



**N/O DONÖR ATOMLU SİKLOTETRAFOSFAZEN TÜREVLERİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

Nagehan RAMAZANOĞLU

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2020

Nagehan RAMAZANOĞLU tarafından hazırlanan N/O DONÖR ATOMLU SİKLOTETRAFOSFAZEN TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Leyla AÇIK

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Doç. Dr. Aytuğ OKUMUŞ

Kimya Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Elif Burcu BALI

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 20/01/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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.

Nagehan RAMAZANOĞLU

20/01/2020

N/O DONÖR ATOMLU SİKLOTETRAFOSFAZEN TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

(Doktora Tezi)

Nagehan RAMAZANOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2020

ÖZET

Bu tez çalışmasında oktaklorosiklotetrafosfazen ($N_4P_4Cl_8$) ile N/O donör atomlu bidentat ligandın sodyum tuzunun ($FeCH_2NHCH_2CH_2CH_2ONa$) 1:1 mol oranındaki tepkimeleri sonucunda sentezlenen mono-ferrosenil-2-cis-4-dikloro-ansa- (2,4-ansa; 3) ve N-mono-ferrosenil-propanoksi- (spiro; 4) siklotetrafosfazen bileşiklerinin; monoaminler [pirolidin (3a, 4a), piperidin (3b, 4b), morfolin (3c, 4c), 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD), (3d, 4d)] diaminler [4-florobenzil-*N'*-metilpropan-1,3-diamin (3e, 4e), *N*-4-florobenzil-*N'*-metiletan-1,2-diamin (4f)] dialkoksitler [(2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit (3g, 4g) ve 2,2-dimetil-1,3-propandioksit (3h, 4h)] ile reaksiyonu sonucunda oluşan toplam 16 adet kısmen ve tamamen sübstitüe siklotetrafosfazen bileşiğinin biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan siklotetrafosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş, bileşiklerin en düşük seviyede etki eden konsantrasyonları minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) yöntemi ile belirlenmiştir. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşim durumu agaroz jel elektroforez yöntemi ile araştırılmış, DNA ile etkileşime giren bileşiklerin hangi nükleotidlerden DNA'ya bağlandığının tespiti için BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri yapılmıştır. Bileşiklerin sitotoksik özelliklerini araştırmak için L929 fare fibroblast hücreleri ve MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik aktivitesi WST-1 yöntemiyle tespit edilmiş, bileşiklerin hücre proliferasyonuna ilişkin etkisi ayrıca Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile araştırılmıştır. Bunun yanında bileşiklerin çalışılan hücre hatları üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkileri Hoescht 33342 ve propidyum iyodür ikili boyaması ile ortaya konulmuştur. Yapılan biyolojik aktivite çalışmaları sonucunda 3d, 3h ve 4h olarak isimlendirilen bileşiklerin, referans olarak kullanılan antibiyotiklere kıyasla daha yüksek oranda antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular bileşiklerin kimyasal özellikleri ile birlikte değerlendirilmiş, bu bileşiklerin enfeksiyon hastalıkları ve kanser tedavi yöntemlerinde kullanım potansiyeli ortaya konulmuştur.

Bilim Kodu : 20326
Anahtar Kelimeler : Fosfazen, Antimikrobiyal aktivite, DNA etkileşim, Sitotoksik aktivite, Apoptoz
Sayfa Adedi : 192
Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CYCLOTETRAPHOSPHAZENE WITH N/O DONOR-TYPE

(Ph. D. Thesis)

Nagehan RAMAZANOĞLU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2020

ABSTRACT

In this thesis, the biological activities of mono-ferrocenyl-2-cis-4-dichloro-ansa- (2,4-ansa; 3) and N-mono-ferrocenyl-propanoxy- (spiro; 4) synthesized as a result of 1:1 molar reactions of octachlorocyclotetraphosphazene ($N_4P_4Cl_8$) and sodium salt of N/O donor-type bidentate ($FeCH_2NHCH_2CH_2CH_2ONa$), and partly and fully substituted cyclotetraphosphazene derivatives formed by reaction of these compounds with monoamines [pyrrolidine (3a, 4a), piperidine (3b, 4b), morpholine (3c,4c), 1,4-dioxa-8-azaspiro [4.5] decane (DASD) (3d, 4d)], diamines [4-fluorobenzyl-*N'*-methylpropane-1,3-diamine (3e, 4e) and *N*-4-fluorobenzyl-*N'*-metyethane-1,2-diamine (4f)], dialkoxides [2,2,3,3-tetrafluoro-1,4-butanedioide (3g, 4g) and 2,2-dimethyl-1,3-propanedioide (3h, 4h)] were investigated. The antimicrobial activity of the cyclotetraphosphazene compounds was determined by the agar well diffusion method and minimally effective concentrations of compounds were determined by the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBK) methods. We also performed BamHI and HindIII restriction endonuclease enzyme digestion were also made to determine which nucleotides of the DNA interact with the compounds. To investigate the cytotoxic properties of the compounds, cytotoxic activities of L929 mouse fibroblast cells and MCF-7 breast cancer cells were determined by the WST-1 method. The effect of the compounds on cell proliferation was also investigated by Real Time Cell Analysis. Furthermore, the apoptotic and necrotic effects of the compounds on the studied cell lines were demonstrated by Hoescht 33342 and propidium iodide dual staining. As a result of the biological activity studies, it was found that the compounds named 3d, 3h and 4h showed higher antimicrobial activity compared to the reference antibiotics. We evaluated the findings together with the chemical properties of the compounds and we demonstrated the potential of cyclotetraphosphazene compounds for use in infectious diseases and cancer treatment methods.

Science Code : 20326

Key Words : Phosphazene, Antimicrobial activity, DNA interaction, Cytotoxic activity, Apoptosis

Page Number : 192

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

İlk olarak, sadece bu tezin hazırlanmasında değil, akademik kariyerimin her yönden gelişmesinde verdiği büyük katkılardan dolayı, on yılı aşkındır öğrencisi olmaktan büyük onur duyduğum Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK’a,

Doktora tezim için sadece materyalleri sağlamakla kalmayıp, çalışmanın kimyasal altyapısıyla ilgili sorularımı her seferinde sabırla yanıtlayan, yönlendiren Sayın Prof. Dr. Zeynel KILIÇ, Sayın Doç. Dr. Gamze ELMAS ve Sayın Doç. Dr. Aytuğ OKUMUŞ’a,

Tez izleme komitesinde yer alarak tezin kuramsal temelini oluşturulması konusunda katkılar sağlayan Sayın Prof. Dr. Şule CEVHER COŞKUN’a ve sitotoksik aktivite deneyleri için değerli deneyimlerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK’e,

Uzun saatlerce birlikte çalıştığımız laboratuvar ortamını eğlenceli hale getiren sevgili Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı öğrencilerine, özellikle Süheyla Pınar ÇELİK ve Pelin ÖZBEDEN’e,

Bu çalışmanın tamamlanması için en çok ihtiyacım olan şeyi sağlayıp beni motive eden, adını geçiremediğim ancak kalben her zaman birlikte olacağımız tüm değerli dostlarıma ve sevgili Ömer BAHADIR’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması da hayatımdaki diğer tüm başarılarım gibi ailemin eşsiz katkılarıyla hazırlandı. Bu nedenle bu çalışmayı tarif edilmez destekleri için sevgili ağabeyim, babam, annem ve anneanneme ithaf ediyorum.

