ajanlar) tanımlamak için genel bir

şekilde kullanılmaktadır. Topikal tedavi veya çevresel dekontaminasyon dışında kullanılamayacak kadar toksik olan antimikrobiyal maddeler ise antiseptikler veya dezenfektanlar olarak adlandırılmaktadır (Greenwood ve diğerleri, 2012).

2.4.1. Antibakteriyel maddeler

Antibakteriyel maddeler, etki mekanizmalarına göre temel olarak 5 başlıkta incelenmektedir. Bu etki mekanizmaları Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde benzer prensiplere dayanmaktadır (Çizelge 2.3).

Hücre zarı sentezini etkileyen antibiyotikler

Polimiksin molekülüleri, hücre dışı zarından ve hücre duvarından sitoplazmik zara yayılarak, zarın bütünlüğünü bozar ve dengesizleştirir. Bu durum sitoplazmanın hücre dışına sızmasına neden olarak hücre ölümüyle sonuçlanır. Gram pozitif hücre duvarındaki kalın peptidoglikan tabaka bu molekülülerin geçişini zorlaştırdığı için Gram negatif bakteriler üzerinde daha etkilidir (Bender ve diğerleri, 2019; Török ve diğerleri, 2017).

Hücre duvarına etki eden antibiyotikler

Hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotikler, peptidoglikan sentezini veya çapraz bağlanmayı bloke ederek etki etmektedir. Büyüme aşamasındaki bakterilere karşı daha aktiftirler ve bakterisit etkileri vardır (Török ve diğerleri, 2017).

Gram negatif bakterilerde β - laktam antimikrobiyaller, hücreye dışı zardaki porin kanallarından girerek, sitoplazmik membran yüzeyindeki penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanır. Bu, zayıflamış veya kusurlu hücre duvarları sentezine sebep olur ve hücre lizisine yol açar (Török ve diğerleri, 2017).

Gram pozitif bakterilerde, β -laktam antimikrobiyaller doğrudan hücre duvarına girer ve PBP'lere bağlanır, bu da hücre duvarlarının zayıflamasına ve hücre lizisine neden olur. Glikopeptitler, peptidoglikan öncülerinin D-ALA-D-ALA terminal ucuna bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe eder, böylece transglikosidaz ve transpeptidazların etkisini inhibe eder (Bender ve diğerleri, 2019)

Protein sentezine etki eden antibiyotikler

Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler, rRNA'nın iki alt biriminden (30S ve 50S) oluşan bakteriyel ribozomların bu alt birimlerine bağlanarak etki mekanizması oluştururlar. Tetrasiklinler; 30S ribozomal alt birimine bağlanarak, transfer RNA'nın (tRNA) bağlanmasını ve amino asitlerin protein zincirine eklenmesini bloke ederken, bakteriyostatik etki oluştururlar (Abushaheen ve diğerleri, 2020).

Aminoglikozitler de 30S ribozomal alt birimine bağlanır ve onun haberci RNA'ya (mRNA) bağlanmasını önler. Aminoglikozitler ayrıca mRNA'nın yanlış okunmasına da neden olarak yanlış amino asidin eklenmesine veya amino asitlerin birbiriyle bağlantı kurma yeteneğinde etkiye neden olabilir. Bu iki mekanizma birleşik olarak bakterisit etki yaratır. Makrolidler ve linkozamidler, 50S ribozomal alt birimine bağlanır ve büyüyen protein zincirinin sonlanmasına neden olarak bakteriyostatik etkiyi sağlarlar. Kloramfenikol, 50S ribozomal alt birimine bağlanır ve amino asitlerin büyüyen zincire bağlanmasına müdahale eder. Aynı zamanda bakteriyostatiktir. Linezolid (bir oksazolidinon), 50S alt biriminin 23S ribozomal RNA'sına (rRNA) bağlanır ve protein sentezi için gerekli olan 70S başlatma kompleksinin oluşumunu engeller ve bakteriyostatik etkiyi oluşturur (Bender ve diğerleri, 2019; Török ve diğerleri, 2017).

Nükleik asitleri etkileyen antibiyotikler

Florokinolonlar, DNA giraz enzimini bloke ederek DNA sentezine etki eder. Bu enzim DNA'ya bağlanır ve DNA sarmalının gevşemesine neden olarak yapıda kırılmalar sağlar. Florokinolonlar, DNA giraz-DNA kompleksine bağlanır ve kırık DNA ipliklerinin hücreye salınmasına sebep olarak hücre ölümüne neden olurlar (Abushaheen ve diğerleri, 2020).

Antimetabolitler

Sülfonamidler, nükleik asitlerin sentezi için önemli olan folik asit sentezinde yer alan temel bir metabolit olan Para-aminobenzoik asit (PABA) ile yapısal analoglardır ve dihidropteroat sentetaz enzimi için PABA ile rekabet eder. Trimetoprim ise, folik asit sentez yoluna etki ederek dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder. Hem trimetoprim hem de sülfonamidler bakteriyostatiktir. Birlikte kullanıldıklarında, folik asit sentez yolunun bloke olmasına neden

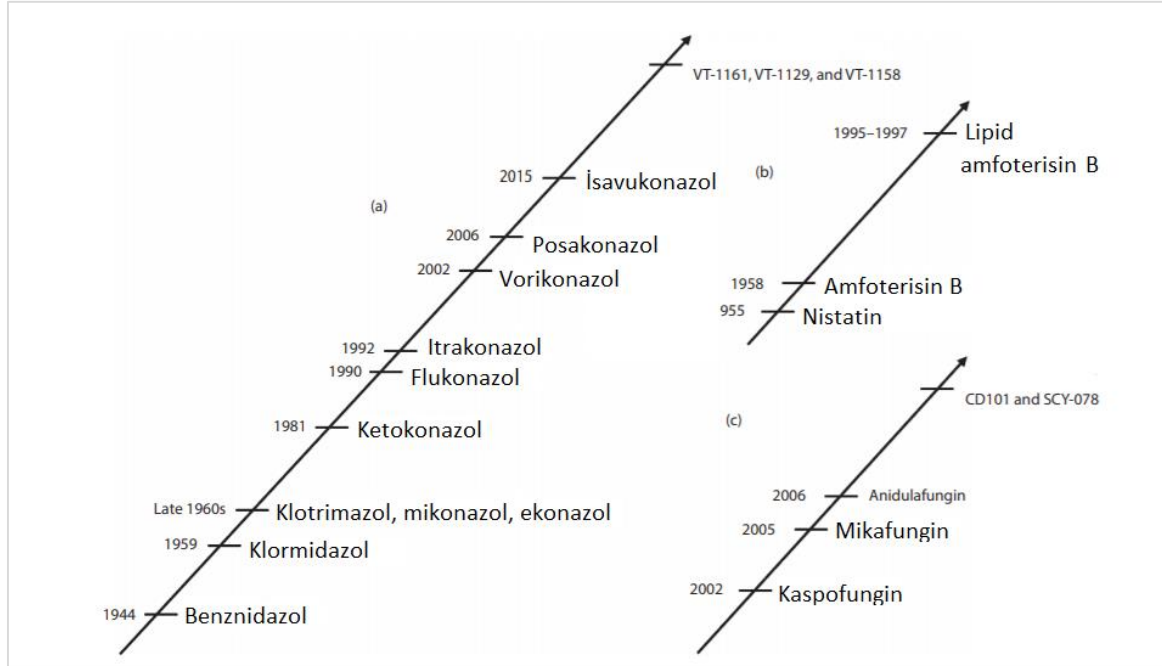
olurlar ve sinerjik bir etki yaratırlar (Abushaheen ve diğeri, 2020; Bender ve diğeri, 2019).

Çizelge 2.3. Antibiyotiklerin sınıflandırılması (Begum, Begum, Rahman ve Khan, 2021)

Sınıf	Etki Alanı	Örnek
Beta-laktamlar	Hücre duvarı sentezi	Penisilin, Sefalosporin, Monobaktam ve Karbapenemler
Makrolidler	Protein sentezine etki	Eritromisin, Azitromisin, Klaritromisin
Tetrasiklinler	Protein sentezine etki	1.nesil: Tetrasiklin, Klortetrasiklin, Oksitetrasiklin ve Demeklosiklin 2.nesil: Doksisiklin, Lymesiklin, Meklosiklin, Metasiklin, Minosiklin ve Rolitetrasiklin 3. nesil: Tigesiklin
Kinolonlar	DNA replikasyonu ve transkripsiyon	Sinoksasin, Norfloksasin, Ofloksasin, Siprofloksasin, Temafloksasin, Sparfloksasin, Nalidiksik Asit, Enoksasin
Aminoglikozidler	Protein sentezine etki	Streptomisin, Gentamisin, Neomisin, Tobramisin ve Amikasin

2.4.2. Antifungal maddeler

Antifungal maddeler, fungusların neden olduğu hastalıkların tedavisinde geçtiğimiz yüzyıl boyunca büyük ilerlemeler kaydetmiştir (Şekil 2.10). Günümüzde kullanımda olan bir dizi antifungal ajan mevcuttur. Antifungal maddelerin sınıfları, etkileri ve örnekleri Çizelge 2.4’de gösterilmektedir (Grayson ve diğeri, 2017).



Şekil 2.10. Antifungal tedavide ilerlemeler (Ghannoum ve Perfect, 2019)

Çizelge 2.4. Antifungal madde sınıfları (Grayson ve diğerleri, 2017)

Sınıf	Etki Alanı	Örnek
Polienler	Hücre zarı	Amfoterisin B, Nistatin, Natamisin
Azoller	Ergosterol sentezi	Klortrimazol, Ketokonazol, Flukanozol, Mikonazol, İtrakonazol, Posakonazol, Ravukonazol, Vorikonazol, İsavukonazol, Albakonazol
Ekinokandinler	Hücre duvarı	Kaspofungin, Mikafungin, Anidulafungin
Topikal antifungaller	Enzim inhibisyonu, Ergosterol sentezi	Tolnaftat, Amororlfin, Siklopiroks, Rilopiroks
Alilamin ve Benzilamin Türevleri	Ergosterol sentezi	Terbinafin, Butenafin, Naftifin
Diğer Antifungaller	Nükleik asit ve protein sentezi, hücre zarı ve duvarı	Flusitozin, Griseofulvin, Haloprogin

2.4.3. Antimikrobiyal direnç

İnsanların tarih boyunca mikroorganizmalarla, özellikle de bakterilerle uzun süreli bir savaş içinde oldukları ve mikroorganizmaların dünyanın dört bir yanında önemli morbidite ve mortaliteye neden olduğu bilinmektedir. 1940'ların başlarında penisilin, bakteriler için etkili bir antimikrobiyal ajandı ve birçok bulaşıcı hastalığa karşı önemli ölçüde kullanılmaktaydı.

Fakat aşırı ve yanlış penisilin kullanımı ile beraber bakteriler çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmeye başlamış ve etkinlik git gide azalma göstermiştir (Abushaheen ve diğerleri, 2020).

Antimikrobiyal direnç, mikroorganizmaların bir maddeye karşı dirençli olmaları veya başta duyarlı oldukları antimikrobiyal maddeye direnci olarak tanımlanır (Puglia ve Gualerzi, 2017). Antimikrobiyal ilaçların yanlış uygulanması ve antimikrobiyal direncin küresel yayılımı ile artan bu durum, öncelikle bağışıklık sistemi düşük olan hastaları etkilemektedir. Antimikrobiyal direnç, dünyada tüm ülkelerin sağlık sektörlerine yüksek maliyetler getirmekte ve birçok araştırmacı antimikrobiyal direnci azaltmanın yollarını aramaktadır (Jindal, Pandya ve Khan, 2015).

Dünyada insanların antibiyotik direncinden daha fazla haberdar edilmesi ve toplumdaki (hastanelerde olduğu gibi) hijyen standartlarının önemli ölçüde artırılması gerekmektedir. Ayrıca, direncin temellerini ele alan araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır ve bu da antibiyotikle ilişkili mikroorganizmalarda direnç mekanizmasının anlaşılmasını içerir (Puglia ve Gualerzi, 2017).

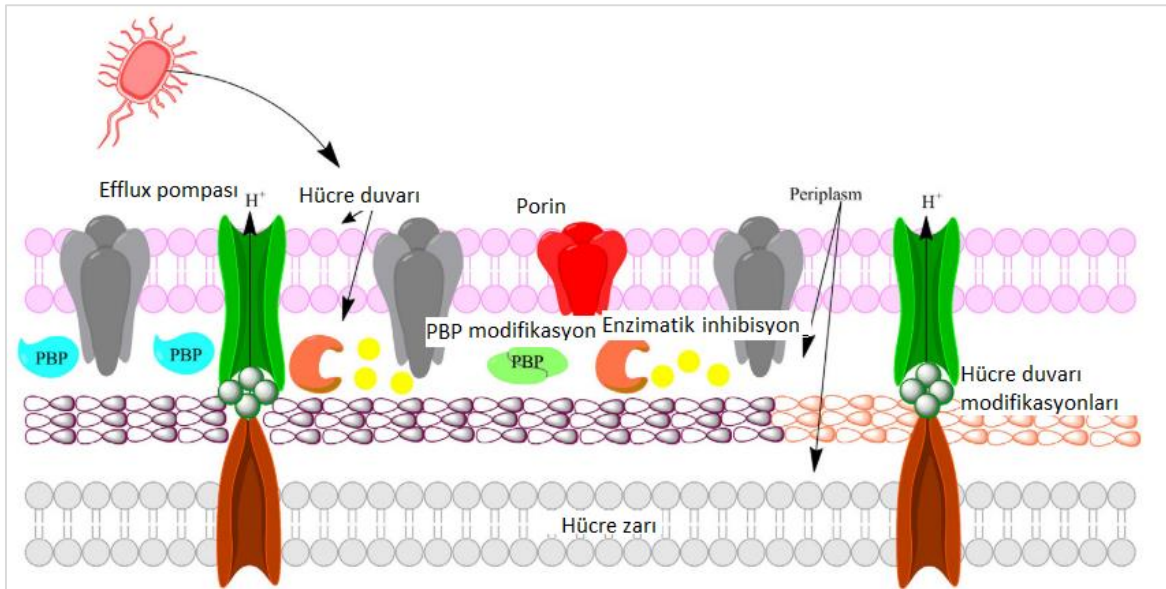
Antimikrobiyal ilaçlara direnç farklı şekillerde olabilir. Bazı antimikrobiyal ilaçlar bakterinin genetik özelliği sebebiyle bakteri üzerinde bir etki yaratmaz; bu nedenle bu özellik bakterinin “doğal direnci” olarak tanımlanır. Bakterilerdeki genetik özelliklerin mutasyona uğraması sonucu oluşur (transpozon veya plazmid DNA). Dirençli bakteriden konjugasyon, transformasyon ya da transdüksiyon ile meydana gelen direnç ise kazanılmış dirençtir. Oksijen basıncındaki değişiklikler, dokulardaki pH değişiklikleri ve antimikrobiyal ajanın enfeksiyon bölgesine ulaşamaması gibi nedenlerle ortaya çıkan direnç ise in vitro ortamda sonuç vermiş fakat in vivo ortamda sonuç alınamayan “çevre ve koşullara bağlı” dirençtir (Kayaş, 2019).

Bakterilerde birçok direnç mekanizması vardır. Bunlardan en sık gözlenenler; enzimatik modifikasyon/inhibisyon, penisilin bağlayıcı protein (PBP) modifikasyonları, porin mutasyonları, efflux pompaları ve hedef değişikliklerdir (Şekil 2.11) (Begum ve diğerleri, 2021; Puglia ve Gualerzi, 2017).

Enzimlerin modifikasyonu/antibiyotiklerin inaktivasyonu hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde görülür. Enzimatik modifikasyonda, bakteriyel enzimler antibiyotikleri asetilasyon, adenilasyon veya fosforilasyon ile kimyasal olarak değiştirerek, antimikrobiyal ajanları etkisiz hale getirir ve hedef bölgeye bağlanmasını engeller. Makrolidlerde fosforilasyon, aminoglikozitlerde ise aminoglikozid modifiye edici enzimler ile asetilasyon, adenilasyon veya fosforilasyon meydana gelir. Beta laktam grubu antibiyotiklere karşı ise beta laktamaz enzimi ile beta laktam halkaları etkisiz hale gelir (Abushaheen et al. 2020; Begum et al. 2021; Christaki, Marcou, and Tofarides 2020).

Bir dış zar proteini olan porinlerde, porin genlerinin aşağı regülasyonu yani azaltılması, yapısal modifikasyonu ve fonksiyonel olarak işlevsiz hale getirilmesi/silinmesi gibi fonksiyonel modifikasyonlar ile antimikrobiyal ajanın hücreye girişi engellenir veya yavaşlatılır (Abushaheen ve diğerleri, 2020; Christaki ve diğerleri, 2020).

Efflux pompaları yani aktif akış pompaları ilacın hücre içinde birikmesine engel olmak amaçlı, ilacı sürekli hücre dışına atan sistemlerdir. Aktif pompa sistemleri azalid ve streptograminler, kinolonlar, 14 üyeli makrolidler, kloramfenikol ve β -laktamlara dirençte etkilidir ve genellikle kromozom ve plazmid kontrolündedir (Begum et al. 2021).



Şekil 2.11. Antimikrobiyal direnç mekanizmaları (Puglia ve Gualerzi, 2017)

Hedef yapısındaki değişiklikler, β -laktam, kinolon, glikopeptid, makrolid, tetrasiklin ve rifampisine direnç gelişmesinde önemlidir. Hedef bölgelerdeki değişiklikler: DNA girazdaki

topoizomeraz II ve topoizomeraz IV; kinolon direncini belirleyen bölgenin mutasyonları olarak gösterilebilir ve florokinolon direncine neden olur. Benzer şekilde kromozomlarda; penisilin bağlayan proteinlerde meydana gelen mutasyon sonucu antimikrobiyal ajan hedefine bağlanamaz (Abushaheen ve diğerleri, 2020).

Çizelge 2.5. Yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesi için DSÖ öncelikli patojenler listesi (DSÖ, 2017)

Öncelik Dercesi	Kritik	<i>Acinetobacter baumannii</i> , karbepenem-dirençli <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , karbepenem -dirençli <i>Enterobacteriaceae</i> , karbepenem -dirençli, GSBL-üreten
	Yüksek	<i>Enterococcus faecium</i> , vancomisin- dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> , metisilin- dirençli, vancomisin-orta duyarlı and dirençli <i>Helicobacter pylori</i> , klaritromisin - dirençli <i>Campylobacter</i> spp., florokinolon- dirençli <i>Salmonellae</i> , florokinolon - dirençli <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , sefalosporin- dirençli, florokinolon - dirençli
	Orta	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , penicilin - duyarlı <i>Haemophilus influenzae</i> , ampicillin- dirençli <i>Shigella</i> spp., fluoroquinolone- dirençli

2.4.4. Antifungal direnç

Viral ve bakteriyel enfeksiyonlarla karşılaştırıldığında daha az bir kitleyi etkiliyor olsa da fungal enfeksiyonlar özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda sıklıkla yüksek morbidite ve mortalite oranları ile ilişkilendirilmiştir. Öte yandan, mukozal ve sistemik enfeksiyonlar sıklıkla fırsatçı olarak değerlendirilir; bağışıklık azalması ve düşmesi sırasında ortaya çıkma eğilimindedir ve genellikle yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara yol açar. Bu fırsatçı organizmalardan en sık karşılaşılanlar; *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* ve *Cryptococcus neoformans*'tır. Bu patojenler; AIDS, diyabet, kistik fibrozis ve kanserli hastalar gibi bağışıklığı baskılanmış bireyleri hedef almaktadır. Ayrıca fungal enfeksiyonların insidansının bağışıklığı baskılanmış bireyler, organ nakilleri, otoimmün

bozukluklar ve karsinom sayısındaki artışla beraber artmakta olduğu gösterilmiştir. Bu enfeksiyonlarda, mortalite ve morbiditenin yüksek düzeyde seyretmesinin nedeni yanlış tanı, ilaç direnci ortaya ve etkili antifungal tedavinin gerçekleştirilememesi olarak gösterilebilir (Srinivasan, Lopez-ribot ve Ramasubramanian, 2014).

Antifungal direnç oluşmasında birçok farklı yol vardır. Bu yollar hücre içinde antifungal ajan birikimini azaltma yani arttırılmış akış etkisi, hedef enzimde modifikasyon, metabolik değişiklikler olarak özetlenmektedir. Çizelge 2.6’de ilaç grupları ve bu ilaç gruplarına karşı geliştirilen direnç mekanizmalarına örnekler verilmiştir (Costa-de-oliveira ve Rodrigues, 2020; Srinivasan ve diğerleri, 2014).

Çizelge 2.6. Antifungal direnç mekanizmalarına örnekler (Srinivasan ve diğerleri, 2014)

Sınıf	Örnek	Direnç mekanizması
Polienler	Amfoterisin B	İlacın hedefi olan ergosterol konsantrasyonunun azaltılması ve kompozisyonunda değişiklik.
	Natamisin	POL gen ailesinde değişiklik
Azoller	Flukanozol	İlaç taşıyıcıları ile ilacın dışarı atılması; ABC gen ailesi.
	İtrakonazol	İlaç hedefi bağlanmasını etkileyen Erg11p'ye amino asit ikamesi.
	Ketokonazol	İlacın etkisini azaltan Erg11p'nin aşırı ifadesi.
	Posakonazol	Erg3 alellerindeki mutasyon ile toksik sterol konsantrasyonundaki değişiklik.
Ekinokandinler	Kaspofungin	Fks1 ve Fks2 bağlama birimlerinde mutasyon.
Primidin analogları	5-Flusitozin	Sitozin permeaz ve deaminazda mutasyon.

2.5. Biyofilm

Biyofilmler, biyofilmi oluşturan aynı veya farklı mikroorganizmalar tarafından salgılanan hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşan matriste, homojen veya heterojen mikroorganizma popülasyonlarını içeren, tek veya çok katmanlı yapılardır (Gupta ve ark., 2016). Biyofilm oluşumu biyotik ve abiyotik olmak üzere geniş çapta birçok yüzeyde görülebilmektedir. Biyofilmin, temel olarak mikroorganizmalar ile EPS’den oluştuğu ve bu yapının organik karbonun %50-90’ını barındıran bir matristen oluştuğu kabul edilmiştir. Glikopeptit, lipidler ve lipopolisakaritler gibi polimerler bir yapı iskelesi oluşturur ve biyofilmi bir arada tutar yani EPS ana yapısı polisakaritlerden oluşur. Bunun dışında proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi diğer biyomoleküller de EPS’de bulunur (Cortés ve ark., 2011). EPS’nin viskoelastik yapıda bir hidrojel formunda olması biyofilmin mekanik

strese dayanıklı olmasını sağlar. Böylece biyofilm ortamı bakterileri dış saldırılara, yırtıcı saldırılara ve antibiyotikler gibi kimyasal işlemlere karşı korur. Mikroorganizmalar, EPS matrisinde bulunan besin ve suyu kullanmaktadır. Matrikste bulunan su, EPS'deki hidrofilik polisakkaritlerle hidrojen bağı yaparak da verimli bir şekilde tutulur. Mikroorganizmalar, biyofilm içeriğini modifiye ederek farklı çevresel koşullara uyum sağlayabilirler (Kostakioti, Hadjifrangiskou ve Hultgren, 2013).

Mikrobiyal biyofilmlerin kanalizasyonun saflaştırılmasında, petrol ile kirlenmiş suların arıtılmasında ve nitrifikasyon sürecinde rol oynadığı, bazı toprak çeşitlerinde verimliliği ve bitki büyümesini artırdığı bildirilmiştir. Polimerler üzerindeki biyofilmin, polimerin bozunmasını verimli bir şekilde arttırdığı bildirilmiştir. Bu yararlı etkilerin yanı sıra biyofilmlerin ciddi zararlı etkileri vardır. Biyofilmler, çeşitli enfeksiyonlarda ve tıbbi cihazların yüzeyinde bulunabilir (Vasudevan, 2014). Biyofilm, bakteriler arasında gen transferini kolaylaştırarak virulent suşların sayısında artışa neden olabilir. Ayrıca, biyofilm tabakası içindeki mikroorganizmalar, gen ifadesi ile yüzey antijenindeki hızlı değişiklikler sayesinde bağışıklık sisteminden kaçabilir. Bununla birlikte inflamatuvar sitokinler EPS yapısını çok etkilemeyeceğinden, biyofilmi bozmak yerine çevre dokularda hasara yol açabilir. Benzer şekilde antimikrobiyal maddelerin EPS içerisine geçişi zor olacağı için biyofilm yapısındaki mikroorganizmalar etkilenmeden kalabilir (Hall ve Mah, 2017).

2.5.1. Biyofilm oluşumu ve çeşitleri

Biyofilm oluşumu temel olarak 5 aşamada ele alınmaktadır. Geri dönüşümlü tutunma, geri dönüşümsüz tutunma, planktonik hücrelerin EPS üreterek yüzeye bağlanması, koloni oluşturma ile biyofilm yapısının olgunlaşması ve olgun biyofilmdeki hücrelerin göçü basamaklarından oluşmaktadır (Şekil 2.12) (Esperanza Cortés ve diğerleri, 2011; Gupta ve diğerleri, 2016; A. Temel ve Erač, 2018).

Geri dönüşümlü tutunma

Biyofilm oluşumunun ilk aşamasıdır. Bu aşamada tek tek yani planktonik olan mikroorganizmalar ile yüzey arasında zayıf bir etkileşim oluşmaktadır. Bu zayıf etkileşimler genellikle elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals bağları gibi

etkileşimleridir. Mikroorganizma ile yüzey arasındaki bağ kopabilir (Esperanza Cortés ve diğerleri, 2011; Gupta ve diğerleri, 2016; A. Temel ve Eraç, 2018).

Geri dönüşümsüz tutunma

Mikroorganizmalar biyofilm oluşumunun ikinci aşamasını; planktonik formdayken tutunacakları yüzeyin besin ve su açısından yeterli olması durumunda, güçlü (dipol-dipol etkileşimleri, kovalent bağlar ve hidrojen bağları) bağlarla yüzeye tutunmaları ile gerçekleştirirler (Esperanza Cortés ve diğerleri, 2011; Gupta ve diğerleri, 2016; A. Temel ve Eraç, 2018).

Planktonik hücrelerin EPS üreterek yüzeye bağlanması

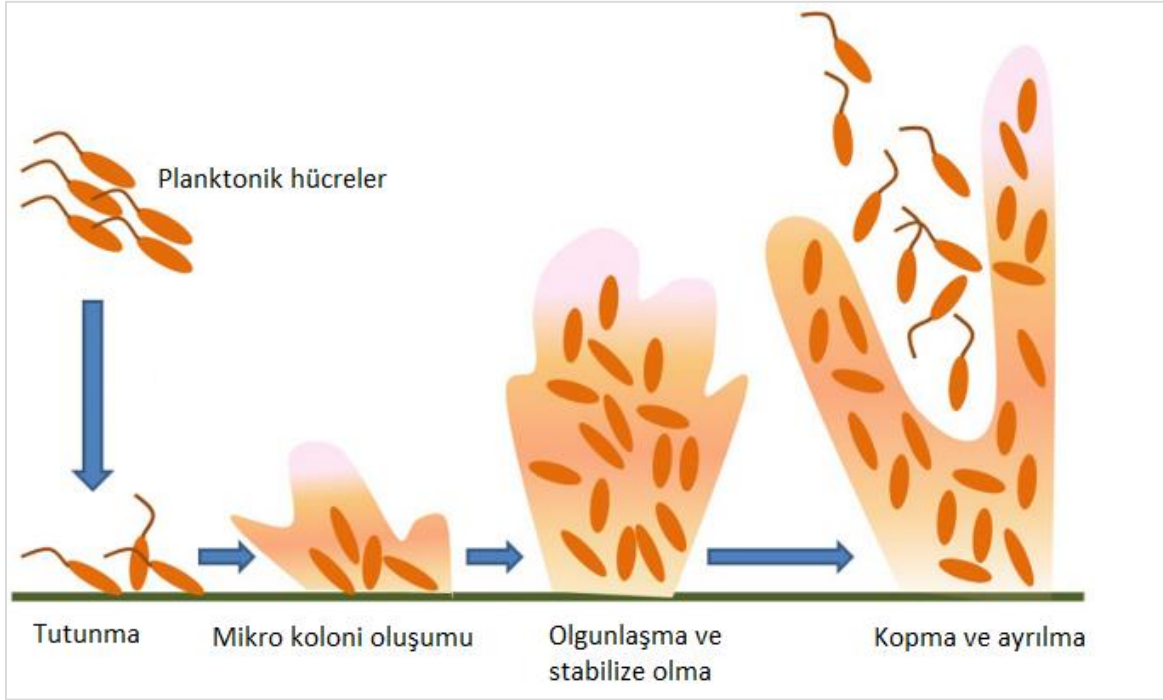
Mikroorganizmaların birbirleriyle iletişim kurarak EPS tabakasını oluşturmaya başlamaları aşamasıdır. Bu aşamada biyofilm tabakası erken olgunlaşmada ve ince bir tabaka halindedir (Esperanza Cortés ve diğerleri, 2011; Gupta ve diğerleri, 2016; A. Temel ve Eraç, 2018).

Koloni oluşturma ile biyofilm yapısının olgunlaşması

EPS tabakasının artması ile mikrokolonilerin oluşması aşamasıdır. Bu aşamada biyofilm yapısındaki besin ve atık kanalları organizasyonu gerçekleşir. Olgunlaşma ile biyofilm tabakası da kalınlaşmıştır. Tabakanın alt kısımlarında kalan mikrokoloniler ile üst kısımdakiler arasında metabolik farklılıklar görülebilir (Esperanza Cortés ve diğerleri, 2011; Gupta ve diğerleri, 2016; A. Temel ve Eraç, 2018).

Olgun biyofilmdeki hücrelerin göçü

Oksijen, su ve besin yetersizliği gibi zorlayıcı koşullar sebebiyle mikrokoloniler veya planktonik formlar halinde yer değiştirme ya da biyofilm tabakadan kopmaların gerçekleştiği aşamadır (Esperanza Cortés ve diğerleri, 2011; Gupta ve diğerleri, 2016; A. Temel ve Eraç, 2018).



Şekil 2.12. Biyofilm oluşum aşamaları

2.5.2. Biyofilm bağlantılı enfeksiyon hastalıkları

Enfeksiyon hastalıklarında biyofilmler, mikroorganizmaların patojenitesini artırabilir, EPS tabakası nedeniyle yok edilmekten koruyabilir ve tedavinin başarısız olmasına neden olabilir. Biyofilmler hücreleri UV radyasyonu, pH stresi, kimyasal maruziyet, fagositoz, dehidrasyon, mekanik stres ve antibiyotikler gibi saldırılara karşı korur (Gupta ve diğerleri, 2016).

Günümüzde tıbbi cihaz (Yapay kalp kapakçıkları, koroner stentler, kataterler, implantlar, ortopedi ve diş protezleri) ve biyomateryal kullanımı yaygınlaşmıştır. Biyofilmler bu tedavi araçları üzerinde veya tedavi gören konakçı hücre ve mukozal bölgelerde oluşarak; kronik yara enfeksiyonları, kistik fibrozis, endokardit gibi pek çok farklı hastalıkta rol oynamaktadır.

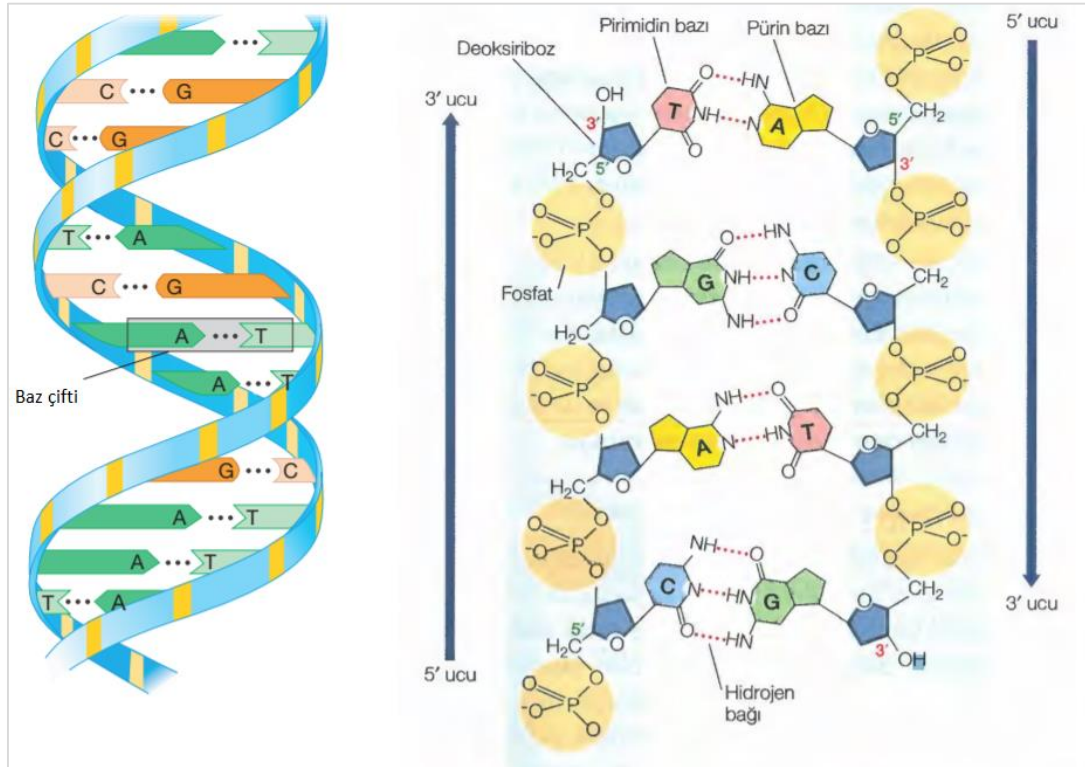
2.6. Türkiye’de ve Dünyada Enfeksiyon Hastalıkları

Antimikrobiyal direncin artması hem bölgesel hem ulusal hem de uluslararası düzeyde endişe yaratıcı tüm dünyayı etkileyen bir problemdir. Antimikrobiyal direncin tamamen ortadan kaldırılması gibi bir sonuç yaratmak mümkün değilken, akılcı ve bilinçli

antimikrobiyal kullanımıyla antimikrobiyal direnç gelişimi kontrol altına alınabilir. Antimikrobiyal maddelerin kullanımına yönelik, ulusal ve uluslararası politikalar, düzenlemeler ve iyileştirmeler, sürdürülebilir sürveyans sistemlerinin yani veri toplanması, analiz edilmesi, değerlendirilmesi ve raporlandırılmasının, antimikrobiyal direnç ile mücadelede temel unsur olduğu ortadadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), üye ülkelerde belirlenmiş mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların antimikrobiyallere karşı direnç sıklığının izlendiği ulusal antimikrobiyal direnç sürveyans sistemlerinin kurulmasını önermektedir.

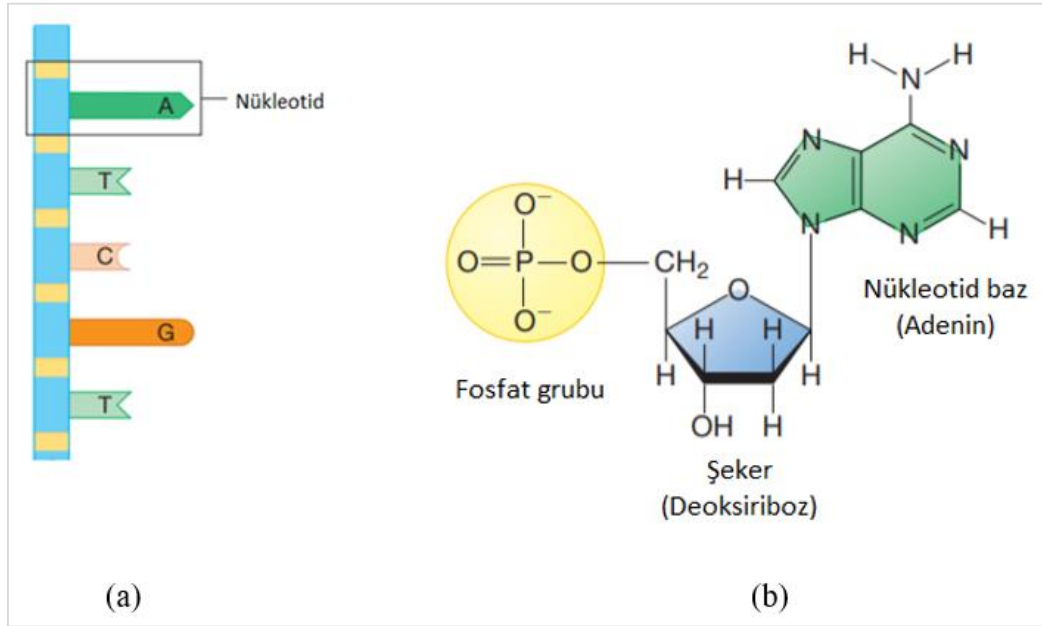
2.7. DNA'nın Genel Yapısı

Deoksiribonükleik asit (DNA), hücrede genetik bilginin kopyalanmasını, taşınmasını ve gelecek nesillere aktarılmasını sağlayan en önemli yapıdır (Bayrakçı ve Yılmaz, 2019). Canlılarda, kalıtsal bilgiyi taşımasıyla beraber bu bilginin replikasyon ve transkripsiyon yoluyla protein ve enzim gibi hayati önem taşıyan moleküllerin sentez mekanizmalarında kullanılmasında görevli olması sebebiyle de DNA yaşamın devamı için önemli moleküldür (Alotaibi ve Momen, 2020; Yılmaz, 2021).



Şekil 2.13. DNA super sarmalı yapısı ve hidrojen bağları (Sadav, Hillis, Heller ve Berenbaum, 2014)

DNA; sitozin (C), adenin (A), timin (T) ve son olarak guanin (G) olmak üzere dört azotlu bazdan oluşan bir kod şeklinde saklanır. Adenin ve guanin çift halkasal yapı içerip pürin; timin ve sitozin tek halka içerip pirimidin pirimidin olarak adlandırılır (Şekil 2.14) (Alotaibi ve Momen, 2020).



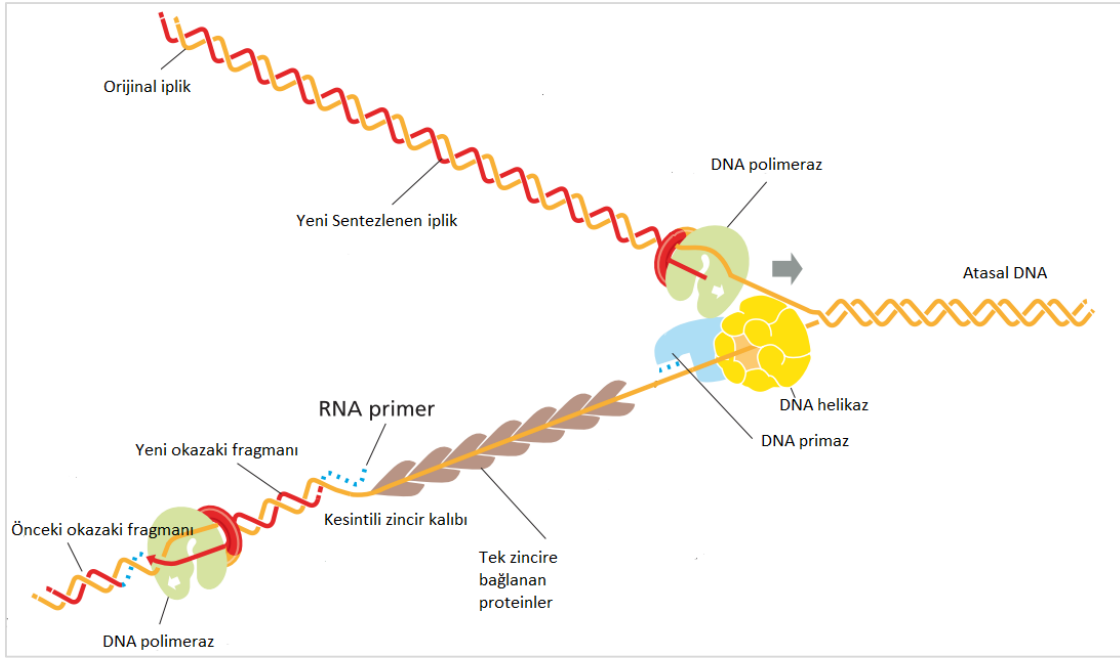
Şekil 2.14. Polinükleotid (a) ve nükleotid (b)

DNA'nın kimyasal yapısına bakıldığı zaman nükleotit monomerlerinin bir araya gelmesiyle oluşmuş lineer bir polimer olduğu görülmektedir. Fosfat grubu, şeker (5 karbonlu deoksiriboz şekeri) ve bir adet organik baz birlikte nükleotid olarak adlandırılır. Nükleotidler iki uzun zincir halinde düzenlenirler ve böylece çift sarmal olarak bilinen bir spiral oluştururlar (Şekil 2.13).