Bu tez çalışması 215Z496 no’lu TÜBİTAK KBAG projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Fosfazenlerin Tarihçesi	6
2.2. Fosfazenlerin Yapısı.....	7
2.2.1. Halkalı fosfazenler.....	9
2.2.2. Siklotetrafosfazenler	10
2.3. Fosfazenlerin Hidrolizi.....	11
2.4. Fosfazenlerin Kullanım Alanları	12
2.4.1. Fosfazenlerin biyomedikal kullanım alanları	12
2.4.2. Doku mühendisliğinde kullanımı	15
2.4.3. İlaç taşıma sistemlerinde kullanımı	17
2.4.4. Batarya ve yakıt pili teknolojilerinde kullanımı	20
2.4.5. Alevlendirmeyi geciktirici ve önleyici materyal olarak kullanımı	22
2.4.6. Diğer kullanım alanları	22
2.5. Fosfazenlerin Biyolojik Aktiviteleri	24
2.5.1. Fosfazenlerin antimikrobiyal özellikleri.....	24
2.5.2. Fosfazenlerin antioksidan özellikleri.....	26

	Sayfa
2.5.3. Fosfazenlerin antikanser özellikleri	27
2.6. Enfeksiyon Hastalıkları ve Etmenleri	29
2.6.1. Bakteriler	32
2.6.2. Mayalar	48
2.7. Antimikrobiyal Maddeler	50
2.7.1. Antimikrobiyal maddelerin tarihçesi	51
2.7.2. Antimikrobiyal ilaçların etki mekanizması	52
2.7.3. Antimikrobiyal direnç	55
2.7.4. Yeni antimikrobiyal ajanların keşfi	59
2.7.5. Antimikrobiyal aktivite tespit yöntemleri	61
2.8. Kanser ve Etkenleri	63
2.8.1. Kanser Tedavisi	65
2.8.2. Kanser Türleri	68
2.9. DNA-İlaç Etkileşimi	73
2.9.1. DNA-ilaç etkileşim mekanizmaları	73
2.9.2. DNA-ilaç etkileşiminin tespitinde kullanılan yöntemler	78
2.10. Hücre proliferasyonunun tespiti	82
2.11. Apoptoz ve Nekroz	87
2.11.1. Apoptoz	88
2.11.2. Nekroz	94
2.11.3. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün tespiti	97
3. MATERYAL VE YÖNTEM	99
3.1. Materyal	99
3.1.1. Fosfazen bileşikleri	99
3.1.2. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar ve kimyasal malzemeler	102

	Sayfa
3.1.3. DNA ile etkileşim deneylerinde kullanılan malzemeler.....	104
3.1.4. Sitotoksik aktivite deneylerinde kullanılan hücre hatları ve kimyasal malzemeler	104
3.1.5. Kullanılan aletler ve cihazlar	105
3.1.6. Kullanılan çözeltiler.....	106
3.2. Yöntem	107
3.2.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	108
3.2.3. DNA ile etkileşim çalışmaları	109
3.2.4. Sitotoksik aktivite ve apoptotik, nekrotik etki çalışmaları	111
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	115
4.1. Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi	115
4.1.1. Antimikrobiyal aktivite.....	115
4.1.2. Bileşiklerin MİK ve MBK değerleri.....	122
4.2. Bileşiklerin Plazmit DNA İle Etkileşimi.....	125
4.2.1. Bileşiklerin DNA'ya hangi nükleotidlerden bağlandığının gösterilmesi	128
4.3. Bileşiklerin Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi.....	130
4.3.1. WST-1 testi sonuçları	130
4.3.2. Apoptotik ve nekrotik etki sonuçları	135
4.3.3. Hücre proliferasyon analizi sonuçları	141
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	143
6. ÖNERİLER.....	159
KAYNAKLAR	161
ÖZGEÇMİŞ	191

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Fosfazenlerin yapısındaki bazı yan grupların bileşiğe sağladığı özellikler	9
Çizelge 2.2. <i>B. subtilis</i> tarafından üretilen protein örnekleri	36
Çizelge 2.3. <i>E. coli</i> suşlarında bulunan direnç genleri ve mekanizmaları	41
Çizelge 2.4. <i>P. aeruginosa</i> bakterisinin virülans faktörleri	45
Çizelge 2.5. Bakterisidal ve bakteriostatik ilaçlar	55
Çizelge 2.6. Yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi sürecindeki fazlar	60
Çizelge 2.7. Kanserin oluşmasına sebep olan gen sınıfları.....	64
Çizelge 2.8. Dünya genelinde, yeni kanser tanısında ve ölüm vakalarında kanser türleri.....	70
Çizelge 2.9. DNA etkili bazı ilaçların ayrıntılı etki mekanizmaları ve tedavisinde kullanıldığı kanser türlerine örnekler	75
Çizelge 2.10. Kültür hücrelerinde toksisitenin değerlendirilmesinde kullanılan temel sitotoksik kriterler	83
Çizelge 2.11. Apoptozda rol alan proteinlerden bazıları	89
Çizelge 2.12. Nekrotik hücre ölümüyle ilişkili hastalıklar	96
Çizelge 2.13. Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması.....	97
Çizelge 3.1. Fosfazen bileşiklerinin isimleri.....	99
Çizelge 3.2. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar	103
Çizelge 3.3. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan malzemeler	103
Çizelge 3.4. DNA ile etkileşim deneylerinde kullanılan malzemeler.....	104
Çizelge 3.5. Sitotoksikite ve apoptotik, nekrotik etki deneylerinde kullanılan malzeme listesi	105
Çizelge 3.6. Kullanılan alet, cihaz ve markaları	106
Çizelge 4.1. Bileşiklerin Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri	116
Çizelge 4.2. Bileşiklerin Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri.....	117
Çizelge 4.3. Bileşiklerin mayalara karşı antimikrobiyal aktivitesi	121
Çizelge 4.4. Bileşiklerin bakterilere karşı MİK ve MBK değerleri	122

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.5. Bileşiklerin L929 fibroblast hücrelerinde doza bağlı apoptotik hücre indeksleri	138
Çizelge 4.6. Bileşiklerin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı apoptotik hücre indeksleri.....	138
Çizelge 4.7. Bileşiklerin L929 fibroblast hücrelerinde doza bağlı nekrotik hücre indeksleri	139
Çizelge 4.8. Bileşiklerin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı nekrotik hücre indeksleri.....	140

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Fosfazenin sentez reaksiyonu	7
Şekil 2.2. Fosfazenlerin sınıflandırması.....	8
Şekil 2.3. Fosfazenleri hidrolitik açıdan duyarlaştıran yan gruplar	12
Şekil 2.4. PCPP ve PCEP'in yapısı.....	14
Şekil 2.5. Polifosfazenlerin ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilen formları	19
Şekil 2.6. Hidrofobik L-izolösin etil ester alanı ile hidrofilik α -amino- ω -methoksi-poli(etilen glikol) alanı içeren hidrojel şematik diyagramı.....	20
Şekil 2.7. <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren halkalı fosfazenlerin yapısı.....	26
Şekil 2.8. Enfeksiyon hastalıklarının 1940 - 2000 yılları arasındaki vaka sayıları.....	31
Şekil 2.9. Gram pozitif ve Gram negatif bakteri yapısı	33
Şekil 2.10. Hastane enfeksiyonu etmenleri ve tedavisinde kullanılan antibiyotikler	52
Şekil 2.11. Antimikrobiyal ilaç etki mekanizmaları	53
Şekil 2.12. Antibiyotik dirençlilik geninin yayılımı ve rekombinasyonuna ilişkin örnekler	57
Şekil 2.13. Antikanser ilaç direncinin genel mekanizması	68
Şekil 2.14. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri.....	69
Şekil 2.15. Yaşa göre standartlaştırılmış 2008 yılı meme kanseri insidansı ve ölüm oranları.....	71
Şekil 2.16. Meme kanserinin çok aşamalı karsinogeneze ilişkin şema	72
Şekil 2.17. DNA ile etkileşime giren moleküller ve DNA ile moleküler etkileşimleri ..	76
Şekil 2.18. a) GCN4'ün DNA'ya büyük oluktan bağlanması (Hurley, 2002) b) 9-amino-6-kloro-2-metoksiakridinin DNA'nın büyük oluğu ile etkileşimi ve oluşan üçlü sarmal yapının moleküler modellemesi.....	77
Şekil 2.19. Dispiroferrosenilfosfazen bileşiğinin moleküler yerleştirilmiş pozları ve bileşiğin A-DNA (a) ve B-DNA (b) ile bağlanma etkileşimleri	78
Şekil 2.20. Plazmit DNA'nın farklı konformasyonlarının agaroz jel görüntüsü	80

Şekil	Sayfa
Şekil 2.21. (a) Otomatik elektrokimyasal biyosensör (MiSens®) çalışmasına ilişkin genel şema ve (b) amperometrik ham veri sonuçları.....	81
Şekil 2.22. MTT, XTT, MTS bileşiklerinin yapısı	84
Şekil 2.23. WST-1 tetrazolyum tuzunun parçalanarak formazana dönüşmesi	85
Şekil 2.24. MTT ve WST-1'nin hücre içindeki indirgeme mekanizmasını gösteren şema	85
Şekil 2.25. Gerçek Zamanlı Hücre Analizinde hücre indeksi-zaman grafiği eğiminde empedans aşamaları ve hücresel davranışı	87
Şekil 2.26. Gerçek Zamanlı Hücre Analizindeki hücre inhibisyonunun ölçüm mekanizması	87
Şekil 2.27. Ölüm reseptörleri yolağında apoptoz.....	90
Şekil 2.28. Mitokondriyal yolakta apoptoz.....	91
Şekil 2.29. Perforin/granzim yolağında hücre ölümü	93
Şekil 2.30. Nekrozun moleküler mekanizması	95
Şekil 3.1. Bu çalışmada kullanılan siklotetrafosfazen türevlerinin sentez aşamaları ve kimyasal yapıları.....	101
Şekil 4.1. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 3a, 3b, 3c, 3e, 4b, 4d, 4e ve 4g bileşiklerinin doza bağlı sitotoksik aktivitesi	131
Şekil 4.2. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f ve 4h bileşiklerinin doza bağlı sitotoksik aktivitesi	132
Şekil 4.3. L929 fare fibroblast hücrelerinde 3a, 3b, 3c, 3e, 4b, 4d, 4e ve 4g bileşiklerinin doza bağlı sitotoksik aktivitesi	132
Şekil 4.4. L929 fare fibroblast hücrelerinde 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f ve 4h bileşiklerinin doza bağlı sitotoksik aktivitesi	133
Şekil 4.5. Bileşiklerin L929 fibroblast hücrelerinde Gerçek Zamanlı Hücre Analizi sonucu.....	141
Şekil 4.6. Bileşiklerin MCF-7 meme kanser hücrelerinde Gerçek Zamanlı Hücre Analizi sonucu.....	141

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>B. cereus</i> elektron mikroskobu görüntüleri	34
Resim 2.2. <i>B. subtilis</i> elektron mikroskobu görüntüleri	35
Resim 2.3. <i>E. faecalis</i> taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	37
Resim 2.4. <i>E. hirae</i> bakterilerinin elektron mikroskobu görüntüsü.....	38
Resim 2.5. <i>S. aureus</i> 'un taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	40
Resim 2.6. <i>E. coli</i> 'nin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	42
Resim 2.7. <i>K. pneumoniae</i> elektron mikroskobu görüntüsü.....	43
Resim 2.8. <i>P. vulgaris</i> elektron mikroskobu görüntüsü	44
Resim 2.9. <i>P. aeruginosa</i> bakterisinin elektron mikroskobu görüntüsü.....	46
Resim 2.10. <i>S. typhimurium</i> 'un elektron mikroskobu görüntüsü	48
Resim 2.11. <i>C. albicans</i> hücresinin transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü.....	49
Resim 4.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesini gösteren fotoğraflar.....	120
Resim 4.2. 1,4 dioksanın antimikrobiyal aktivitesi olmadığını gösteren fotoğraflar.....	122
Resim 4.3. Bileşiklerin MİK ve MBK değerlerini gösteren fotoğraflar	125
Resim 4.4. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimini gösteren agaroz jel fotoğrafları..	126
Resim 4.5. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimini gösteren agaroz jel fotoğrafları..	128
Resim 4.6. Bileşik-DNA karışımının <i>Bam</i> HI enzimi ile kesim sonucunda jel elektroforezi fotoğrafları	129
Resim 4.7. Bileşik-DNA karışımının <i>Hind</i> III enzimi ile kesim sonucunda jel elektroforezi fotoğrafları	130
Resim 4.8. L929 fibroblast hücreleri ikili boyama mikroskopi görüntüsü	136
Resim 4.9. L929 fibroblast hücreleri ikili boyama mikroskopi görüntüsü	136
Resim 4.10. MCF-7 meme kanseri hücreleri ikili boyama mikroskopi görüntüsü.....	137
Resim 4.11. MCF-7 meme kanseri hücreleri ikili boyama mikroskopi görüntüsü.....	138

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
®	Müseccel marka tescil
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
atm	Atmosfer
Da	Dalton
Kob	Koloni oluşturan birim
mL	Mililitre
rpm	Devir sayısı
V	Volt

Kısaltmalar

Açıklamalar

ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
BODIPY	Borondipirometen
CDC	Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
CI	Hücre indeksi
CSA	Kiral kaydırma ajanı
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CT-DNA	Dolaşımdaki tümör DNA'sı
Cyt c	Sitokrom c
DASD	1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan

Kısaltmalar**Açıklamalar**

DDS	İlaç taşıma sistemleri (Drug Delivery Systems)
DMEM	Dulbecco Modifikasyonlu Eagle Besiyeri
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EtBr	Etidyum bromür
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FLIP	FLICE inhibe edici protein
HE	Hemotoksilen-eozin
HOMO	En yüksek dolu moleküler orbitali
IC₅₀	Yarım maksimum inhibitör konsantrasyon
LDH	Laktat dehidrogenaz
LPS	Lipopolisakkarit
LUMO	En düşük boş moleküler orbitali
MEA	Malt extract agar
MBK	Minimal bakterisidal konsantrasyon
MDRO	Çoklu ilaç dirençli organizma
MFK	Minimal fungusidal konsantrasyon
MHA	Mueller - Hinton agar
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyon
MTT	Metiltiazol difenil tetrazolyum
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NO	Nitrik oksit
NRRL	Kuzey Bölgesel Araştırma Laboratuvarı
OFP	Poli[bis(oktafloropentoksi)fosfazen]
PAEP	Poli[2-(2-aminoetoksi)etoksi]fosfazen
PBP	Penisilin bağlanma proteini
PCEP	Poli[di(sodyumkarboksilatofenoksi)fosfazen]
PCPP	Poli[di(sodyumkarboksilatofenoksi)fosfazen]
PDHP	Poli(DMAEA/His(Boc)-OMe)fosfazen