DNA replikasyonu

DNA replikasyonu, orijinal DNA molekülünden iki adet çift sarmal DNA üretilmesi işlemidir; her DNA sarmalı, nükleotit dizisinde üretilmiş olduğu orijinal DNA çift sarmalıyla aynı olur. Replikasyonda; her yeni DNA molekülünde bir iplik orijinal DNA'dan gelir, diğer iplik ise yeni sentelenmiş iplik olarak çift sarmalın yapısında bulunur. Bu model, yarı korunumlu bir modeldir (Şekil 2.15).

DNA replikasyonu DNA helikaz enziminin çift sarmalı ayırması ile başlar. Daha sonra DNA polimeraz enzimi ile orijinal DNA zincirinin 3' ucuna nükleotidlerin eklenmesi ile bir iplikte; okazaki fragmanlarının eklenmesi ile parçalı olarak diğer iplikten DNA replikasyonu devam eder. Okazaki fragmanları primaz enziminin katalizlenmesi ile oluşur. Okazaki fragmanları ile oluşan kesintili zinciri ise DNA ligaz enzimi bağlayarak kesintisiz zincir haline getirir.



Şekil 2.15. DNA replikasyonu (Alberts ve diğerleri, 2019)

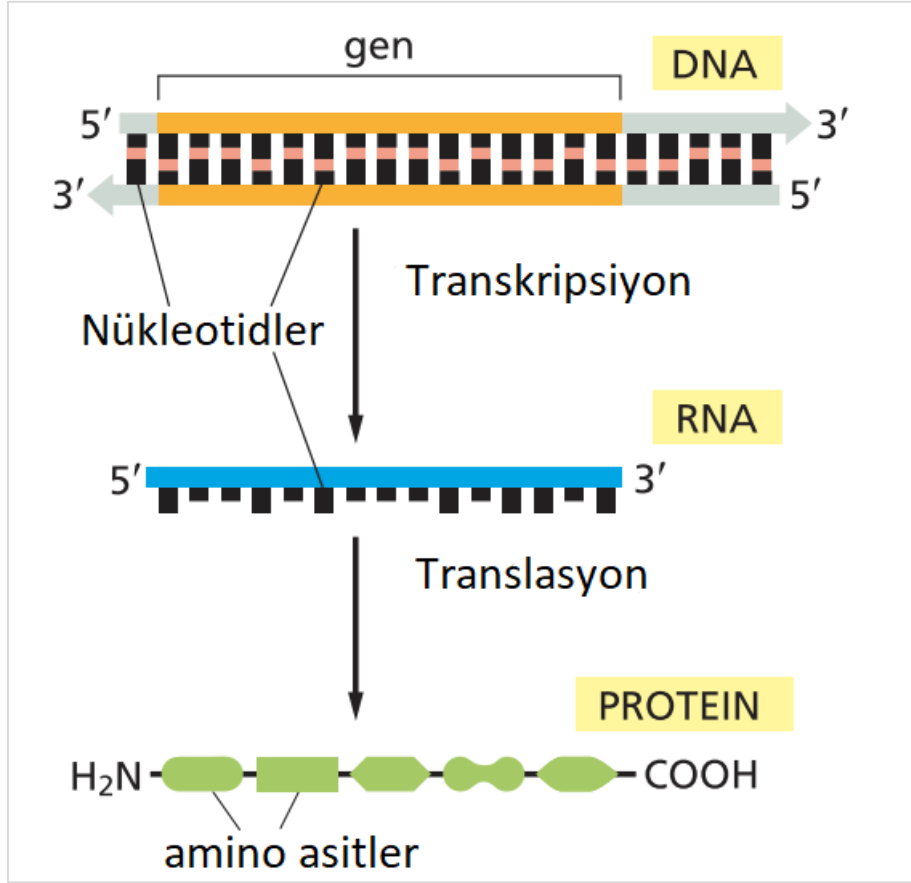
DNA polimeraz, 107 nükleotid çiftinde bir hata yapar. Bu çok düşük bir hata oranıdır fakat yine de hataların ortadan kaldırılmaması mutasyon birikimine sebep olur. Mutasyonların birikmemesi DNA polimeraz enziminin kontrolleri ile engellenir. DNA polimeraz ispat okuması ve polimerizasyon ile hataları sentez sırasında eş zamanlı olarak düzeltir. DNA topoizomerase replikasyonda rol oynayan bir diğer enzimdir. Bu enzim DNA helikazın açmış olduğu ve açılmaya devam edecek olan çift zincir tarafındaki sıkı yapının gevşemesine yardımcı olur. Ayrıca DNA kelepçesi denilen yapı ile de DNA polimerazın iplik üzerinden ayrılması ve tekrar sarmal yapıya dönüştürülmesi sağlanır (Weinberg, 2014).

DNA onarımında, depürinasyon ve deaminasyon sıklıkla DNA hatalarını ortadan kaldırmak için aktive edilen mekanizmalardandır. Replikasyon sırasında yanlış baz eşlemesi ile nükleotidlere yer değişikliği ya da delesyon gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Fakat nükleazlar, DNA polimerazlar ve ligazlar bu hasarları eşzamanlı olarak ortadan

kaldırabilirler. Bu onarımlar kanser oluşumunu önlemede kilit rol oynamaktadır. Özellikle ailesel kanserlerde bu hasarların engellenememesi, sıradan bir hücrel mutasyona oranla çok daha yüksek oranda karsinogeneze neden olacak sonuçlar doğurabilir. Bazen hücrenin DNA replikasyonu ve onarım süreçleri başarısız olur ve bir mutasyona yol açar. DNA dizisindeki bu kalıcı değişikliğin derin sonuçları olabilir. Yalnızca tek bir nükleotid çiftini etkileyen bir mutasyon, değişiklik DNA dizisinde hayati bir konumda meydana gelirse, organizmanın uygunluğunu ciddi şekilde tehlikeye atabilir. Her proteinin yapısı ve aktivitesi, amino asit dizisine bağlı olduğundan, dizilimi değiştirilmiş bir protein, zayıf işlev görebilir veya hiç çalışmayabilir (Alberts ve diğerleri, 2019).

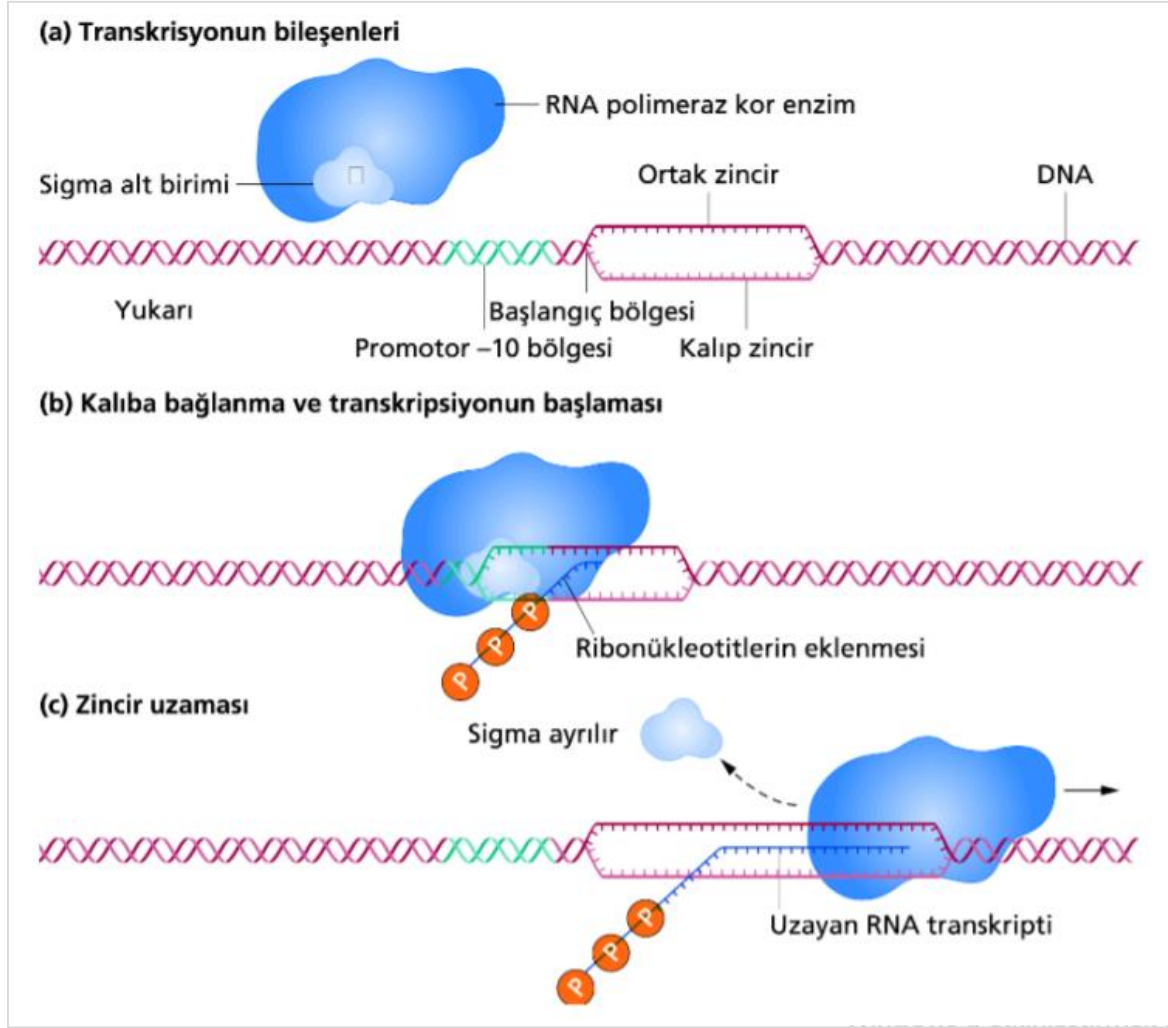
Transkripsiyon ve translasyon

Transkripsiyon DNA molekülündeki bilginin RNA nükleotid dizisi haline çevrilmesi yani DNA'dan RNA sentezlenmesi işlemidir. Hücre içi gen ekspresyonunun ilk basamağıdır. Transkripsiyon sonucunda, ikili sarmal DNA'nın bir dizisinin karşılığı olan mRNA sentezlenir. Transkripsiyon, DNA çift sarmalının kısa bir bölgesinin açılması ile başlar. DNA ipliklerinden biri RNA sentezi için kalıp iplik olarak kullanılır. DNA replikasyonundaki gibi sentezin temeli tamamlayıcı baz eşleşmelerine dayanır. Transkript her defasında bir nükleotid boyu kadar uzatılarak elongasyon (uzama) devam eder (Şekil 2.16) (Alberts ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.16. Transkripsiyon ve translasyon (Alberts ve diğerleri, 2019)

RNA sentezi, RNA polimeraz enzimi tarafından katalizlenir. RNA polimeraz, genin başlangıcında yer alan promotör bölgesine bağlanınca o genin transkripsiyonu başlar. RNA transkripsiyonunun başladığı ilk baza başlama noktası adı verilir. RNA polimeraz sonlandırma dizisine (terminatör) gelinceye kadar senteze devam eder. Promotörden terminatöre kadar olan kalıp DNA dizisi transkripsiyon birimi olarak adlandırılır. Bir transkripsiyon birimi birden fazla gen içerebilir. Başlama noktasından önceki diziler upstream, sonraki diziler downstream olarak adlandırılır (Reece, Taylor, Simon ve Dickey, 2021).



Şekil 2.17. Prokaryotik transkripsiyon basamakları (Alberts ve diğerleri, 2019)

Prokaryotlarda birbirine komşu birkaç gen aynı promotoru paylaşabilir; ökaryotlarda ise her genin kendi promotoru vardır ve promotor genellikle kodlayıcı bölgeden önce yer alır. Prokaryotik RNA polimerazdan farklı olarak ökaryotik RNA polimeraz promotor dizisini kendi başına tanımaz. Ökaryotik genler intronlar denilen ve kodlayıcı olmadığı düşünülen bazı dizileri de içerir. İtronlar arasında ise ekzonlar yani ifade edilen bölgeler yer alır. Pre-mRNA olarak adlandırılan birincil RNA transkripti hem intronları hem de ekzonları içerdiği halde, olgun mRNA translasyona uğramak üzere çekirdekten çıkmadan önce intronlar çıkarılarak ve kalan ekzonlar uç uca bağlanır. Transkribe edilen pre-mRNA'nın 5' ucuna bir G şapkası eklenir. G şapkası kimyasal olarak değişikliğe uğratılmış bir guanozin trifosfat (GTP) molekülüdür. Bu şapka mRNA'nın translasyona uğramak üzere ribozoma bağlanmasını mümkün kılar ve mRNA'yı ribonükleazların parçalamasına karşı korur. Transkripsiyon sonunda pre-mRNA'nın 3' ucuna bir poli A kuyruğu eklenir. Ökaryotlarda, pre-mRNA'nın 3' ucunda, son kodondan sonra genellikle bir poliadenilasyon dizisi

(AAUAAA) bulunur. Bu dizi pre-mRNA'yı kesecek enzim için bir sinyal görevi yapar. Bu kesimden hemen sonra bir başka enzim pre-mRNA'nın 3' ucuna 100 ila 300 tane adenin nükleotid (poli A kuyruğu) ekler. Bu kuyruk mRNA'nın hem çekirdekten çıkmasına yardımcı olur hem de kararlılığı açısından önemlidir (Şekil 2.17) (Alberts ve diğerleri, 2019).

Translayon, mRNA'nın tRNA ile proteine tercüme edilmesidir. Özgül bir aminoaside bir aminoasıl-tRNA sentetaz bağlanarak tRNA antikodonu sayesinde mRNA üzerindeki tamamlayıcı kodon ile hizalanır. Ribozom (rRNA ve protein) bu eşleşmeyi kolaylaştırır. Ribozomlar translayonun başlama, uzama ve sonlanma aşamalarında koordinatör olarak yer alır (Reece ve diğerleri, 2021).

Başlama aşamasında; küçük ribozomal altbirim mRNA üzerindeki tanıma bölgesine bağlanır, metiyonin ile yüklü tRNA, AUG kodonuna bağlanarak başlama kompleksini tamamlar ve son olarak büyük ribozomal altbirim başlama kompleksine katılır (Sadav ve diğerleri, 2014).

Uzama aşamasında; yeni gelen tRNA'nın antikodonu A bölgesindeki kodona bağlanır, büyük alt birim üzerindeki peptidil transferaz aktivitesi ile peptid bağları oluşumunu katalizler ve böylece P bölgesindeki amino asit yani metiyoninin yeni proteinin N-terminali haline gelir. İlk tRNA metiyoninden ayrıldıktan sonra E bölgesine hareket eder ve ribozomdan ayrılarak bir başka metiyonin ile yüklenmek üzere tekrar sitozole döner. Bu sırada iki amino asit içeren peptid taşımakta olan tRNA, ribozomun mRNA üzerinde 5' - 3' yönüne bir kodon kadar hareket etmesiyle P bölgesine kaydırılır. Bu basamaklar tekrarlandıkça uzama aşaması devam eder (Sadav ve diğerleri, 2014).

Sonlanma aşamasında ise UAA, UAG ya da UGA sonlanma kodonlarından birine gelinmesiyle sentezi tamamlanmış olan polipeptidin ribozomdan ayrılması ile tamamlanır (Sadav ve diğerleri, 2014).

2.7.1. DNA- ilaç etkileşim mekanizmaları

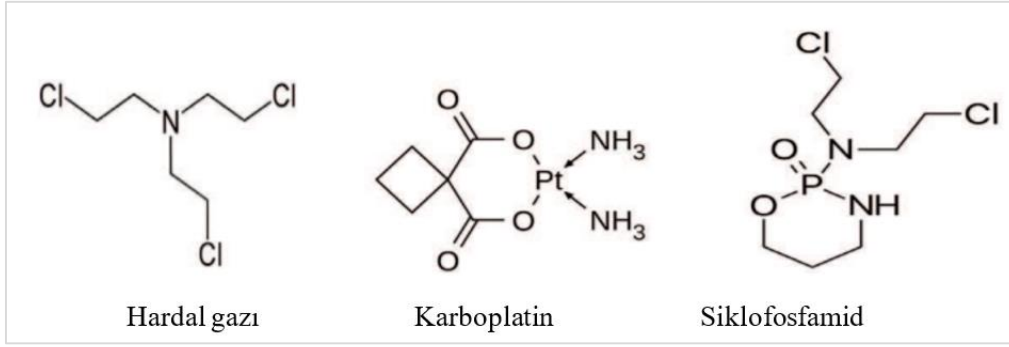
DNA'nın kimyasal bazlı moleküllerle etkileşime girmesi ve bu etkileşimlerin belirlenmesi, kanser ve enfeksiyon hastalıkları başta olmak üzere birçok DNA temelli hastalıkta yeni

ilaçların geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle transkripsiyon ve replikasyona etki ederek hücre fonksiyonunu düzenlemek için DNA'yı hedef olarak seçmek mantıklı ve hızlı sonuç alabilme potansiyeli taşımaktadır (Yılmaz, 2021). DNA'ya bağlanma özelliği olan birçok molekül replikasyon aşamalarında, kanserli hücre gelişimini inhibe ederek göstermektedir. Ayrıca bu moleküller transkripsiyon sırasında proteinlerin ve enzimlerin biyolojik sentezinde etki edebilmektedirler. Bazı küçük moleküllerin DNA ile bağlanma mekanizması üzerine yapılan çalışmalar, geçtiğimiz yıllarda hız kazanarak önem kazanmıştır. DNA'nın yapısal özelliklerini, genlerde meydana gelen mutasyonları, hastalıkların kökenlerini, ve ilaçlarının etki mekanizmalarını anlamak ve böylece hastalıklar ile mücadelede ilerlemek için yeni ilaçlar geliştirilmesi öncelikli alanlar arasına girmiştir (DeVita, Lawrence ve Rosenberg, 2019).

Kanser tedavisinde kullanılan birçok ilaç DNA molekülleri ile etkileşime girerek DNA-ilâç komplekslerini oluşturur. İlaç molekülleri, DNA ile kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla etkileşime geçebilir. DNA molekülünde bu etkileşimler; iki baz çifti arasında (tam interkalasyon), ana olukta, küçük olukta, dış tarafta sarmal yapıda ve elektrostatik bağlama olarak gerçekleşebilir (Yılmaz, 2021).

Kovalent bağlanma

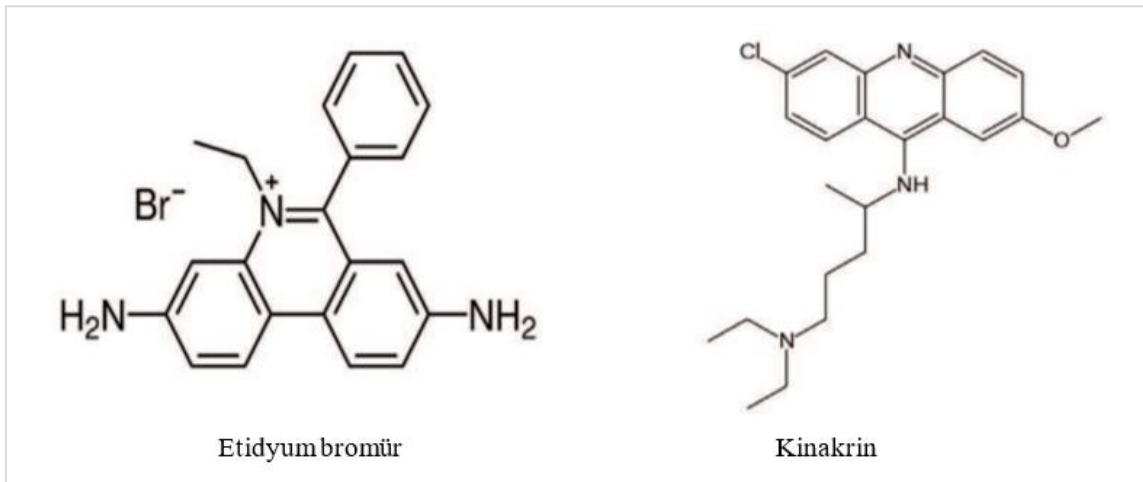
Kovalent bağlanma geri dönüşümsüz bir yoldur ve DNA işleyiş sürecinin tümünü etkileyerek hücreyi ölüme götürmektedir. Kovalent bağlayıcıların en büyük avantajı ise yüksek bağlanma kuvvetidir. Sisplatin antikanser ilaç olarak kullanılan en iyi bilinen ve en sık kullanılan kovalent bağlayıcıdır. Bununla birlikte, sisplatin ile kemoterapi tedavisinde sisplatin sadece kanser hücrelerine değil, aynı zamanda sağlıklı hücrelere de etki ederek öldürdüğü için özel olarak kanser hücrelerini hedefleyen yeni sisplatin analoglarını tasarlamak önemlidir. Ayrıca, çoğu kanser hücresi sisplatine karşı duyarsızdır veya direnç geliştirir. Bu nedenle, daha geniş bir sitotoksite aralığına sahip sisplatin analoglarının geliştirilmesine de ihtiyaç duyulmaktadır. Kovalent bağlanma mekanizmasına sahip olan ilaçlara örnek olarak; hardal gazı, karboplatin ve siklofosfamid verilebilir (Şekil 2.18) (Alotaibi ve Momen, 2020).



Şekil 2.18. Kovalent bağlanma mekanizmasına sahip olan bazı ilaçların moleküler formülleri (Alotaibi ve Momen, 2020)

Kovalent olmayan bağlanma

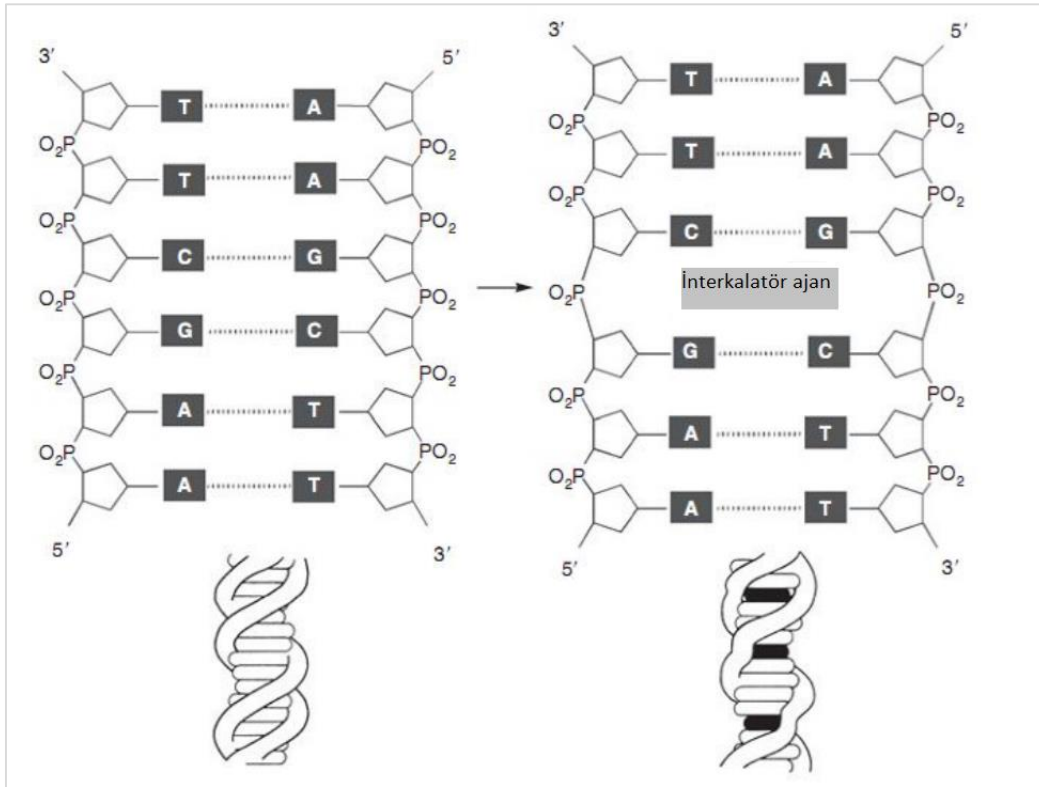
Kovalent olmayan DNA etkileşim ajanları (DNA interkalatörleri ve oluk bağlayıcılar) genellikle kovalent DNA eklentileri ve diğer DNA hasarları üreten ajanlardan daha az sitotoksik olarak kabul edilir. Kovalent olmayan bağlanma tipi tersine çevrilebilir kovalent bağlanarak etki eden ilaçlara göre daha az toksik etki gösterirler. Bununla beraber, kovalent olmayan DNA etkileşim ajanları, DNA’da konformasyonel ve yapısal değişikliklere yol açabilir, protein-DNA etkileşimini kesintiye uğratabilir, mitokondriyal DNA fonksiyonlarında değişikliklere ve DNA zincir kırılmalarına yol açabilir. Kovalent bağlanmayan mekanizmaya sahip ilaçlara etidyum bromür ve kinakrin örnek olarak verilebilir (Şekil 2.19) (Alotaibi ve Momen, 2020).



Şekil 2.19. Kovalent olmayan bağlanma mekanizmasına sahip olan bazı ilaçların moleküler formülleri (Alotaibi ve Momen, 2020)

İnterkalasyon

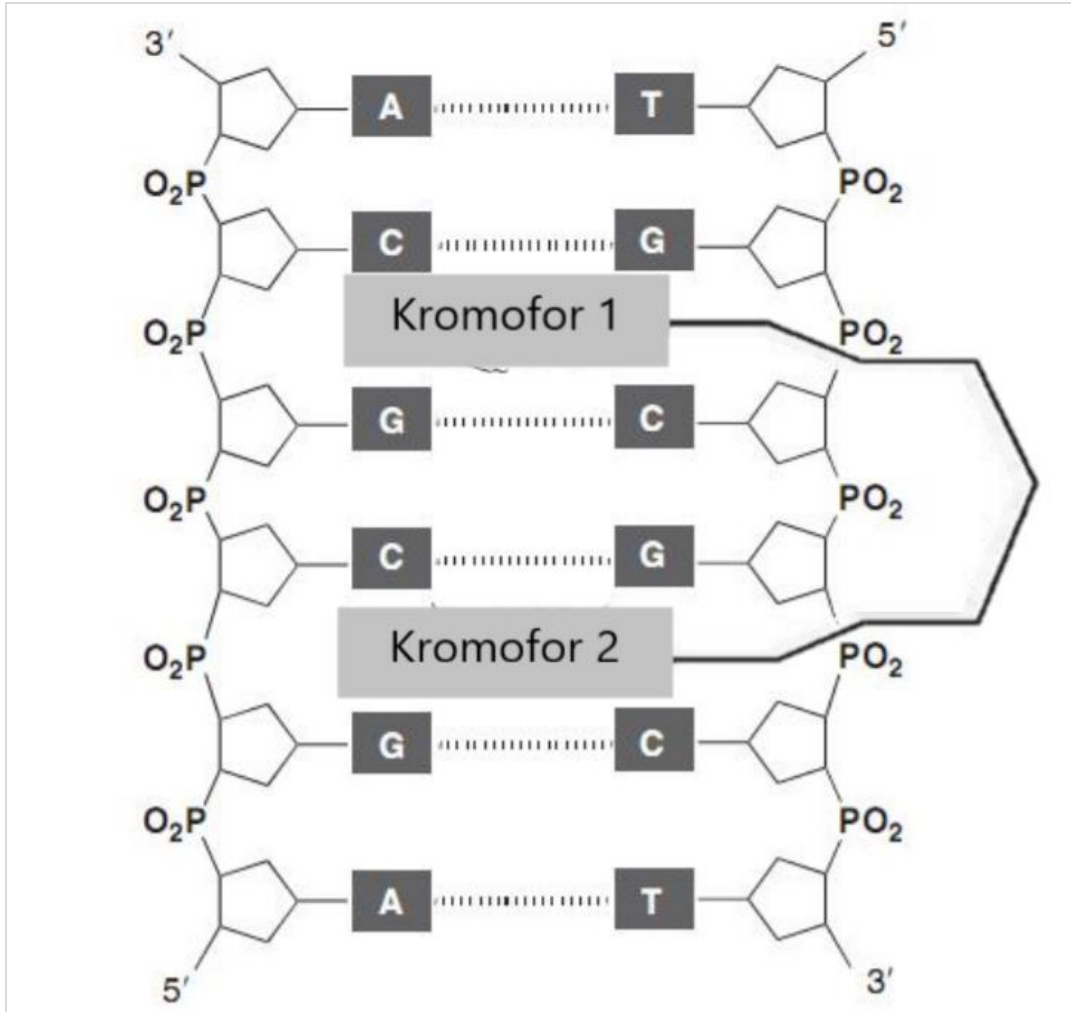
Birçok antikanser ilacı, düzlemsel aromatik veya heteroaromatik halkalı içeren bileşiklerin, DNA sarmalının eksenine dik olarak bitişik baz çiftleri arasına yerleşmesi yoluyla DNA ile etkileşime girer. Birçok tipik interkalasyon ajanı, elektromanyetik spektrumun UV-görünür bölgesinde ışığı emen üç veya dört kaynaşmış halka içerdiğinden, genellikle kromoforlar olarak bilinirler. Kromoforun yanı sıra, interkalatör molekülündeki diğer süstitüentler bağlanma mekanizmasını, ligand-DNA kompleksinin geometrisini ve varsa dizi seçiciliğini büyük ölçüde etkileyebilir (Şekil 2.20) (Karimi Goftar, Kor ve Kor, 2014).



Şekil 2.20. İnterkalatör ajanın DNA'yı deforme etme mekanizması (Karimi Goftar ve diğerleri, 2014)

İnterkalatörler klinik kullanımda; antimikrobiyal, antiparazitik ve antikanser ajanlar olarak kullanılmaktadırlar. Antimikrobiyal ajanlara örnek olarak proflavin verilebilir. Proflavine dezenfektan ve antibakteriyel ajan olarak kullanılmıştır ve halen topikal antiseptik olarak kullanılmaktadır. Bu ajanın, viral RNA'ya interkalasyon yeteneği nedeniyle HIV tedavisinde de umut verici bir aday olduğu bildirilmiştir (DeJong, Chang, Gilson ve Marino, 2003). Trapaflavin, etakridin ve akriflavin de antibakteriyel ajan olarak kullanılmıştır. Berberis

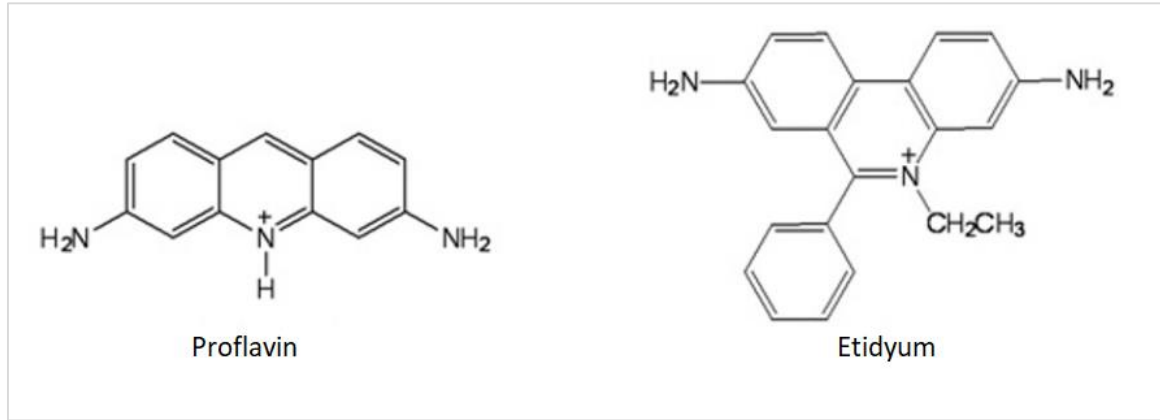
bitkisinden elde edilen analkaloid olan Berberin maddesi ise antifungal, antibakteriyel ve antiviral özelliklere sahiptir. Mepakrin (veya kinakrin), sıtma tedavisinde kullanılan bir akridin türevi olarak antiparazitik interkalatörlere örnek olarak verilebilir. Mepakrin, proflavin ve etidyum bromür gibi akridin türevleri de tripanozomiyaz tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 2.21) (Mukherjee ve Sasikala, 2013).



Şekil 2.21. Bisinterkalatör ile DNA'nın şematik olarak etkileşimi (Karimi Goftar ve diğerleri, 2014)

İnterkalatörlerin, antikanser özellikleri genel olarak 3 mekanizma ile incelenir. Bunlardan ilki olan DNA'ya bağımlı enzimlerin inhibisyonunda enzimin DNA ile etkileşime girememesi için bağlanma bölgelerini bloke eder ve enzim inhibe olur. Böylece DNA replikasyonu ve transkripsiyonu engellenmiş olur. Antrasiklin antibiyotikleri ve amsakrin topoizomeraz II inhibitörü ve eliptisin ve analogları topoizomeraz II, DNA polimeraz ve RNA metilazı inhibe eder (DeVita ve diğerleri, 2019). Proflavine ve aktinomisin D DNA

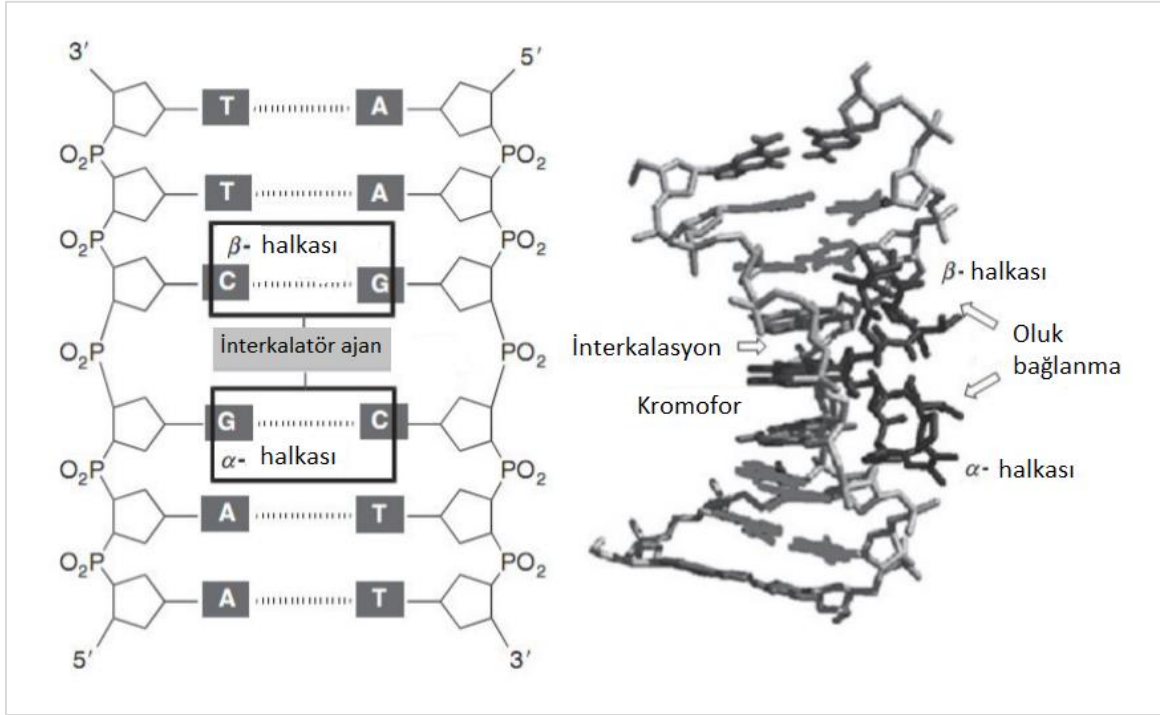
polimeraz inhibitörü iken, etidyum bromür, aktinomisin D ve proflavin polimeraz inhibitörleri olarak interkalasyon etkisi gösterirler (Mukherjee ve Sasikala, 2013). İkinci bir mekanizmaya sebep olan interkalatörler, çerçeve kayması mutasyonlarına sebep olmaktadır. DNA'daki bir bazın veya daha fazla bazın silinmesi veya eklenmesi ile çerçeve kayması mutasyonları ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyon ise mRNA sentezi sırasında hatalı kodon okunmasına ve mutasyona uğramış bir proteinin sentezlenmesine sebep olmaktadır. Etidyum bromür, proflavin ve akridinin çerçeve kayması mutasyonlarına neden olduğu bilinmektedir (Şekil 2.22) (DeVita ve diğerleri, 2019). Üçüncü bir mekanizma olarak incelenmekte olan DNA'ya hasar vererek interkalatör olan Doksorubisin ve analogları ise DNA interkalasyonu ile birlikte DNA'nın tek iplikli kırılmasına neden olur ve ayrıca DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu inhibe eder (Mukherjee ve Sasikala, 2013).



Şekil 2.22. Proflavin ve etidyum interkalatörlerinin kimyasal yapısı (Mukherjee ve Sasikala, 2013)

Oluk bağlanma

Oluk bağlanmada, interkalasyonun aksine, DNA'da büyük konformasyonel değişiklikler olmamaktadır. Büyük ve küçük oluğa, ligandlar, baz çiftlerindeki fonksiyonel gruplar ile hidrojen bağı yaparak bağlanırlar. Küçük moleküller genellikle DNA'daki küçük oluğa van der Waals etkileşimi ve hidrojen bağları ile bağlanmaktadır. Oluk bağlayıcı moleküllerin genellikle adenin-timin (AT) bakımından zengin dizilere özgü olmasına rağmen bazıları guanin-sitozin (GC) bakımından zengin dizileri de tercih edebilmektedir (Alotaibi ve Momen, 2020).



Şekil 2.23. Kovalent olmayan DNA etkileşim ajanlarının DNA'ya bağlanma bölgeleri (Karimi Goftar ve diğerleri, 2014)

2.8. Kanser

Kanser, kontrol edilemeyen bir şekilde bölünen, normal vücut dokusuna yerleşme ve tahrip etme kabiliyetinde olan anormal hücrelerin gelişimi ile karakterize çok sayıda hastalığı ifade etmektedir (Fior ve Zilhao, 2019). Kanser, özünde genetik bir hastalık olduğu ve somatik hücrelerin genomunda moleküler değişikliklerin birikmesinin, kanser ilerlemesinin temeli olduğu konusunda geniş bir fikir birliği vardır (DeVita ve diğerleri, 2019). Kanser, tek bir mutasyonla ortaya çıkmadığı, bir ömür boyu devam eden DNA'da hasara sebep olan mutajenlere maruz kalma sonucu uzun bir süreç sonunda birçok genin mutasyona uğraması ile oluştuğu da bilinmektedir (Fouad ve Aanei, 2017).

2.8.1. Kanser biyolojisi

Kanser tüm organlarda farklı oranlarda ve sıklıkta gelişebilir. Kanser, işleyişini anlayabilmek için neoplazi, benign ve malignant (malignancy) terimlerini açıklamak gerekmektedir. Neoplazi, kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize olan hastalık sürecidir ve bir tümörün (neoplazma) oluşmasına neden olur. "İyi huylu (benign)" olarak adlandırılan tümör çeşitleri, dokular arasında geçiş yapmaz ve çevre dokuları istila etmezler.