Kısaltmalar**PEG****PFPN****pH****PI****RSKK****RTCA****SIPs****TAE****TE****T_g****TNF****UV****WHO****WST-1****Açıklamalar**

Polietilen glikol

Pentaflorosiklotrifosfazen

Asitlik derecesi

Propidiyum iyodür

Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu

Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (Real-Time cell analysis)

Akıllı inorganik polimerler

Tris-asetik asit-EDTA

Tris-EDTA

Camsı geçiş sıcaklığı

Tümör nekroz faktörü

Mor ötesi (Ultra viyole)

Dünya Sağlık Örgütü

2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-
2H-tetrazolyum

1. GİRİŞ

Fosfazenler, her fosfora iki grubun bağlandığı, fosfor ve azot atomlarının sıralı diziliminden oluşan bileşiklerdir (Allcock, Lampe, Mark 2003). Halkalı yapıdaki siklofosfazenlerin trimer ya da tetramer halkasındaki çok sayıda Cl atomunun organik nükleofillerle yer değiştirme reaksiyonu veriyor olması sebebiyle çeşitli özelliklere sahip maddeler oluşturulabilmektedir. Özel yapıdaki inorganik iskeletiyle birleştirilen polifosfazenlerin süper hidrofobiklikten suda çözünürlüğe, katyonik ile anyonik arasında değişen, çok farklı özelliklere sahip malzemelerin gelişmesine yol açması uzun yıllardır akademik ilginin de odağında yer almasını sağlamıştır (Rothmund ve Teasdale, 2016; De Jaeger, 1998). Fosfazenlerin iyon geçirgen özelliği nedeniyle lityum temelli bataryalarda ve yakıt pillerinde (Klein, Welna, Weikel, Allcock ve Runt, 2007; Allcock ve Wood, 2006b), optik materyallerde (Dembek ve diğerleri, 1990), nanofiltrasyon membranlarında (You ve diğerleri, 2019), elektronik ve optoelektronik cihazlarda (Koran, Özen, Biryen, Demirelli ve Görgülü, 2016) ve alev geciktirici katkı maddesi olarak (Yang ve diğerleri, 2019) kullanılabileceği ortaya konulmuştur. Bunun dışında yapılan araştırmalar, fosfazenlerin biyomedikal uygulamalarda da kullanım imkânı olduğunu göstermektedir. Örneğin kemik doku mühendisliğinde (Nukavarapu ve diğerleri, 2008), aşı taşımada (Andrianov ve diğerleri, 2011), tedavi amaçlı olarak çevresel sınırlarının onarımında (Nicoli-Aldini ve diğerleri, 1997), kanser tedavisinde (Brandt, Kruszynski, Bartczak ve Porwollik-Czomperlik, 2001), gen ve ilaç taşımada (Teasdale ve Brüggemann, 2013) kullanım potansiyeli olduğu ifade edilmiştir.

Bakterilerden kaynaklı enfeksiyonlar dünyadaki insan hastalıkları ve ölümlerinin başlıca nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus* ve *Enterococcus* suşlarının sebep olduğu solunum yolu enfeksiyonu, farenjit, pnömoni, sinüzit, sepsis, idrar yolu enfeksiyonları vb. enfeksiyonlar ile Gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* patojenlerinin sebep olduğu hastane enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ve ticari olarak temin edilebilen çok sayıda antimikrobiyal madde mevcuttur. Ancak antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olan suşlar nedeniyle yeni antimikrobiyal ilaçlara ihtiyaç olduğu açıktır (J. Davies ve D. Davies, 2010; Wang ve diğerleri, 2018). Özellikle çoklu ilaç direncine sahip olan mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonları tedavi etmekte zorluklar bulunmaktadır (Siegel, Rhinehart, Jackson ve Chiarello, 2006). Bu nedenle antimikrobiyal direncin yaygınlaşması halk

sağlığı için önemli ve acil çözüm bulunması gereken sorunlardan biri haline gelmiştir (Costelloe, Metcalfe, Lovering, Mant ve Hay, 2010).

Kanser, dünya genelinde ana ölüm nedenlerinden biridir. Özellikle nüfusun büyümesi, yaşlanması nedeniyle kanser oluşumu artmakta, sigara, aşırı kilo, fiziksel hareketsizlik, kentleşme ve ekonomik gelişme gibi risk etkenleri de bu artışı etkilemektedir (Torre ve diğerleri, 2015a). Yaygın görülen kanser türlerinden olan meme kanseri de ülkemizde, kadınlarda en çok teşhisi konulan kanserdir ve ölüm oranı gittikçe artmaktadır (Özmen, 2013). Günümüzde bazı kanser tedavileri mevcut olsa da, bu tedavilerin bazı hususlarda sınırlı kalması ve istenmeyen yan etkilerinin olması, araştırmacıları daha güvenli, daha etkili ve seçici antikanser ajanları geliştirmeye teşvik etmektedir (Hare ve diğerleri, 2017).

Oktaklorosiklotetrafosfazenlerin ($n=4$; $N_4P_4Cl_8$, tetramer) reaksiyonları, tetramer halkasındaki Cl atomları sayısının fazla olması ve Cl atomlarının sübstitüentlerle girdiği yer değiştirme reaksiyonlarıyla çok sayıda izomerinin oluşması sebebiyle heksaklorosiklotrifosfazenlere ($n=3$; trimer) göre daha az çalışılmıştır (De Jaeger ve Gleria, 1998). Bu sebeple bu çalışmada farklı gruplarla sübstitüe, tetramerik fosfazen ile N/O donör atomlu ferrosenil bidentat ligandın sodyum tuzunun 1:1 mol oranındaki tepkimeleri sonucunda elde edilen mono-ferrosenil-2-cis-4-dikloro-ansa- ve N-mono-ferrosenil-propanoksi-siklotetrafosfazen türevleri ile bu bileşiklerin pirolidin, piperidin, morfolin, 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD), 4-florobenzil-N'-metilpropan-1,3-diamin, N-4-florobenzil-N'-metiletan-1,2-diamin, 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit ve 2,2-dimetil-1,3-propanedioksit gruplarıyla tepkimesi sonucunda elde edilen bileşiklerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri, DNA etkileşimleri, sitotoksik aktiviteleri ve apoptotik, nekrotik etkileri araştırılmış, bu bileşiklerin biyomedikal alan başta olmak üzere kullanılabileceği alanlara ilişkin önerilerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması amacıyla agar kuyu difüzyon yöntemi, minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerinin araştırılması amacıyla ise mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Bileşiklerin DNA ile etkileşim durumları agaroz jel elektroforezi ile araştırılıp UV ışığında bant durumları görüntülenerek değerlendirilmiştir. DNA ile etkileşimde olduğu tespit edilen bileşiklerin hangi nükleotidlerden DNA'ya bağlandığının tespiti için ise *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri yapılmıştır. Bileşiklerin sitotoksik

aktiviteleri MCF-7 meme kanseri hücreleri ile L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak WST-1 yöntemi ile çalışılmış, 96 saatlik proliferasyon etkileri ise Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile ortaya konulmuştur. Tüm bileşiklerin MCF-7 meme kanseri hücreleri ile L929 fibroblast hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkisi ise Hoescht 33342 ve propidyum iyodür (PI) ile ikili boyama yapılarak ortaya konulmuş, apoptotik ve nekrotik hücreler floresan mikroskopta incelenerek fotoğraflanmıştır. Bu çalışmadaki toplam 16 adet N/O donör atomlu oktaklorosiklotetrafosfazen bileşiğinin biyolojik aktivitelerine ilişkin elde edilen bulguların, enfeksiyon hastalıkları ve kanserin tedavisinde etken ya da aracı madde olarak kullanılma durumu değerlendirilmiştir. Edinilen bilgiler ışığında bu bileşiklerin, antikanser ve antimikrobiyal ajan olarak ilaç tasarımında ve malzeme teknolojilerine yönelik araştırmalarda kullanılabileceği yorumlanmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Çok çeşitli özelliklere sahip olan polimerler günlük yaşamın her alanında önemli bir yere sahip olan materyallerdir. Bu materyallerden inorganik polimerler özel kimyasal ve fiziksel özellikleri sebebiyle hem akademik hem de endüstriyel araştırmacıların uzun süredir ilgi odağındadır (Caminade, Hey-Hawkins ve Manners, 2016).

Düşük inflamatuvar cevaba yanıtı sebep olan kollajen ve kitosan gibi doğal polimerler biyolojik olarak uyumlu yapıda ve gelişmiş hücre adhezyonuna sahip olmasına rağmen enzimler tarafından parçalanabilir olması ve düşük mekaniksel özelliklere sahip olması nedeniyle biyomedikal uygulamalarda sınırlı düzeyde kullanılabilmektedir. Bu nedenle biyoyumlu özelliğe sahip sentetik polimerlerin üretimi ve kullanımı yıllar içinde yaygınlaşmıştır (Khan ve diğerleri, 2018).

Bu tezde ele alınan fosfazenler dışında endüstriyel açıdan cazip özelliklere sahip pek çok inorganik polimer üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bunlara örnek olarak elektrik iletim özelliğinden dolayı organik ışık yayan diyot (OLED) ve organik fotovoltaiik hücre (OPV) teknolojilerinde kullanılan π -konjuge fosfoller, bor kümeleri içeren silan, siloksan ve hibrit organik-inorganik π -konjuge polimerler, tekrarlı monomerik birimlerden oluşan ve kataliz, malzeme, nanotıp teknolojilerinde kullanılan dendrimerler, elektro aktive edilmiş redoks-aktif jeller, fiberler, filmler ve nanogözenekli membranların üretiminde kullanılan ferrosenler ve ilaç taşıma aracı, ilaç ve biyosit olarak kullanılabilen metallopolymerler verilebilir (Caminade ve diğerleri, 2016).

Polifosfazen molekülleri, her fosfora iki grubun bağlandığı fosfor ve azot atomlarının sıralı diziliminden oluşur (Allcock, Lampe, Mark 2003).

İnorganik polimer araştırmalarındaki gelişmelerin önemli bir kısmı fosfazen polimerleri üzerinedir (Allcock, Lampe ve Mark, 2003). Halkalı fosfazenler ve polifosfazenler en iyi bilinen ve en çok çalışılan fosfor-nitrojen türevlerindendir (Allcock, 1972a).

Polifosfazen iskeletine halojen, psödohalojen, amino, azido, alkoksi, ariloksi, alkilamino, arilamino, alkil ve aril gibi çok farklı yan grupların bağlanabiliyor olması (Allcock, 1972a: 3-5), bu moleküllerin inorganik-organik polimerler arasında birbirinden çok farklı

özelliklerde kullanım alanına sahip olmasına sebep olmuştur. Düşük sıcaklık elastomerleri, biyomalzemeler, polimerik ilaçlar, hidrojel, sıvı kristalin materyalleri, yanmaz fiberler ya da elektrik yarı iletkenleri buna örnektir (Allcock ve diğerleri, 2003).

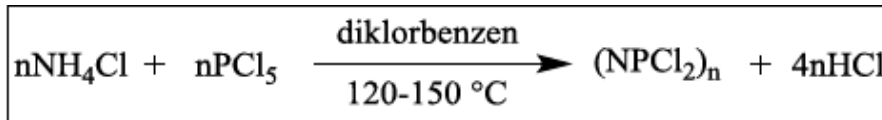
Çoğu fosfazen bileşikler organik sıvılarda çözünebilen beyaz, kristal katılardır (Allcock, 1972a: 3-5). İlk sentezlenen fosfazen bileşikler 1834 yılında Liebig ve Wöhler ile Rose tarafından üretilen klorofosfazenlerdir ($(\text{NPCl}_2)_n$) (Allcock, 1972a: 3-5). Sonraki yıllarda (1965 sonrası) düz zincirli polidiklorofosfazenin sentezlenmesiyle birlikte pek çok bilim adamı sentezledikleri fosfazenlerin farklı alanlardaki kullanımını ve potansiyelini araştırmaya başladı. Günümüzde fosfazen türevleri inorganik, organometalik ve organik kimyanın sınırları arasında teknolojik öneme sahip bir yerde bulunmaktadır. Fosfazenlerin yapısına ilişkin oluşturulan kuramsal yaklaşımlar ve ilgi çekici özelliklerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar yeni polimerik, seramik ve metalik malzemelerin geliştirilmesine imkân oluşturmaktadır (Gleria ve De Jaeger, 2004: 1-22).

2.1. Fosfazenlerin Tarihçesi

Fosfazen kimyası, fosfazenlerin kökeninin keşfedildiği 1800'lü yıllara kadar uzanmaktadır. Bu yıllarda birkaç araştırmacı fosforpentaklorür (PCl_5) ile NH_4 veya NH_4Cl 'nin tepkimesi sonucu oluşan $(\text{NPCl}_2)_3$ ve $(\text{NPCl}_2)_4$ olarak formüle edilen heterosiklik bileşikler sentezlemiştir (Allcock, Desorcie ve Riding, 1987). İlk defa 1834 yılında Liebig ve Wöhler'in elde ettiği beyaz katı kristal (Wöhler, Kopp, Erlenmeyer ve Volhard, 1874) üzerine yapılan çalışmalarda çok düşük verimde fosfazen bileşiği izole edilebilmiştir (Schenk ve Romer, 1924).

Polifosfazenlerin üretimine yönelik girişimi 1895 yılında Stokes, halka öncülü olan heksaklorosiklotrifosfazen $(\text{NPCl}_2)_3$ kullanarak başlatmış, ancak elde edilen polimer çözünmeyen çapraz bağlı bir jel içerdiği için başarısız olmuştur (Sabir, Xu ve Li, 2009).

1924 yılında klorofosfazenin yüksek verimde üretimi Schenk ve Römer tarafından yapılmıştır (Schenk ve Romer, 1924) ve kullandıkları yöntem günümüzde de bu fosfazenlerin sentezi için kullanılan en uygun yöntemdir (Şekil 2.1) (Altınbarın, 2018).