Bununla beraber vücutta bazı işlevleri engelleyebilecekleri için yine de uzaklaştırılmaları gerekir. Kanser (malignancy veya malignant tümör) ise çevre dokuları istila eden ve genellikle daha uzak dokuları da etkileyen neoplazmiyi ifade eder. Buna göre genellenmiş 3 kanser gurubu vardır. Bunlardan ilki olan karsinomalar, akciğer ve meme gibi epitel dokudan köken alan kanserlerdir. Kemik iliğinde, lenfatik sistemde ve periferik kanda ortaya çıkan tümörler (lösemi ve lenfoma gibi) hematopoetik veya lenfoid kanserleri ifade ederken, sarkomalar; kas, bağ doku ve sinir dokularında ortaya çıkan tümörler olarak gruplandırılır (Rosenberg ve Rosenberg, 2013).

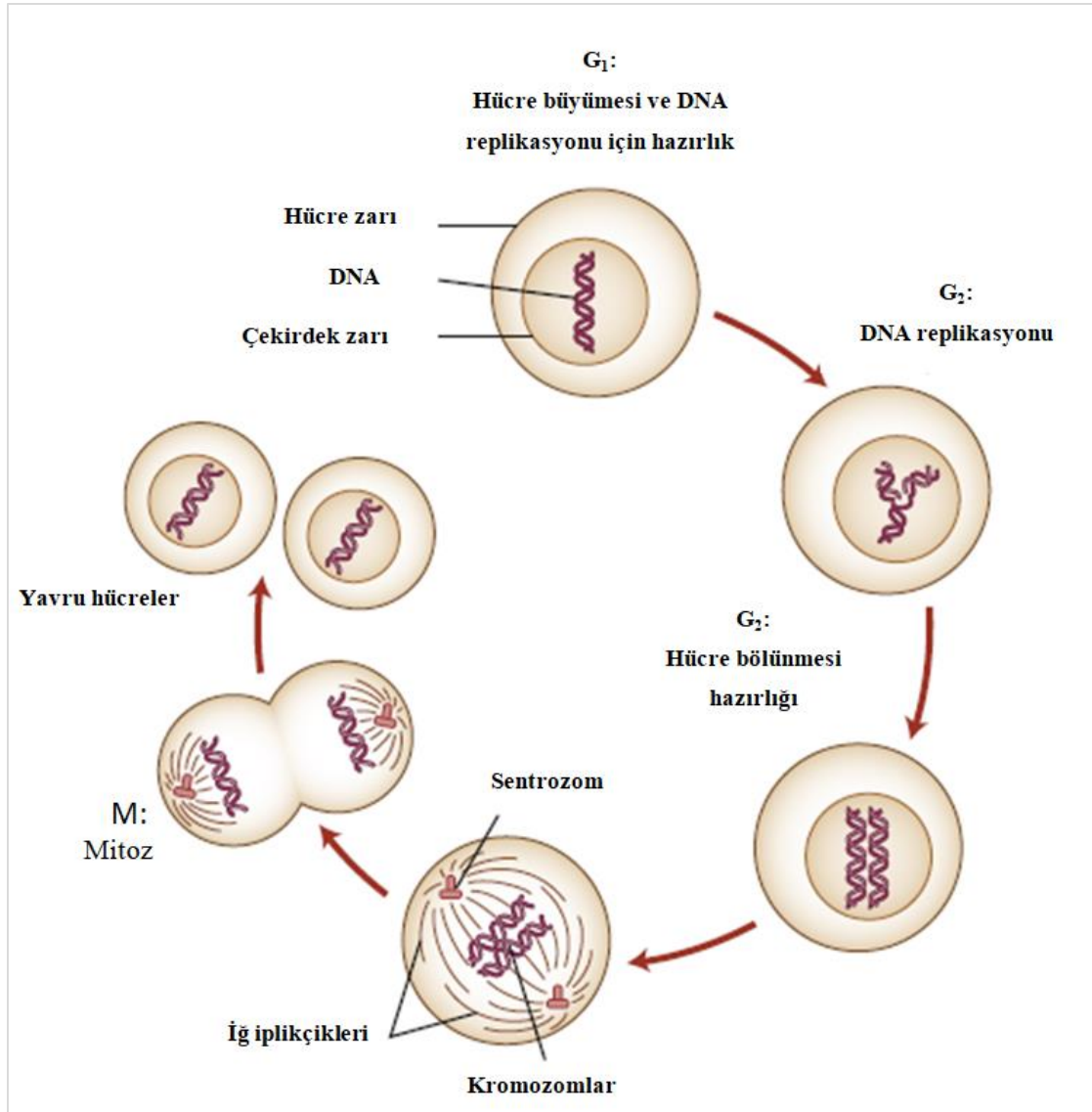
Hücre döngüsü

Ökaryotik hücrelerde, yeni DNA'nın replikasyonu veya sentezi, hücreyi bölünmeye hazırlamaya yarayan hücre döngüsüyle yakından bağlantılıdır. Hücre döngüsü, hücre bölünmesinin sadece uygun olduğunda gerçekleşmesini sağlamak için titizlikle düzenlenen bir dizi aşamadır. Hücre döngüsü bir daire olarak gösterilebilir. Dairenin M fazı, bir hücrenin, mitoz olarak da bilinen kısa bir hücre bölünmesi periyodu geçirdiğini ve ardından interfaz olarak adlandırılan uzun bir I (interfaz) fazını geçirdiğini gösterir. İnterfaz, hücrelerin besin aldıkları ve büyüdüğü, DNA'larını kopyaladıkları ve bölünmeye hazırlandıkları 3 aşamaya ayrılır. Büyüme fazı 1 (G1) olarak adlandırılan birinci faz boyunca, proteinler sentezlenir ve hücresel bileşenler toplanır. G1'in sonuna doğru, hücreler G0 adı verilen aktif olmayan, sakın bir faza girmeye mi yoksa DNA replikasyonunun S fazında senteze mi devam edeceğine karar verir. S fazına doğru ilerleyen hücreler, DNA'larını çoğaltmak için ayrılmak üzere hazırlanmalıdır. S evresine girdikten sonra, DNA doğrulanır ve bir sonraki evre için evreyi ayarlayarak G2, kopyalanan DNA'nın doğru ve tam olarak kopyalandığından emin olmak için kontrol edilir ve hücre hücre bölünmesi için gerekli proteinleri oluşturur. Her şey kontrol edildiğinde, hücre, hücrenin bölündüğü mitozun M fazına girer ve ardından döngü tekrar başlar (Şekil 2.24).

Hücre döngüsünün kontrolü

Hücre proliferasyonu, ökaryotik organizmaların büyümesi, gelişimi ve yenilenmesi için temel mekanizma olup aynı zamandada kanser oluşumuna sebebiyet veren bir mekanizmadır. Hücre bölünmesi, proteinler, metabolizma ve sinyaller ile hücre çoğalmasını mümkün kılmayı amaçlayan kontrol mekanizmaları içeren karmaşık bir etkileşimli ağ

tarafından düzenlenir. Hücrenin kontrol noktası adı verilen ve yalnızca her şeyin yolunda olduğunu belirledikten sonra bir aşamadan diğerine ilerlemesini sağlayan çeşitli mekanizmalar vardır. DNA replikasyonu ancak DNA hasar incelemesini geçerse gerçekleşir. Hasar tespit edilirse, bir dizi olay hücre döngüsünü durdurur. İlk olarak, bir proteinin (p53) seviyeleri ve aktivitesi artar, bu da p21 olarak adlandırılan bir proteinin üretimini artırır, bu da hasar, hücre onarım sistemleri tarafından ele alınana kadar S-faz replikasyonuna ilerlemesini önler. DNA hasarı düzeltilemeyecek kadar genişse, p53 kötü bir şekilde zarar görmüş DNA'lı bir hücrenin çoğalmasını önlemek için hücre ölümünü tetikler. Bununla birlikte, işlevsel p53'e sahip olmayan hücreler, tehlikeye atılmış DNA'larını çoğaltmaya ve çoğalmaya devam edebilir (Ahern, 2019).



Şekil 2.24. Hücre döngüsü aşamaları (Rosenberg ve Rosenberg, 2013).

Hücre döngüsünde, birçok molekülün koordinasyonunda; Siklin bağımlı kinazlar (CDK) - siklin kompleksleri, metabolik enzimler ve reaktif oksijen türleri (ROS) ana rolleri üstlenmişlerdir. Üstelik kanser oluşumu da hepsiyle ilişkilendirilmiştir (Diaz-moralli, Tarrado-castellarnau, Mirandave Cascante, 2013).

Serbest radikaller, ortaklanmamış elektron içermelerinden dolayı oldukça reaktiftirler. Oksijenden oluşan reaktif oksijen türleri, kısaca ROS'lar, en önemli serbest radikallerdir. ROS oluşumunu ve bununla beraber oluşan hasarı engellemek için antioksidan koruma sistemi yani antioksidanlar devreye girer. Hücresel oksidan sistemi ile antioksidan koruma sistemi, vücuttaki dengeyi sağlar. Fakat hücresel oksidan sisteminin aşırı yüklenmesi durumunda bu denge bozulur ve hücre oksidatif strese girer. Oksidatif stres sonucunda ise ROS, hücre hasarı oluşturur. ROS nedeniyle ortaya çıkan DNA hasarı; hidroksil radikalının DNA zincirini kırması, baz modifikasyonu ve deoksiriboz fragmentasyonu ile oksidatif stres nedeniyle oluşan endonükleaz inaktivasyonu ile DNA fragmentasyonlarının meydana gelmesidir. Ayrıca ROS ve bu oluşuma yol açan karsinojenler, büyüme desteği ve inhibisyonu ile apoptotik sinyal yollarına etki ederek, tümör oluşumunu ve gelişimini etkileyebilir (Yokuş ve Çakır, 2012).

Hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan CDK'lerin aktivitesi sıkı bir şekilde kontrol edilir; mitojenik sinyaller tarafından uyarılır ve DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsü kontrol noktalarının aktivasyonu ile inhibe edilebilir (Otto ve Sicinski, 2017).

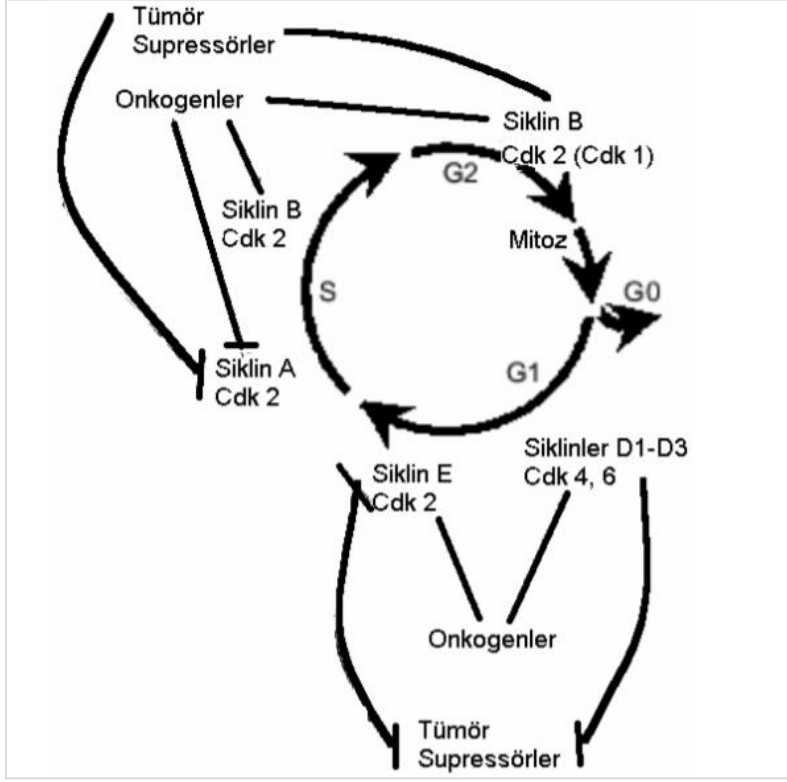
Siklin proteinleri; siklin A, B, C, D ve CDK proteinleri; CDK 1, 2, 3, 4, 5, 6 bulunmaktadır. G-1 evresinin orta ve son dönemlerinde Siklin D-CDK 4 ile Siklin D-CDK 6, geç dönemlerinde Siklin E-CDK 2 ile S evresinde Siklin A-CDK 2 işlev görmektedir. Büyümeyi uyaran sinyal, hücrede siklin D ailesinin düzeyini artırmakta ve uygun CDK'ler aktive olmaktadır. Bu nedenle siklin D salınımında oluşan bir mutasyon, hücreyi S fazına sokmakta ve tümör oluşumu yani neoplastik transformasyon gelişmektedir. Birçok tümör baskılayıcı ve onkogenin proteinleri, sentez öncesi G1 fazının hücre tipine bağlı olarak CDK4/CDK6 ile siklin D1-D3 kompleksleri başlangıç basamaklarından sorumludur ve DNA sentezinin (siklinE-CDK2) S fazına G1'in geçişinden sorumlu, siklin bağımlı kinazların aktivitesini artırır. Bazı proto onkogen ve tümör baskılayıcılar, A-CDK2 (DNA replikasyonu) ve B-CDK1 komplekslerinin aktivitesini artırır (Şekil 2.25) (Fior ve Zilhao, 2019).

Sitoplazmadaki, sinyal ileti moleküllerini (Ras ve Jak) ve transkripsiyon faktörlerini (Fos, Jun, NF-AT, NF κ B, Myc) fosforilleyen kinazları (ERK ve proteinkinaz C) mitogenlerin reseptörlerine bağlanmasıyla aktifleşen proteinkinazlar, uyarmaktadır. Böylelikle transkripsiyon faktörleri, fosforillenerek aktifleşmekte ve çekirdekte bulunan ilişkili genleri uyarmaktadır. Transkripsiyonel düzenlemeyi sağlayan E2F, pRb (retinoblastoma proteini, tümör baskılayıcı gen ürünü ve hücre döngüsünü düzenleyicidir) ile inhibe edilmektedir. G-1 evresinden S evresine geçmek için E2F gereklidir. Proteinkinazların etkisiyle (Siklin D-CDK 4, Siklin D-CDK 6 kompleksleri ile) E2F bağlı Rb fosforilasyonu sonucu, E2F serbest hale geçerek, G-1'den S fazına geçiş tamamlanır ve böylece hücre DNA sentez fazına girmektedir. E2F transkripsiyon faktörünün aktifleşmesi ile replikasyonda gerekli proteinler, deoksiribonükleotid ile siklinler, proteinkinazlar, CDK düzenleyici proteinlerinden bazıları sentezlenmektedir (Fior ve Zilhao, 2019).

Hücre bölünmeden önce, DNA hasarının durdurulduğu veya düzeltildiği aşamalar yer almaktadır. Sentezlenen DNA'da replikasyonda hata olduğunda veya DNA'nın hasarlı olduğu durumlarda döngü M evresine girmeden, G-2 evresinde durdurulmaktadır. G1'de belirlenen DNA hasarı, orta derecede ise tümör baskılayıcı gen yani p53 tarafından p21 proteininin sentezlenmesi sağlanmaktadır. Siklin CDK kompleksi inhibe edilerek döngü G1 veya G2 evresinde durdurulmakta/askıya alınmaktadır. Eğer DNA hasarı çok büyük ise, p53 hücrenin apoptoza girmesine sebep olmaktadır (Fior ve Zilhao, 2019).

Sinyal iletim yolları; hücrelerin çoğalma, farklılaşması ve işlevini düzenleyen mekanizmalardır (Çizelge 2.7). Genetik veya epigenetik değişikliklerle aktive veya inaktive olan kanser ile ilişkili bir yolak, kanserin gelişimine neden olan hücresel düzenlenmenin ortaya çıkmasına sebep olur. Ras, STAT, PI3K, MAPK, TGF- β , Notch, APC, Hedgehog, apoptozis, kromatin modifikasyonu, transkripsiyonel modifikasyon ve DNA hasarı kontrolü sinyal yollarında meydana gelen değişiklikler kanserli hücrenin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Kanser Genom Atlası projesinde çalışılan 33 kanser tipinde hücre döngüsü yolağı, Hippo, Myc, Notch, Nrf2, PI3K/Akt, RTK-Ras, TGF- $\beta\beta$, p53 ve β -katenin-Wnt yollarının öne çıktığı bildirilmiştir. Kanserli dokuların %89'unda bu yollarında en az bir sürücü (driver) değişikliğinin, %30'unda ise bu yollarında birden fazla değişikliğin ortaya çıktığı belirlenmiştir. En sık değişikliğe uğrayan yolağın RTK-Ras yolağı olduğu ve bu yolda en sık değişikliğe uğrayan genlerin sırasıyla KRAS, BRAF ve EGFR olduğu bildirilmiştir. p53, hücre siklusu, Ras ve PI3K yollarında tek değişikliğin yeterli olduğu

sonucuna varılmış, bununla birlikte Hippo, RTK ve Wnt yolaklarında ise aynı anda birden çok değişikliğin ortaya çıktığını ve bunun sinerjistik bir aktivasyona neden olduğunu bildirmişleridir (Sanchez-Vega ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.25. Hücre siklusu, siklinler ve CDK'lar ile ilişkisi (Yokuş ve Çakır, 2012)

Protein kinazlar, membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılır ve sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu (aktivasyonunu) sağlarlar. Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar denilmektedir. Reseptör tirozin kinaz süperailisinde 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu proteinlerden bazıları: büyüme faktörleri (EGF, FGF, NGF, PDGF, VEGF) reseptörleri, insülin reseptörü ve efrin reseptörleridir (EphA, EphB). Reseptör tirozin kinazlar, sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu bir bölge (tirozin kinaz bölgesi) içerirler. Reseptör tirozin kinaz aktivasyonu, reseptörün fosforillenmesiyle başlar, bu fosforlanan bölgelere çeşitli SH2 (Src-homology-2) bölgeleri içeren adaptör proteinler bağlanırlar ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar. Reseptör tirozin kinazın aktivasyonunun sonlandırılmasında fosfataz grubu proteinler tersinir özellik gösterir ve reseptör tirozin kinaz aracılı sinyal iletimi kontrol altında tutulur. Karsinogenezde ise, sürekli ve kontrolsüz reseptör tirozin kinaz aktivitesi görülmektedir. Sitoplazmik protein kinazlar (Src, Abl, fokal adezyon kinazı (FAK), Janus

Family Kinases (JAK) proteinleri), sitoplazmada inaktif halde bulunur ve hücrenin büyüme faktörleri veya sitokinler ile uyarılmasından sonra aktif hale geçerek sitoplazma veya nükleustaki hedeflerine yönelirler. Bu sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu; tümör büyümesi, transformasyon, onkojenik sinyal iletimi gibi olayları hızlandırarak karsinogeneze neden olmaktadır (Fior ve Zilhao, 2019).

Çizelge 2.7. Karsinogeneze rol oynayan önemli sinyal yolları, hücre mekanizmaları ve sorumlu genler (Sanchez-Vega ve diğerleri, 2018)

Sinyal Yolu	Sinyal yolağının bulunduğu hücre mekanizmaları	Başlıca genler
RTK/RAS	Hücre proliferasyonu, büyümesi, sağ kalımı, metabolik değişiklikleri, migrasyonu ve polaritesi	Reseptör tirozin kinazlar, RAS, KIT, MET, bNF1, RET, MAP2K1, BRAF, , EGFR, ALK
PI3K	Hücre proliferasyonu, büyümesi, sağ kalımı, metabolik değişiklikleri, migrasyonu ve polaritesi	PIK3CA, EGFR, PTEN, MTOR, RET, KIT, ALK, MET
STAT	Hücre sağ kalımı	JAK1/2/3, MPL, CRLF2, SOCS1
TGFβ-β	Hücre proliferasyonu, apoptozis, kök/progenitor hücre fenotipi kazanılması, diferansiyasyon	TGFBR1/2, GATA1/2, ACVR2A/B, FOXL2,
NOTCH NOTCHx, JAGx,	Hücreler arası iletişim, hücre büyümesi ve apoptozis	EP300, GATA1/2, CREBBP
Hedgehog	Hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu	PTCH1, SPOP, SMO
APC	Hücre sağ kalımı, hücre diferansiyasyonu	APC, SOX9, HNF1A, AXIN1, FAM123B, NF2,CTNNB1
Hücre siklusu	Mitotik hücre döngüsünün progresyonunun düzenlenmesi	CDK'ler, CDKN2A/B, CCND'ler
HIPPO	Hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu	LATS1/2, YAP1, WWTR1
MYC	Hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozis	MYC, MGA, MAX
NRF2	Oksidatif stres yanıtı	NFE2L2, CUL3, KEAP1
TP53	Hücre sağ kalımı, proliferasyonu, DNA tamiri, yaşlanması ve apoptozis	TP53, ATM, MDM2/4, CDKN2A
WNT	Hücre proliferasyonu, doku homeostazisi	RNF43, APC, CTNNB1, FZD'ler

Protoonkogenler

Protoonkogenler, büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz için alınan sinyal iletilerinde, büyüme faktörleri ve reseptörleri, transkripsiyon faktörleri gibi birçok proteinin sentezinden sorumlu olan genlerdir. Bu sinyal yollarındaki proteinleri kodlayan protoonkogenlerin (cyclin D, CDK4, SİS, HST-1, İNT-2, RET, RAS, ERB-B1 ve B2, FMS, ABL, MYC, N-MYC vb.) mutasyona uğramaları ile büyüme faktörlerinin aşırı üretimi, hücre zarı ve transkripsiyon faktörlerinin sentezinin artması, hücre bölünmesi kontrolünün olmaması gibi sonuçlar ortaya çıkmakta ve bu genlere onkogen denmektedir. Bu protoonkogenlerin, onkogen haline dönüşmesi ile hücre büyümesindeki kontrol mekanizması bozulmakta, hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarına ve büyümelerine yol açmakta ve kanser hücrelerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Alberts ve diğerleri, 2019; Yokuş ve Çakır, 2012).

Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar sonucu kanser oluşumu gözlenebilir fakat bu genlerdeki mutasyonlar genellikle çekinik allelde meydana gelmektedir ve bu karsinogenez için yeterli değildir. Karsinogenezin gerçekleşmesi için iki allelde de mutasyon gerçekleşmesi gerekmektedir. Fakat bu durumda dahi karsinogenezin gerçekleşmeme ihtimali vardır çünkü gen susturulabilir (L. H. Wang, Wu, Rajasekaran ve Shin, 2019). Tümör süpresör genlerdeki kalıcı mutasyonlar ve hasarlar, işlev kaybı, kanser oluşumu ve kanserin ilerlemesi ile sonuçlanır. pBR, p16 gibi tümör süpresör genler hücre döngüsünün kontrolünde hücre içi proteinleri kodlayan genlerdendir. Transforme edici büyüme faktörü, TGF- β ve APC, adenomatöz polipozis koli gibi hücre proliferasyon, inhibisyonuna neden olan, sinyal üretimini tetikleyen genler; BRCA (meme kanseri), p16,14 hücre döngüsünün durmasını tetikleyen genler; apoptoz indükleyen ve DNA onarımını sağlayan p53 gibi genler tümör baskılayıcı genlere örnektir.

2.8.2. Akciğer kanseri

IARC 2018 verilerine göre akciğer kanseri, dünyada ve Türkiye'de de diğer kanser türleri arasında en yüksek insidans ve mortalite oranına sahiptir (100 binde 30,13 insidans). Akciğer kanserinde sağ kalım oranının düşük olmasında; akciğer kanserinin gelişim mekanizmasının bilinmemesi ve erken metastazi, tümörün vücuttaki büyüklüğü ve yerleşim yeri nedeniyle

cerrahi tedavide başarı sağlanamaması ile radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavilere direnç göstermesi büyük rol oynayan faktörlerdir. Kemoterapi etkili seçeneklerden biridir ve akciğer kanseri tedavisinde uzun yıllardır birinci basamak tedavi olarak kullanılmaktadır. Ancak kanser hücrelerinin kullanılan ilaçlara dirençli hale gelmesini takiben kemoterapötik ilaçların yüksek dozda uygulanması sonucu ortaya çıkan ciddi yan etkiler nedeniyle klinikte kullanımını sınırlıdır (Kara, Tuncer, Türk ve Denkbaş, 2015).

Akciğer kanseri; adenokarsinomlu küçük ve küçük hücreli olmayan, skuamöz ve büyük hücre tipi olmak üzere 2 sınıfa ayrılmıştır. Küçük hücreli dışı akciğer kanser, tüm akciğer kanseri olgularının %80- 85 kadarından sorumludur ve başlıca üç tipi vardır; Skuamöz hücreli (epidermoid) kanser (Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 20-30'unu oluşturur), adenokanser ve büyük hücreli kanser tipleridir (Özet, Özdemir ve Yazıcı, 2020).

Kanser Genom Atlasında, 230 akciğer adenokarsinomunun moleküler profilini çıkarmak için haberci dizileri RNA, mikroRNA ve DNA'nın yanı sıra kopya numaraları, metilasyon ve proteomik testleri kullanılmıştır. RIT1, EGFR, NF1, MET, ERBB2, RBM10 ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolundaki diğer genlerde, megabaz başına 9'u aşan mutasyon sıklıkları ile istatistiksel olarak önemli mutasyonlar rapor edilmiştir (Çizelge 2.8) (Sanchez-Vega ve diğerleri, 2018).

EGFR mutasyonu

EGFR hücrede; proliferasyon, apoptoz gibi mekanizmaları düzenleyen, sinyal iletim yollarını kontrol eden bir hücre yüzey reseptörüdür. Kromozom 7p12-13'e lokalize olup tirozin kinazların ErbB gen ailesinin bir üyesidir. *EGFR* mutasyonu; bu gen üzerinde aktive edici bir mutasyon olup, gefitinib ve erlotinib gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin hedef alanıdır. *EGFR* mutasyonu akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %20'sinde tespit edilmektedir. Mutasyonlar genellikle *EGFR* geni üzerinde 18-21. ekzonları arasında saptanmaktadır. En sık izlenen mutasyonlar 19. ve 21. ekzon üzerinde yer almaktadır. Daha nadir görülen mutasyonlar ise 20. kromozom üzerindeki 768. pozisyon ve öncesindeki insersiyonlardır. *EGFR* tirozin kinaz inhibitörleriyle tedavi olan hastaların büyük bir kısmında tedavide ilaca karşı gelişen direnç nedeniyle hastalıkta tekrar atak dönemi görülür. Bu direncin büyük kısmı diğer *EGFR* mutasyonlarına ikincil olarak tedavi sürecinde gelişen

bir mutasyon olan T790M'den kaynaklanır ve geliştiği noktadan itibaren tedaviye dirençten sorumludur. Dinlenme halindeki bir hücrede, *EGFR* bloke haldedir. Ancak *EGFR* geninde (7. kromozom üzerinde) özellikle de ekzon 19 (delesyonlar) veya ekzon 21'de (nokta mutasyonu) meydana geldiğinde *EGFR* sürekli dimerize halde kalır, hücreye sürekli olarak proliferasyon ve apoptozdan kaçabilme sinyalleri verilir (Özet ve diğerleri, 2020).

ALK rearranjmanı

ALK genini içeren bir dizi kromozomal değişikliklerdir. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %5'inde görülür ve en sık kromozomal bir insersiyon olan EML4-*ALK* füzyon rearranjmanı şeklinde saptanır. Anaplastik lenfoma kiraz (*ALK*) ilk olarak 2007 yılında, kromozom 2p üzerindeki bir tirozin kinaz domainindeki, bir kırılma ve inversiyonun, sonrasında aynı kromozom üzerinde bulunan EML-4 ile birleşerek EML4-*ALK* füzyon geninin yaratılmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir. *ALK* translokasyonu, *ALK* tirozin kinazın sürekli aktivitesine yol açan onkojenik füzyonlara neden olur ve bu da hücrede proliferasyon, migrasyon yeteneğini arttırarak hayatta kalabilmesini sağlar (Özet ve diğerleri, 2020).

ROS1 rearranjmanı

Aynı *ALK* gibi *ROS1* genini içeren bir dizi kromozomal değişikliklerdir. *ROS1* insülin reseptör ailesinden bir tirozin kinaz reseptörüdür ve 6. kromozom üzerinde yer alır. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %1-2'sinde görülür ve yine aynı *ALK* gibi *ROS1* rearranjmanı saptanan hastalar bir tirozin kinaz inhibitörü olan krizotinibe yanıt verir. *ROS-1* translokasyonunda bu genin tirozin kinaz domaininde, meydana gelen kırılma sonrası en sık CD74 olmakla birlikte 7'den fazla partnerle füzyon oluşturan bir gen değişikliğiyle meydana gelir (Özet ve diğerleri, 2020).

BRAF

BRAF mutasyonu küçük hücre dışı akciğer kanserlerinin %2-4 oranında görülmektedir. Rat sarkom (*RAS*) gen ailesinden biri olan *BRAF*, küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde en sık V600E nokta mutasyonu şeklinde görülür. Akciğer adenokarsinomlarının ise yaklaşık %5'inde saptanmaktadır (Özet ve diğerleri, 2020).

RET rearranjmanı

ALK ve *ROS1* gibi *RET* genini içeren, bir dizi kromozomal değişikliklerdir. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %1-2'sinde görülmektedir (Özet ve diğerleri, 2020).

KRAS mutasyonu

Kirsten sıçan sarkomaviral onkogen (*KRAS*) mutasyonu akciğer adenokarsinomlarında izlenen en sık (%20-30) onkojenik değişikliklerden biridir. *KRAS* mutasyonuna sahip tümörler çoğu zaman *EGFR* ve *ALK* gibi diğer onkojenik değişiklikleri içermezler. Ancak son yıllarda tüm bu onkojenik değişiklikleri bir arada gösteren hastaların varlığı ortaya çıkmaya başlamıştır (Özet ve diğerleri, 2020).

ERBB2 (HER2) mutasyonu ve amplifikasyonu

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (*ERBB2*) bir tirozin kinaz reseptörüdür. 17. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Akciğer adenokarsinomlarında *ERBB2* amplifikasyonu yaklaşık %10-20 oranında bulunurken, *ERBB2* mutasyonları yaklaşık %2-4 oranında saptanmaktadır. *ERBB2* aşırı ekspresyonu veya gen amplifikasyonu saptanan tümörlerde *EGFR* ve *KRAS* mutasyonları gibi diğer “driver” onkojenik değişiklikler de izlenebilir. Bu durum *ERBB2* değişikliklerinin “driver” onkojenik değişikliklerden çok, kanser progresyonu ve kazanılmış ilaç dirençleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Özet ve diğerleri, 2020).

Akciğer kanseri, hedefe yönelik tedaviler açısından son yıllarda başarı kazanılmış olan bir solid tümördür. Her geçen gün yeni bir hedefe yönelik tedavi ajanının ortaya atıldığı bu dönemde doğru hastaya doğru tedavinin uygulanabilmesi için moleküler testler daha da önem kazanmaktadır. Moleküler testler sadece tedavi sürecinin belirlenmesinde değil, aynı zamanda tedavi direnç mekanizmalarının anlaşılmasında ve çözümünde, hastalıkların prognozunun tahmininde ve daha da önemlisi kanserin patogenezinin anlaşılmasında rol almaktadır. Dolaşan tümör hücreleri ve dolaşan DNA üzerinden de yapılmaya başlanan moleküler testler moleküler patolojinin çok yakında daha neler yapabileceğinin habercisi gibidir. (Öz, 2017; Bozkurtlar ve Kaya, 2018)

Çizelge 2.8. Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde (adenokarsinom) görülen bazı moleküler/genetik değişiklikler (Öz, 2017)

	Gen	Gendeki aktive edici patoloji/varyantlar
Mutasyonlar	EGFR	Egzon 19 delesyonları, Egzon 21 L858R, Egzon 20 T790M
	KRAS	G12X, G13X, G61X
	BRAF	V600E
	HER-2	Ekzon 20'de p.A775 G776 insersiyon
	MET	Ekzon 14 ve çevresinde skip mutasyon
Gen füzyonları	ALK	EML4-ALK, TGF-ALK, KIF5B-ALK
	ROS-1	CD74-ROS-1, EZR-ROS-1, SLC34A2-ROS-1, SDC4-ROS-1
	RET	KIF5B-RET, CCDC6-RET
Gen sayı değişiklikleri	MET	Gen amplifikasyonları
	HER-2	
	FGFR	
	EGFR	

2.8.3. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar

Cerrahi ve radyoterapi, loko-bölgesel tedavinin iki şeklidir. Geçmişte, cerrahi uygulama kanser tedavisi için tek yöntem olarak kullanılmaktaydı. Antikanser ilaçların ve iyonize radyasyonun ilerlemesiyle tedavi süreci gelişerek günümüzde tedavinin hem primer hem de metastatik tümörler için çeşitli terapötik seçeneklerin birlikte kullanılması durumunu içerir hale gelmiştir (Fior and Zilhao 2019; Wang 2010)

Sistemik tedavide; kemoterapi, hormon tedavisi, biyolojik/moleküler hedefli tedavi ve immünoterapi kullanılmaktadır. Kemoterapi, DNA sentezine ve hücre bölünmesine etki eden geniş bir sitotoksik ilaç grubunu içerir. Klasik sitotoksik ajanlar; alkilleyici ajanlar, platin analogları, antimetabolitler, sitotoksik antibiyotikler/antrasiklinler, topoizomera inhibitörleri ve anti-mikrotübüllerden oluşur (M. K. Temel, 2015). Bu ajanlar, tümör progresyonu ve transformasyonu sürecini karakterize eden moleküler hedefli ajanlardan farklı olarak, DNA sentezi ve mitoz gibi fizyolojik sürece katılan ve sağlıklı hücreleri de etkileyebilen timidilat sentaz veya tübülün gibi spesifik hedeflere yöneliktir. Hormonal tedavi, kanser hücrelerindeki hormon reseptörlerine dolayısıyla büyüme sinyali etki eden ilaçları içerir. Bu ajanlar daha çok meme ve prostat kanserinde yani hücrelerin aktif olarak

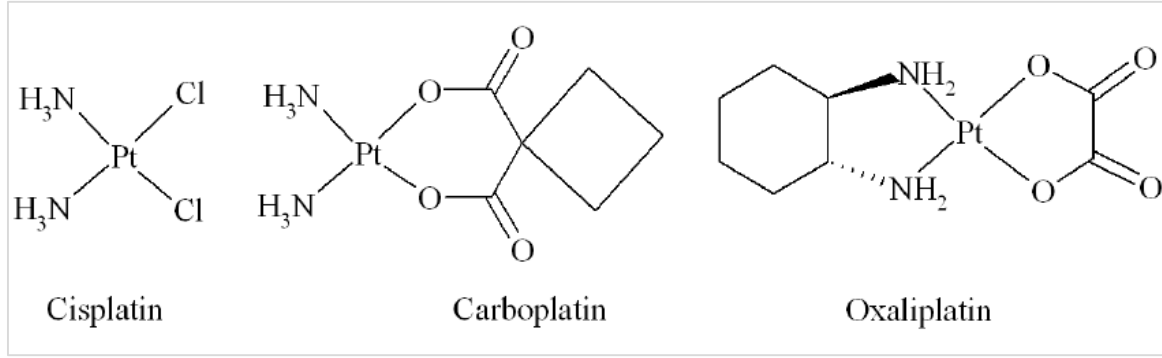
hücre bölünmesine uğramadığı tümörlerde kullanılır. Biyolojik/Moleküler hedefli tedavide, tanımlanmış moleküler hedeflere yönelik spesifik bir tedavi stratejisi uygulanmaktadır. Bu ajanlar, belirli kanser türlerini benzersiz ve tekrarlayan bir şekilde karakterize eden spesifik moleküler anormalliklerin hedeflenmesi ile kanserli olmayan normal hücrelere zararlı etkiyi en aza indirirerek, spesifik kanser hücrelerini seçici olarak hedeflemektedir (Fior and Zilhao 2019; Wang 2010).

Alkilleyici ajanlar

Alkilleyici ajanlar, hücresel nükleofilik bölgelere kovalent bağlanan ve bu şekilde reaksiyona giren bir antikanser ajanlar grubudur. Alkilleyici ajanlar hücre döngüsünün tüm fazlarında hücrelerle reaksiyona girse de, etkinlikleri ve toksisitesi hızla çoğalan dokularla etkileşimden kaynaklanır. Alkilleyici ajanlar, kemik iliğinde ve bağırsak mukozasında toksisiteye neden olur, diğer organ sistemleri de doza ve süreye bağlı olarak etkilenir. Bu ilaç grubu spesifik olmayan ilaç sınıfı içinde yer alır ve kanser kemoterapisinde önemli bir rol oynamaktadır. Alkil Sulfonatlar, Aziridinler ve Triazinler alkilleyici ajanlar grubu sınıflarındandır (DeVita ve diğerleri, 2019).

Platin analogları

Platin ilaçları, cis diamindikloroplatinum (II) (sisplatin) ve analoglarını barındıran çok önemli bir antitümör bileşikler sınıfını temsil eder. Sisplatin ile tedavide, yüksek toksisite ve etki gözlemlenmektedir. Sisplatine ek olarak, günümüzde tedavide kullanım için iki platin kompleksi daha onay almıştır: cis diaminsiklobutanikarboksilato platin (II) (karboplatin) ve 1,2-diaminosikloheksanoksalato platin (II) (oksalipatin) (Amerika Birleşik Devletleri) (Şekil 2.26). Benzeri görülmemiş aktivitelere sahip diğer birkaç analog, klinik gelişimin çeşitli aşamalarında ve nedaplatin (Japonya) ve lobaplatin (Çin) yerel olarak kayıtlıdır (DeVita ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.26. Platin analogları (Smerkova, Ryvolova, Hynek ve Adam, 2012)

Antimetabolitler

Antimetabolit ilaçların çoğu nükleik asit sentezi sırasında, sentez basamaklarında rol oynayan enzimleri inhibe ederek ya da metabolit gibi davranarak, DNA ve RNA ile etkileşime girerek hücre bölünmesine müdahale eder ve kanserli hücre proliferasyonunu engeller. Pürin analogları (Merkaptopürin), pirimidin analogları (5- Fluourasil) ve antifolatlar grubu ilaçları içerir (M. K. Temel, 2015).

Sitotoksik antibiyotikler / antrasiklinler

Bu sitotoksik antibiyotikler, ilk olarak İkinci Dünya Savaşı yıllarında mikroorganizmalardan yeni antibiyotik maddeler elde etmek için yapılan çalışmalar sırasında ortaya çıkmıştır. *Streptomyces peucetius* türünden elde edilen; Daunorubisin, doksorubisin ve semisentetik *Streptomyces peucetius* türevleri epirubisin, idarubisin antrasiklin antibiyotikler; *Streptomyces verticillus* türlerinden elde edilen Bleomisin A2 ve B2 glikopeptit antibiyotikler; *Streptomyces parvulus* türlerinden elde edilen; Daktinomisin Polipeptit antibiyotikler ve *Streptomyces caespitosus* türlerinden elde edilen Mitomisin Mitozanlar olarak adlandırılmaktadır (M. K. Temel, 2015)

Topoizomeraz inhibitörleri

Topoizomeraz inhibitörleri, transkripsiyon sırasında süpersarmal DNA'nın açılması göreviyle bulunan topoizomeraz enzimlerini inhibe ederek DNA'nın transkripsiyonunu engeller. DNA'nın çift ipliğinde meydana gelen ve inhibe olmuş enzim nedeniyle tamir edilemeyecek olan kırık sonucunda hücre apoptoza gider ve kanserli hücre proliferasyonu

engellenir. İrinotekan ve Topotekan topoizomera I enzimini; Teniposid ve Etoposid gibi ilaçlar ise topoizomera II enzimini inhibe etmektedir (Baykara, 2016).

Antitübülün ajanlar

Ökaryotik hücrede hücre iskeletinin oluşması ve hareketin sağlanması için gerekli olan ipliksi hücre içi protein yapılarına mikrotübül denmektedir. Bu yapılara bağlanarak mikrotübül oluşumunu ve böylece hücrenin mitoz fazının devamını engelleyen ajanlara antitübülün ajanlar denmektedir. Mikrotübül yapılarının oluşamaması sonucu yeni oluşan kromozomların zıt kutuplara çekilmesi durdurulmuş ve hücre bölünmesi de gerçekleşememiş olacaktır. Dosetaksel, Vinblastin ve Paklitaksel mikrotübül oluşumunu engellemek üzere tasarlanmış antitübülün ajanlardır (Baykara, 2016).