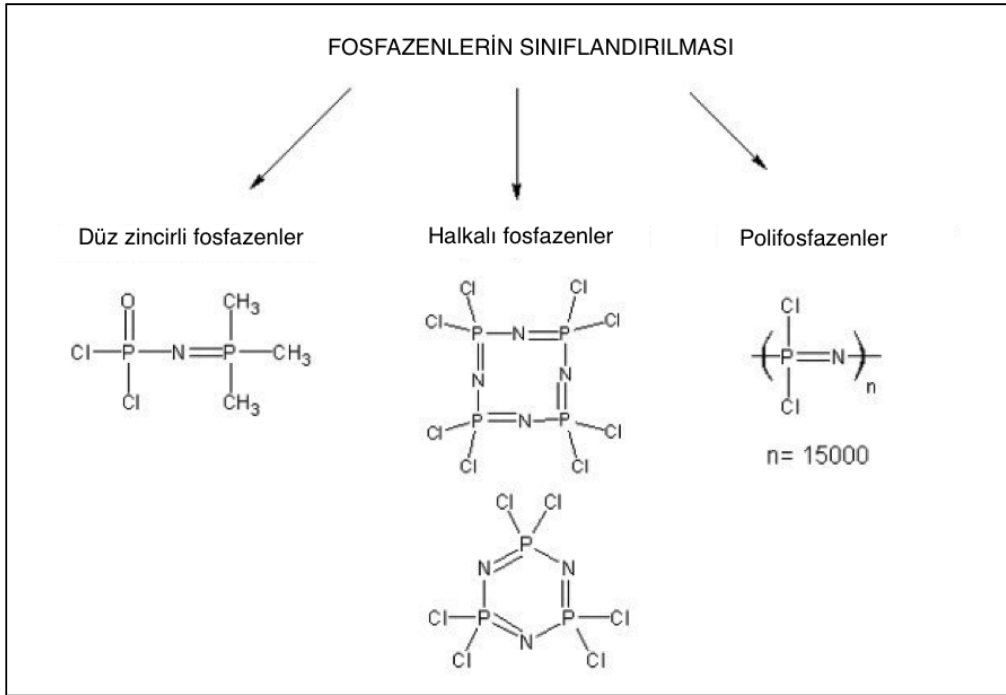
Şekil 2.1. Fosfazenin sentez reaksiyonu (Altınbarın, 2018)

Keşfinden 1940'lara kadar en önemli gelişmelerden biri halojenofosfazenlerin sentezlenmesi ve hidroliz reaksiyonlarının araştırılmasıdır. 1950 ile 1970 yılları arasında siklofosfazenlerin organik kimyası üzerinde gelişmeler olmuştur. Bu gelişmeler daha çok klorosiklofosfazenlerin, alkoksit, ariloksit ve birincil, ikincil amin gibi reaktiflerle girdiği nükleofilik yer değiştirme reaksiyonlarına dayanmaktadır. 1960'ların sonu itibarıyla de fosfazenlerin ayrıntılı yapısı nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrum ve X-ışınları kırınım metresi ile aydınlatılmaya başlanmıştır (Allcock ve diğerleri, 1987). Allcock ve Kugel (1965) polifosfazenlerin ilk başarılı sentezini gerçekleştirmiş ve ilk üretilen polifosfazenlerin biyolojik olarak kararlı olduklarını ortaya koymuştur. Polifosfazenlerin hidroliz sürelerinin kontrolü, içerdiği yan grup sübstitüe türlerinin kontrolü ile mümkündür. Aynı şekilde polifosfazenlerin hidrolizi sonucu ayrılan ürünlerin doğal ve toksik olmaması (Sabir ve diğerleri, 2009), bu bileşiklerin üzerine yapılan çalışmaları hızlandırmış ve 2000'li yıllarla birlikte fosfazenlerin yapılarını ayrıntılı olarak araştıran çok sayıda çalışma ortaya konulmuştur (Tekdemir, 2015).

2.2. Fosfazenlerin Yapısı

Fosfazenler üç sınıfa ayrılır: düz zincirli, halkalı (siklo) ve polifosfazenler. Halkalı ve polifosfazenler, monofosfazenlerden daha kararlı yapıda olduğu için daha çok çalışılmıştır (Çil, Arslan, Aslan ve Öztürk 2003). Fosfazenlerin bu üç yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir (Tekdemir, 2015).

Fosfazenler P=N bağından dolayı inorganik görünüm sergilerken, organik çözücülerle çözülebilmesi de bu bileşiklere organik karakteri verir (Alidağı, 2016). Ayrıca siklofosfazenlerin kiralitesi, bir diğer ifadeyle stereojenikliği üzerine yapılan çalışmalar P atomunun C atomu gibi optik aktifliğe sahip olabileceğini göstermektedir. X-ışınları kristallografisi ve ^{31}P -NMR spektrumuna CSA (kiral kaydırma ajanı) ya da CSR ilave edilerek fosfazenlerin kiralitesi ortaya konulabilmektedir (Davies ve diğerleri, 2000).



Şekil 2.2. Fosfazenlerin sınıflandırması (Tekdemir, 2015)

Halkalı ve polifosfazenlerin yapıları incelenirken çeşitli yöntemler kullanılır. ^{31}P -NMR spektrumu fosfaze bağli grupların bağlanma durumları ile ilgili bilgi verirken, ^1H -NMR spektrumu bağli grupların yapısal ve geometrik durumları hakkında, ^{13}C -NMR spektrumu ile kimyasal kayma değeri ile fosforla etkileşim değeri hakkında sonuçlar elde edilir (Ulkar, 2018).

Amino asit ester yan grubu içeren polifosfazenler hidrolize olduğunda fosfat, amonyak, aminoasit ve alkol gibi vücut tarafından atılabilen ya da metabolize olabilen zararsız yan ürünler ortaya çıkar. Bu özellikleri onları ilaç taşıma ve doku mühendisliği çalışmaları için cazip hale getirmiştir. (Conconi, Lora, Menti, Carampin ve Parnigotto, 2006; Allcock, Fuller, Mack, Matsumura ve Smeltz, 1977).

İnorganik bir iskelet ve P atomuna bağli iki organik yan gruptan oluşan ve termal halka açılım polimerizasyonu ya da yaşayan katyonik polimerizasyonu ile sentezlenen poliorganofosfazenlerin (POPs) ayarlanabilir hidrofilik/hidrofobik özelliği ve uyarılara duyarlı olması, biyouyumlu olan yapısına ekstra avantaj sağlamaktadır. Aynı zamanda bu bileşikler membran, film, fiber, jel, kâğıt ve hidrojel gibi farklı formlarda üretime uygun olacak şekilde sentetik esnekliğe sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı yapay kalp kapakçıkları, bağışıklık destekleyiciler, antiinflamatuvar ve antibakteriyal ajanlar, tümör

hücrelerine *in vivo* gen taşıma, aşı ve protein taşınımı, enzim immobilizasyonu gibi pek çok biyomedikal uygulamada kullanılabilmektedir. Farklı yan grupların polifosfazenlerin özelliğine olan etkisine ilişkin örnekler Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Khan ve diğerleri, 2018).

Çizelge 2.1. Fosfazenlerin yapısındaki bazı yan grupların bileşiğe sağladığı özellikler (Khan ve diğerleri, 2018; Gavasane ve Pawar, 2014)

Kullanılan Yan Grup	Polifosfazende Kazanılan Özellik
Glikozil, gliseril, OC_2H_5	Biyo-erozyon; polimer matrisinden kütle kaybı
Aminoasit ester	Osteoindüktivite (kemik oluşumunun uyarımı) ve osteokondüktivite (kemik iletimi)
Hidroksiapatit [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]	Ca birikimi ve biyouyumluluk
Sitronellol	Antiinflamatuvar aktivite ve çapraz bağlanma
$\text{OC}_6\text{H}_4\text{COOH}$, $\text{OC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$	Mikroküre ve misel yapısını sağlar
NHCH_3 , OCH_3	Suda çözünürlük ve hidrojel
OCH_2CF_3 , $\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$	Yüzey hidrofobikliği
$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	Katı iyonik iletkenlik
OC_6H_5 , $\text{OC}_6\text{H}_5\text{OCH}_3$	Mekanik dayanıklılık
NHC_6H_4 , NHC_6H_5	İletkenlik
$\text{OC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$	Diğer moleküllere bağlanma
OCH_2CF_3 , OC_6H_5 , $\text{OC}_6\text{H}_4\text{R}$	Fiber ve film oluşumu
OCH_3 , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, OC_2H_5	Elastomer oluşumu

Fosfazenlerin farklı yapılarda ve özelliklerde hazırlanabilme zenginliği, bu yapıların malzeme biliminde sayısız alanlarda kullanabilmesine olanak sağlamıştır (Allcock, 2006a).