Hormon aktivitesini inhibe eden antikanser ilaçlar

Hormonlar vücutta doğal olarak üretilen, dolaşıma katılıp endokrin sinyaller yoluyla doku ve organların davranışını kontrol eden proteinlerdir. Kanser tedavisinde kullanılan hormonal terapötikler; Steroitler, antiöstrojenler, antiandrojenler ve aromataz inhibitörleri olarak 4 grupta incelenmektedir (M. K. Temel, 2015).

Steroid hormon reseptörleri, sitoplazmik veya nüklear proteinlerdir ve steroid molekülü için bağlanma bölgesi barındırmaktadırlar. Bu steroid moleküllerine yanıt veren elementler DNA dizilerine bağlanır. Bu bağlanma promotor tarafından kontrol edilen geni aktif hale getirir veya baskılar. Antikanser ilaçların bazıları bu steroid hormonların biyosentezini inhibe ederek, hormon reseptörlerine bağlanıp onları inaktif hale getirerek veya steroid hormonunun sentezinde görev alan enzimleri inhibe ederek etkisini göstermektedir (Baykara, 2016; Weinberg, 2014).

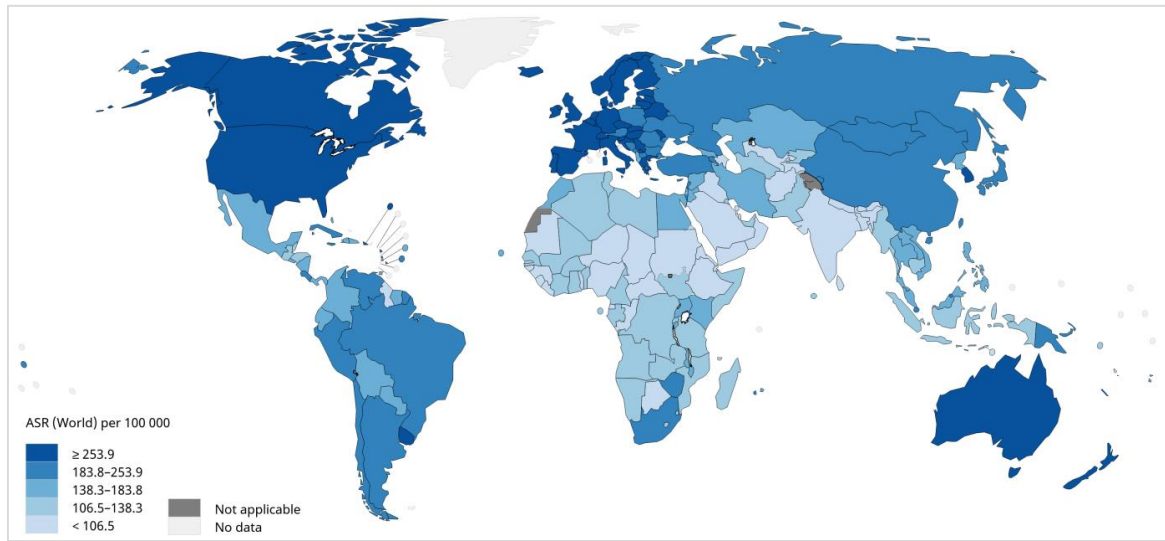
Antiöstrojenler ve antiandrojenler hormon reseptör antagonistleri olarak işlev sağlarlar. Meme ve prostat kanserlerinin tedavisinde kullanılmasıyla beraber lenfoid dokular üzerindeki fonksiyonu sebebiyle de kortikoidler miyeloma ve lenfoma tedavisinde kullanılmaktadır (Baykara, 2016; Weinberg, 2014).

Aromataz inhibitörleri, hormon sentez inhibitörleri olarak görev yaparlar. Menopoz sırasında androjen hormonlarını östrojene çevirmekten sorumlu olan enzimlerdir. Aromataz

inhibitörleri bu dönüşümü baskılayarak östrojen seviyesini düşürmeyi ve hücre büyümesini engellemeyi sağlar (Baykara, 2016; Weinberg, 2014).

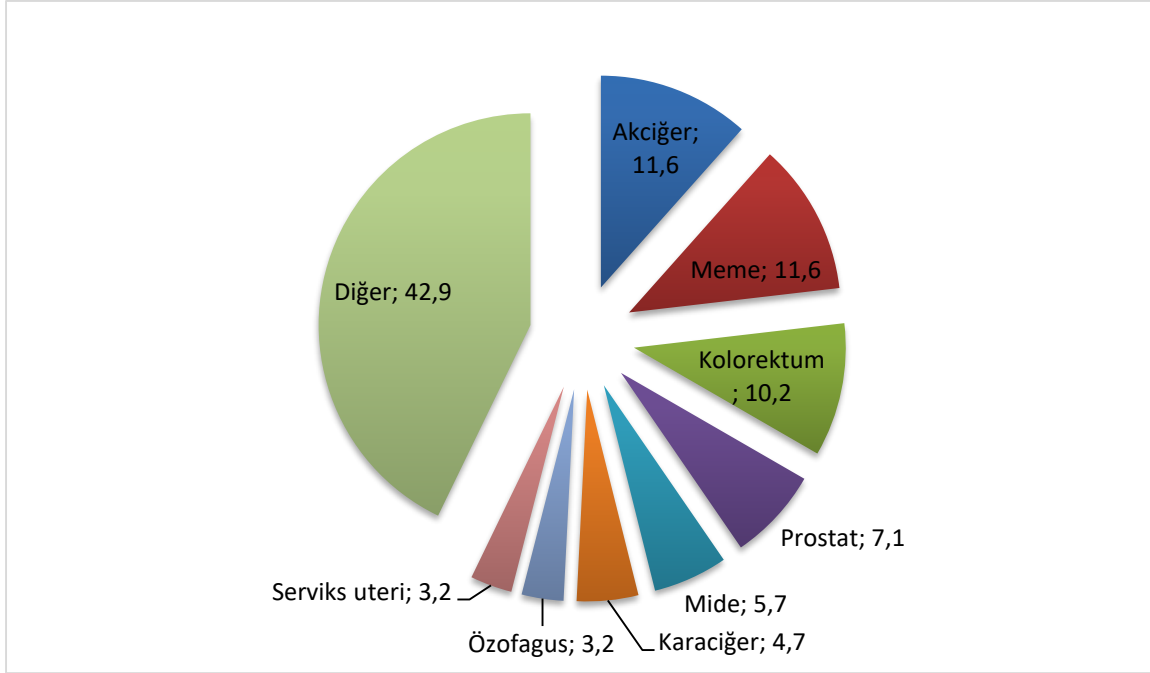
2.8.4. Türkiye ve Dünya’da kanser

Hemen hemen tüm ülkeler için kanser insidansı ve mortalite verilerinin belirlenmesi, kanser kontrolünün temelini oluşturur. Bu veriler -özellikle spesifik tümör tipleriyle ilgili olanlar- hastalık yükünü belirler ve ayrıca birçok durumda nedensel ilişkiler, sosyoekonomik farklılıkların etkisi ve kanser kontrol seçeneklerine uygulanabilecek öncelikleri de gösterirler. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), IARC (International Agency for Research on Cancer) tarafından her 4-5 yılda bir yayınlanan Dünya Kanser Raporları, kanserin dünya çapında hangi boyutlara geldiğini göstererek ve alınması gereken önlemler ile uygulamaları belirlemede öncülük etmektedir (World Cancer Report, 2014).

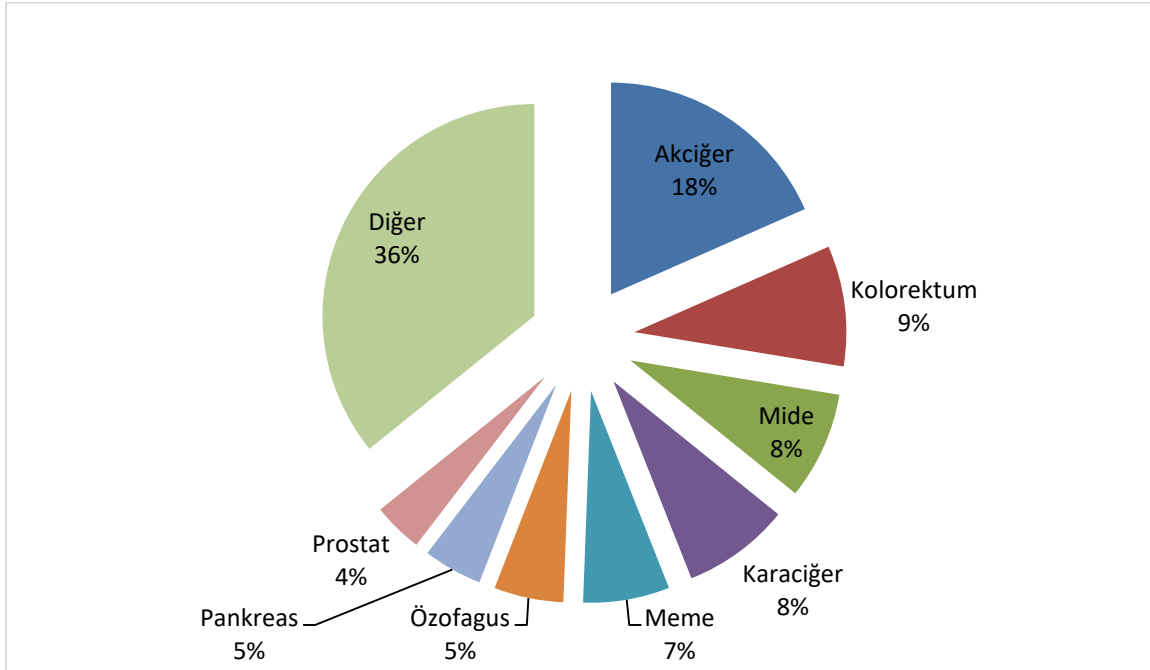


Şekil 2.27. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), IARC 2018 dünya kanser görülme sıklığı verileri haritası; tüm kanser türleri, her iki cinsiyet ve tüm yaşlar için

IARC 2018 yılı verilerine göre; dünyada yeni kanser vakası teşhisi konulan kişi sayısı 18 078 957 olup yine 2018’de kanser sebebiyle görülen ölüm vakaları 9 555 027 kişidir (Şekil 2.27-29). Dünya Sağlık Örgütü’nün araştırmalarına göre ise, kanser gelişmiş ülkelerde ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve gelişmekte olan ülkelerde yetişkinler için önde gelen üç ölüm nedeni arasındadır. Dünyadaki yetişkin insanların giderek artan oranı göz önünde bulundurulduğunda, 2020 yılında kadar yaklaşık 16 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkacaktır.



Şekil 2.28. IARC 2018 yılı verilerine göre dünyadaki yeni kanser vakaları yüzdeleri, toplam 18 078 957 kişi; her iki cinsiyet ve tüm yaşlar için



Şekil 2.29. IARC 2018 yılı verilerine göre dünyadaki kanser sebebiyle ölüm yüzdeleri, toplam 9 555 027; her iki cinsiyet ve tüm yaşlar için

Çizelge 2.9. IARC Türkiye kanser istatistikleri (2018)

	Erkek	Kadın	Her iki cinsiyet
Nüfus	40 371 479	41 545 387	81 916 866
Yeni kanser vakası	118 882	91 655	210537
75 yaştan önce kanser geliştirme riski (%)	28.6	17.9	22.8
Kanser sebebiyle ölüm	74 542	42 168	116 710
75 yaştan önce kanser sebebiyle ölme riski (%)	18.6	8.3	13.1

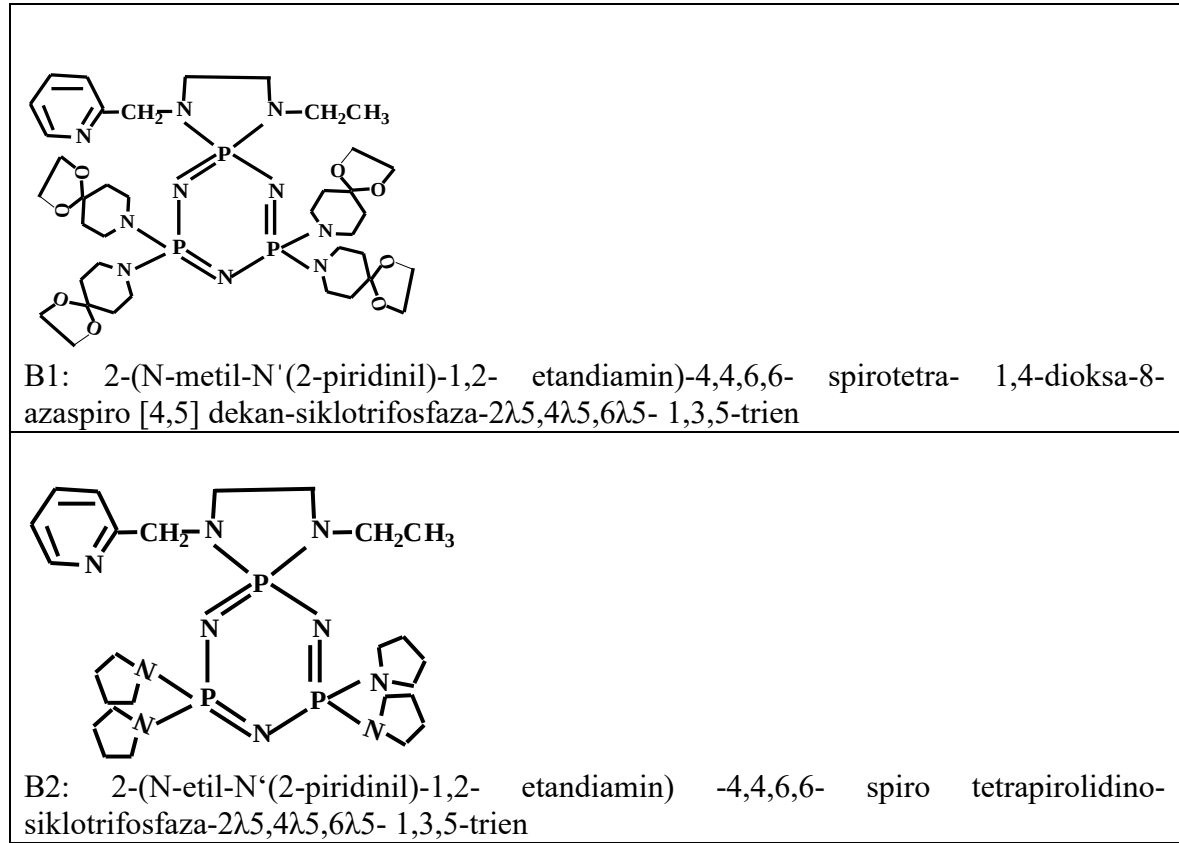
IARC 2018 yılı verilerine göre Türkiye’de yaklaşık 82 milyon nüfusta 210537 yeni kanser vakası görülmüş olup kanser sebebiyle ölen vaka sayısı 116710 olarak bildirilmiştir. 75 yaştan önce kanser sebebiyle ölme riski %13.1 olarak bildirilirken, kanser geliştirme riski ise %22.8 olarak belirlenmiştir (Çizelge 2.9).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bileşikler

Çalışmada kullanılan; N-alkil-N'-2-piridilmetiletilendiaminler ile heksaklorosiklotrifosfazen reaksiyonlarından elde edilen tetrakloro-2-piridilmetilspiro-N/N-etilendiamino-siklotrifosfazenleri; pirolidin, morfolin ve 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekan (DASD) ile reaksiyona sokulması sonucu elde edilmiş tam substitüe tetraaminosiklotrifosfazen bileşikler Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. Zeynel KILIÇ ve Doç. Dr. Aytuğ OKUMUŞ tarafından sentezlenmiş olup bileşiklerin molekül yapıları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bileşikler

B3: 2-(N-etil-N'(2-piridinil)-1,2-etandiamin)-4,4,6,6-siklotrifosfaza-2λ5,4λ5,6λ5- 1,3,5-trien	
B5: 2-(N-metil-N'(2-piridinil)-1,2-etandiamin)-4,4,6,6-tetrapirolidino-siklotrifosfaza-2λ5,4λ5,6λ5- 1,3,5-trien	
B6: 2-(N-metil-N'(2-piridinil)-1,2-etandiamin)-4,4,6,6-spirotetramorfolino-siklotrifosfaza-2λ5,4λ5,6λ5- 1,3,5-trien	

Şekil 3.1. (devam) Çalışmada kullanılan bileşikler

3.1.2. Kullanılan mikroorganizmalar ve gelişme ortamları

Çalışmamızda kullanılan mikroorganizmalar, gelişme ortam, süre ve sıcaklıkları Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir. Mikroorganizmaların tamamı ATCC'den (American Type Culture Collection) Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan mikroorganizmalar; gelişme ortam, süre ve sıcaklıkları

Mikroorganizma Adı	İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi	Geliştiği Besi Ortamı
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	37 °C	24 saat	Tryptic Soy Agar/Broth
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	37 °C	24 saat	Tryptic Soy Agar/Broth
MRSA (Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>) (ATCC 43300)	37 °C	24 saat	Tryptic Soy Agar/Broth
VRE (Vankomisin dirençli <i>Enterococcus faecalis</i>) (ATCC 51299)	37 °C	24 saat	Brain- Heart Infusion Agar/Broth (4µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	37 °C	24 saat	Tryptic Soy Agar/Broth
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 13061)	30 °C	24-48 saat	Tryptic Soy Agar/Broth
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	37 °C	24-48 saat	Brain- Heart Infusion Agar/Broth
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	24-26 °C	24-48 saat	Sabouraud Dekstroz Agar/Broth

3.1.3. Kullanılan hücre hatları ve gelişme ortamları

Çalışmamızda kullanılan hücre hatları, L929 (*Mus musculus*, fibroblast) ve A549 (Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) olup Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan hücre hatları; gelişme ortam, süre ve sıcaklıkları

Hücre Hattı Adı	İnkübasyon Sıcaklığı ve Ortamı	İnkübasyon Süresi	Geliştiği Besi Ortamı
L929 (<i>Mus musculus</i> , fibroblast)	37 °C %5 CO ₂	24 saat	DMEM besiyeri (%10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin)
A549 (Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri)	37 °C %5 CO ₂	24 saat	DMEM besiyeri (%10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin)

3.1.4. Kullanılan besi ortamları ve malzemeler

Triptic Soy Agar(Merck), Triptic Soy Broth (Merck), Sabouraud dekstroz Agar (Merck), Sabouraud Dekstroz Broth (Merck), Brain-Heart Infusion Agar (Merck), Brain-Heart Infusion Agar (Merck), Nutrient Broth (oxoid#2), Mueller Hinton Broth (Merck),Mueller Hinton Broth (Merck), NaCl (Merck), Metilen mavisi (Merck), glikoz (Merck),L-glutamin içermeyen fetal calfserum (FCS)'lu Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (BiologicalIndustries), trypsin-EDTA (Biological Industries), Fetal Bovine Serum (FBS, Biological Industries), Tris (Merck), Asetik asit (Merck), izopropanol (Sigma), DMSO (Sigma), Trypan blue(NanoEnTek), Eve hücre sayım kaseti (NanoEnTek), MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür) tuzu (VWR Life Science), EDTA (etilendiamintetraasetik asit) (Merck), agaroz (Appllichem), etidyum bromür (Sigma),9-Aminoacridine (Sigma), 4-Nitro-o-phenylenediamine (Sigma), Sodium azide (Sigma), Mitomycin C (Sigma), 2-Aminoanthracene (Sigma).

3.1.5. Kullanılan alet ve cihazlar

Mikroplaka okuyucu (Biotek PowerWave XS2), hücre sayım cihazı (İnvitrogen), soğutmalı santrifüj (Hettich), inkübatör (Binder), karbondioksitli inkübatör (Binder CB150), FT-IR(Bruler Vertex), Zeta sizer (Malware), otoklav (Jeotech), yatay jel elektroforez sistemi (Biorad), jel görüntüleme cihazı (Biometra), pH metre (Mettler Toledo), hassas terazi (Mettler Toledo),flow kabini (Esco), vorteks, kit saklama dolabı (+4°C) (Uğur), spektrofotometre (Biotek), derin dondurucu (-20°C ve -80 °C), mikrodalga fırın (Beko), mikropipetler (Eppendorf), liyofilizatör (Christ, Alpha 1-2 LO plus), manyetik karıştırıcı (Corning), Taramalı elektron mikroskobu (Quanta FEG 450),

3.1.6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

%1 Asetik asit çözeltisi: 1mL asetik asit alınarak üzeri 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Kitosan Çözeltisi: %1 asetik asit içerisinde 1-5mg/mL aralığında kitosan 24 saat oda sıcaklığında 750 rpm'de karıştırılarak hazırlanmıştır.

Tripolifosfat (TPP) Çözeltisi: 1-5mg/mL aralığında TPP oda sıcaklığında 750 rpm’de karıştırılarak hazırlanmıştır.

Besiyerleri: Çalışmamızda kullanılan tüm besiyerleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır.

Serum fizyolojik: 9g NaCl 1000mL distile su içerisinde çözdürülerek hazırlanmış ve 15 dakika 121 °C’de 1,5 atm basınçta otoklav ile steril edilmiştir.

TAE (Tris asetik asit EDTA) tamponu (50X): 242 g Tris base, 57,1 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) bir miktar distile su ile çözüldükten sonra hacim distile su ile 1000mL’ye tamamlanmıştır.

Agaroz jel: 1g agaroz 100mL 1X TAE içerisine alınarak ve mikrodalga fırında birkaç defa karıştırılarak agarozun tamamen erimesi sağlanmıştır. Jel soğuması için bir süre bekletildikten (45°C) sonra etidium bromüreklenerek jel tankına dökülerek polimerleşmesi beklenmiştir.

Jel yükleme tamponu: % 40 sukroz, % 0,025 bromfenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol ile hazırlanmıştır.

Etidyum bromür: 10 mg/ml derişimde hazırlanmıştır. Koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Hücre hatlarının geliştirilmesi için besiyeri: %89 Dulbecco’s Modified Eagles Medium/F-12, %10 Fetal bovin serum, %1 penisilin/streptomisin çözeltisi steril ortamda karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Nanopartikül sentezlenmesi

Nanopartikül eldesi çalışmalarında Calvo, Remunan-Lopez, Vila-Jatove Alonso(1997) öncelikli olmak üzere; Qi, Xu, Jiang, Hu, ve Zou (2004); Wu, Yang, Wang, Hu, ve Fu (2005); Rampino, Borgogna, Blasi, Bellich, ve Cesàro (2013); Naskar, Sharma, ve Kuotsu

(2019) gibi çeşitli araştırmacıların yöntemlerinin denemeleri yapılmış ve en verimli olacağı öngörülen sonucun elde edildiği yöntem seçilmiştir.

Sentez çalışmaları oda sıcaklığında ve 750 rpm manyetik karıştırıcı ortamında gerçekleştirilmiştir. Kitosan ve tripolifosfat (TPP) çözeltilerinin 1-5 mg/mL aralığında 3 (5 mg/mL):1 (2,5 mg/mL) oranında karıştırılması ile iyonik jelleşme reaksiyonu sonucu elde edilen veriler değerlendirilerek bileşiklerin yüklenmesi için nanopartiküller seçilmiştir.

3.2.2. Sentezlenen nanoparçacığın FT-IR analizi

Nanopartikülsentezlendikten sonra FT-IR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) analizleri Bruker Vertex 70 V ile yapılmıştır. Analizler 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte ATR tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Boş ve yüklü nanopartiküllerin FT-IR analizleri ile yüklemenin gerçekleşip gerçekleşmediği değerlendirilmiştir.

3.2.3. Sentezlenen nanoparçacığın boyut ve yük dağılımının belirlenmesi

Elde edilen nanopartikülün boyut ve yük dağılımının belirlenmesi için Zeta Sizer (Malware) cihazı kullanılmıştır. Ölçüm için sentez sonrası çöktürülüp yıkama adımlarından geçirilen nanopartiküller, steril distile su içerisinde seyreltilerek, clear disposable zeta cell içine aktarılmıştır. Refraktif index (RI) değeri 1.523'e ayarlanarak 25°C'de yük ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Aynı şartlarda disposable sizing cuvette ile de boyut ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. SEM

Sentezlenen nanoparçacıkların yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM – Quanta FEG 450) ile incelendi. 10-30 kv ile yüksek vakum altında incelenmiştir.

3.2.5. Etkin madde verimliliğinin belirlenmesi

Çeşitli konsantrasyonlarda yükleme yapılmış olan nanopartiküller 11000 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüjlendikten sonra, bağlanmayan madde miktarı süpernatantdan alınan 2 μL 'nin UV- vis spektrofotometre ile 262nm dalga boyunda ölçülmesi ile belirlenmiştir. Etkin madde yükleme verimliliği aşağıdaki eşitlik (3.1) ile hesaplanmıştır.

$$\%iYV = \frac{\text{Toplam etken madde miktarı} - \text{serbest etken madde miktarı}}{\text{Toplam etken madde miktarı}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.6. Etken madde salımının belirlenmesi

Etken madde salım çalışmaları için yarı geçirgen bir diyaliz membran kullanılmıştır. Membran içerisine belirli konsantrasyonlarda etken madde yüklü olan nanopartiküller ve fosfat tamponu konarak (toplam 5mL) yine içerisinde 5 mL fosfat tamponu bulunan bir beher içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra belirli zamanlarda içerisine nanopartikül eklenmemiş olan kısımdan 2 mL örnek alınarak yerine 2 mL fosfat tamponu çözeltisi eklenmiştir. Alınan 2 mL'lik örnekler UV-vis spektrofotometrede okutularak salım grafiği oluşturulmuştur.

3.2.7. Nanopartikül kararlılık çalışmaları

Optimizasyonu yapıldıktan sonra sentezlenerek 4 ve 25°C'de muhafaza edilen nanopartiküllerin kararlılık çalışmaları; çökelme gözlemleri ve boyut ve yük değişimi ölçümleri 1. ve 15. günde yapılmıştır.

3.2.8. Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla önce Kirby-Bauer disk difüzyon testi daha sonra ise çıkan sonuçlar ışığında mikrodilüsyon testi uygulaması yapılmıştır.

Kirby-Bauer disk difüzyon testi

Kirby- Bauer disk difüzyon testi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) rehberliğinde gerçekleştirilmiştir. Bakteriler için CLSI M100 (CLSI, 2015) standardı, *Candida albicans* suşları için CLSI M44-A standardı rehber olarak kullanılmıştır. Rehber göre tüm mikroorganizmaların 24 saatlik taze kültürlerinin konsantrasyonları, 0.5 MacFarland bulanıklık standardına göre ayarlanmış ve eküvyon çubuğu ile; bakteriler için Mueller Hinton Agara (Merck), *C. albicans* için 0,5µg/mL metilen mavisi (Merck) ve %2 glikoz (Merck) ile zenginleştirilmiş Mueller Hinton Agara ekimleri yapılmıştır. Uygulama için, tüm maddeler 2000µM konsantrasyonuna ayarlanmıştır. %10 ve %100 DMSO (Sigma) ile çözündürülmüş maddelerden, toplamda 6 konsantrasyon (1000µM, 500µM, 250µM,

125µM, 62.5µM ve 31,25µM) 20' şer mikrolitre boş disklerle emdirilmiş ve kurumaları sağlanmıştır. Maddelerin bulunduğu diskler ekimi yapılmış olan Mueller Hinton Agara yerleştirilmiş ve petriler *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), MRSA (Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*) (ATCC 43300), VRE (Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*) (ATCC 51299), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) için 37°C'de 18-24 saat; *Bacillus cereus*(ATCC 13061) için 30°C'de 18-24 saat ve *Candida albicans* (ATCC 10231) için 24-26°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası oluşan zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

Mikrodilüsyon yöntemi

Mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite deneylerinde; bakteriler için CLSI M100 standardı, *Candida albicans* suşu için CLSI M44-A standartı rehber olarak kullanılmıştır. Rehber göre tüm mikroorganizmaların 24 saatlik taze kültürlerinin konsantrasyonları, 0.5 MacFarland bulanıklık standardına göre ayarlanmış ve 1:10 oranında sulandırılmıştır. Elde edilen inokülümden 5 µL alınarak tüm kuyucuklara eklenerek istenilen konsantrasyonda ekim gerçekleştirilmiştir. %10'luk DMSO ile çözdürülmüş maddelerden, toplamda 6 konsantrasyon (1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62.5 µM ve 31,25 µM) ve nanopartiküllere yüklenmiş maddelerin toplam 6 konsantrasyonu (1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62.5 µM ve 31,25 µM) kuyucuklara uygulanmıştır. Sterilite kontrolü için sadece besiyeri bulunan kuyular ve bakteri büyümesi değerlendirmesi için sadece inokülüm ekili kuyucuklar ayrılmıştır. Tüm uygulamalar yapıldıktan sonra hazırlanan mikroplakalar kilitli poşet içerisine konularak, nemli ortamda 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimum fungal konsantrasyon (MFK) değerlerinin belirlenmesi için; inkübasyon sonrasında mikroplakalardaki her kuyucuktan 10 µl alınarak bakteriler için triptik soy agar ve maya için sabouraud dekstroza agar besiyerine ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gözle değerlendirme gerçekleştirilmiş ve 600nm'de spektrofotometrik okumaları yapılarak % etki değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.2.9. Anti-biyofilm aktivite

Biyofilm oluşumunun önlenmesinin gözlenmesi çalışmaları için; mikroorganizmaların 24 saatlik taze kültürlerinin konsantrasyonları 0.5 MacFarland bulanıklık standardına göre ayarlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrolakaların her bir kuyucuğuna (İlk kuyucuk hariç) ilk olarak 100 µL besiyeri (tryptic soy broth) ilave edilmiştir. İlk kuyucuğa 100 µL bileşik çözeltilisi (1000 µM) ve yüklü nanopartiküller konularak seyreltme yapılmıştır. Daha sonra, 0,5 MacFarland bulanıklılığına ayarlanmış olan mikroorganizmalar serum fizyolojik ile 1/10 oranında seyreltilip 5 µl alınarak kuyucuklara ilave edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılarak 200 µL steril distile su ile 3 defa yıkanmıştır. Oluştugu öngörülen biyofilmlerin sabitlenmesi için tüm kuyucuklara 200 µL %99'luk metanol eklenmiş 15dk sonra kuyucuklardaki metanol uzaklaştırılarak mikrolakalar oda sıcaklığında kuruması için bekletilmiştir. Sabitlenen biyofilmlerin boyanması için tüm kuyucuklara için 200 µL %2'lik kristal viyole eklenmiş ve oda sıcaklığında 5dk bekletilmiştir. Sonrasında fazla boyanın uzaklaştırılması için akan su altında yıkanarak kuruması beklenmiştir. Kuruyan mikrolakaların her kuyucuğuna 160 µL %33'lük glacial asetik asit eklenerek 570nm'de spektrofotometrik olarak ölçümleri yapılmıştır. Değerlendirmeler aşağıdaki çizelgeye göre yapılmıştır.

Çizelge 3.3. Biyofilm derecelendirme kriterleri

OD Değeri	Adezyon	Biyofilm Derecesi
$OD \leq OD_C$	yapışma olmayan	0
$OD_C < OD \leq 2 \times OD_C$	zayıf yapışma	I
$2 \times OD_C < OD \leq 4 \times OD_C$	orta derecede yapışma	II
$4 \times OD_C < OD$	güçlü yapışma	III

OD: Optik yoğunluk (Optical density)

OD_C: Kontrol Kuyucuğunun optik yoğunluğu

3.2.10. Sitotoksiste

Bileşiklerin sitotoksik aktivitelerini belirlemek için TS EN ISO 10993-5 (Vücut dışı sitotoksiste deneyleri) standardı rehber olarak kullanılmıştır. Standart nötral kırmızısı alımı (NKA) sitotoksiste deneyi, koloni oluşumu sitotoksiste deneyi, MTT sitotoksiste deneyi ve XTT sitotoksiste deneylerinden birinin yapılmasını sitotoksik aktivite belirlemede

kullanılabilecek deneyler arasında göstermektedir. Çalışmamızda bu deneyler arasından MTT sitotoksikite deneyi uygulaması yapılmıştır.

Deney, suda çözünen sarı renkli MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür) tuzunun, canlı hücrelerde metabolik olarak mavi-mor renkte, suda çözünmeyen formazana indirgenmesi esasına dayanır. Canlılık, formazanın alkolde çözüldükten sonra spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin edilir.

Sitotoksik aktivite belirlenmesi için; stok halinde donmuş olarak bulunan hücreler 37°C’de çözündürülmüştür. Çözölmüş olan hücreler 15 mL’lik vidalı tüpe alınarak, hücrelerin üzerine dondurma solüsyonunun inaktif hale gelmesi için 2 mL DMEM besiyeri eklenmiş ve 2000 rpm’de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrası dibe çökmüş olan hücreler DMEM ile homojen hale getirilmiş, canlanmaları ve çoğalmaları için kültür kaplarına ekimleri yapılarak 37°C’de %5 CO₂’li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Üremiş olan hücreler kültür kaplarından tripsin/EDTA eklenerek kaldırılarak bir vidalı tüp içerisine alınmış ve 200 g’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası canlı hücre sayımı için üzerlerine 1 mL DMEM eklenerek homojen hale getirilmiştir. Homojen hale getirilen hücreler canlı hücre sayımı için; 10µL tripan mavisi 10 µL hücre süspansiyonu ile karıştırılarak hücre sayım kasetine aktarılmış ve hücre sayım cihazında okuması gerçekleştirilmiştir.

Hücre yoğunluğu DMEM ile 1×10^5 / kuyu olacak şekilde ayarlanarak, önceden her kuyusuna 100 µL besiyeri eklenmiş 96 kuyucuklu mikrotitre kültür plakasına 100 µL/kuyu olarak ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler % 5 CO₂ ‘li ortamda 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek çoğalma fazına doğru gelişmeye bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası hücreler üzerinden besi yeri uzaklaştırılarak ilk kuyucuklara 1000µM yoğunluğunda bileşiklerden eklenmiş ve toplamda 6 konsantrasyon olmak üzere dilüsyonları yapılmıştır (1000- 31,25µM). Negatif (sadece hücre) ve pozitif kontrol (%20 DMSO) kuyucukları ile sisplatin ve kör (besi yeri) kuyucukları da 3’er tekrarlı olacak şekilde ayarlanmıştır. % 5 CO₂’li ortamda 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek sitotoksik etkinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

24 saatlik inkübasyon sonunda 96 kuyucuklu mikropłakaiçinden besi yeri dikkatli bir şekilde çekilerek her kuyucuğā 10µL MTT çözeltisi eklenmiş ve 37 °C’de 1-4 saat inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası MTT çözeltisi kuyucuklardan çekilerek her kuyucuğa 100 µL izopropanol eklenerek çalkalanmış ve 570 nm’de mikroparka okuyucuda absorbans okuması yapılmıştır. Kör değere kıyasla canlılıktaki azalma % olarak aşağıdaki denkleme (3.2) göre hesaplanmıştır.

$$\%Canlılık = \frac{\text{Madde OD}}{\text{Kontrol OD}} \times 100 \quad (3.2)$$

OD: Optik yoğunluk (Optical Density)

3.2.11. DNA etkileşimi

B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin DNA etkileşimleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir. Bileşiklerin 1000 µM’den başlayacak şekilde stok çözeltileri %10 DMSO içerisinde hazırlanmış ve 1 saat içerisinde kullanılmak üzere 6 konsantrasyon olarak seyreltilmiştir. Son hacimdeki çözücü oranının %0,1’i geçmemesi sağlanmıştır. Bileşiklerin tüm konsantrasyonları plazmit DNA ile 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bileşik-DNA karışımları agaroz jele yüklenerek, elektroforez işlemi TAE tamponu içerisinde; 70 V akımda 3 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonrasında jel, etidyum bromür ile boyanarak BioDoc Analyze jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiş ve kayıt altına alınmıştır.

BamHI ve HindIII enzimleri ile restriksiyon endonükleaz reaksiyonu

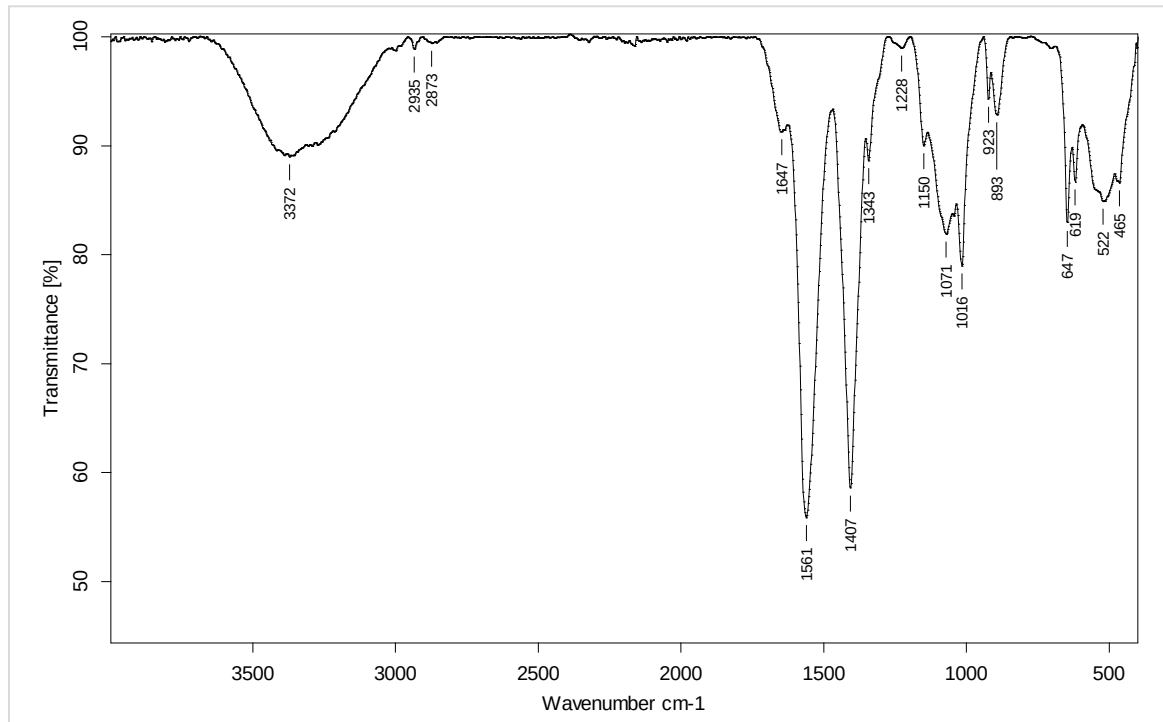
BamHI enzimi DNA’nın 5’-G/GATCC-3’ bölgesini, HindIII enzimi ise 5’- A/AGCTT-3’ bölgesini tanımaktadır. Bileşiklerin DNA üzerindeki bu bölgelere bağlanma durumunu belirlemek üzere, bileşik-DNA karışımları 24 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında BamHI veya HindIII enzimleri ile karıştırılarak kesim için 2 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kesilmiş olduğu öngörülen bileşik-DNA karışımları agaroz jele yüklenerek, TAE tamponu içerisinde 70 V akımda 3 saat süre ile elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonrasında jel, etidyum bromür ile boyanarak BioDoc Analyze jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiş ve kayıt altına alınmıştır.

4. BULGULAR

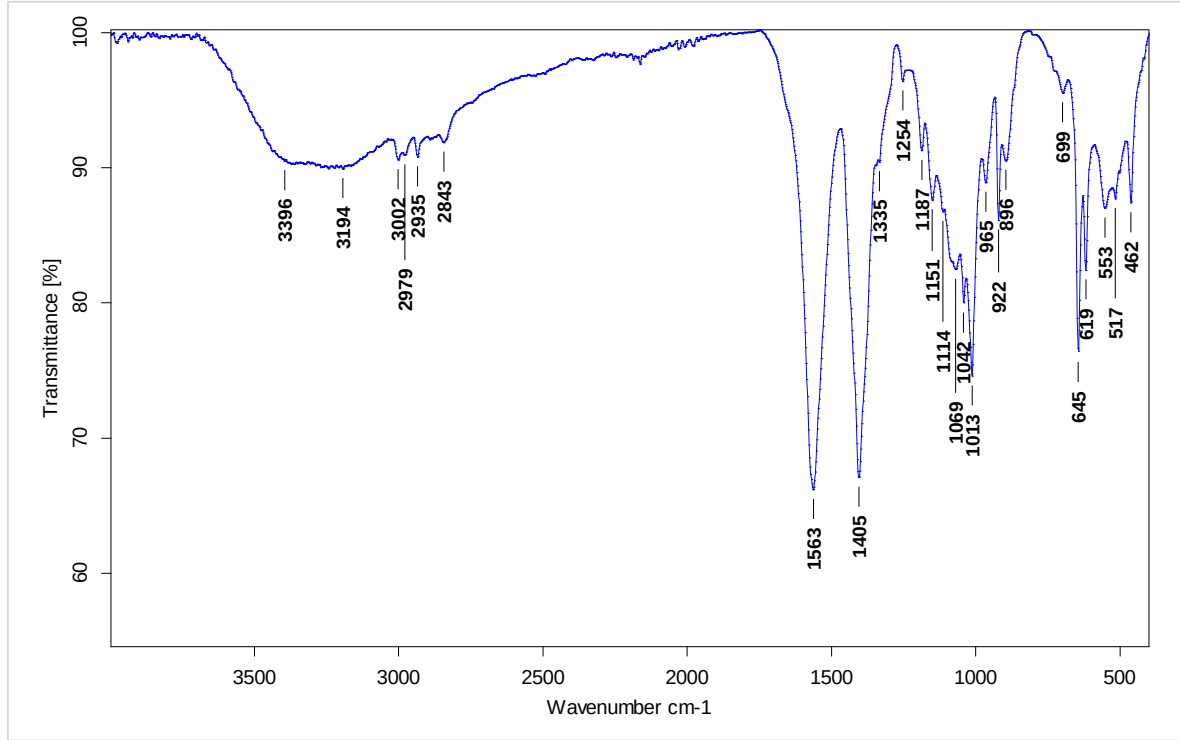
4.1. Üretilen Nanoparçacığın FT-IR Analizi

Kitosan/TPP nanoparçacığının IR spektrumunda, kitosanda bulunan N-H bağlarının karakteristik pikleri 1647 cm^{-1} 'de ve 1071 cm^{-1} 'de bulunan C-O-C bağlarının kitosana ait glukozaminin amino ve sakkarit gruplarını göstermektedir.

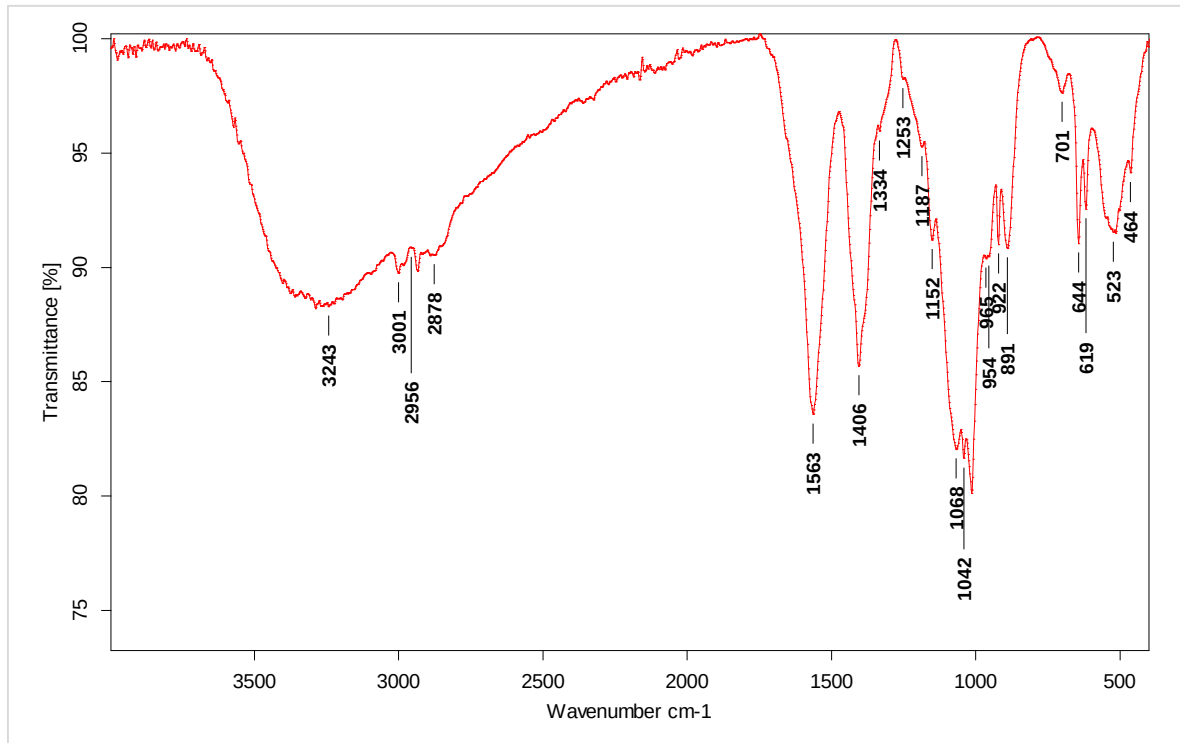
Enkapsülasyonu yapılmış bileşiklerin (CSNP-B1-B6) IR spektrumlarında, bileşiklerde bulunan P=N bağlarının karakteristik pikleri $1149\text{--}1153\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmektedir. Bileşiklerdeki piridin halkasındaki C=N aromatik bağlarının karakteristik pikleri de $1570\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir. Alınan IR spektrumları Şekil 4.1-4.6'da ve gözlenen spesifik pikler çizelge 4.1'de verilmiştir.



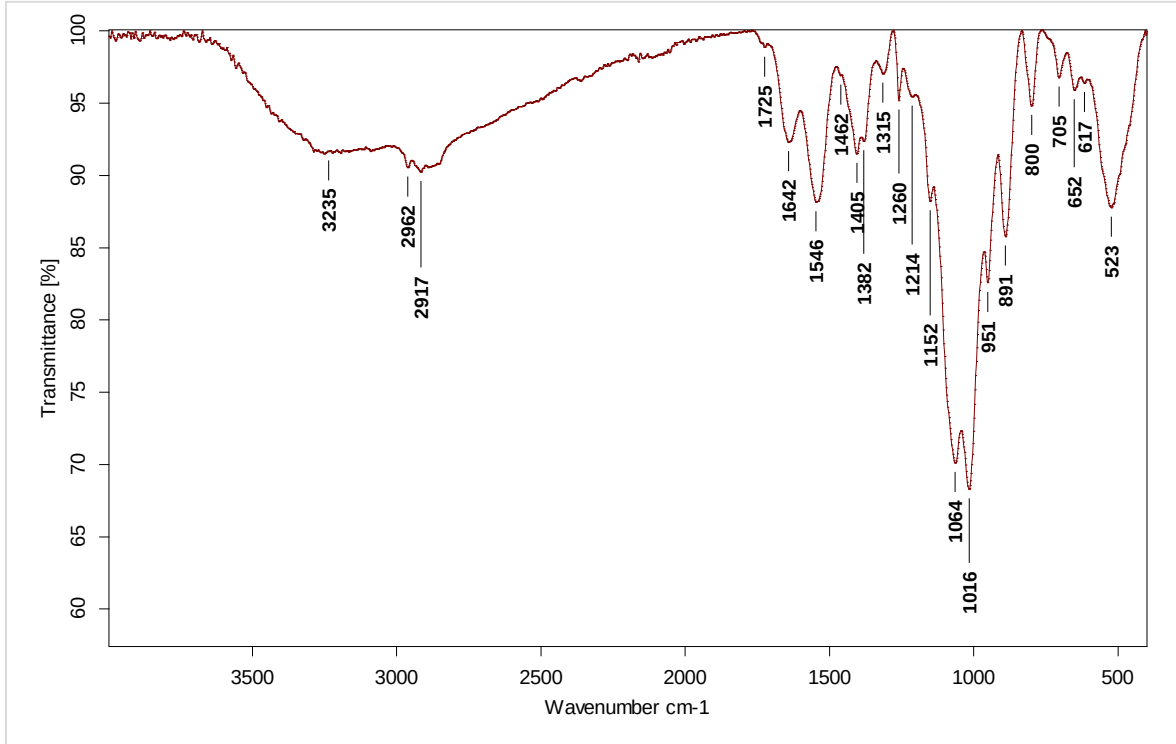
Şekil 4.1. Sentezlenen nanopartikülün FT-IR spektroskopisi



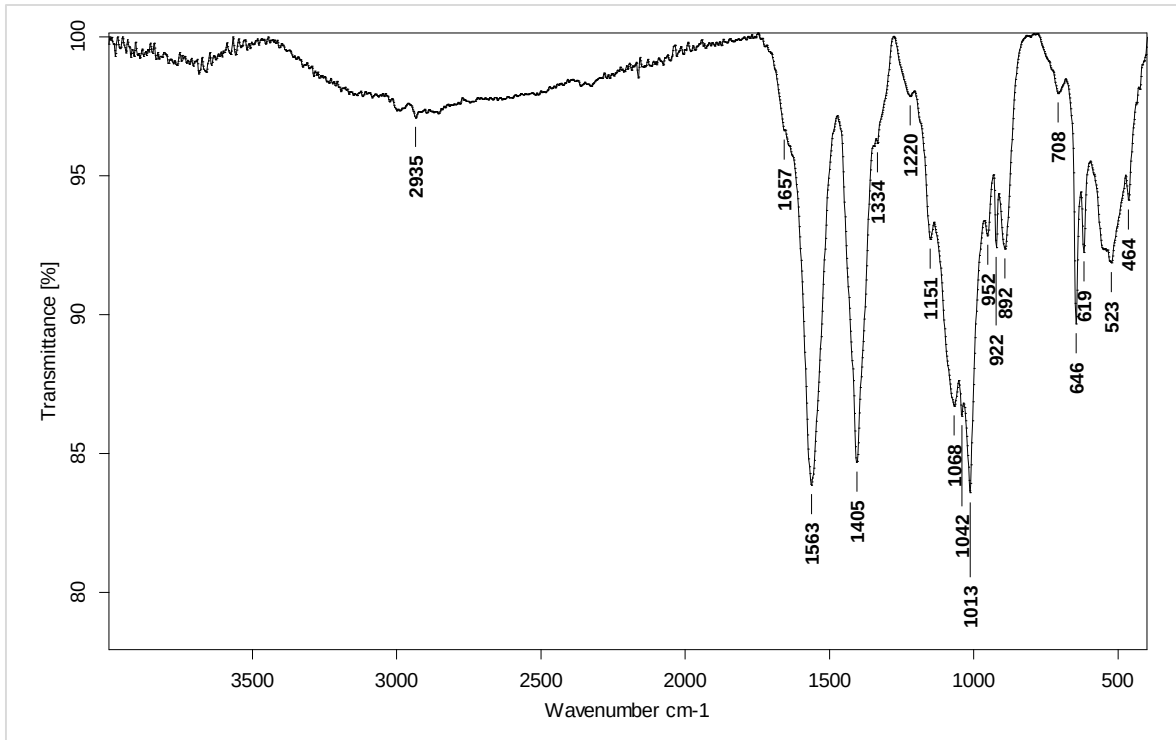
Şekil 4.2. Enkapsülasyonu yapılmış B1 maddesinin IR spektrumu



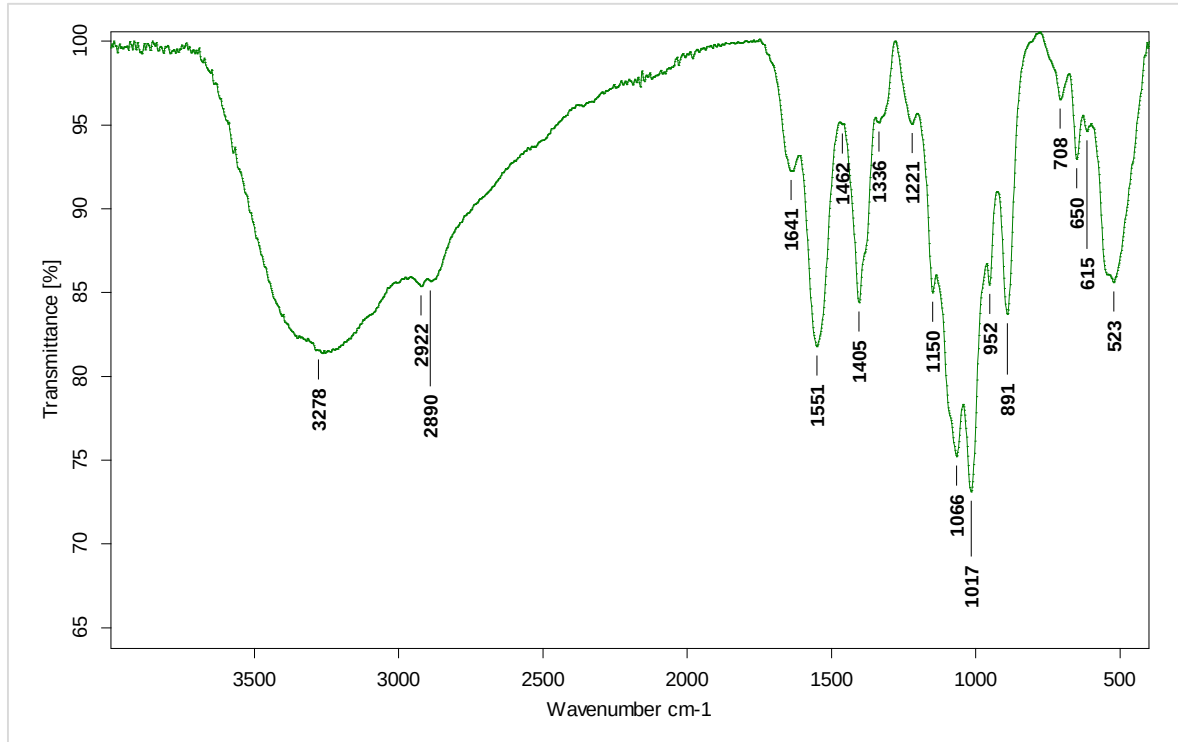
Şekil 4.3. Enkapsülasyonu yapılmış B2 bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 4.4. Enkapsülasyonu yapılmış B3 bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 4.5. Enkapsülasyonu yapılmış B5 bileşiğinin IR spektrumu



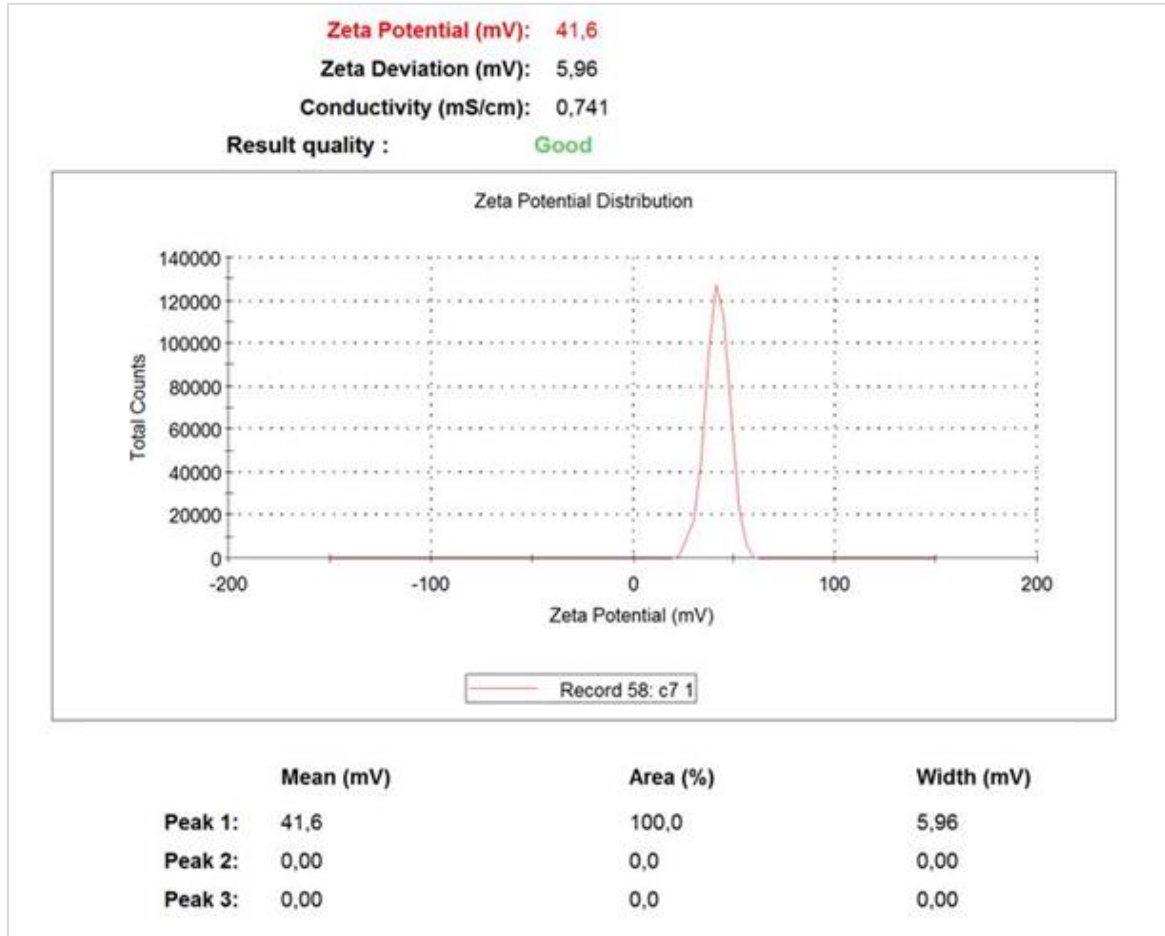
Şekil 4.6. Enkapsülasyonu yapılmış B6 bileşiğinin IR spektrumu

Çizelge 4.1. Enkapsüle bileşiklerin IR spektrumu verileri (cm⁻¹)

Enkapsüle bileşikler	$\nu_{P=N}$	$\nu_{C=N}$ (aromatik)
CSNP-B1	1254;1151	1563;1405
CSNP-B2	1253;1152	1563;1406
CSNP-B3	1260;1152	1546;1462
CSNP-B5	1220;1150	1563;1405
CSNP-B6	1221; 1150	; 1462

4.2. Sentezlenen Nanopartikülün Boyut ve Yük Dağılımının Belirlenmesi

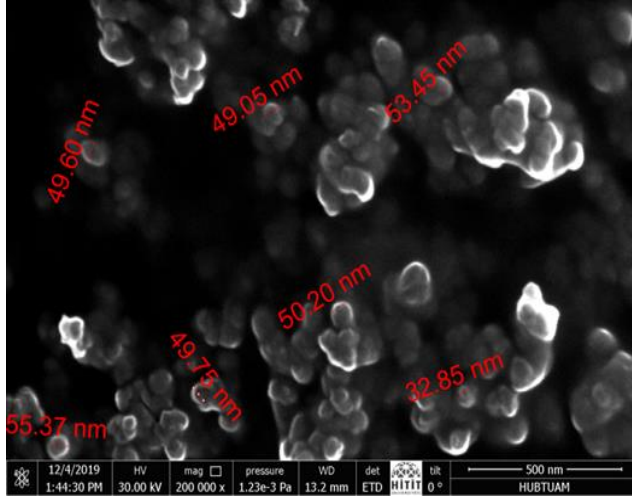
Elde edilen nanoparçacığın boyut ve yük dağılımının belirlenmesi için Zeta Sizer (Malware) cihazı kullanılmıştır.



Şekil 4.7. Zeta Sizer (Malware) cihazından alınan grafik ve veriler

4.3. SEM

CSNP'lerin şekli ve yüzey özellikleri, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak araştırıldı. CSNP'lerin morfolojisi Resim 4.1'de gösterilmektedir. Nanopartiküllerin boyut ölçümleri de SEM ile yapılarak Malvern cihazından alınan sonuçlar ile karşılaştırıldı ve uyumlu olduğu görüldü. SEM görüntülerine göre partikül boyutunun 32.85 ile 59.72 nm arasında değiştiği gözlemlendi.

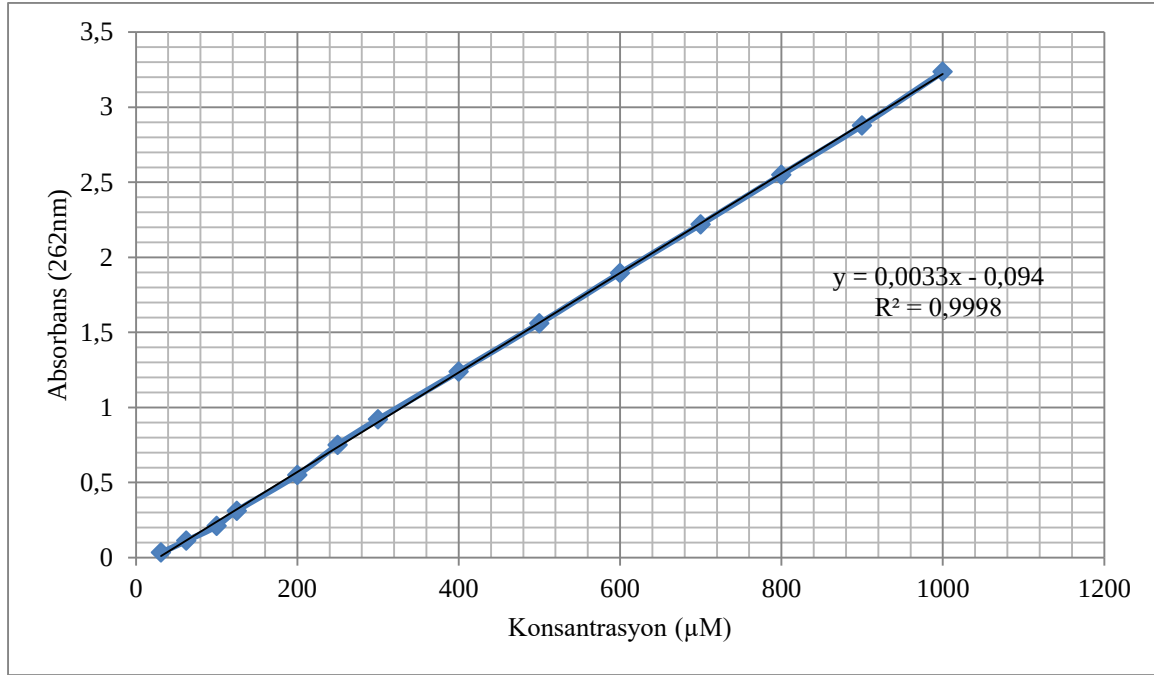


Resim 4.1. Sentezlenen nanopartiküllerin SEM görüntüleri

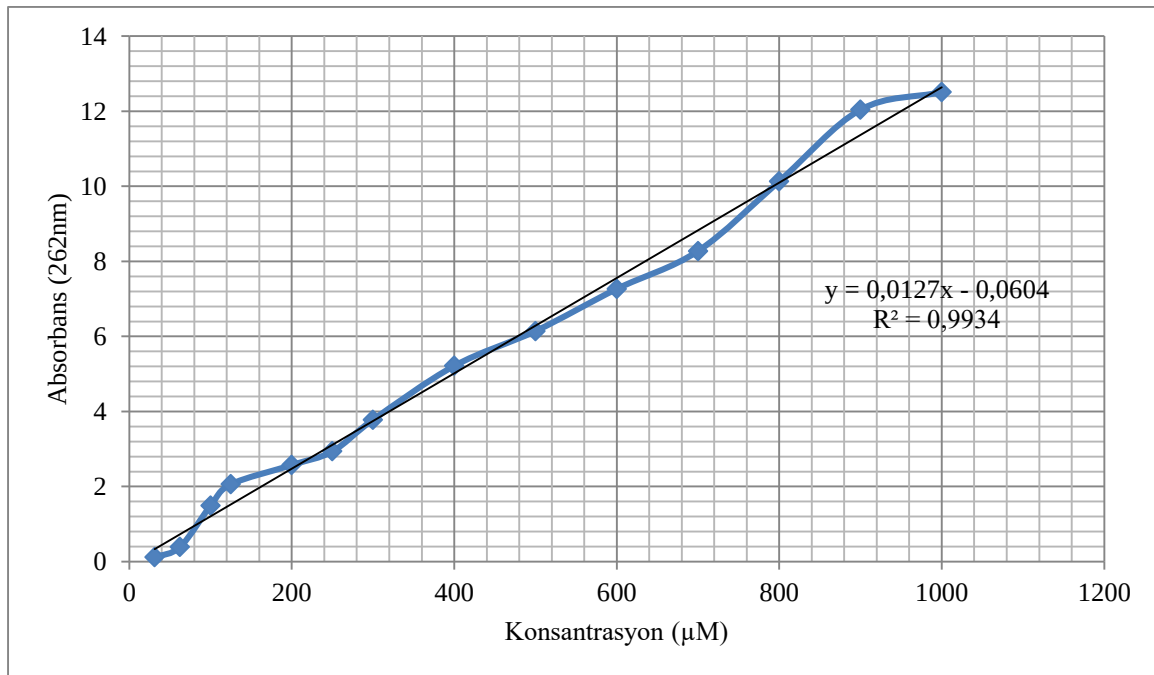
4.4. Etken Madde Yükleme Verimliliğinin Belirlenmesi

Kitosan nanopartiküllere yükleme verimliliğinin hesaplanması amacıyla öncelikle etken maddelere ait kalibrasyon grafiği çıkarılmıştır. Bu amaçla öncelikle Uv/Vis spektrofotometrede etken maddelerin en yüksek absorptans değerleri 0-800 nm aralığında tarama yapılarak belirlenmiştir.

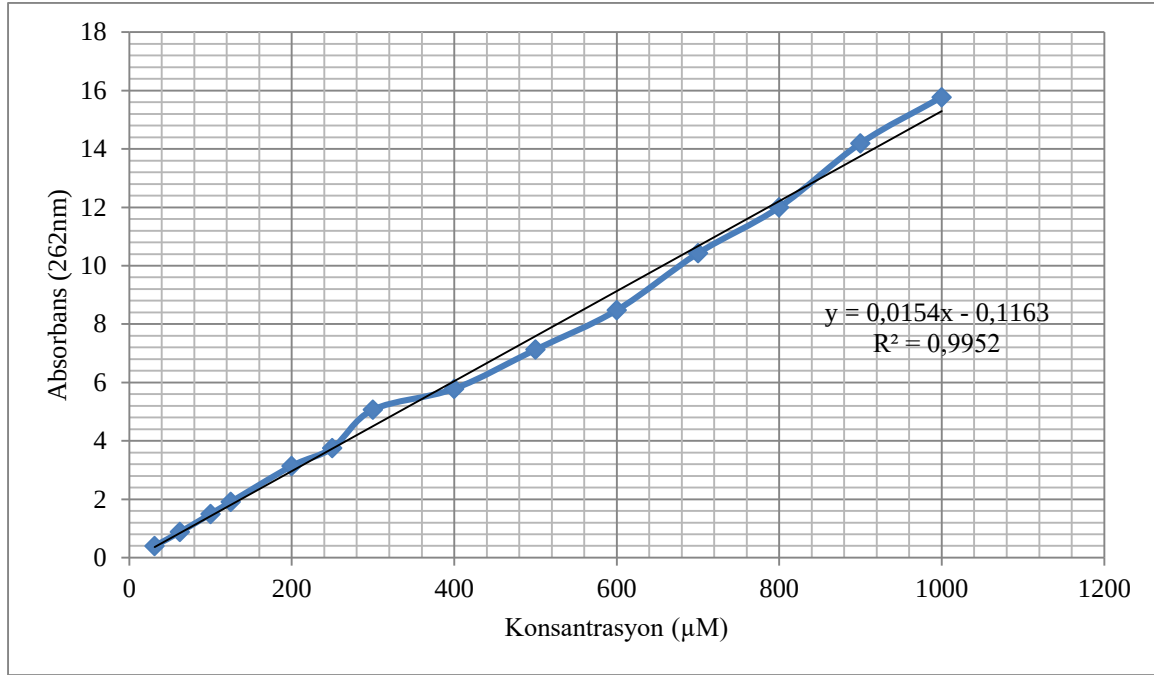
Tarama sonucunda 262nm’de en yüksek absorptans değerini gösteren etken maddelerin 1000 μ M- 31,25 μ M aralığındaki konsantrasyonlarda absorptans değerleri saptanarak kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafikleri şekil 4.8-12’de verilmiştir. Etken madde yükleme verimliliği yöntemde belirtilmiş olan formül ile hesaplanarak, % etken madde yükleme verimleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.



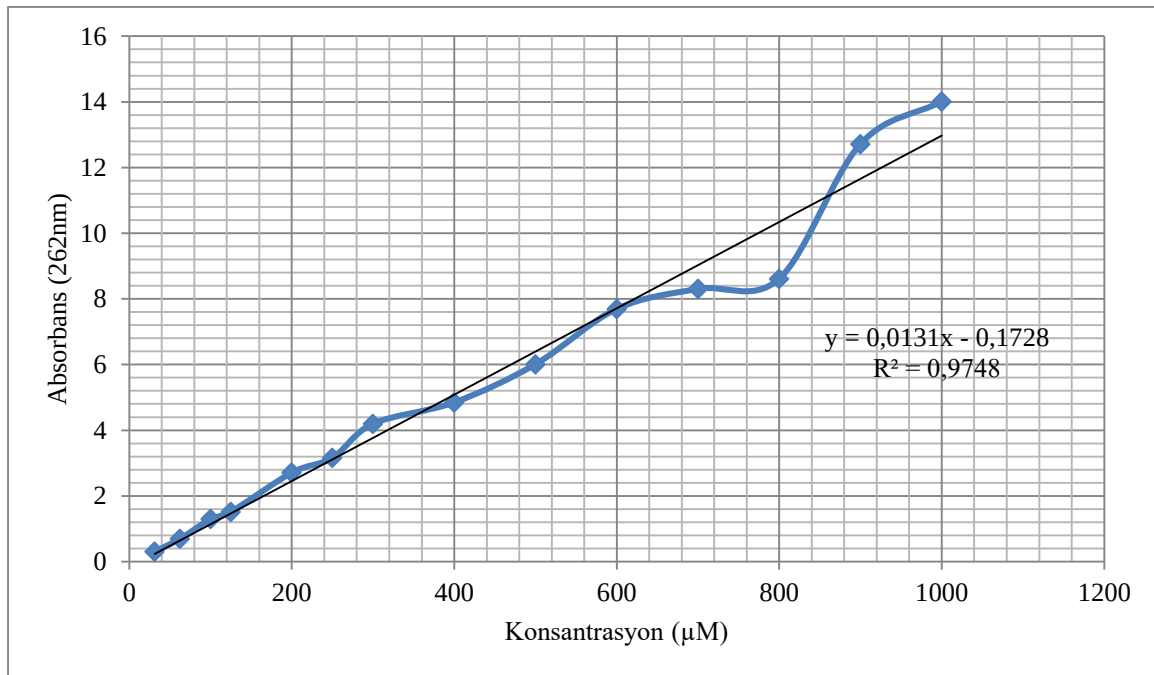
Şekil 4.8. B1 bileşiğine ait kalibrasyon grafiği



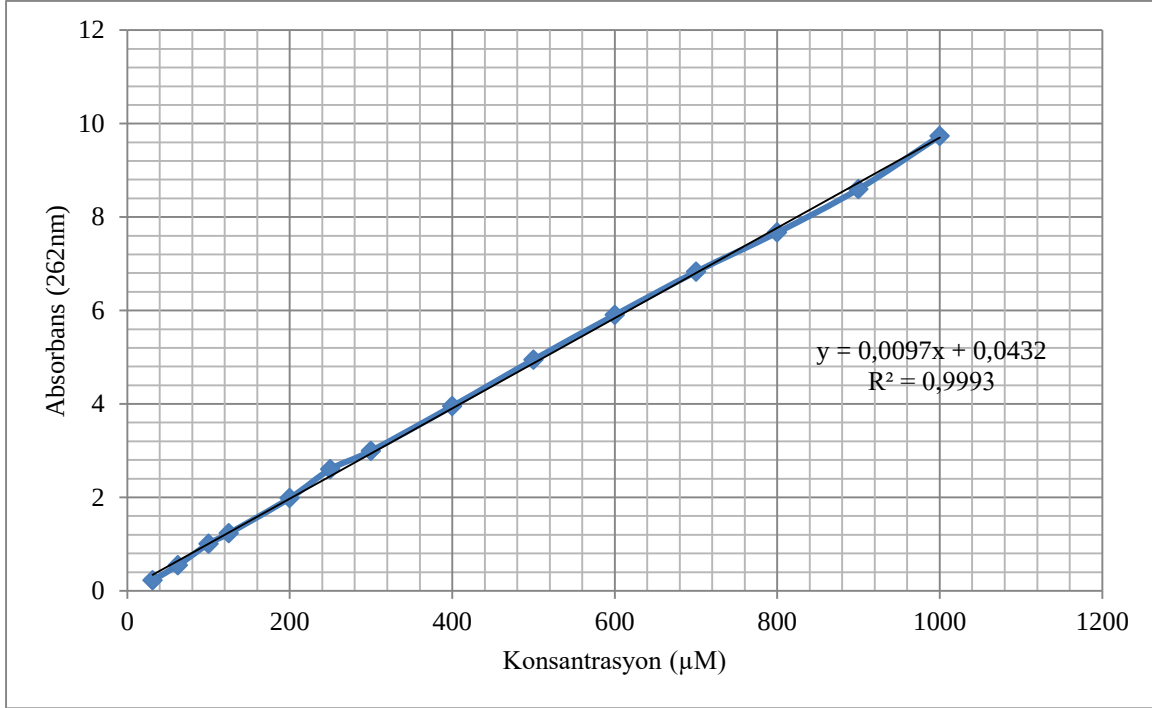
Şekil 4.9. B2 bileşiğine ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.10. B3bileşiğine ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.11. B5 bileşiğine ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.12. B6 bileşiğine ait kalibrasyon grafiği

Tüm maddelerin 1000μM konsantrasyonlarında verim %79,2 ve üzerinde belirlenirken, yüklemesi yapılan en düşük konsantrasyon olan 31,25 μM ile yükleme verisi elde edilememiştir.

62,5 μM konsantrasyonda en düşük yükleme verimi, %7,3 ile B3 maddesinde elde edilmişken, en yüksek verim B6 maddesinde %50,4 olarak belirlenmiştir.

125 μM konsantrasyonunda %44,7 ile en düşük verim B2 maddesinde belirlenmişken, en yüksek verim %70,6 ile B6 maddesinde elde edilmiştir.

250 μM konsantrasyonunda %71,9 ile en düşük verim B3 maddesinde belirlenmişken, en yüksek verim %87,7 ile B5 maddesinde elde edilmiştir.

500 μM konsantrasyonunda %81,6 ile en düşük verim B6 maddesinde belirlenmişken, en yüksek verim %83,8 ile B5 maddesinde elde edilmiştir.

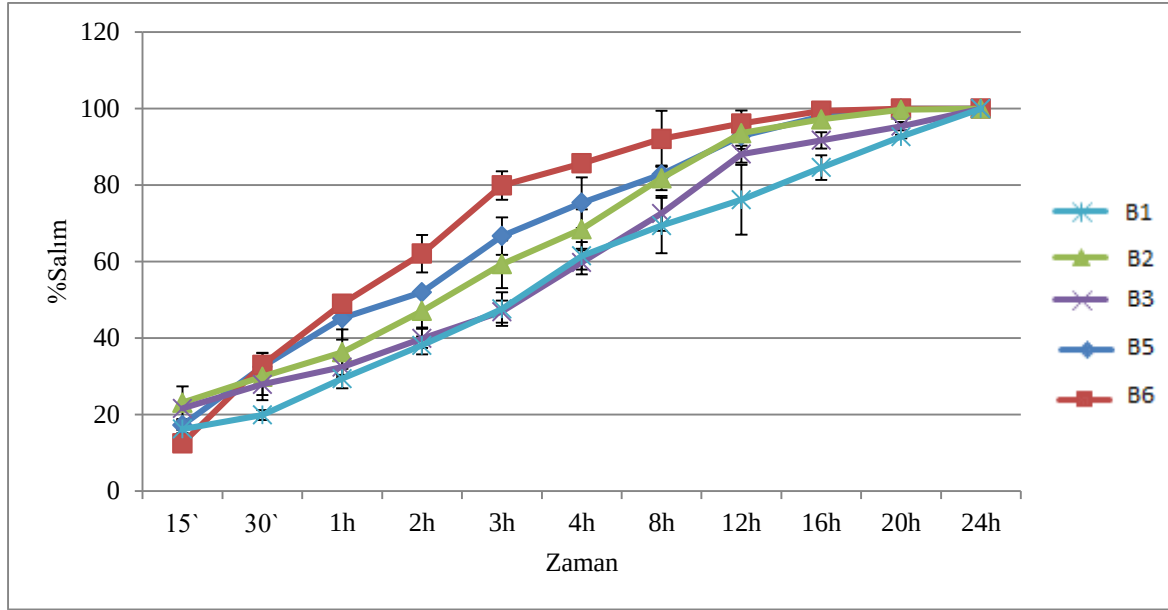
1000 μM konsantrasyonunda %79,2 ile en düşük verim B6 maddesinde belirlenmişken, en yüksek verim %86,1 ile B5 maddesinde elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen nanopartiküllere bileşik enkapsülasyonu verimi

Bileşik	Konsantrasyon (μM)	Verim (%)
B1	1000	83,4 $\pm$ 1,2
	500	83,3 $\pm$ 4,5
	250	79,1 $\pm$ 1,6
	125	65,4 $\pm$ 2,9
	62,5	40,9 $\pm$ 1,9
	31,25	0
B2	1000	84,3 $\pm$ 4,8
	500	82,7 $\pm$ 1,1
	250	73,2 $\pm$ 2,7
	125	44,7 $\pm$ 3,1
	62,5	20,0 $\pm$ 2,2
	31,25	0
B3	1000	84,7 $\pm$ 1,2
	500	82,3 $\pm$ 0,8
	250	71,9 $\pm$ 8,2
	125	55,2 $\pm$ 5,6
	62,5	7,3 $\pm$ 7,3
	31,25	0
B5	1000	86,1 $\pm$ 3,2
	500	83,8 $\pm$ 2,8
	250	87,7 $\pm$ 1,3
	125	64,8 $\pm$ 2,1
	62,5	19,1 $\pm$ 0,9
	31,25	0
B6	1000	79,2 $\pm$ 4,6
	500	81,6 $\pm$ 5,1
	250	74,7 $\pm$ 3,5
	125	70,6 $\pm$ 2,0
	62,5	50,4 $\pm$ 3,1
	31,25	0

4.5. Etken Madde Salımının Belirlenmesi

Etken madde salım çalışmaları için yarı geçirgen bir diyaliz membran ile UV-vis spektrofotometre kullanılarak ölçümler yapılmış ve salım grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. CSNP-B1, CSNP-B2, CSNP-B3, CSNP-B5 ve CSNP-B6 bileşiklerinin salım grafiği

Bileşiklerin tümü benzer salım fazları sergilemişlerdir. Salım ilk 15 dakikada hızlı, ardından 24 saate kadar yaklaşık olarak eşit yavaş salma şeklinde gözlemlenmiştir. 24 saatlik bir süre içinde, bileşiklerin nanopartiküllerden yavaş ve kontrollü salımı, bileşiklerin biyolojik etkinliğinin artması açısından da büyük önem taşımaktadır.