2.2.1. Halkalı fosfazenler

Halkalı (siklo) fosfazenler, fosfor-azot omurgasından dolayı yüksek kararlılıkta, halka yapısının yan grupları ikame edebilme kabiliyeti sayesinde çok yönlü inorganik halkalı bileşiklerdir (Gleria ve De Jaeger, 2004: 1-22).

En iyi bilinen halkalı fosfazenler üç ya da dört $-P=N$ birimine sahip olanlardır. Beş, altı, yedi ve daha yüksek sayıda $-P=N$ birimi içeren fosfazenler bilinmesine rağmen çok yaygın değildir (Karadağ, 2018).

2.2.2. Siklotetrafosfazenler

Siklotetrafosfazenler sekiz üyeli bir halkaya sahiptir ve aromatik değildir. Siklotrifosfazenlerin aksine düzlemsel değildir. Ancak P atomuna Cl dışındaki grupların bağlanması fosfazenin yapısını düzlemsele daha fazla yaklaştırır (Breza, 2000).

Siklotetrafosfazenler $(NPX_2)_n$ olarak ifade edilir. n, 3 ve 7 arasında değişirken, X halojen ya da değişken organik gruptur. Siklofosfazenler aktif P-halojen bağlarını içeren ve organik çözücülerde rahatlıkla çözülebilen bileşiklerdir. Hekzaklorosiklotrifosfazen ($N_3P_3Cl_6$) ve oktaklorotetrafosfazen ($N_4P_4Cl_8$) trimerik ve tetramerik siklofosfazen türevlerinin başlangıç bileşiği olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Binici ve diğerleri, 2019). Siklotetrafosfazenlerden oktaklorosiklotetrafosfazenler ($N_4P_4Cl_8$) siklotrifosfazenlerden daha az araştırılmıştır, çünkü siklotetrafosfazenlerin reaksiyonları daha karmaşık ve hızlıdır. Bunun yanı sıra beklenen muhtemel izomer sayısı daha fazladır (Okumuş ve diğerleri, 2016; Doğan, Balcı ve Beşli, 2018). Bunun sebebi siklotetrafosfazenlerin tetramer halkasında çok sayıda Cl atomu bulunması ve bu Cl atomlarının yer değiştirme reaksiyonlarına girerek çok sayıda izomerin oluşmasına sebep olmasıdır. Reaksiyon sonucunda izomerlerin ayrılmasından kaynaklanan zorluklar sebebiyle siklotetrafosfazenler, siklotrifosfazenlere oranla daha az çalışılmıştır (De Jaeger, 1998). Oktaklorosiklotetrafosfazenlerdeki halkanın P-N-P bağı yüksek derecede esnek olduğundan halka daha kararlı yapıdadır ve bu esneklik değişik konformasyonların oluşmasına sebep olmaktadır. Örneğin sandalye (T) formu kayık (K) formu, taç formu ve semer formu. Bu konformasyonlar arasında en kararlı form sandalye (T) formudur (Wagner ve Vos, 1968). Siklotetrafosfazenler bu konformasyonları ve halka büyüklüğünden dolayı daha hızlı tepkimeye girer ancak bu tepkimeler sonucunda birbirinden ayrılması zor olan çok sayıda izomeri oluşur (Allcock, 1972b).

Oktaklorosiklotetrafosfazenlerdeki Cl atomlarının amin ve alkoksit gibi monodentat ligandlarla gerçekleştirebildiği yer değiştirme reaksiyonları araştırılmış ve $N_4P_4Cl_8$ 'in çift işlevli ve çok işlevli reaktiflerle olan reaksiyonları sınırlı düzeyde olduğu ortaya

konulmuştur (Elmas ve diğerleri, 2018; Okumuş, 2016; Kumaraswamy, Vijjulatha, Muthiah, Kumara Swamy ve Engelhardt, 1999). Bu reaksiyonlar sonucunda geometrik ve optik izomerler elde edilmiştir. Ancak bu geometrik ve optik izomerlerin ayrılması, saflaştırılması ve karakterizasyonunda bir takım zorluklar bulunmaktadır (Uslu ve Yeşilot, 2015). Siklofosfazenlerin mono-, di-, tri- ve tetra işlevsel reaktifleri ile reaksiyonları sonucunda, açık zincir, ansa, diansa, bino, spiro, spiro-ansa-spiro (sas) ve ansa-spiro-ansa (asa) gibi bölge izomerleri oluşur (İbişoğlu ve diğerleri, 2009).

Oktaklorosiklotetrafosfazenlerin aminlerle etkileşimiyle HX çıkar ve bu tepkimeler aminoliz tepkimeleri olarak isimlendirilir. Oktaklorosiklotetrafosfazenlerin aminoliz tepkimeleri ile ilgili siklotrifosfazenlere göre daha az bilgi mevcuttur (Allcock, 1972b).