4.6. Antimikrobiyal Aktivite

Disk difüzyon yöntemi

Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen B1 maddesinin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, VRE(Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*), *Bacillus cereus* ve *Candida albicans* suşları üzerinde antimikrobiyal etkisi olmadığı, zon gözlenmemesi sonucunda belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. B1 maddesinin (%10 DMSO); *S. aureus*, MRSA ve *S. mutans* suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri (mm)

	B1-1	B1-2	B1-3	B1-4	B1-5	B1-6
<i>Staphylococcus aureus</i>	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7
MRSA	8	8	8	7	7	7
<i>Streptococcus mutans</i>	7	7	7	-	-	-

Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen B2 maddesinin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, VRE (Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*), *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans* ve *Candida albicans* suşları üzerinde antimikrobiyal etkisi olmadığı, zon gözlenmemesi sonucunda belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. B2 maddesinin (%10 DMSO); *S. aureus* ve MRSA suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri (mm)

	B2-1	B2-2	B2-3	B2-4	B2-5	B2-6
<i>Staphylococcus aureus</i>	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7
MRSA	9	9	9	8	8	8

Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen B3 maddesinin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, VRE (Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*), *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans* ve *Candida albicans* suşları üzerinde antimikrobiyal etkisi olmadığı, zon gözlenmemesi sonucunda belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. B3 maddesinin (%10 DMSO); *S. aureus* ve MRSA suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri (mm)

	B3-1	B3-2	B3-3	B3-4	B3-5	B3-6
<i>Staphylococcus aureus</i>	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7
MRSA	9	9	9	8	8	8

Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen B5 maddesinin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, VRE (Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*), *Bacillus*

cereus, *Streptococcus mutans* ve *Candida albicans* suşları üzerinde antimikrobiyal etkisi olmadığı, zon gözlenmemesi sonucunda belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. B5 maddesinin (%10 DMSO); *S. aureus* ve MRSA suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri (mm)

	B5-1	B5-2	B5-3	B5-4	B5-5	B5-6
<i>Staphylococcus aureus</i>	7-8	7-8	7-8	7-8	7-8	7-8
MRSA	8	8	8	8	8	8

Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen B6 maddesinin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, VRE (Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*), *Bacillus cereus* ve *Candida albicans* suşları üzerinde antimikrobiyal etkisi olmadığı, zon gözlenmemesi sonucunda belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. B6 maddesinin (%10 DMSO); *S. aureus* ve MRSA suşları üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösterir zon çapı ölçümleri (mm)

	B6-1	B6-2	B6-3	B6-4	B6-5	B6-6
<i>Staphylococcus aureus</i>	7-8	7-8	7-8	7-8	7-8	7-8
MRSA	8	8	8	8	8	8

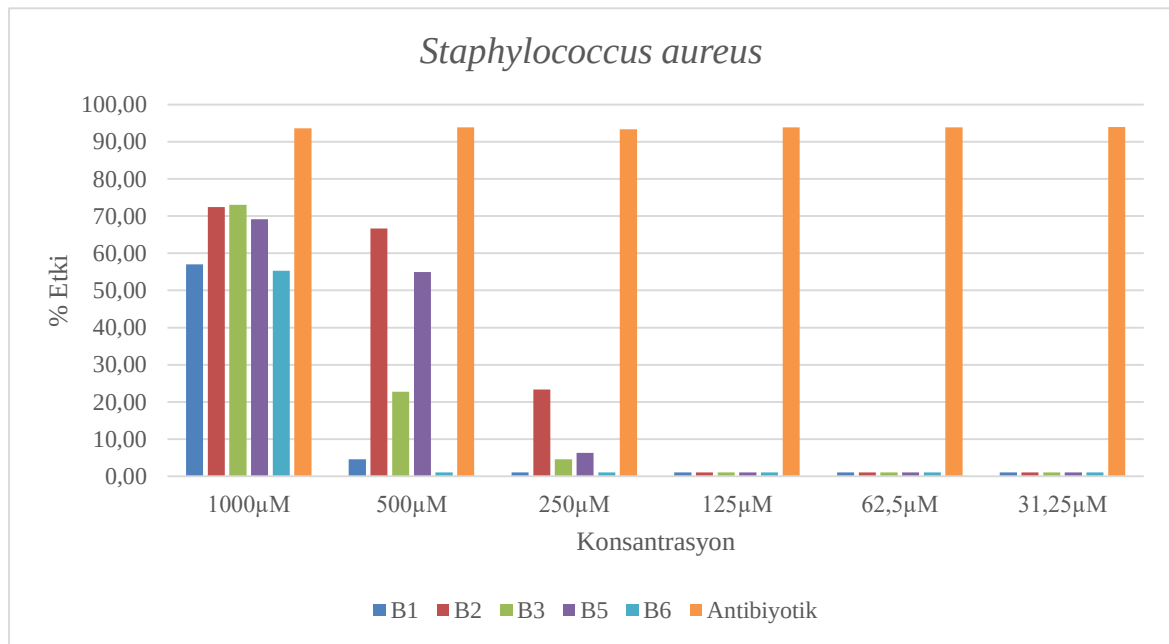
B1, B2, B3, B5 ve B6 maddelerinin yüklemelerinin yapılmış olduğu kitosan nanopartiküllerin *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), MRSA (Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*) (ATCC 43300), VRE (Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*) (ATCC 51299), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Bacillus cereus* (ATCC 13061) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) üzerindeki antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile belirlenememiştir.

Mikrodilüsyon yöntemi

B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılan antimikrobiyal etkinlikleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda göz ile sonuç değerlendirilmesi

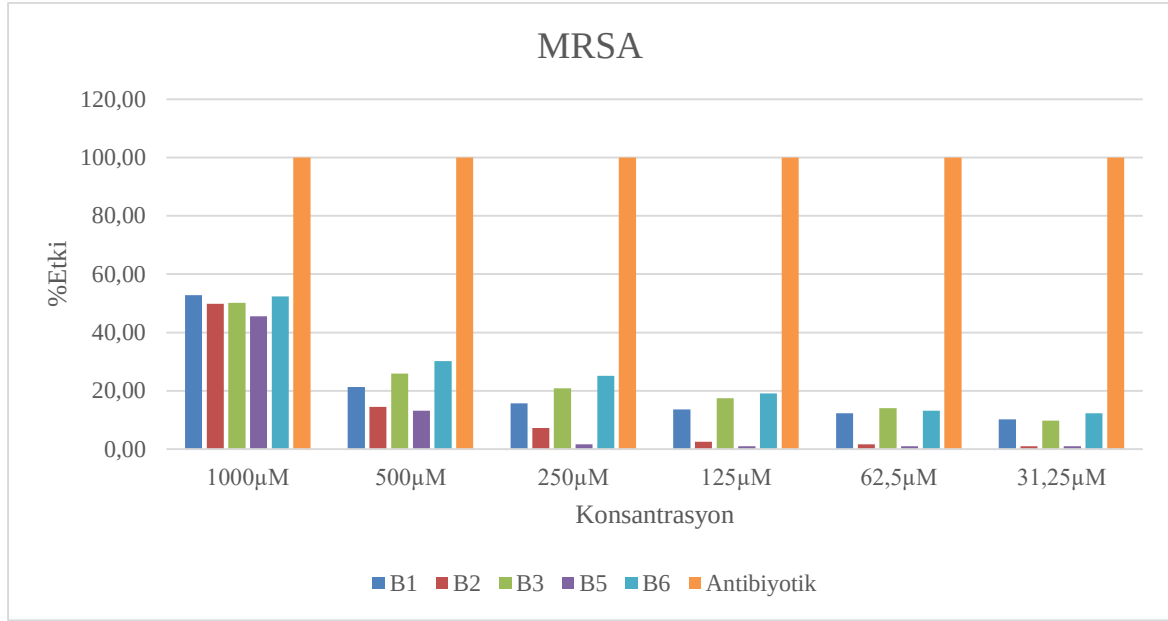
yapılamamış olup spektrofotometrik ölçümler ile bileşiklerin % inhibisyon etkisi değerlendirilmiştir.

Bileşiklerin 1000 μM konsantrasyonlarının *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bakterisi üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğu ve konsantrasyonun azalmasıyla antimikrobiyal etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin çeşitli konsantrasyonlarının (1000 - 31,25 μM), *S. aureus* (ATCC 25923) suşu üzerindeki etkileri grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.14).



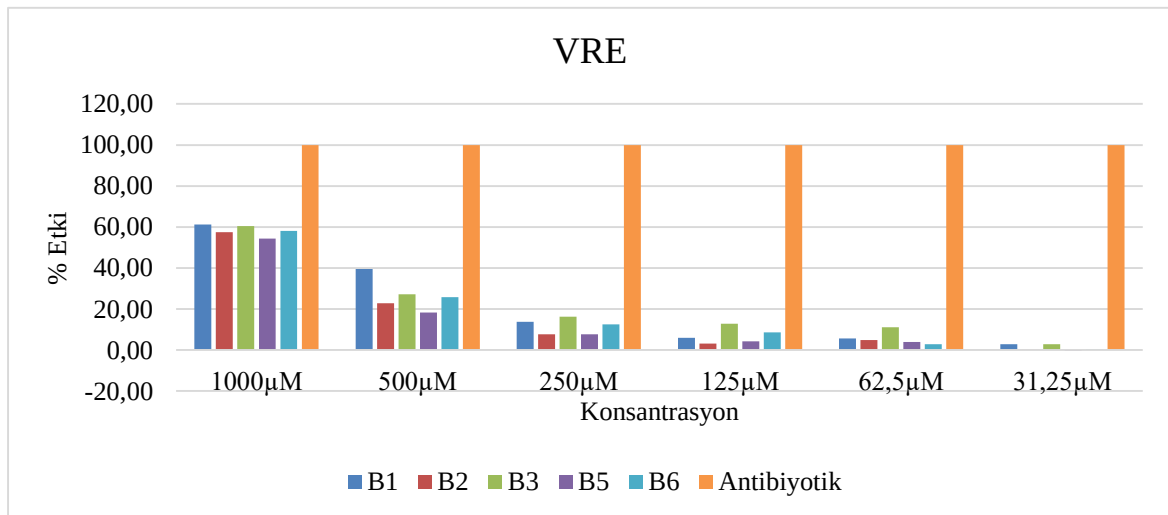
Şekil 4.14. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin *S. aureus* (ATCC 25923) suşu üzerindeki %inhibisyon etkisi

Bileşiklerin 1000 μM konsantrasyonlarının MRSA (ATCC 43300) bakterisi üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğu ve konsantrasyonun azalmasıyla antimikrobiyal etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin çeşitli konsantrasyonlarının (1000 - 31,25 μM), MRSA (ATCC 43300) suşu üzerindeki etkileri grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.15).



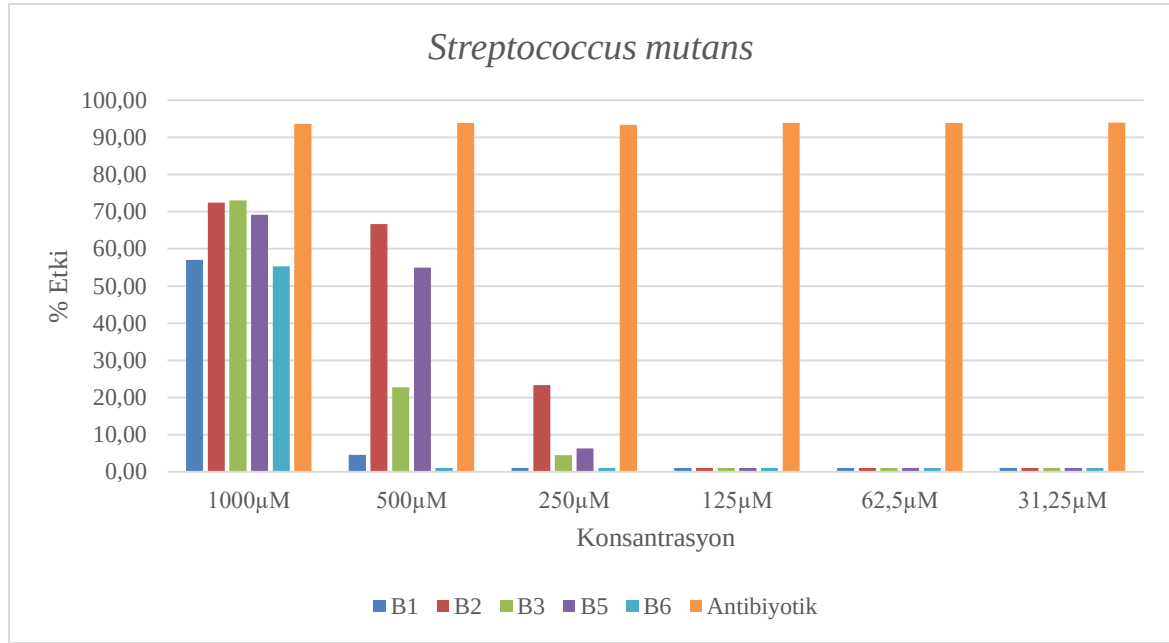
Şekil 4.15. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin MRSA (ATCC 43300) suşu üzerindeki %inhibisyon etkisi

Bileşiklerin 1000 µM konsantrasyonlarının VRE (ATCC 51299) bakterisi üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğu ve konsantrasyonun azalmasıyla antimikrobiyal etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin çeşitli konsantrasyonlarının (1000 - 31,25µM), VRE (ATCC 51299) suşu üzerindeki etkileri grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.16).



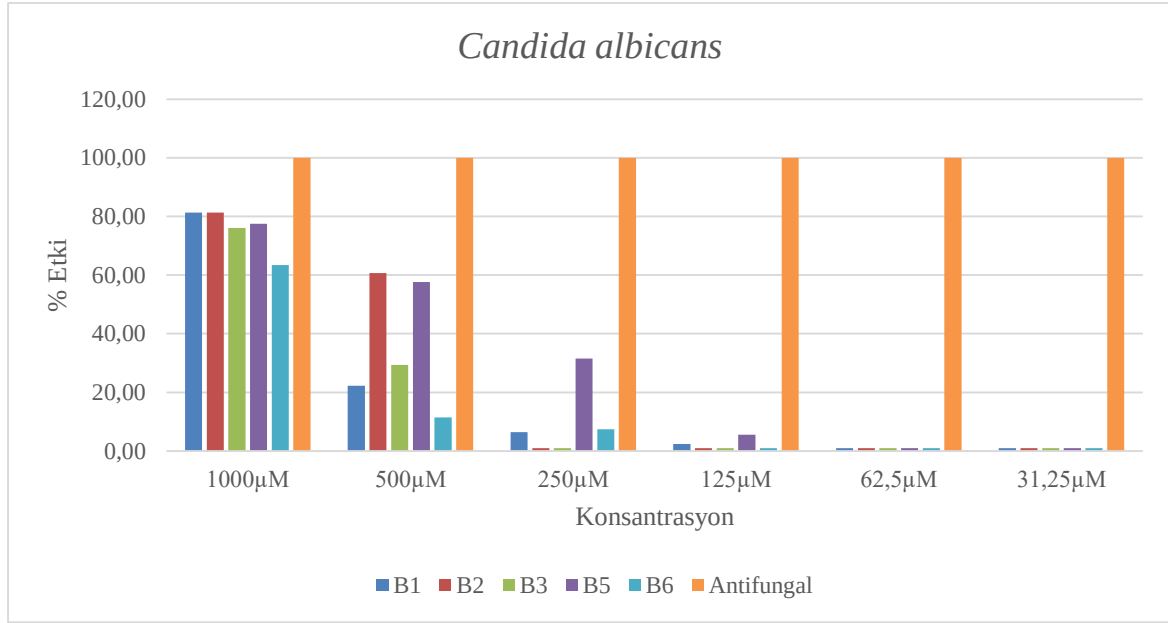
Şekil 4.16. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin VRE (ATCC 51299) suşu üzerindeki %inhibisyon etkisi

Bileşiklerin 1000 μM konsantrasyonlarının *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) bakterisi üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğu ve konsantrasyonun azalmasıyla antimikrobiyal etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin çeşitli konsantrasyonlarının (1000 - 31,25 μM), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) suşu üzerindeki etkileri grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) suşu üzerindeki %inhibisyon etkisi

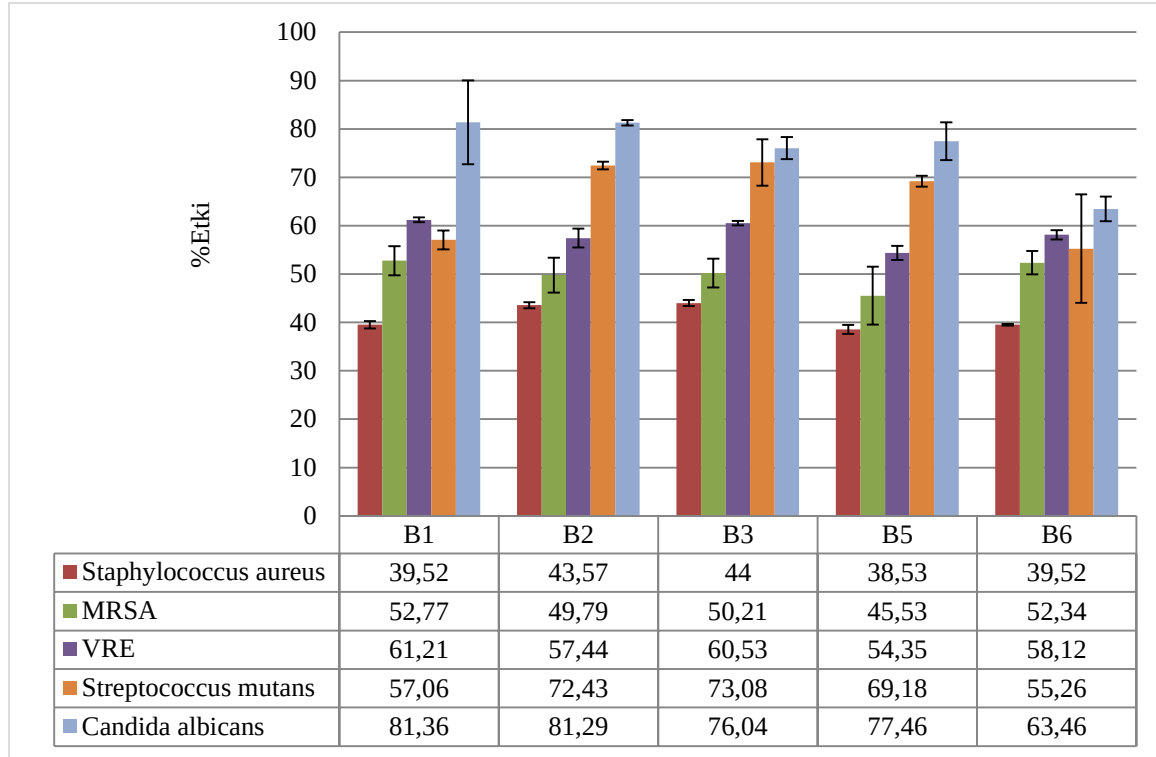
Bileşiklerin 1000 μM konsantrasyonlarının *Candida albicans* (ATCC 10231) bakterisi üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğu ve konsantrasyonun azalmasıyla antimikrobiyal etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler ile; %10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin çeşitli konsantrasyonlarının (1000 - 31,25 μM), *Candida albicans* (ATCC 10231) suşu üzerindeki etkileri grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin *Candida albicans* (ATCC 10231) suşu üzerindeki % inhibisyon etkisi

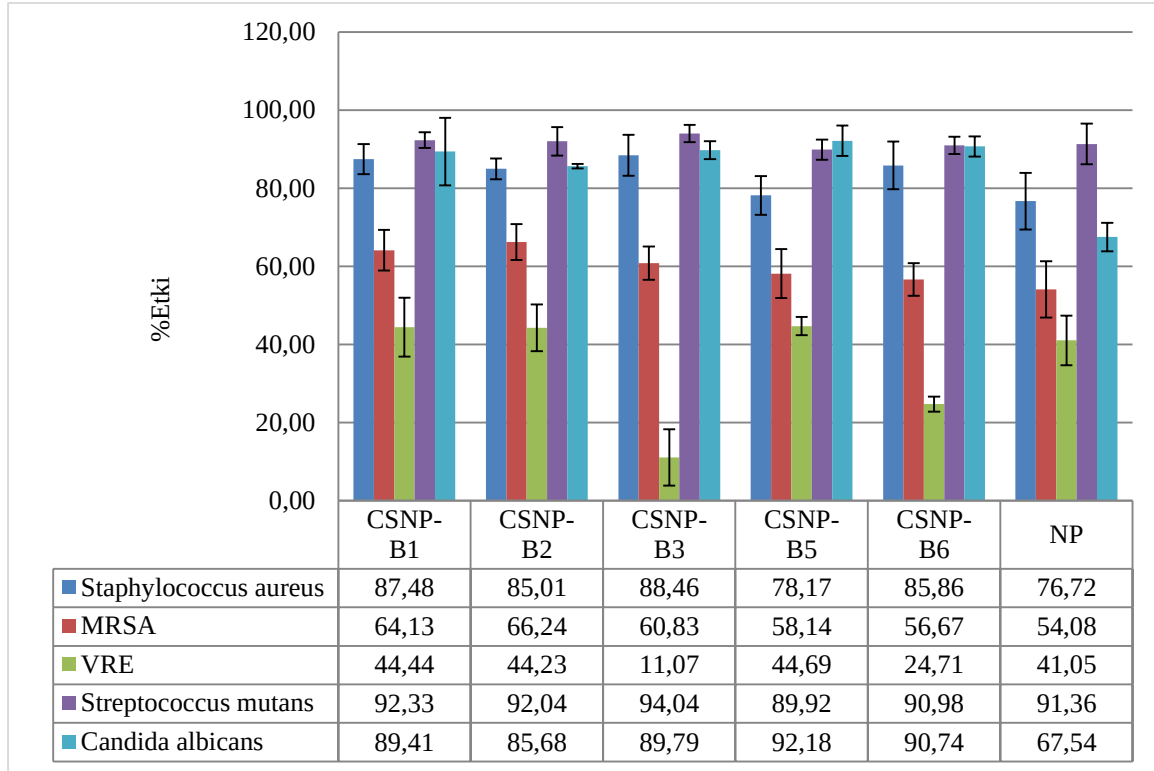
Tüm bileşiklerin 1000 µM konsantrasyonlarının; *S. aureus* (ATCC 25923), MRSA (ATCC 43300), VRE (ATCC 51299), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğu belirlenmiş ve bileşiklerin 1000 µM konsantrasyonlarının kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmesi ile antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilere göre tüm bileşiklerin 1000 µM konsantrasyonlarının *C. albicans* mayası üzerinde %63,46 ile %81,36 oranında inhibisyon etkisi olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber tüm bileşiklerin 1000 µM konsantrasyonlarının *S. mutans* bakterisi üzerinde en az %55,26 (B6) inhibisyon etkisi olduğu ve en düşük etkinin ise *S. aureus* bakterisi üzerinde B5 maddesinin gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. 1000 μ M konsantrasyonunda B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin antimikrobiyal etkinlikleri

Bileşiklerin 1000 μ M konsantrasyonlarının kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmesi ile elde edilen verilere göre ise tüm maddelerde antimikrobiyal etkinliğin arttığı; *S. aureus* bakterisi üzerinde en düşük etkinliğin %76,72; *S. mutans* bakterisi üzerindeki en düşük etkinliğin %89,92 ve *C. albicans* mayası üzerindeki etkinliğinin en düşük 67,4 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.20).



Şekil 4.20. Bileşiklerin 1000µM konsantrasyonunda enkapsüle edilmiş CSNP-B1-B6 bileşiklerinin antimikrobiyal etkinlikleri.

4.7. Anti-Biyofilm Aktivite

%10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin ve enkapsüle edilmiş bileşiklerin *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşunun biyofilm oluşturma üzerindeki etkileri tabloda gösterilmiştir (Çizelge 4.8). Elde edilen verilere göre; tüm bileşiklerin *S. aureus* bakterisinin biyofilm oluşturma üzerinde etkisi olduğu bununla beraber kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmiş bileşiklerin tamamında biyofilm oluşumunun engellendiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri

	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> Kontrol
B1	I	II
B2	I	II
B3	I	II
B5	I	II
B6	I	II
CSNPB1	0	II
CSNP-B2	0	II
CSNP-B3	0	II
CSNP-B5	0	II
CSNP-B6	0	II

%10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin ve enkapsüle edilmiş bileşiklerin MRSA (ATCC 43300) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri tabloda gösterilmiştir (Çizelge 4.9). Elde edilen verilere göre; tüm bileşiklerin MRSA bakterisinin biyofilm oluşturmada üzerinde etkisi olduğu ayrıca kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmiş bileşiklerin tamamında biyofilm oluşumunun engellendiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin MRSA (ATCC 43300) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri

	MRSA	MRSA Kontrol
B1	I	II
B2	I	II
B3	I	II
B5	I	II
B6	I	II
CSNPB1	0	II
CSNP-B2	0	II
CSNP-B3	0	II
CSNP-B5	0	II
CSNP-B6	0	II

%10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin ve enkapsüle edilmiş bileşiklerin VRE (ATCC 51299) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri tabloda gösterilmiştir (Çizelge 4.10). Elde edilen verilere göre; tüm bileşiklerin VRE bakterisinin biyofilm oluşturmada

üzerinde etkisi olduğu ayrıca kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmiş bileşiklerin tamamında biyofilm oluşumunun engellendiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin VRE (ATCC 51299) suşunun biyofilm oluşturması üzerindeki etkileri

	VRE	VRE Kontrol
B1	I	I
B2	I	I
B3	I	I
B5	I	I
B6	I	I
CSNPB1	0	I
CSNP-B2	0	I
CSNP-B3	0	I
CSNP-B5	0	I
CSNP-B6	0	I

%10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin ve enkapsüle edilmiş bileşiklerin çözdürülen maddelerin *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) suşunun biyofilm oluşturması üzerindeki etkileri tabloda gösterilmiştir (Çizelge 4.11). Elde edilen verilere göre; tüm bileşiklerin çözdürülen maddelerin *S. mutans* (ATCC 25175) bakterisinin biyofilm oluşturması üzerinde çok etkili olduğu, B2 ve B5 bileşiklerinin biyofilm oluşumunu tamamen engellediği ayrıca kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmiş bileşiklerin tamamında biyofilm oluşumunun engellendiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin *Streptococcus mutans* (ATCC) suşunun biyofilm oluşturması üzerindeki etkileri

	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> Kontrol
B1	I	III
B2	0	III
B3	I	III
B5	0	III
B6	I	III
CSNPB1	0	III
CSNP-B2	0	III
CSNP-B3	0	III
CSNP-B5	0	III
CSNP-B6	0	III

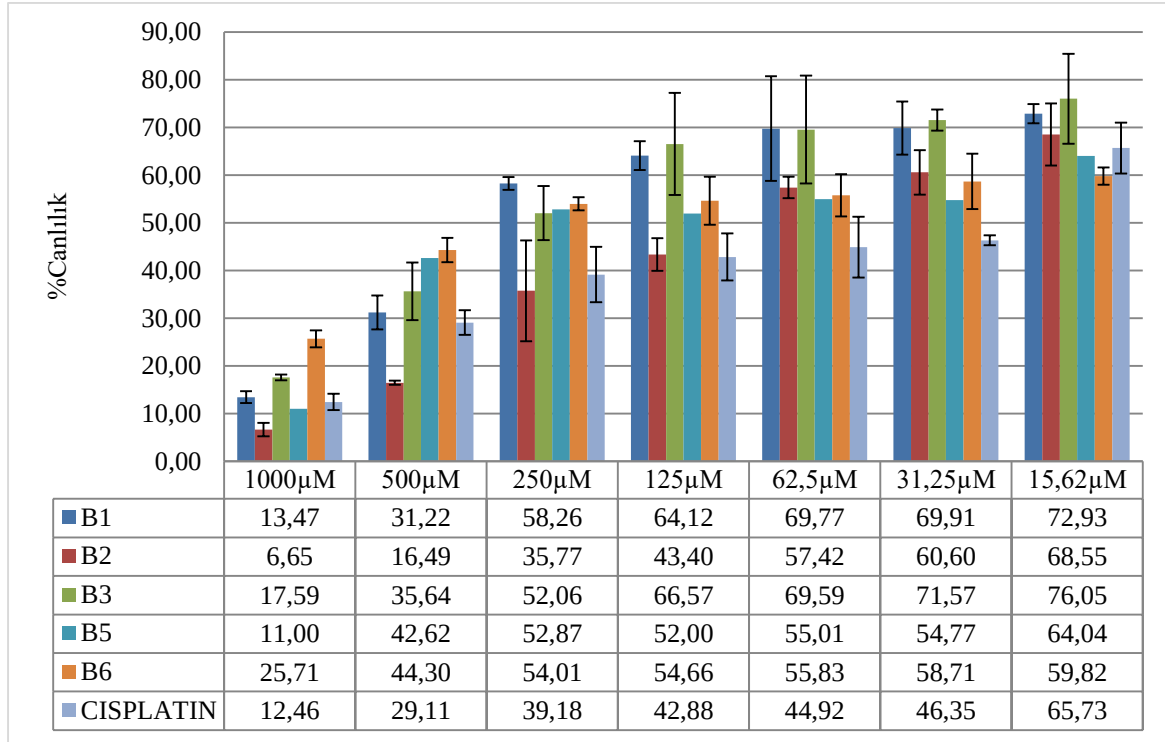
%10'luk DMSO'da çözdürülen bileşiklerin ve enkapsüle edilmiş bileşiklerin çözdürülen maddelerin *Candida albicans* (ATCC 10231) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri tabloda gösterilmiştir (Çizelge 4.12). Elde edilen verilere göre; tüm bileşiklerin çözdürülen maddelerin *Candida albicans* (ATCC 10231) bakterisinin biyofilm oluşturmada üzerinde çok etkili olduğu, B2 ve B5 bileşiklerinin biyofilm oluşumunu tamamen engellediği ayrıca kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmiş bileşiklerin tamamında biyofilm oluşumunun engellendiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. Bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin *Candida albicans* (ATCC 10231) suşunun biyofilm oluşturmada üzerindeki etkileri

	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> Kontrol
B1	I	III
B2	I	III
B3	I	III
B5	I	III
B6	II	III
CSNP-B1	0	III
CSNP-B2	0	III
CSNP-B3	0	III
CSNP-B5	0	III
CSNP-B6	0	III

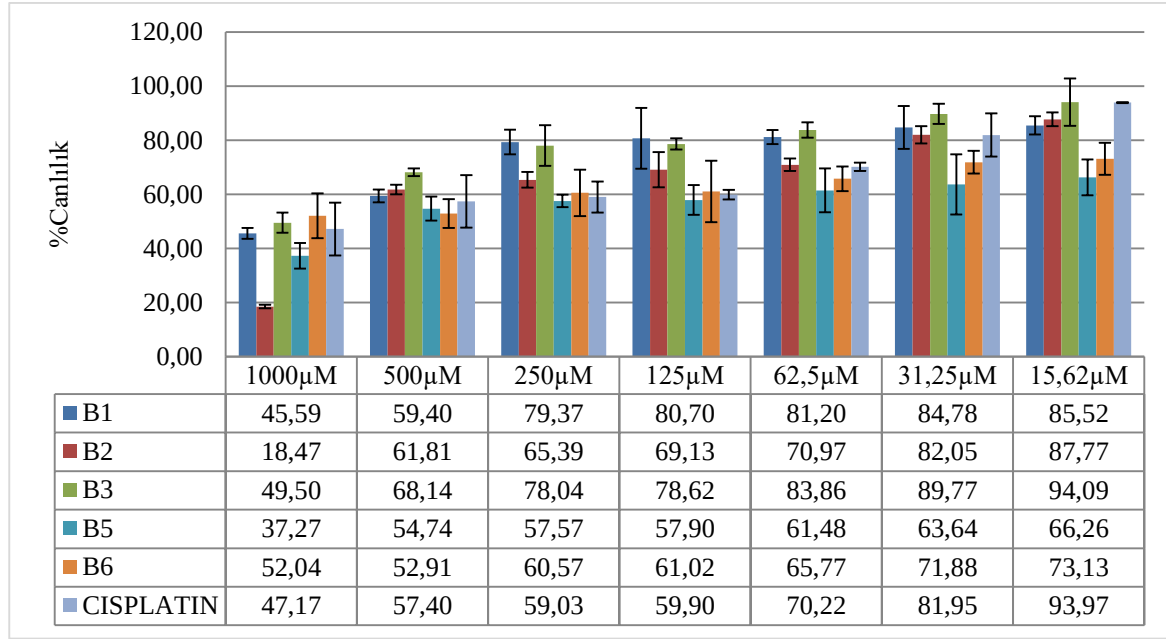
4.8. Sitotoksikite

L929 ve A549 hücreleri, 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler bileşiklerin %10'luk DMSO'da çözdürülmüş ve hücreler bileşiklerin ve enkapsüle bileşiklerin 6 farklı konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra, MTT yöntemi ile her konsantrasyon için formazan oluşumu tayin edilerek kontrol kültürlerinde elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır. Çözücü kontrolünün etkisi değerlendirilerek, her konsantrasyon için % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Bileşiklerin L929 ve A549 hücrelerine karşı etki değerlendirilmeleri Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de; enkapsüle bileşiklerin L929 ve A549 hücrelerine karşı etki değerlendirilmeleri Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'de gösterilmektedir.

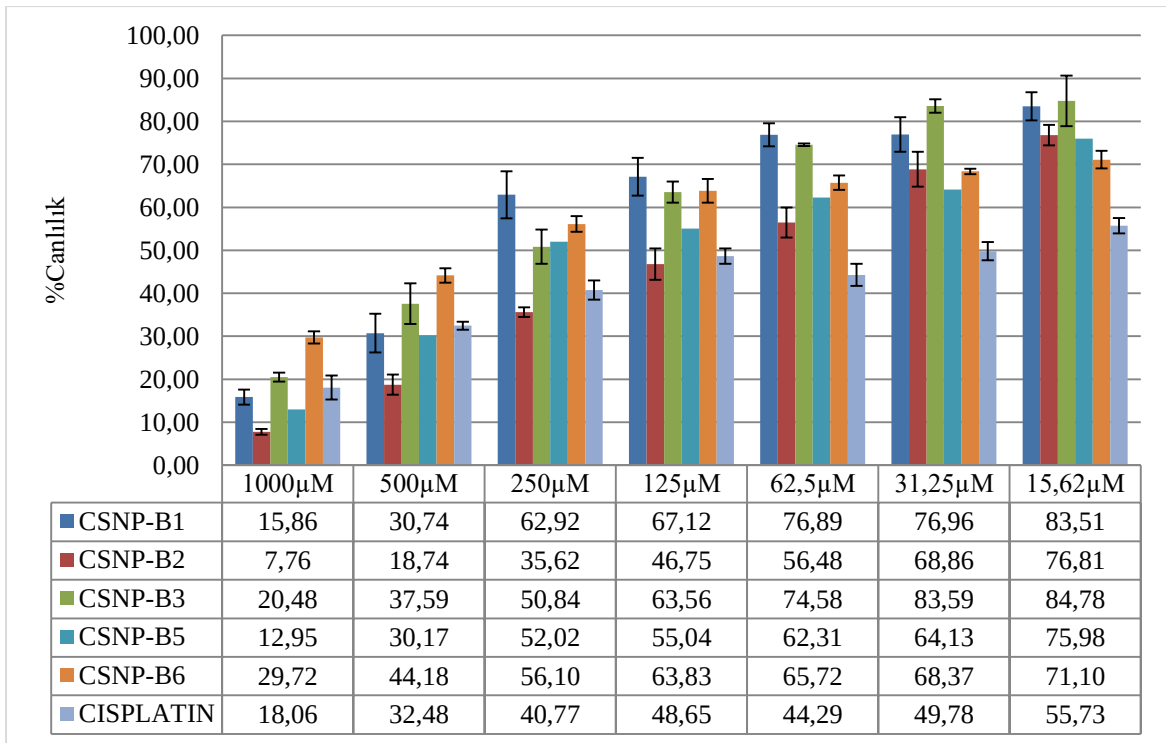


Şekil 4.21. B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin (1000 µM-31,25 µM) ve Sisplatinin (1000 µM-31,25 µM) L929 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

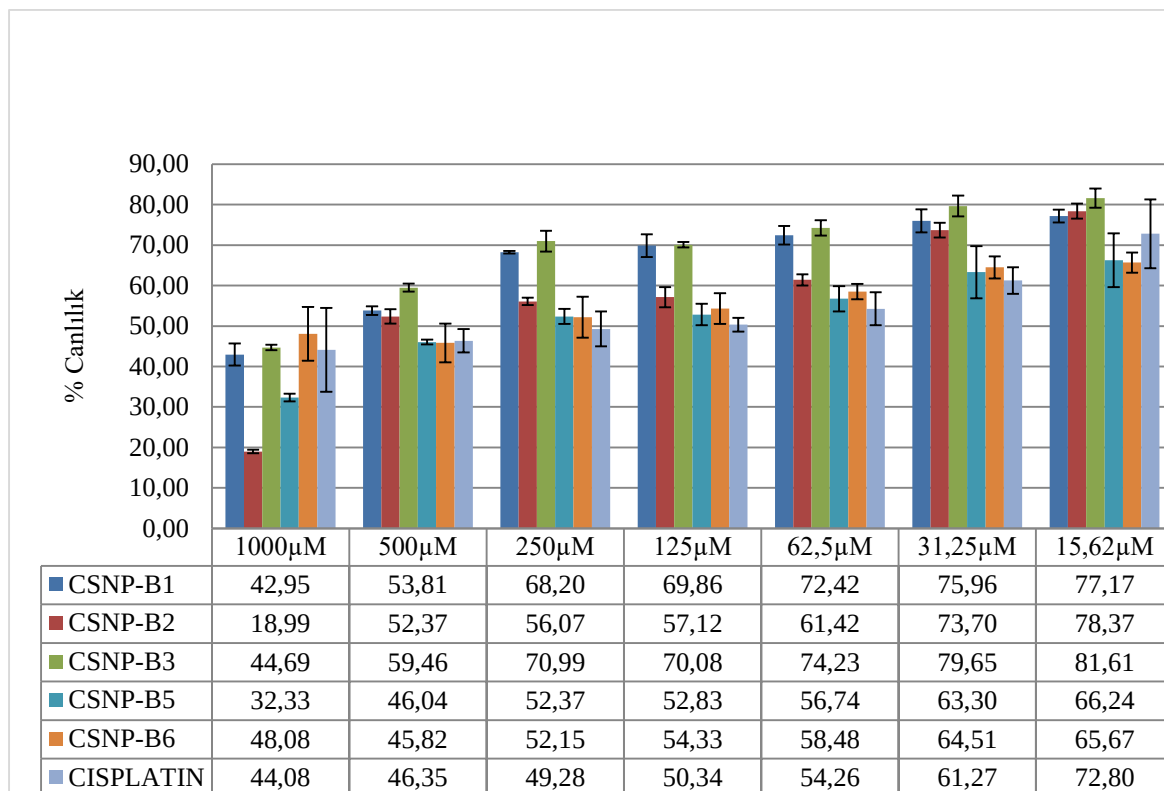
Elde edilen verilere göre tüm maddelerin konsantrasyona bağlı olarak her iki hücre hattında da sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. L929 hücre hattında en düşük sitotoksik aktiviteyi B6 bileşiği göstermiştir. Bununla birlikte B1, B3 ve B6 bileşiklerinin 1000µM konsantrasyonda, A549 hücrelerine sisplatinin 1000µM konsantrasyonundan daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. B1, B3 ve B6 bileşiklerinin ise 1000 µM konsantrasyonunda L929 hücrelerine sisplatinden daha düşük sistotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.22. B1, B2, B3, B5, B6 bileşiklerinin (1000µM-31,25µM) ve Sisplatinin (1000µM-31,25µM) A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri



Şekil 4.23. Enkapsüle B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin (1000µM-31,25µM) ve Sisplatinin (1000µM-31,25µM) L929 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri



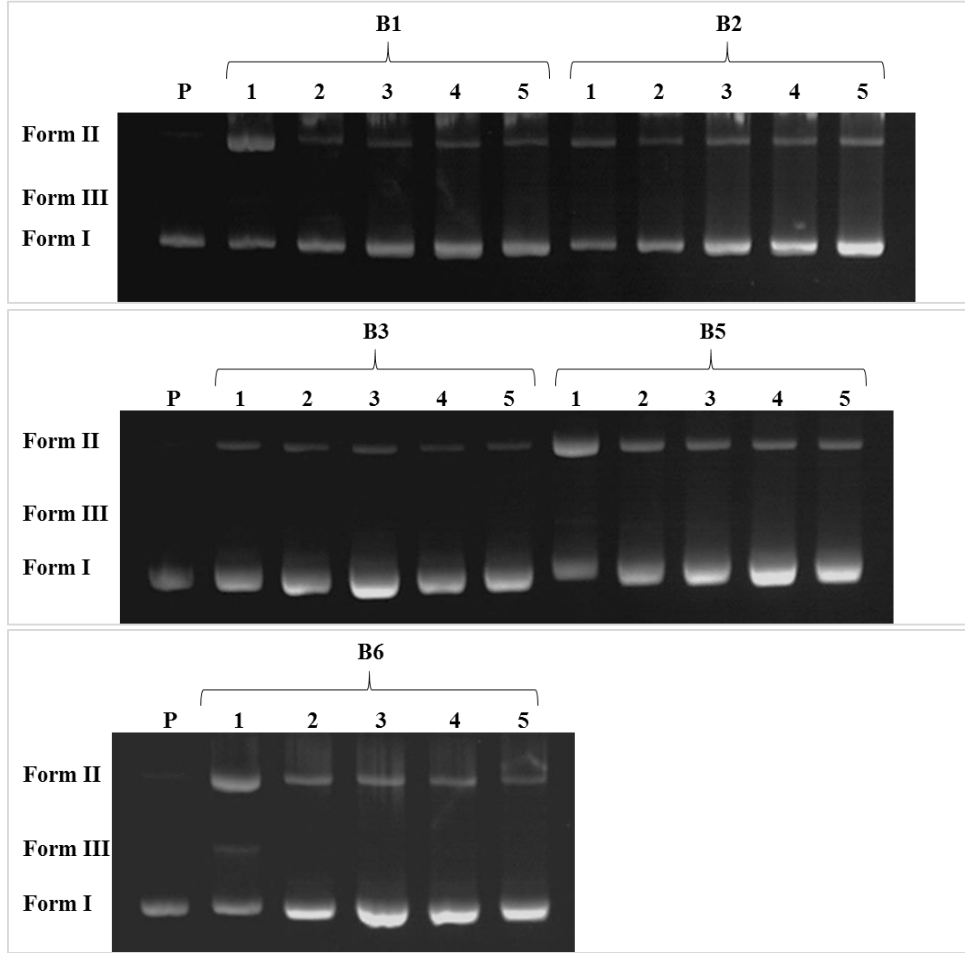
Şekil 4.24. Enkapsüle B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin (1000µM-31,25µM) ve Sisplatinin (1000µM-31,25µM) A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

Elde edilen verilere göre tüm enkapsüle bileşiklerin konsantrasyona bağlı olarak her iki hücre hattında da sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. A549 hücre hattında en yüksek sitotoksik aktiviteyi enkapsüle B6 bileşiği göstermiştir. Bununla birlikte enkapsüle B1, B2 ve B5 bileşiklerinin 1000µM konsantrasyonda, A549 hücrelerine karşı sisplatinin 1000µM konsantrasyonundan daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Enkapsüle B3 ve B6 bileşiklerinin ise 1000 µM konsantrasyonunda L929 hücrelerine sisplatinden daha düşük sistotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

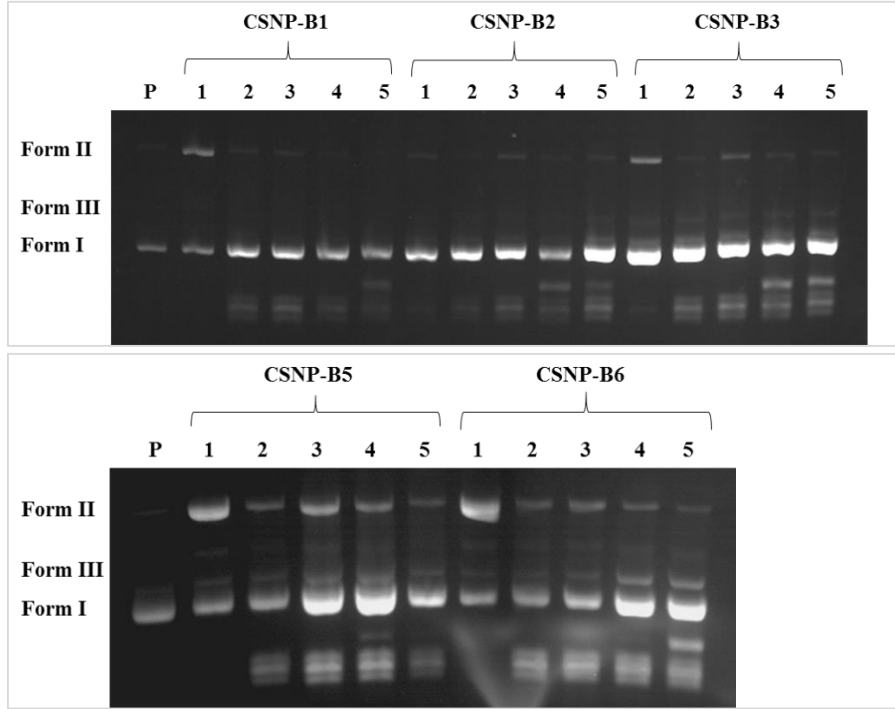
4.9. Bileşiklerin DNA Üzerine Etkisi

Çalışmada kullanılan B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin plazmit DNA ile etkileşimleri agaroz jel elektroforezi ile araştırılmıştır. Bileşiklerin 1000, 500, 250, 125 ve 62,5 µM konsantrasyonlarının pBR322 plasmid DNA ile etkileşiminden elde edilen sonuçlarda pBR322 plasmid DNA'nın 2 formu da görülmüştür. Bileşiklerin konsantrasyonları arttıkça, özellikle B1 ve B3 için hem form I hem de II bantlarının hareketlerinin ve yoğunluklarının biraz azaldığı gözlemlenmiştir. B1 bileşiği için aynı zamanda lineer form olan form III gözlemlenmiştir. B5 bileşiğinde, bileşiğin konsantrasyonunun artmasıyla form I bandının

yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir (Resim 4.2). CSNP-B1, CSNP-B2 ve CSNP-B3 nanopartiküllerinde de form I hareketliliğinde benzer şekilde azalma gözlenmiştir. CSNP-B2 ve CSNP-B3’de, form I’de küçük bantlar gözlenmiş olup, bu da DNA kırıklarının oluştuğunu göstermektedir (Resim 4.3).



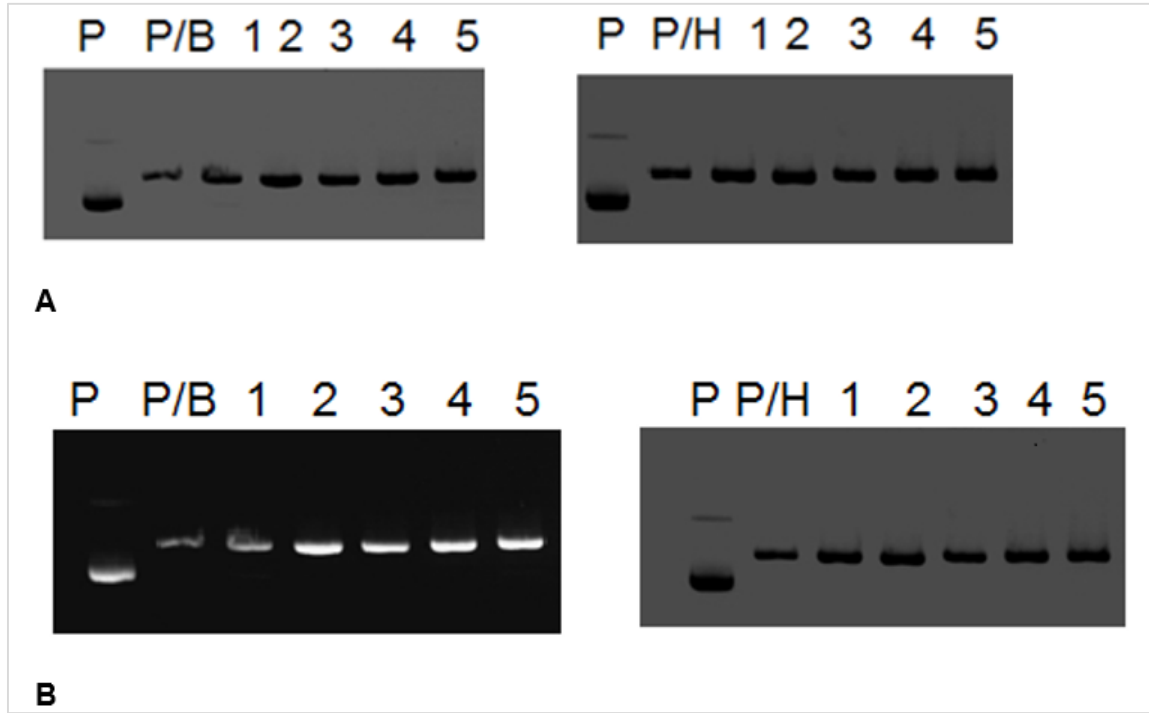
Resim 4.2. Bileşiklerin 1000, 500, 250, 125 ve 62,5 μ M konsantrasyonlarının pBR322 plasmid DNA ile etkileşiminden elde edilen elektrofotogram



Resim 4.3. Enkapsüle bileşiklerin 1000, 500, 250, 125 ve 62,5 μ M konsantrasyonlarının pBR322 plasmid DNA ile etkileşiminden elde edilen elektrofotogram

BamHI ve HindIII enzimleri ile restriksiyon endonükleaz reaksiyonu

Bileşiklerin DNA'daki nükleotitlere bağlanma durumlarını belirlemek için; bileşiklerin (B1-B6) ve kitosan nanopartiküle enkapsüle edilmiş bileşiklerin (CSNP-B1-CSNP-B6) 1000 μ M konsantrasyon ile muamele edilmiş plazmit DNA'nın *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleazlar ile enzim kesimleri yapılmıştır. *Bam*HI enzimi DNA üzerindeki 5'-G/GATCC-3' bölgesini tanıırken; *Hind*III enzimi 5'-A/AGCTT-3' bölgesini tanımaktadır. *Bam*HI ile muamele edilmiş bileşik-DNA karışımlarından tüm örneklerin enzim ile kesildiği görülmekte ve aynı şekilde *Hind*III enziminin tüm örnekleri kestiği tespit edilmiştir. Bu durum hiçbir bileşiğin ve enkapsüle bileşiğin DNA'ya *Bam*HI ve *Hind*III enzimlerinin kesim bölgesindeki nükleotitlerden bağlanmadığını göstermektedir. Bileşikler ve nanopartiküller ile etkileşime girmiş DNA'nın enzim kesimine bakıldığında bileşiğin DNA'ya A/A ve G/G nükleotitlerinden bağlanmadığı enzim kesiminin gerçekleştiği belirlenmiştir. Buna dayanarak maddenin DNA'ya olan etkisinin bağlanma şeklinde olmadığı belirlenmiştir. Etkileşimin elektrostatik etkileşimler ile olabileceği düşünülmektedir (Resim 4.4).



Resim 4.4. Çalışmada kullanılan bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA'nın BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile kesimi (A), Çalışmada kullanılan enkapsüle bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA'nın BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile kesimi (B). (P): Bileşiklerle muamele edilmemiş plazmit DNA; (P/B): BamHI ile kesilmiş plazmit DNA; (P/H): HindIII ile kesilmiş plazmit DNA

5. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2019 verilerine göre, dünyadaki ölüm sebepleri arasında ilk 10 hastalık arasında enfeksiyon hastalıkları ve kanser türleri bulunmaktadır.

Tüm dünyada özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimi gösteren patojen mikroorganizmalar sebebiyle önemli bir sağlık problemi haline gelmiş olan enfeksiyon hastalıkları için yeni antimikrobiyal ajanların keşifleri ile ilgili yapılan çağrılar ve yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Bu süreçte araştırmacılar fosfazen türevlerinin patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmiş ve yeni fosfazen türevleri sentezlenmesi çalışmalarına hız kazandırmışlardır.

Kanser tedavisinde kullanılmakta olan etkili yöntemlerden biri olan kemoterapik ilaçların yüksek toksisiteye sahip olması nedeniyle tedavi sırasında sağlıklı hücrelere de hasar verdiği bilinmektedir. Bu nedenle yeni kemoterapötik ajanların araştırılma ve geliştirilme çalışmaları devam etmektedir. Fosfazen türevlerinin birçok farklı kanser hattı üzerindeki sitotoksik etkisini ortaya koymak için de çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Nanoteknolojinin geçmiş yıllarda hız kazanarak, hastalıkların tedavisinde etkili ve hedefe yönelik ajanların geliştirilmesi çalışmaları ile enfeksiyon hastalıkları ve kanser tedavileri alanlarında umut vaadeden sonuçlar elde edilmiştir. Fosfazen türevlerinin mikroorganizmalar ile kanser hücreleri üzerine olan etkilerinin, nanopartiküllerin sağladığı avantajlar ile biraraya getirilmesi, bu hastalıkların tedavi süreçlerinde ortaya çıkan; ilaçlara karşı direnç ve toksik etkilerin azaltılması hatta ortadan kaldırılması potansiyelini ortaya koymaktadır. Bununla beraber, hastane enfeksiyonlarının başlıca sebepleri arasında gösterilen tıbbi cihaz ve ekipmanlar üzerinde oluşan biyofilm oluşumunun engellenmesi de toksik etki göstermeyen fakat mikroorganizma tutunmasını engelleyen nanopartikül düzeyde yüzey kaplamaları ile engellenebilmektedir. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında; kitosan nanopartiküllere enkapsüle edilmiş fosfazen türevlerinin enfeksiyon hastalıklarının ve kanserin tedavisi ile biyofilm oluşumunun engellenmesinde yeni bir ajan olarak potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Khoerunnisa ve diğeri (2021), iyonik jelasyon yöntemi ile sentezledikleri kitosan/TPP nanopartiküllerin *Echerichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. Sentezledikleri kitosan/TPP nanopartiküllerin her iki mikroorganizma için de yüksek antimikrobiyal etkinlik sergilediğini gözlemlemişlerdir. Bu etkinliğin kitosan ve türevlerinin hücrelerdeki lipopolisakkarit tabakanın anyonik olmasından kaynaklı olduğunu ve bunun katyonik yapıdaki kitosan nanopartiküllerin daha iyi absorbe edilmesini teşvik ettiğini bildirmişlerdir (Khoerunnisa ve diğeri, 2021).

Hu ve diğeri (2021), çalışmalarında, A549 insan akciğer kanseri hücre hattında aptamer (Apt)-konjuge kitosan (CST) kapsüllenmiş mikojenik (*Talaromyces purpureogenus* (Tp)) altın nanoparçacıklarının (AuNP'ler) sitotoksitesini araştırmışlardır. TEM analizi ile Tp-AuNP'ler ve Apt-CST-Tp-AuNP'ler sırasıyla 37.06 ± 6.70 nm ve 62.05 ± 15.22 nm boyutlarında bulunduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen kitosan/TPP nanopartikülleri de benzer bulgular elde edilmiş ve SEM ile incelendiğinde 32.85 ile 59.72 nm aralığında gözlemlenmiştir. Apt-CST-Tp-AuNP'lerin 47.31 ± 0.63 mV zeta potansiyeli sergilediğini ve Tp-AuNP'lerin ise -58.83 zeta potansiyeli sergilediğini gösterdi. Bu tez çalışmasında elde edilen kitosan/TPP nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin de bu çalışma bulgularına yaklaşık olmakla beraber $+41,6$ mV olduğu gözlemlenmiştir. Apt-CST-TpAuNP'ler insan akciğer kanseri hücrelerinde (A549) yaklaşık %60 sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve Apt-CST-Tp-AuNP'lerin A549 hücrelerinde Tp-AuNP'ler ve CST-Tp-AuNP'lerden daha yüksek sitotoksik etkiye (~ 8.60) sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan bileşikler ile bu bileşiklerin kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmeleriyle elde edilen sitotoksikite çalışması bulguları arasında da benzer şekilde çok büyük bir fark gözlemlenmemiştir (Hu, Saravanakumar, Sathiyaseelan, Rajamanickam ve Wang, 2021).

Marangon ve diğeri (2020), kitosan/TPP nanopartiküllerini iyonik jelasyon yöntemi ile sentezleyerek bir biyosüpfaktan olarak bilinen rampolidi enkapsüle etmişlerdir. Bu sentezledikleri nanopartiküllerin *Staphylococcus aureus* DSM 1104, *Staphylococcus aureus* DSM 2569 (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044 ve *Klebsiella oxytoca* DSM 5175 mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal ile antibiyofilm etkilerini ve HUVEC insan endotel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Sentezlenen ve yükleme yapılan nanopartiküllerin, kitosanın ve rampolidin ayrı ayrı gösterdiği antimikrobiyal ve antibiyofilm etkiyi arttırdığını hatta biyofilm tabakasının üst katmanının

ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da sentez bileşiklerin tek başlarına gösterdiği antimikrobiyal ve antibiyofilm etkiyi, kitosan/TPP nanopartiküllere enkapsüle edildiklerinde özellikle *S. aureus* bakterisi üzerinde ciddi şekilde arttırdığını gözlemledik. HUVEC insan endotel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırdıklarında ise bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile paralel olarak; enkapsüle edilmiş rampolin ile tel başına hücrelere uygulanmış rampolin arasında belirgin bir fark gözlemlemediklerini fakat düşük konsantrasyonlarda sitotoksitede azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir (Marangon ve diğerleri, 2020).

De Carvalho ve diğerleri (2019), kitosan nanopartikülleri, çapraz bağlayıcı olarak tripolifosfat (TPP) kullanılarak iyonik jelasyon ile sentezlemişler ve sentezledikleri nanopartiküllerin *Candida albicans* türüne karşı etkinliğini ve biyofilm oluşturma özelliklerindeki değişimi nistatin antifungal ajanı ile karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Sentezledikleri nanopartiküllerin, serbest kitosan ve nistatin ile karşılaştırdıklarında zamanla daha düşük *C. albicans* canlılığına neden olduğunu, bununla beraber nanopartiküllerin, *C. albicans*'ın yüzeye yapışmasını ve biyofilm oluşumunu azaltarak biyofilm oluşumunu yavaşlattığını gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında da *C. Albicans* üzerinde hali hazırda etkili bulunmuş olan B1-B6 maddelerinin, kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmesiyle biyofilm oluşumunun engellendiği gözlemlenmiştir (de Carvalho ve diğerleri, 2019).

Sullivan ve diğerleri (2018), düşük molekül ağırlıklı ve orta molekül ağırlıklı kitosan kullanarak, iyonik jelasyon yöntemi ile sentezledikleri kitosan/TPP nanopartiküllerin, farklı pH koşullarında *Staphylococcus aureus* (NCIMB 13062), *Bacillus cereus* (NCIMB 9373), *Escherichia coli* (NCIMB 11943) ve *Pseudomonas fluorescens* (NCIMB 9046) mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Çalışmaları sonucunda düşük molekül ağırlıklı kitosan ile sentezlenen nanopartiküllerin daha yüksek antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini buna karşın orta molekül ağırlıklı kitosan ile sentezlenen nanopartiküllerin *E. coli* üzerinde daha yüksek etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında sentezlenen kitosan/TPP nanopartiküllerde, hücreye tutunma ve yapışmasının daha etkili olduğu bilinen düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılmıştır (Sullivan ve diğerleri, 2018).

Okumuş ve diğerleri (2021), yürüttükleri çalışmada mono-ferrosenil-2-cis-4-dikloro-ansa- (2,4-ansa; 3) ve mono-ferrosenil-spiro- (spiro; 4) heksaklorosiklotetrafosfazenler olmak üzere iki tür bileşik sentezlemişler ve bu bileşiklerin; 11 bakteri ve 3 maya suşuna karşı antimikrobiyal aktivitelerini, L929 fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik aktivitelerini ve DNA ile etkileşimlerini incelemişlerdir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında bileşik 3e *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* hariç tüm mikroorganizmalar karşı etkili bulunurken, bileşik 4 ve 4d test edilen tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Bileşik 3d ise çalışılan mikroorganizmalar üzerinde hiçbir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Sitotoksisite çalışmalarının bulgularına göre ise L929 fibroblast hücreleri üzerinde siklotetrafosfazenlerin (4 ve 4b hariç) 200 µg/ml konsantrasyonuna kadar toksik etki göstermemle birlikte proliferatif etki gösterdiği ve hiçbir konsantrasyonda sitotoksik etki göstermediği bildirilmiştir. MCF7 hücrelerinde de sitotoksik etki gözlemlenmemişlerdir. Buradan yola çıkarak sitotoksik etkinin 200 µg/ml'den yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkacağı ve maruz kalma süresinin uzatılması gerektiği sonucuna varmışlardır. DNA ile etkileşim çalışmalarında pBR322 plazmid DNA ile karşılaştırıldığında, 3e bileşiğinde Form I bandının en yüksek konsantrasyonda gözlenmediği ancak daha düşük konsantrasyonlarda hem Form I hem de Form II bandının gözlendiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, plazmit DNA, azalan 3a konsantrasyonu ile etkileşime girdiğinde, Form I bandı kaybolurken, en yüksek konsantrasyonlarda açık dairesel Form II çok hafif gözlenmiştir. 3d bileşiğinin en yüksek konsantrasyonunda bantlar saptanamamış olup 4, 4a ve 4d bileşiklerinde, fosfazenlerin DNA'da kırıklara yol açtığı bildirilmiştir. BamHI ve HindIII restrüksiyon endonükleazlarla kesim çalışmalarında ise bu tez çalışmasındaki bulguların aksine 4a bileşiğinin DNA'ya A/A v G/G bölgelerinden bağlandığını ve kesim işlemini engellediğini bildirmişlerdir (Okumuş ve diğerleri, 2021).

Kuzey ve diğerleri (2020), çalışmalarında 4-bromobenzyldiaminlerden, pirolidin, DASD ve piperidinin aşırı ise tamamen süstitüe monospirofosfazen türevleri sentezlemişlerdir. Sentezledikleri bu bileşiklerin *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (NRRL-B-3711), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) ve *Candida krusei* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinliklerini ve DNA ile

etkileşimlerini incelemişlerdir. Çalışması yapılan tüm mikroorganizmalara karşı bir antimikrobiyal etkinlik görülmüşken, 5b ve 6b hariç tüm siklotrifosfazenlerin, *E. coli* ATCC 25922'ye karşı Kloramfenikolden daha etkili olduğunu ve 6a, 7b, 6c ve 7c bileşiklerinin, *E. coli* ATCC 35218'e karşı hemen hemen Ampisilin kadar etkili olduğu bildirilmiştir. Tetrakloro (57), pirolidin (6a) ve DASD süstitüe (7b) fosfazenlerin, *C. Kruseias*'a karşı neredeyse Ketoconazole kadar etkili olduğunu, bununla birlikte, DASD süstitüe fosfazenlerin, *C. albicans*'a karşı Ketoconazole'den da daha etkili olduğunu gözlemlemişleridir. Bu tez çalışmasında da pirolidin ve DASD süstitüe bileşiklerin *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğu bulunmuştur. (Kuzey ve diğerleri, 2020).

İşcan ve diğerleri (2020), heksaklorosiklotrifosfazen ($N_3P_3Cl_6$, trimer) N/O donör atomlu benzilaminlerle monospiro- ve dispiro-trimerik fosfazen türevleri ve kısmen süstitüe tetrakloro fosfazenlerin sekonder aminlerle reaksiyonlarından elde edilen tamamen süstitüe fosfazen bileşiklerini sentezlemişlerdir. Sentezlemiş oldukları bileşiklerin; *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris* ve *Pseudomonas aeruginosa* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri ile DNA etkileşimlerini incelemişlerdir. Bileşiklerin *S. aureus*, *S. Typhimurium* ve *P. aeruginosa* üzerinde etkili olduğunu, bununla birlikte *E. faecalis* ve *E. coli* suşlarının oldukça dirençli olduklarını gözlemlemişlerdir. Pirolidin (6), piperidin (9 ve 10) ve DASD ile süstitüe edilmiş benzil-kollu monospirofosfazenlerin Gram pozitif bakterilerine karşı aktiviteye sahip olduğunu, buna karşın kloro (3 ve 4) ve morfolino (7 ve 8) bileşiklerinin aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında da pirolidin ve DASD ile süstitüe edilmiş bileşiklerin gram pozitif bakteriler üzerinde yüksek bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve pirolidin ve morfolin ile süstitüe bileşiklerin Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca tetrakloro monospiro (3) ve dikloro dispiro (15) bileşiklerinin Gram negatif bakterilerden; *S. typhimurium*, *P. vulgaris*, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae*'ye karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. DNA ile etkileşim çalışmalarında azalan konsantrasyonla beraber Form I ve II bileşik 3, 4 ve 15 haricinde gözlemlenmiş; özellikle bileşik 3 ve 4'ün DNA'yı parçaladığı bildirilmiştir. Bileşik 15'de ise konsantrasyon azaldıkça Form I ve II'nin bant yoğunluğunun arttığını bildirmişlerdir (İşcan ve diğerleri, 2020).

Öztürk ve diğerleri (2019), sentezlemiş oldukları NN-izopropil köprülü bisiklotrifosfazen bileşiklerinin; *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini, L929 fibroblast hücreleri ile A549 akciğer kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkinliklerini ve pBR322 plazmit DNA ile etkileşimlerini incelemişlerdir. 2a ve 2h bileşiklerinin; *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* ve *B. cereus* suşlarına karşı genel olarak önemli aktiviteleri olduğunu, ayrıca *C.krusei* suşuna karşı neredeyse Ketokanozol kadar aktif olduklarını gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında da en yüksek antimikrobiyal etkinliğin bir *Candida* türü olan *Candida albicans*'a karşı olduğu belirlenmiştir. Buna karşın *S. aureus*, *E. hirae*, *E. faecalis*, *C.tropicalis* ve *C. albicans* mikroorganizmalarının bu bileşiklere karşı dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Bileşiklerden 2d ve 2h'nin artan konsantrasyonla beraber sitotoksik aktivitelerinin de arttığını gözlemleyen araştırmacılar, bileşiklerin toksik etkisinin A549 akciğer kanseri hücrelerine olduğu kadar L929 fibroblast hücrelerine de olduğunu belirtmişlerdir. Yine, 2h bileşiğinin 2d bileşiğinden daha düşük toksik etkiye neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde bileşiklerin artan konsantrasyon ile beraber L929 fibroblast ve A549 akciğer kanseri hücrelerine sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. DNA etkileşim çalışmalarında ise genel olarak Form I ve II'nin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Özellikle pirolidin süstitüe olan 2h bileşiğinde artan konsantrasyonla Form I bandının yoğunluğunda artış olduğunu ve bu tez çalışmasındaki B1 bileşiğinde de gözlemlenmiş olan zayıf bir Form III bandı belirlendiğini bildirmişlerdir. BamHI ve HindIII ile muamele edilmiş bileşik-DNA karışımlarından tüm örneklerde enzim ile kesilmediği tespit edilmiştir Bunun ise bileşiklerin DNA'ya G/G ve A/A bölgelerinden bağlandığını gösterdiğini bildirmişlerdir (Öztürk ve diğerleri, 2019).

Tanrikulu ve diğerleri (2019), Cl değiştirme reaksiyonları ile heksaklorosiklotrifofazen, spirociklotrifosfazen türevlerini sentezlemişlerdir. Sentezlemiş oldukları fosfazen türevlerinin DNA etkileşim reaksiyonlarını araştırmışlardır. 1b, 1c, 3b-5b ve 6 bileşiklerinin plazmit DNA ile etkileşimlerinde; 3b, 4b ve 5b bileşiklerinin, form I ve form II DNA'nın hareketliliklerinde ve yoğunluklarında bir azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir. 1b, 1c ve 6 bileşiklerinin, plazmit DNA'nın çift sarmal yapısında kırılmaya neden olduğunu ve etkileşime tabi tutulan tüm bileşiklerin, spesifik G/G ve A/A nükleotitlerine bileşik

bağlanmaları gösteren enzim kesimini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (İnci Tanrikulu ve diğerleri, 2019).

Elmas ve diğerleri (2018), mono-(4-fluorobenzyl)-siklotetrafosfazen bileşiklerinin; *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258 ve *Candida tropicalis* Y-12968 mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini ve pUC18 plazmit DNA etkileşimlerini incelemişlerdir. 3e bileşiğinin, *E. faecalis*, *P. vulgaris* ve *S. aureus* dışındaki mikroorganizmaların çoğuna karşı aktivite gösterdiğini, özellikle de *K. pneumoniae*, *C. tropicalis* ve *C. albicans*'a karşı daha fazla inhibe edici aktivite sergilediğini gözlemlemişlerdir. Bu bileşiğin ayrıca *C. albicans* için Ketokonazolden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. DNA ile etkileşim çalışmalarında ise yüksek konsantrasyonlarda Form I bandının saptanamadığını, bununla beraber daha düşük konsantrasyonlarda gittikçe artan bant oluşumu gözlemlediklerini bildirmişlerdir (Elmas ve diğerleri, 2018).

Okumuş ve diğerleri (2016) sentezlemiş oldukları mono(4-nitrobenzil)spirosiklotrifosfazen bileşiklerinin *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus subtilis* ATCC 29213, *Bacillus cereus* NRLL B-3008, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida tropicalis* ATCC 13803 mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesini ayrıca L929 fibroblast hücrelerine, HeLa (ATCC CCL-2) servikal kanser hücrelerine ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini ve DNA etkileşimlerini incelemişlerdir. En yüksek konsantrasyondaki bileşiklerin denenen mikroorganizmalara karşı zayıf antimikrobiyal etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. 5a ve 6a bileşikleri *B. subtilis*; 6a ise *B. cereus* bakterisine karşı bileşik 6 ise *S. typhimurium* ve *E. coli* ATCC 35218 bakterilerine karşı etki göstermiştir. Bileşik 5b ve 6b ise *C. tropicalis* fungusuna karşı etkili olmuştur. Bileşiklerin, tüm hücre hatlarında konsantrasyon arttıkça daha yüksek bir sitotoksik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. tüm hücre hatlarında sitotoksik etki göstermiş fakat Bileşik 4c'nin kanser hücre hattında, yüksek konsantrasyonlarda bileşik 4a'ya göre daha toksik olduğu fakat bileşik 4c'nin fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin bileşik 4a'ya göre daha düşük olduğu belirlemişlerdir. Bileşik 4b, 5b ve 6b'nin plazmit DNA ile etkileşimlerinin benzer olduğu ve konsantrasyon azaldıkça Form 1 DNA'nın hareketliliğinde azalma olduğu; bileşik 4a, 5a, 6a, 4c, 5c ve 6c'nin DNA üzerinde çok az bir

etkiye sahip olduğu; tetraklorofosfazen bileşiklerinin ise DNA'yı parçaladığı belirlenmiştir. Bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA'nın BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen bantlaşmalara bakıldığında bileşiklerin enzim kesimini engellediğı ve bu bileşiklerin G/G ve A/A nükleotitlerinden DNA'ya bağlandığı bildirilmiştir. Nitro grubu redoks, aktif merkez olduğundan dolayı 4-nitro benzil öncüsü fosfazen halkasına birleşmektedir ve redoks aktif merkez içeren bileşiklerin DNA ile etkileşimi başlattığı ve bunun da bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesini arttırdığı düşünülmektedir (Okumuş ve diğerleri, 2016).

Başterzi ve diğerleri (2015), sentezlemiş oldukları spiro-ansa-spiro-cyclotriphosphazen bileşiklerinin; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini, L929 fibroblast ve A549 akciğer kanseri hücrelerine karşı sitotoksitelerini (WST-1) ve pBR322 plazmit DNA etkileşimlerini incelemişlerdir. Bileşiklerin, 7 numaralı örneğin *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* ve *E. coli* ATCC 25922 mikroorganizmaları üzerinde yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını ve $N_3P_3Cl_6$, heterocyclic heterosiklik aminler ve dibenzo-diaza podandları (3 ve 4) ve fosfazen türevlerinin (6, 8, 10a, ve 10b) diğer bir *E. coli* suşu ATCC 35218 üzerinde de belirgin aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Sitotoksitelerde çalışmalarında yalnızca 9a bileşiğinin 100 mg/mL konsantrasyonunda L929 fibroblast hücrelerine karşı düşük bir toksik etki gözlenmiş olup bileşiklerin A549 akciğer kanseri hücrelerine karşı konsantrasyonla orantılı olarak artan toksik etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. En yüksek sitotoksik etkiyi %42 oranında 9c bileşiğinin 100 mg/mL konsantrasyonunda sergilediğini bildirmişlerdir. AEM ve DASD süstitüe türevlerinin (10b ve 10c) aynı konsantrasyonda sırasıyla %32 ve %30 oranlarında, kısmen süstitüe edilmiş fosfazen türevlerinin (7 ve 8 numaraları örnekler) ise yine bu konsantrasyonda da sırasıyla %24 ve %28 oranında toksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Sonuç olarak sentezlemiş oldukları spiro-ansa-spiro-cyclotriphosphazen bileşiklerinin A549 akciğer kanseri hücreleri üzerinde L929 fibroblast hücrelerine göre daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bileşiklerin pBR322 plazmit DNA ile etkileşimleri incelendiğinde, pirolidin, AEM ve spiro-bino-spiro (sbs) 6'nın plazmit DNA üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını ve DASD'ın form I DNA'nın hareketliliğini artırdığını tespit etmişlerdir. $N_3P_3Cl_6$ 'nın plazmit DNA'nın zincirlerinde çentik oluşturarak hızlı hareket eden form I'i daha yavaş hareket eden form II'ye dönüştürdüğünü; fosfazen türevleri 5, 7, 8, 9b ve 9c'nin

form I DNA'nın hareketini artırırken 9a'nın yavaşlamaya yol açtığını belirlemişlerdir (Başterzi ve diğerleri, 2015).

Elmas ve diğerleri (2016) sentezledikleri 4-florobenzilspiro (N/O) siklotrifosfazen bileşikleri ile bu bileşiklerin fosfazeniyum tuzlarının (protik iyonik sıvılar-PILs) *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter faecalis* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi ve DNA ile etkileşimlerini incelemişlerdir. Bileşik 3c ve 4c'nin *E. faecalis*'e karşı diğer bileşiklere göre daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda tuzların serbest bazlara göre *C. albicans* ve *K. Pneumoniae* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinliğinin daha yüksek olduğunu ve tuz formunun antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığını bildirmişlerdir. Bu sonuçtan yola çıkarak, bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin tuz formlarının antimikrobiyal aktivite üzerinde daha yüksek bir etki sergileyebileceği düşünülmektedir. Araştırmacılar plazmit DNA ile etkileşimlerini incelediklerinde; konsantrasyon azaldıkça Form I DNA'nın hareketinin bir miktar arttığını ve bileşik 3d haricindeki diğer tüm bileşiklerin de benzer aktiviteye gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Plazmit DNA'nın BamHI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmesi çalışmalarında ise bu tez çalışmasında elde edilen verilerin aksine 3a, 3b, 3c, 4b ve 4c bileşiklerinin BamHI enziminin tanıma bölgesi olan GG nükleotitlerine; 3b, 4a ve 4b bileşiklerinin ise HindIII enziminin tanıma bölgesi olan AA nükleotitlerine bağlandığını tespit etmişlerdir (Elmas, Okumuş, Kılıç, Gönder ve Açık, 2016).

Berberoğlu ve diğerleri (2016) spiro-ansa-spiro ve spiro-bino-spiro tetramerik fosfazen türevlerinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* NRRL-B-3711 , *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Enterococcus faecalis* ATCC 292112, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 13803 ve *Candida krusei* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini, L929 fibroblast ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerine sitotoksik aktivitelerini ve DNA ile etkileşimlerini incelemişlerdir. Bileşiklerden, 16 kodlu bileşik hariç diğer bileşiklerin çok düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu; bileşik 16'nın bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin özellikle gram pozitif bakteriler ve mayalar üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Bileşik 13 ve 16'nın fibroblast ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları üzerinde sisplatin gibi yüksek

oranda sitotoksik etkisinin olduğunu ve IC50 değerlerinin sisplatinden daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise enkapsüle B1, B2 ve B5 bileşiklerinin 1000µM konsantrasyonda, A549 hücrelerine karşı sisplatinin 1000µM konsantrasyonundan daha etkili olduğu ve enkapsüle B1, B2 ve B5 bileşiklerinin ise 1000 µM konsantrasyonunda L929 hücrelerine sisplatinden daha düşük sistotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bileşiklerin DNA ile etkileşimleri incelendiğinde ise 12, 13, 14 ve 18 kodlu bileşiklerin DNA'nın hareket ve yoğunluğunu etkilediğini gözlemlemişlerdir (Berberoğlu ve diğerleri, 2016).

Elmas ve diğerleri (2014), 2-trans-6-dikloro asa (ansa-spiro-ansa) (1b, 2b, 1c ve 2c) ve 2-trans-6-dikloro monoferrosenil-spiro-asa siklotetrafosfazen (3a, 3b, 4a, 4b, 5a ve 5c) bileşiklerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* NRRL-B-3711, *Enterococcus faecalis* ATCC 292112, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida tropicalis* ATCC 13803 mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini, MCF-7 meme kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini ve DNA ile etkileşimlerini incelemişlerdir. Çalışmada elde edilen bileşiklerin ve ayrıca başlangıç bileşiği (N₄P₄Cl₈), piperidin, DASD (1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5] dekan), aminopodand 1 ve 2'nin; 2b, 2c ve 5a bileşiklerinin *B. subtilis*'e karşı etkili olduğunu; 3b, 4b ve 5b bileşiklerinin *B. cereus*'a karşı zayıf antimikrobiyal aktivite gösterdiğini; 5a bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 bakterisine karşı yine zayıf antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca bileşiklerin, bu tez çalışmasındaki maddelerin aksine antifungal etkiye sahip olmadığını tespit etmişlerdir. Bileşiklerin MCF-7 meme kanser hücre hattındaki sitotoksik aktivitesini incelediklerinde ise bileşik 1b ve 2b'nin yüksek konsantrasyonda hücre canlılığını %40 düşürürken aynı konsantrasyondaki sisplatinin %35 düşürdüğünü belirtmişlerdir. Bileşiklerin DNA ile etkileşimini belirlemek üzere yürüttükleri çalışmalardan elde edilen elektroforetogramlar incelendiğinde ise 3a-5a ve 3b-5b bileşiklerinin DNA'yı kesme yeteneğinin olduğunu görmüşler ve bu etkiye bileşiklerdeki redoks aktif ferrosen biriminin sebep olabileceğini söylemişlerdir (Elmas ve diğerleri, 2014).

Tümer ve diğerleri (2013) spirosiklik mono (1 ve 2) ve bisferrosenil siklotrifosfazenler (3–5) ile 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehidin (potasyum vanillinat) potasyum tuzunun Cl yer değiştirme reaksiyonları sonucunda mono (1a– 5a), geminal (gem-1b–5b), non-geminal

(cis-1b, cis-5b ve trans-2b–5b), tri (1c–5c) ve tetra-substitüe fosfazen (1d–5d) bileşiklerini elde etmişler ve bu bileşiklerin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *C. albicans* ve *C. tropicalis* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini, HeLa servikal kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri ve DNA ile etkileşimlerini araştırmışlardır. 5a,cis-1b ve 2c bileşiklerinin *E. coli* üzerinde, cis-1b bileşiğinin aynı zamanda *B. cereus* üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğunu gözlemleyen araştırmacılar; pirolidino-fosfazen N/O, 4-florobenzil- ve ferrosenil-spirosiklik gruplarının *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *C. Albicans* ve *C. Tropicalis* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında, tez çalışmamızın sonuçlarıyla benzerlik gösteren şekilde; 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dec-ane (DASD)-süstitüe ferrosenilfosfazenler, *S. aureus*, *B. cereus* ve *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal etki gösterirken tetra-morfolino süstitüe ferrosenilfosfazenler çalışması yapılan mikroorganizmalara karşı etkinlik göstermemiştir. Araştırmacılar Ferrosenil siklotrifosfazen türevlerinin antimikrobiyal etkinliklerinin, P atomuna bağlanan substitüentlere (pirolidin, 1,4-dioksa-8-azaspiro [4,5]dekan, morfolin ve vanillinato grupları) bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini söylemişlerdir. HeLa kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki çalışmalarında 2d bileşiğinin 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında aynı konsantrasyonda kullanılmış olan sisplatin ve paklitaksel kadar sitotoksik etkisinin olduğunu hatta 48 saatte hücre canlılığının azaldığını ve 72. Saatte canlılıkta biraz daha azalma olduğunu, bundan yola çıkarak pendant ferrosenil ve dört vanillin grubunun siklotrifosfazenlerin HeLa hücre hattına karşı antiproliferatif etkisini artırdığını bildirmişlerdir. DNA ile etkileşim çalışmalarında, bileşik 2d'nin en yüksek iki konsantrasyonunun süper sarmal DNA'nın yoğunluğunu artırdığını, madde konsantrasyonu azaldıkça form I'in hızında artış olurken form II'nin hızında azalma oluştuğunu ve DNA'da kırıklar meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Gem-1b ve cis-1b bileşiklerinin konsantrasyonu azaldıkça form I DNA'nın hız ve yoğunluğunda azalma olduğunu; 1d bileşiğinin konsantrasyonu arttıkça form I DNA'nın hız ve yoğunluğunda artış olduğunu ve bu tez çalışmasındaki B1 maddesinin DNA etkileşim sonuçlarıyla benzer şekilde, aynı zamanda DNA'nın kesilmesinden kaynaklanan form III bandının varlığını tespit etmişler. Enzim kesimi çalışmalarında, plazmit DNA BamHI ve HindIII enzimleri ile kesilmek istendiğinde DNA'nın kesilmediği görülmüş ve tez çalışmamızdaki bileşiklerin aksine bileşiklerin bu enzimlerin DNA'yı tanıma bölgesi olan G/G ve A/A nükleotitlerinden DNA'ya bağlandığını bildirmişlerdir (Tümer ve diğerleri, 2013).

Koçak ve diğerleri (2013), tam heterosiklik amin (pirolidin, piperidin, morfolin ve 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekan -DASD) substitüe sas 5a-5d ve sbs 6a-6d siklotrifosfazen bileşiği sentezlemişler ve bu bileşiklerin çeşitli patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA ile etkileşimlerini incelemişlerdir. Başlangıç bileşiği ($N_3P_3Cl_6$), pirolidin, piperidin, morfolin, DASD ve dibenzo-diaza podandının (2) sentezlenen fosfazen türevleri (3, 4, 5a-5d ve 6a-6d) ile birlikte antimikrobiyal aktivitesine bakıldığında $N_3P_3Cl_6$ bileşiğinin *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* NRRL-B-3711 ve *E. coli* ATCC 25922 bakterilerine; piperidinin *B. cereus* NRRL-B-3711, morfolinin *P. aeruginosa* ATCC 27853, ve DASD'ın *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. cereus* NRRL-B-3711 bakterilerine karşı zayıf antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. 6a bileşiğinin ise *Candida tropicalis*'e karşı oldukça yüksek bir antifungal etkisinin olduğunu belirtmişlerdir ve bu etkinin bileşiğin sbs yapısı ile pirolidinil yan gruplarından meydana gelmiş olabileceğini söylemişlerdir. 5000 - 625 μ M arasındaki konsantrasyonlardaki başlangıç bileşiği ($N_3P_3Cl_6$), pirolidin, piperidin, morfolin, DASD ve dibenzo-diaza podandı (2) ve sentezlenen fosfazen türevlerinin (3, 4, 5a-5d ve 6a-6d) pBR322 plazmit DNA ile etkileşimleri incelendiğinde bu tez çalışmasıyla paralel olarak pirolidin, morfolin ve 2 bileşiğinin plazmit DNA üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını; piperidin ve DASD'ın yalnızca form I DNA'nın hareketliliği üzerinde küçük bir azalmaya sebep olduğunu; buna karşın başlangıç bileşiğinin ciddi bir konformasyonel değişime neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Koçak ve diğerleri, 2013).

Asmafiliz ve diğerleri (2013); tetramorfolin mono- ve bisferrosenilmetilspirosiklotrifosfazen (8a-12a) bileşiklerini sentezlemiş ve bu bileşiklerin *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (NRLL B3008), *Bacillus subtilis* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Enterobacter faecalis* (ATCC 292112), *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *Candida tropicalis* (ATCC 13803) mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini ve DNA ile etkileşimlerini incelemişlerdir. 8a, 9a, 11a ve 12a bileşiklerinin antimikrobiyal etkinliklerini incelemiş ve kloramfenikol, ampicilin ve ketokanozol antimikrobiyal ajanları ile karşılaştırmışlardır. Bileşiklerin araştırmada kullanılan mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçların aksine tez çalışmamızdaki morfolin ile substitüe edilmiş bileşiklerin antimikrobiyal etkisinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 8a, 9a, 11a ve 12a bileşiklerinin plazmit DNA ile 24 saat boyunca etkileştirilmesi sonrasında DNA

bantlarını incelediklerinde 11a, 12a bileşiklerinin DNA'nın hareketini etkilediğini ve DNA'yı kestiğini belirlemişlerdir. Enzim kesimi çalışmalarında ise Plazmit DNA BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmek istenildiğinde bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin aksine enzimlerin DNA'yı kesemediğini görmüşler ve test edilen tetramorfolin fosfazenlerin plazmit DNA'da konformasyonel değişime sebep olduğunu söylemişlerdir (Asmafiliz, Kiliç, Öztürk, ve diğerleri, 2013).

Asmafiliz ve diğerleri (2013); tetrakloro mono (1 ve 2) ve bisferrosenilspirosiklotri fosfazenler (3–5) ile 1,4-dioksa- 8-azaspiro[4,5]dekanın (DASD) reaksiyonu sonucunda mono- (1a–5a), gem- (1b–5b), tri- (1c–4c) ve tetra-DASD-substitüe (1d–5d) ferrosenilsiklotrifosfazen bileşiklerini sentezlemişlerdir. Bu bileşiklerin *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterilerine karşı antimikrobiyal etkinliklerini, HeLa servikal kaner hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini ve DNA ile etkileşimini incelemişlerdir. Bileşiklerin 3a-5a ve 3c bileşiklerinin *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* NRRL-B-3 711 ve *S. aureus* ATCC 25923 mikroorganizmalarına karşı zayıf antibakteriyal etki gösterdiğini, 3a ve 4a bileşiklerinin *B. cereus* NRRL-B-3 711 bakterisine orta derecede antimikrobiyal etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerden DASD substitüe olan B1, bu çalışma ile benzer şekilde etki göstermemiştir. 2b, 1d, 2d ve 4d bileşiklerinin HeLa servikal kanser hücreleri üzerindeki etkisini sisplatin ve paklitaksel antikanser ajanlar ile karşılaştırarak değerlendirmişler ve 4d kodlu bileşiğin bu antikanser ajanlardan daha güçlü sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacıların sentezledikleri; 3a–5a, 2b, 4b, 3c, 4c ve 1d–5d bileşiklerinin plazmit DNA ile etkileşimleri incelendiğinde bu bileşiklerin DNA'da konformasyonel değişimlere sebep olduğu ve restriksiyon analizlerine bakıldığında bu sentez bileşiklerin DNA'ya A/A nükleotitlerinden bağlandığını tespit etmişlerdir (Asmafiliz, Kiliç, Hökelek, ve diğerleri, 2013)

Okumuş ve diğerleri (2011) $N_3P_3Cl_6$ bileşiğinin klorid yer değiştirme reaksiyonu yoluyla spirosiklik mono (1a ve 2a) ve bis(4-florobenzil) monospirosiklofosfazenleri (3a–5a); 1a-5a'nın pirolidin, morfolin ve 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekan (DASD) ile reaksiyonu sonucunda tam substitüe mono(4-florobenzil) (1b–2d) ve bis(4-florobenzil) (4b,4d–5d) monospirosiklofosfazenleri; kaynayan THF içindeki morfolin ve DASD ile reaksiyonu sonucunda ise monoklorobis(4-florobenzil) monospirosiklofosfazenler 4e ve 4f'yi sentezlemişlerdir. Sentezledikleri bu bileşiklerin *Escherichia coli* (ATCC 35218), *E. coli*

(ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 292112), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Bacillus cereus* (NRLLB-3008), *Bacillus subtilis* (ATCC 29213), *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *Candida tropicalis* (ATCC 13803) mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkiliğini ve DNA ile etkileşimlerini incelemişlerdir. 4b bileşiğinin *Candida* türleri üzerinde tek etkili bileşik olduğunu; 1b ve 4b bileşiklerinin ise *Bacillus* türleri ve *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların gözlemledikleri bu sonuçlar ile tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar *S. aureus* ve *C. albicans* üzerindeki etki ile paralellik gösterilen, bu tez çalışmasında *Bacillus* türleri üzerinde antimikrobiyal etki belirlenememiştir. Sentez bileşiklerin plazmit DNA ile olan etkileşimlerinde; plazmit DNA hareketi ve şeklini değiştirmede oldukça etkili olduğunu; 4a, 5a, 2a, 3a, 4e ve 4f bileşiklerinin DNA'yı diğer bileşiklere göre daha yüksek oranda kestğini belirlemişler ve restriksiyon enzimleri ile kesim çalışmaları sonucunda ise bileşiklerin bu çalışmadaki bileşiklerin aksine DNA'ya A/A nükleotitlerinden bağlandığını gözlemlemişlerdir (Okumuş ve diğerleri, 2011).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tezi kapsamında yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıdaki gibidir:

1. Bu çalışma; N-alkil-N'-2-piridilmetiletildiaminler ile heksaklorosiklotrifosfazen reaksiyonlarından elde edilen tetrakloro-2-piridilmetilspiro-N/N-etilendiamino-siklotrifosfazenleri; pirolidin, morfolin ve 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekan (DASD) ile reaksiyona sokulması sonucu elde edilmiş tam substitüe tetraaminosiklotrifosfazen bileşikleri ile yapılan ilk biyolojik aktivite ve nanopartikül çalışmasıdır.
2. Bileşiklerin 1000 µM konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkinlik gösterdiği ve kitosan/TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilmesi ile elde edilen verilere göre ise tüm maddelerde antimikrobiyal etkinliğin arttığı belirlenmiştir. *S. aureus* ve *S. mutans* bakterisi üzerindeki en düşük etkinliğin %75 ve *C. albicans* mayası üzerindeki etkinliğinin en düşük %67,4 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar sentezlenmiş ve kitosan nanopartiküllere enkapsüle edilmiş pirolidin, morfolin ve 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekan (DASD) ile substitüe tetraaminosiklotrifosfazen türevlerinin potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.
3. Yapılan biyofilm oluşumunun engellenmesi çalışmalarında, sentez fosfazenlerin *S. aureus*, MRSA, *S. mutans* ve *C. albicans* biyofilm oluşumunu azalttığı bununla beraber kitosan nanopartiküllere enkapsüle edilmeleriyle beraber biyofilm oluşumunu tamamen engellediği gözlenmiştir. Bu sonuçlar tamamen substitüe tetraaminosiklotrifosfazen türevlerinin kitosan ile beraber kullanılması ile yüzeylerde oluşabilecek ve özellikle hastane enfeksiyonlarına neden olabilecek biyofilm oluşumunun engellenmesi çalışmalarında yüzey kaplama malzemesi olarak kullanılabilirliğini akıllara getirmektedir.
4. Çalışmada elde edilen verilere göre, L929 hücre hattında en düşük sitotoksik aktiviteyi B6 bileşiği göstermiştir. Bununla birlikte B1, B3 ve B6 bileşiklerinin 1000µM konsantrasyonda, A549 hücrelerine sisplatinin 1000µM konsantrasyonundan daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. B1, B3 ve B6 bileşiklerinin ise 1000 µM konsantrasyonunda L929 hücrelerine sisplatinden daha düşük sistotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. A549 hücre hattında en yüksek sitotoksik aktiviteyi enkapsüle B6 bileşiği göstermiştir. Bununla birlikte enkapsüle B1, B2 ve B5 bileşiklerinin 1000µM konsantrasyonda, A549 hücrelerine karşı sisplatinin 1000µM

konsantrasyonundan daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Enkapsüle B3 ve B6 bileşiklerinin ise 1000 µM konsantrasyonunda L929 hücrelerine sisplatinden daha düşük sistotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu veriler, enkapsüle fosfazenlerin kanser tedavisinde kullanılmaya aday bir kemoterapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir.

5. Çalışmada kullanılan B1, B2, B3, B5 ve B6 bileşiklerinin plazmit DNA ile etkileşimleri agaroz jel elektroforezi ile araştırılmıştır. Bileşiklerin 1000, 500, 250, 125 ve 62,5 µM konsantrasyonlarının pBR322 plasmid DNA ile etkileşiminden elde edilen sonuçlarda pBR322 plazmit DNA'nın 2 formu da görülmüştür. Bileşiklerin konsantrasyonları arttıkça, özellikle B1 ve B3 için hem form I hem de II bantlarının hareketlerinin ve yoğunluklarının biraz azaldığı gözlemlenmiştir. B1 bileşiğı için aynı zamanda lineer form olan form III gözlemlenmiştir. B5 bileşiğinde, bileşiğın konsantrasyonunun artmasıyla form I bandının yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir. CSNP-B1, CSNP-B2 ve CSNP-B3 nanopartiküllerinde de form I hareketliliğinde benzer şekilde azalma gözlenmiştir. CSNP-B2 ve CSNP-B3'de, form I'de küçük bantlar gözlenmiştir, bu da DNA kırıklarının oluştuğunu göstermektedir. Bileşiklerin başka enzim kesim noktalarından bağlanabileceğı göz önünde bulundurularak, farklı enzim kesimi çalışmaları yapılabileceğı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abushaheen, M. A., Muzaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., ... Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, (xxxx), 100971. doi:10.1016/j.disamonth.2020.100971
- Agustinho, D. P., Miller, L. C., Li, L. X. ve Doering, T. L. (2018). Peeling the onion: The outer layers of *Cryptococcus neoformans*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(7), 1–8. doi:10.1590/0074-02760180040
- Ahern, K. (2019). *Biochemistry and Molecular Biology How Life Works*. The Great Courses.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., ... Walter, P. (2019). *Essential Cell Biology*.
- Allcock, H. R. (2006). Recent developments in polyphosphazene materials science. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 10(5–6), 231–240. doi:10.1016/j.cossms.2007.06.001
- Alotaibi, S. H. ve Momen, A. A. (2020). Anticancer Drugs ' Deoxyribonucleic Acid (DNA). *Biophysical Chemistry - Advance Applications* içinde (ss. 1064–1088).
- Asmafiliz, N., Kiliç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Süzen, Y. ve Öner, Y. (2013). Phosphorus-nitrogen compounds: Part 26. Syntheses, spectroscopic and structural investigations, biological and cytotoxic activities, and DNA interactions of mono and bisferrocenylspirocyclotriposphazenes. *Inorganica Chimica Acta*, 400, 250–261. doi:10.1016/j.ica.2013.03.001
- Asmafiliz, N., Kiliç, Z., Öztürk, A., Süzen, Y., Hökelek, T., Açık, L., ... Üstündağ, Z. (2013). Phosphorus-nitrogen compounds: Part 25. Syntheses, spectroscopic, structural and electrochemical investigations, antimicrobial activities, and DNA interactions of ferrocenyldiaminocyclotriposphazenes. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 188(12), 1723–1742. doi:10.1080/10426507.2013.779273
- Ayobami, O., Willrich, N., Reuss, A., Eckmanns, T. ve Markwart, R. (2020). The ongoing challenge of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 1180–1193. doi:10.1080/22221751.2020.1769500
- Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K. ve Kumar, N. S. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1072–1083. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113
- Başterzi, N. S., Koçak, S. B., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Çelik, Ö., ... Aydın, B. (2015). Syntheses, structural characterization and biological activities of spiro-ansa-spiro- cyclotriposphazenes †, 39, 8825–8839. doi:10.1039/c5nj01530h
- Baykara, O. (2016). Current Modalities in Treatment of Cancer. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 5(3), 154–165. doi:10.5505/bsbd.2016.93823

- Bayrakcı, M. ve Yılmaz, B. (2019). DNA ile bağlanabilen suda çözünür sülfonato kaliks [8] aren sentezi ve antimikrobiyal aktivitesi synthesis and antimicrobial activity of water-soluble sulfonato calix [8] aren binding with DNA. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 615–620. doi:10.28948/ngumuh.517209
- Begum, S., Begum, T., Rahman, N. ve Khan, R. A. (2021). A review on antibiotic resistance and way of combating antimicrobial resistance. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 14(02), 87–97.
- Behzadi, P., Baráth, Z. ve Gajdács, M. (2021). It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa. *Antibiotics*, 10(1), 1–29. doi:10.3390/antibiotics10010042
- Bélangier, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E. ve Dozois, C. M. (2011). Escherichia coli from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic E. coli. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62(1), 1–10. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x
- Bender, Madigan, Buckley, Sattley ve Stahl. (2019). *Brock Biology of Microorganisms 15th Edition* (2019, Pearson).
- Berberoğlu, I., Asmafiliz, N., Kiliç, Z., Hökelek, T., Yasemin Koç, L., Açık, L., ... Dal, H. (2016). Phosphorus nitrogen compounds: Part 34. Syntheses, structural investigations, cytotoxic and biological activities of spiro-ansa-spiro and spiro-bino-spiro tetrameric phosphazene derivatives. *Inorganica Chimica Acta*, 446, 75–86. doi:10.1016/j.ica.2016.02.060
- Bonten, M., Johnson, J. R., van den Biggelaar, A. H. J., Georgalis, L., Geurtsen, J., de Palacios, P. I., ... Poolman, J. T. (2021). Epidemiology of Escherichia coli Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 72(7), 1211–1219. doi:10.1093/cid/ciaa210
- Bozkurtlar, E. ve Kaya, H. (2018). Akciğer Kanserinde Moleküler Patoloji. *Nükleer Tıp Seminerleri*, 4, 26–31. doi:10.4274/nts.2018.004
- Brandt, K., Kruszynski, R., Bartczak, T. J. ve Porwollik-Czomperlik, I. (2001). AIDS-related lymphoma screen results and molecular structure determination of a new crown ether bearing aziridinylcyclophosphazene, potentially capable of ion-regulated DNA cleavage action. *Inorganica Chimica Acta*, 322(1–2), 138–144. doi:10.1016/S0020-1693(01)00557-6
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L. ve Alonso, M. J. (1997). Calvo1997_Article_ChitosanAndChitosanEthyleneOxi.pdf. *Pharmaceutical Research*.
- Canadell, J., Hunt, B. J., Cook, A. G., Mantecón, A. ve Cádiz, V. (2007). Flame retardance and shrinkage reduction of polystyrene modified with acrylate-containing phosphorus and crosslinkable spiro-orthoester moieties. *Polymer Degradation and Stability*, 92(8), 1482–1490. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.05.017

- Christaki, E., Marcou, M. ve Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. doi:10.1007/s00239-019-09914-3
- Cioffi, N. ve Rai, M. (2012). *Nano-Antimicrobials_ Progress and Prospects-Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2012)*. doi:10.1007/978-3-642-24428-5
- CLSI. (2015). *Clinical and Laboratory Standards Institute) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ed. by Wayne, P.A.24th informational supplement. CLSI M100-S24,35(3):168-170. international Journal of Scientific & Technology Research (C. 3)*.
- Costa-de-oliveira, S. ve Rodrigues, G. (2020). Candida albicans Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections : The Triad Yeast-Host-Antifungal.
- de Carvalho, F. G., Magalhães, T. C., Teixeira, N. M., Gondim, B. L. C., Carlo, H. L., dos Santos, R. L., ... Denadai, Â. M. L. (2019). Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on C. albicans biofilm formation. *Materials Science and Engineering C*, 104(October 2018). doi:10.1016/j.msec.2019.109885
- DeJong, E. S., Chang, C. E., Gilson, M. K. ve Marino, J. P. (2003). Proflavine acts as a Rev inhibitor by targeting the high-affinity Rev binding site of the Rev responsive element of HIV-1. *Biochemistry*, 42(26), 8035–8046. doi:10.1021/bi034252z
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S. ve Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 37–54. doi:10.1038/s41579-020-0416-x
- DeVita, V. T., Lawrence, T. S. ve Rosenberg, S. A. (2019). *Cancer, Principles & Practice of Oncology*.
- Dhote, V. K., Dhote, K., Pandey, S. P., Shukla, T., Maheshwari, R., Mishra, D. K. ve Tekade, R. K. (2018). *Fundamentals of polymers science applied in pharmaceutical product development. Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-817909-3.00003-0
- Diaz-moralli, S., Tarrado-castellarnau, M., Miranda, A. ve Cascante, M. (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(2), 255–271. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.01.011
- Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märklbauer, E. ve Granum, P. E. (2021). The Food Poisoning Toxins of Bacillus cereus. *Toxins*, 13(2). doi:10.3390/toxins13020098
- Elmas, G., Okumuş, A., Cemaloğlu, R., Kılıç, Z., Çelik, S. P., Açık, L., ... Hökelek, T. (2017). Phosphorus-nitrogen compounds. part 38. Syntheses, characterizations, cytotoxic, antituberculosis and antimicrobial activities and DNA interactions of spirocyclotetraphosphazenes with bis-ferrocenyl pendant arms. *Journal of Organometallic Chemistry*, 853, 93–106. doi:10.1016/j.jorganchem.2017.10.025

- Elmas, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Çam, M., Açık, L. ve Hökelek, T. (2018). Inorganica Chimica Acta Phosphorus-nitrogen compounds . Part 40 . The syntheses of (4-fluorobenzyl) pendant armed cyclotetraphosphazene derivatives : Spectroscopic , crystallographic and stereogenic properties , DNA interactions and antimicrobial activi. *Inorganica Chimica Acta*, 476, 110–122. doi:10.1016/j.ica.2018.02.025
- Elmas, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Gönder, L. Y. ve Açık, L. (2016). The Syntheses and Structural Characterizations , Antimicrobial Activity , and in vitro DNA Binding of 4-Fluorobenzylspiro (N / O) Cyclotriphosphazenes and their Phosphazanium Salts, 3(3), 25–46. doi:10.18596/jotcsa.04055.
- Elmas, G., Okumuş, A., Koç, L. Y., Soltanzade, H., Kılıç, Z., Hökelek, T., ... Yavuz, M. (2014). Phosphorus-nitrogen compounds. Part 29. Syntheses, crystal structures, spectroscopic and stereogenic properties, electrochemical investigations, antituberculosis, antimicrobial and cytotoxic activities and DNA interactions of ansa-spiro-ansa cyclotetrapho. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 662–676. doi:10.1016/j.ejmech.2014.10.005
- Enosi Tuipulotu, D., Mathur, A., Ngo, C. ve Man, S. M. (2021). Bacillus cereus: Epidemiology, Virulence Factors, and Host–Pathogen Interactions. *Trends in Microbiology*, 29(5), 458–471. doi:10.1016/j.tim.2020.09.003
- Esperanza Cortés, M., Consuegra Bonilla, J. ve Dario Sinisterra, R. (2011). Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2(January 2011), 896–905.
- Fan, Z., Qin, Y., Liu, S., Xing, R., Yu, H. ve Chen, X. (2018). Synthesis , characterization , and antifungal evaluation of diethoxyphosphoryl polyaminoethyl chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 190(7), 1–11. doi:10.1016/j.carbpol.2018.02.056
- Fior, R. ve Zilhao, R. (2019). *Molecular and Cell Biology of Cancer*. Springer. Springer. doi:10.1201/9781420059984
- Ford, C. A., Hurford, I. M. ve Cassat, J. E. (2021). Antivirulence Strategies for the Treatment of Staphylococcus aureus Infections: A Mini Review. *Frontiers in Microbiology*, 11(January), 1–10. doi:10.3389/fmicb.2020.632706
- Fouad, Y. A. ve Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5), 1016–1036.
- Fulaz, S., Vitale, S., Quinn, L. ve Casey, E. (2019). Nanoparticle–Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends in Microbiology*, 27(11), 915–926. doi:10.1016/j.tim.2019.07.004
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J. ve Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–13. doi:10.3389/fmicb.2019.02993
- Ghannoum, M. A. ve Perfect, J. R. (2019). *Antifungal Therapy* (Second Edi.). CRC Press.

- Gomes, T. A. T., Dobrindt, U., Farfan, M. J. ve Piazza, R. M. F. (2021). Editorial: Interaction of Pathogenic *Escherichia coli* With the Host: Pathogenomics, Virulence and Antibiotic Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(March), 1–5. doi:10.3389/fcimb.2021.654283
- Gopi, S., Thomas, S. ve Pius, A. (2020). *Handbook of Chitin and Chitosan Volume 1: Preparation and Properties*.
- Grayson, M. L., Cosgrove, S. E., Crowe, S. M., Hope, W., McCarthy, J. S., Mills, J., ... Paterson, D. L. (2017). *Kucers' the use of antibiotics: A clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic, and antiviral drugs, seventh edition. Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition*. doi:10.1201/9781315152110
- Greenwood, D., Barer, M., Slack, R. ve Irving, W. (2012). *Medical microbiology*. (D. Greenwood, M. Barer, R. Slack ve W. Irving, Ed.) (Eighteenth.). Elsevier Ltd.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. ve Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1–15. doi:10.1007/s00203-015-1148-6
- Hall, C. W. ve Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. doi:10.1093/femsre/fux010
- Harish Prashanth, K. V. ve Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18(3), 117–131. doi:10.1016/j.tifs.2006.10.022
- Hu, X., Saravanakumar, K., Sathiyaseelan, A., Rajamanickam, V. ve Wang, M.-H. (2021). Cytotoxicity of aptamer-conjugated chitosan encapsulated mycogenic gold nanoparticles in human lung cancer cells. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, (0123456789). doi:10.1007/s40097-021-00437-2
- İnci Tanrikulu, G., Yakut Özgür, M., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Aydın, B. ve Açıık, L. (2019). Phosphorus-Nitrogen compounds part 47: The conventional and microwave-assisted syntheses of dispirocyclotriphosphazene derivatives with (4-fluoro/4-nitrobenzyl) pendant arms: Structural and stereogenic properties and DNA interactions. *Inorganica Chimica Acta*, 490(March), 179–189. doi:10.1016/j.ica.2019.03.018
- İşcan, Ö., Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Açıık, L., Özbeden, P. ve Hökelek, T. (2020). Synthesis and spectroscopic properties of (N / O) mono- and dispirocyclotriphosphazene derivatives with benzyl pendant arms : study of. *Turkish Journal of Chemistry*, 44, 15–30. doi:10.3906/kim-1908-17
- Jabbari, S. M., Shiadeh, Pormohammad, A., Hashemi, A. ve Lak, P. (2019). Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated enterococcus faecalis and enterococcus faecium: A systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2713–2725. doi:10.2147/IDR.S206084

- Jindal, B. A. K., Pandya, M. K. ve Khan, M. I. D. (2015). Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(2), 178–181. doi:10.1016/j.mjafi.2014.04.011
- Kara, G., Tuncer, S., Türk, M. ve Denkbaş, E. B. (2015). Downregulation of ABCE1 via siRNA affects the sensitivity of A549 cells against chemotherapeutic agents. *Medical Oncology*, 32(4), 1–11. doi:10.1007/s12032-015-0557-3
- Karimi Goftar, M., Kor, N. M. ve Kor, Z. M. (2014). DNA intercalators and using them as anticancer drugs. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(3), 811–822. <http://www.ijabbr.com> adresinden erişildi.
- KAYIŞ, U. (2019). Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi*, 5(1), 1–12. <https://dergipark.org.tr/en/pub/asder/issue/45815/578317> adresinden erişildi.
- Khoerunnisa, F., Nurhayati, M., Dara, F., Rizki, R., Nasir, M., Aziz, H. A., ... Opaprakasit, P. (2021). Physicochemical Properties of TPP-Crosslinked Chitosan Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Fibers and Polymers*, 22(11), 2954–2964. doi:10.1007/s12221-021-0397-z
- Koçak, S. B., Koçoğlu, S., Okumus, A., Kiliç, Z., Öztürk, A., Hökelek, T., ... Açıık, L. (2013). Syntheses, spectroscopic properties, crystal structures, biological activities, and DNA interactions of heterocyclic amine substituted spiro-ansa-spiro- and spiro-bino-spiro-phosphazenes. *Inorganica Chimica Acta*, 406, 160–170. doi:10.1016/j.ica.2013.07.023
- Koseva, N., Mitova, V., Todorova, Z. ve Tsacheva, I. (2019). Chapter 5. *Nanomaterials Derived From Phosphorus-Containing Polymers: Diversity of Structures and Applications. Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-813932-5.00005-4
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. ve Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4), 1–24. doi:10.1101/cshperspect.a010306
- Kumar, P., Gajbhiye, K. R., Paknikar, K. M. ve Gajbhiye, V. (2019). *Current Status and Future Challenges of Various Polymers as Cancer Therapeutics. Polymeric Nanoparticles as a Promising Tool for Anti-cancer Therapeutics*. Elsevier Inc. doi:10.1016/b978-0-12-816963-6.00001-7
- Kuzey, N. G., Özgür, M., Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Açıık, L., Hökelek, T. (2020). Mono- and dispirocyclotriphosphazenes containing 4-bromobenzyl pendant arm(s): Synthesis, spectroscopy, crystallography and biological activity studies. *Journal of Molecular Structure*, 1220. doi:10.1016/j.molstruc.2020.128658
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., ... Brady, L. J. (2019). The biology of streptococcus mutans. *Gram-Positive Pathogens*, 435–448. doi:10.1128/9781683670131.ch27

- Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D. ve Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19–31. doi:10.1038/nrmicro.2017.107
- Lu, H., Shrivastava, M., Whiteway, M. ve Jiang, Y. (2021). *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(3), 323–337. doi:10.1080/1040841X.2021.1884641
- Mackay, R. G. ve Tait, J. M. (2011). *Handbook of chitosan research and applications. Handbook of Chitosan Research and Applications.*
- Madigan, T. M., Bender, S. K., Buchley, D. H., Sattley, W. M. ve Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms* (16th bs.). Pearson.
- Madni, A., Kousar, R., Naeem, N. ve Wahid, F. (2021). Recent Advancements in Applications of Chitosan-based Biomaterials for Skin Tissue Engineering. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 0–26. doi:10.1016/j.jobab.2021.01.002
- Marangon, C. A., Martins, V. C. A., Ling, M. H., Melo, C. C., Plepis, A. M. G., Meyer, R. L. ve Nitschke, M. (2020). Combination of Rhamnolipid and Chitosan in Nanoparticles Boosts Their Antimicrobial Efficacy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(5), 5488–5499. doi:10.1021/acsami.9b19253
- Modjarrad, K. ve Ebnesajjad, S. (2014). *Handbook of polymer applications in medicine and medical devices.* Elsevier Inc.
- Mukherjee, A. ve Sasikala, W. D. (2013). *Drug-DNA intercalation: From discovery to the molecular mechanism. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1. bs., C. 92). Copyright © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/B978-0-12-411636-8.00001-8
- Nagpal, K., Singh, S. K. ve Mishra, D. N. (2010). Chitosan Nanoparticles : A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(November), 1423–1430.
- Naskar, S., Sharma, S. ve Kuotsu, K. (2019). Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49(June 2018), 66–81. doi:10.1016/j.jddst.2018.10.022
- Okumu, A., Kili, Z., Hökelek, T., Dal, H., Aik, L., Öner, Y. ve Ko, L. Y. (2011). Phosphorus-nitrogen compounds part 22. Syntheses, structural investigations, biological activities and DNA interactions of new mono and bis (4-fluorobenzyl) spirocyclophosphazenes. *Polyhedron*, 30(17), 2896–2907. doi:10.1016/j.poly.2011.08.035
- Okumuş, A., Akbaş, H., Kılıç, Z., Yasemin Koç, L., Açıık, L., Aydın, B., ... Dal, H. (2016). Phosphorus–nitrogen compounds part 33: in vitro cytotoxic and antimicrobial activities, DNA interactions, syntheses, and structural investigations of new mono(4-nitrobenzyl)spirocyclotriphosphazenes. *Research on Chemical Intermediates*, 42(5), 4221–4251. doi:10.1007/s11164-015-2271-3

- Okumuş, A., Elmas, G., Kılıç, Z., Binici, A., Ramazanoğlu, N., Açık, L., ... Şimşek, H. (2021). The comparative reactions of 2-cis-4-ansa and spiro cyclotetraphosphazenes with difunctional ligands: Structural and stereogenic properties, electrochemical, antimicrobial and cytotoxic activity studies. *Applied Organometallic Chemistry*, 35(4). doi:10.1002/aoc.6150
- Otto, T. ve Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93–115. doi:10.1038/nrc.2016.138
- Öz, B. (2017). Akciğer Kanseri Hedefe Yönelik Tedaviler. *Türk Toraks Dergisi*, 10, 39–44. doi:10.5578/tcb.2017.027
- Özet, A., Özdemir, N. ve Yazıcı, O. (2020). *Akciğer Kanseri*. Türkiye Klinikleri, 13-17.
- Öztürk, E., Okumuş, A., Kılıç, Z., Kılıç, A., Kayalak, H. ve Açık, L. (2019). Inorganica Chimica Acta Phosphorus-nitrogen compounds . Part 44 . The syntheses of N , N-spiro bridged cyclotriphosphazene derivatives with (4-fluorobenzyl) pendant arms : Structural and stereogenic properties , DNA interactions , antimicrobial and cyto. *Inorganica Chimica Acta*, 486(October 2018), 172–184. doi:10.1016/j.ica.2018.10.028
- Pachori, P., Gothwal, R. ve Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes and Diseases*, 6(2), 109–119. doi:10.1016/j.gendis.2019.04.001
- Parıldar, H. (2020). Infectious Disease Outbreaks in History. *The journal of Tepecik Education and Research Hospital*, 30, 19–26. doi:10.5222/terh.2020.93764
- Puglia, A. M. ve Gualerzi, C. O. (2017). *Antibiotic Resistance: Mechanisms and Impact*. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. doi:10.1002/0471238961.0114200913150201.a01.pub2
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. ve Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339(16), 2693–2700. doi:10.1016/j.carres.2004.09.007
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B. ve Cesàro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1–2), 219–228. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.034
- İnternet: Reece, J. B., Taylor, M. R., Simon, E. J. ve Dickey, J. L. (2021). *Campbell Biology: Concepts & Connections*.
- Robino, L. ve Scavone, P. (2020). Nanotechnology in biofilm prevention. *Future Microbiology*, 15(6), 377–379. doi:10.2217/fmb-2019-0327
- Rosenberg, L. E. ve Rosenberg, D. D. (2013). Human Genes and Genomes. *Human Genes and Genomes* içinde (ss. 259–288). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-385212-0.00001-9

- Russo, T. A. ve Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5(5), 449–456. doi:10.1016/S1286-4579(03)00049-2
- Sadav, D., Hillis, D. M., Heller, H. C. ve Berenbaum, M. R. (2014). *Yaşam Bilimi Biyoloji* (C. 1).
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., ... Schultz, N. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*, 173(2), 321–337.e10. doi:10.1016/j.cell.2018.03.035
- Shariatnia, Z. (2019). Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid and Interface Science*, 263, 131–194. doi:10.1016/j.cis.2018.11.008
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R. ve Farokhzad, O. C. (2016). Cancer nanomedicine : progress , challenges and opportunities. *Nature Publishing Group*, 17, 20–37. doi:10.1038/nrc.2016.108
- Singh, A., Krogman, N. R., Sethuraman, S., Nair, L. S., Sturgeon, J. L., Brown, P. W., ... Allcock, H. R. (2006). Effect of side group chemistry on the properties of biodegradable l-alanine cosubstituted polyphosphazenes. *Biomacromolecules*, 7(3), 914–918. doi:10.1021/bm050752r
- Smerkova, K., Ryvolova, M., Hynek, D. ve Adam, V. (2012). Catalytic Electrochemical Analysis of Platinum in Pt-DNA Adducts, (April).
- Srinivasan, A., Lopez-ribot, J. L. ve Ramasubramanian, A. K. (2014). Drug resistance Overcoming antifungal resistance. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 65–71. doi:10.1016/j.ddtec.2014.02.005
- Stewart, B. W. ve Wild, C. P. (2014). *World Cancer Report 2014*. WHO Press. International Agency for Research on Cancer.
- Struthers, K. (2017). *Clinical Microbiology*. (C. Press, Ed.) (Second Edi.).
- Sullivan, D. J., Cruz-Romero, M., Collins, T., Cummins, E., Kerry, J. P. ve Morris, M. A. (2018). Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83, 355–364. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.05.010
- Sun, J., Yu, Z., Wang, X. ve Wu, D. (2014). Synthesis and performance of cyclomatrix polyphosphazene derived from trispiro-cyclotriphosphazene as a halogen-free nonflammable material. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(2), 231–238. doi:10.1021/sc400283d
- Tahaei, S. A. S., Stájer, A., Barrak, I., Ostorházi, E., Szabó, D. ve Gajdács, M. (2021). Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in staphylococcus aureus isolates: A laboratory-based study in Hungary and a review of the literature. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1155–1168. doi:10.2147/IDR.S303992

- Temel, A. ve Eraç, B. (2018). Bacterial Biofilms: Detection Methods and Role in Antibiotic Resistance. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 48(1), 1–13. doi:10.5222/tmcd.2018.001
- Temel, M. K. (2015). Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 30(2), 96–108. doi:10.5505/tjoncol.2015.1151
- Török, M. E., Moran, E. ve Cooke, F. J. (2017). *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology*. (M. E. Török, E. Moran ve F. J. Cooke, Ed.) (Second Edi.). Oxford University Press.
- Tümer, Y., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., ... Yavuz, M. (2013). Phosphorus-nitrogen compounds: Part 28. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing vanillinato and pendant ferrocenyl groups. *Journal of Molecular Structure*, 1049, 112–124. doi:10.1016/j.molstruc.2013.06.036
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(3). doi:10.15406/jmen.2014.01.00014
- Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D. ve Jabra-Rizk, M. A. (2020). Oral candidiasis: A disease of opportunity. *Journal of Fungi*, 6(1), 1–28. doi:10.3390/jof6010015
- Wang, E. (2010). *Cancer systems biology*. *Cancer Systems Biology*. doi:10.1201/9781439811863
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N. ve Shin, Y. K. (2019). Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: An overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2647–2693. doi:10.1159/000495956
- Wang, L., Hu, C. ve Shao, L. (2017). The-antimicrobial-activity-of-nanoparticles--present-situati. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249.
- Weinberg, R. A. (2014). *The Biology of Cancer*.
- World Healt Organization. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America (2014). doi:10.1016/j.giec.2020.06.004
- Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J. ve Fu, S. (2005). Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*, 295(1–2), 235–245. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.01.042
- Xu, G. X., Lu, Q., Yu, B. T. ve Wen, L. (2006). Inorganic polymer phosphazene disulfide as cathode material for rechargeable lithium batteries. *Solid State Ionics*, 177(3–4), 305–309. doi:10.1016/j.ssi.2005.10.029
- Yadav, J., Kumari, R. M., Verma, V. ve Nimesh, S. (2021). Recent development in therapeutic strategies targeting *Pseudomonas aeruginosa* biofilms – A review. *Materials Today: Proceedings*, 46, 2359–2373. doi:10.1016/j.matpr.2021.05.245

- Yahaya, I., Chemchem, M., Aydiner, B., Seferoğlu, N., Erva Tepe, F., Açık, L., ... Seferoğlu, Z. (2019). Novel fluorescent coumarin-thiophene-derived Schiff bases: Synthesis, effects of substituents, photophysical properties, DFT calculations, and biological activities. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 368(September 2018), 296–306. doi:10.1016/j.jphotochem.2018.09.041
- Yilmaz, B. (2021). Araştırma Makalesi / Research Article Spektroskopik Teknikler Kullanılarak Furosemid ile DNA Etkileşimlerinin İncelenmesi Study of Interactions of Furosemide with DNA Using Spectroscopic Techniques, 10(2), 325–331.
- Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2), 7–18.



GAZİ GELECEKTİR..