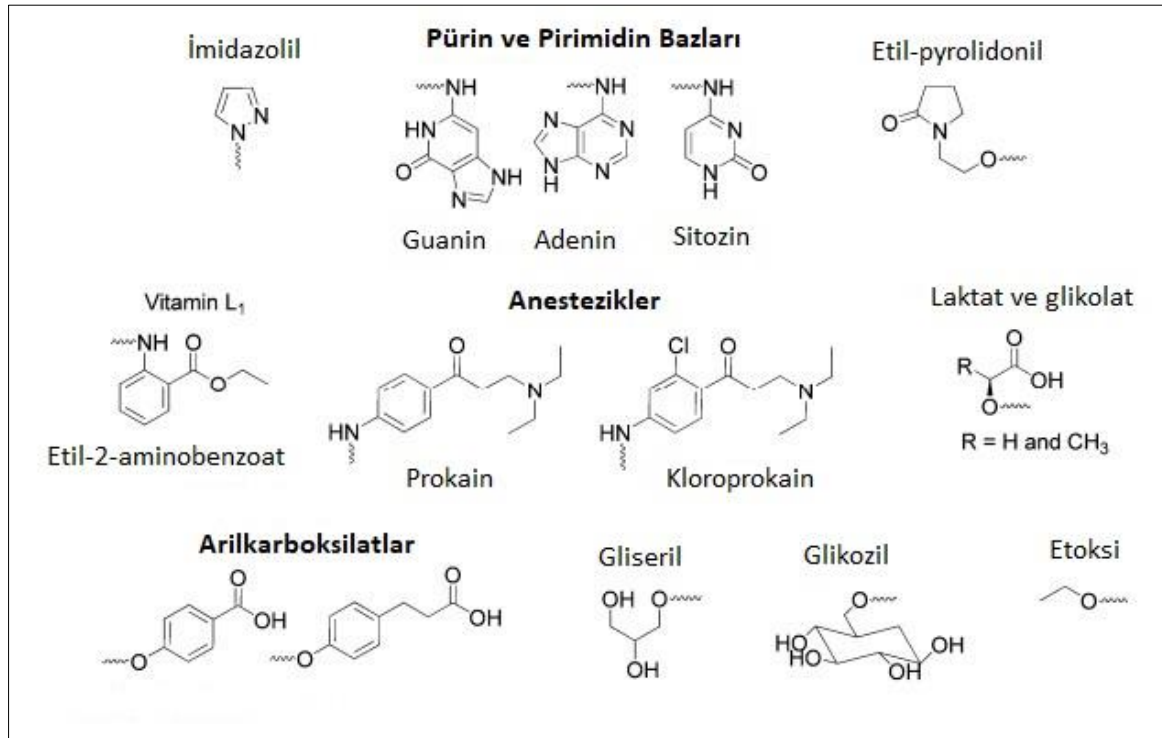
2.3. Fosfazenlerin Hidrolizi

Fosfazenlerin kullanımındaki cazip noktalardan biri biyo-çözünür özellikte olması, kolay hidrolize uğraması ve zararsız maddelere parçalanmasıdır. Bu nedenle fosfazen polimerlerinde bulunan organik ve inorganik yan grupların özelliği ve sayısı, ortaya konulması beklenen polimerin işlevselliği için önem taşımaktadır. Bu nedenle bir fosfazen polimerinin sonradan hidrolize uğrama, parçalanma özelliğinin istenen seviyede olması için, polimer üretilirken aşağıdaki hususlar göz önünde bulundurulabilir:

1. *Omurgaya bağlanma tipi*: Omurgaya bağlanma tipi fosfazenin hidrolize duyarlılığını etkilemektedir. Bazı istisnalar dışında iskeletin P atomuna O atomuyla bağlı olan organik yan gruplara sahip olan polimerler, N atomuyla bağlı olan polimerlere göre hidrolize daha dayanıklıdır.
2. *Eş ikame yan grupların eylemsizliği*: Suya duyarlı bir polifosfazenin hidrolitik ayrışma hızı, hidrolitik anlamda kararsız olan grupların ikame edilmesiyle kontrol edilebilir.
3. *Hidrofililite*: Ariloksi gibi hidrofobik yan gruplar bileşik omurgasının suyla reaksiyona girmesini engelleyerek hidrolizini engellerken, çoklu hidroksil bölgeleri ve karboksilat işlevine sahip gruplar hidrofilik özelliklerinden dolayı bileşikleri hidrolize karşı hassaslaştırır.
4. *Sterik (yapısal) perdeleme*: Hacimli yan gruplar polimeri hidrolize karşı korur. Bu nedenle bu etmen polimerin hidrofobikliğinin sağlanmasıyla ilişkilidir.

5. *Esterlerin işlevi:* Hidroliz oranını etkileyen bir diğer faktör farklı ester gruplarının amino asit ve karboksilat bölgelerin korunumu için kullanılmasıdır.
6. *Hidrojen bağı ve diğer çapraz bağlanma şekilleri:* Makromolekül zincirleri arasındaki H bağı suyun katı maddeye girmesini geciktireceğinden hidrolizi engelleyebilir (Allcock ve Morozowich, 2012b).

Fosfazenlerin hidrolitik duyarlılığının ayarlanması amino asit ester grupları dışında pek çok yan grup rol oynar. Fosfazenlerin hidrolize duyarlı hale gelmesini sağlayan yan gruplar Şekil 2.3’de verilmiştir (Allcock ve Morozowich, 2012b).



Şekil 2.3. Fosfazenleri hidrolitik açıdan duyarlaştıran yan gruplar (Allcock ve Morozowich, 2012)

2.4. Fosfazenlerin Kullanım Alanları

2.4.1. Fosfazenlerin biyomedikal kullanım alanları

Biyo-çözünür polimerler *in vivo* olarak sınırlı zaman içerisinde kullanılabilir olduklarından biyomedikal materyal olarak ilgi çekicidir. Polifosfazenler de fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri (hidrolitik duyarlılıkları vb.) P atomuna bağlı yan grupların değişimiyle birlikte çeşitlilik gösterebildiğinden ve zararsız yan ürünlere ayrışabildiğinden

biyomedikal uygulamalarda kullanılmaya elverişlidir (Atkins, Overton, Rourke, Weller ve Armstrong, 2010: 393-394; Allcock, Lampe ve Mark, 2003: 244). Polifosfazenlerin biyoyumlu yapıda olması için bu bileşiklerin toksik, karsinojenik, immunojenik, trombojenik ve tahriş edici özellikte olmaması gerekmektedir (Williams, 2008).

Fosfazenler tıpta çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Örneğin kalp kapakçıkları ve kan damarlarının yapı malzemesi olarak, cihazların yerleşiminde biyoinert malzeme olarak kullanım olanağı bulunmaktadır (Atkins ve diğerleri, 2010: 393-394).

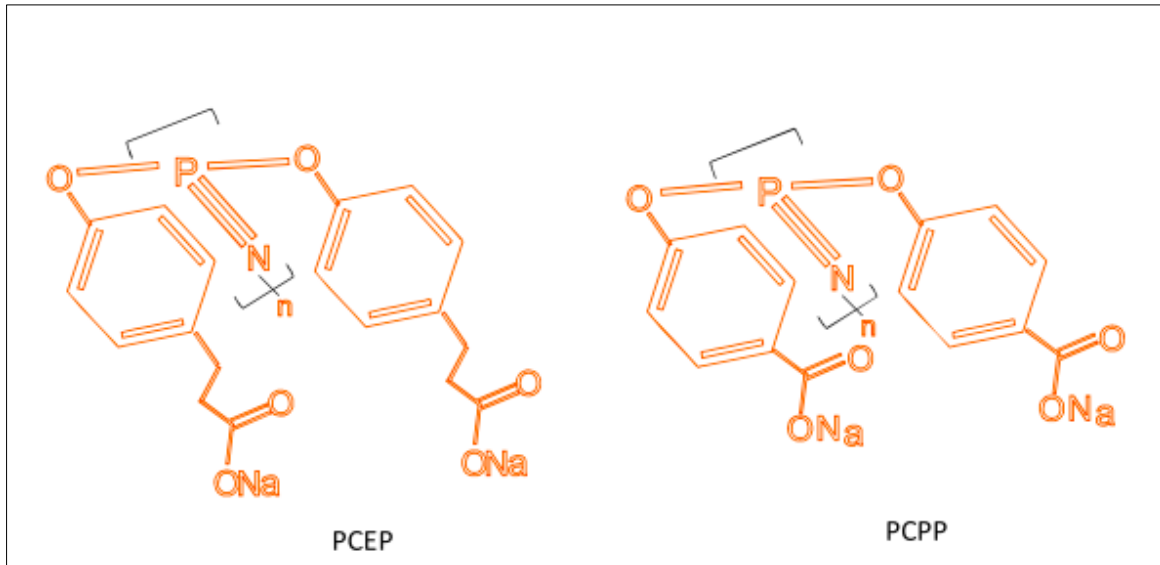
Amino asit ester polifosfazenleri tıp alanında üzerinde çokça çalışılan maddelerdendir ve bu maddelerin biyolojik bozulma oranlarının yan gruplarla düzenlenebileceği gösterilmiştir (Singh ve diğerleri, 2006). Kas-iskelet uygulamaları için vaat eden biyomalzemelerden alanin içeren polifosfazenler buna örnek olarak verilebilir (Deng ve diğerleri, 2008).

Polifosfazenlerin kırık ya da hastalıklı kemik dokuyu onarmasına ilişkin yapılan *in vitro* deneyler ve *in vivo* hayvan modeli çalışmaları 1970'li yıllara dayanmaktadır (Allcock ve diğerleri, 1977; Laurencin ve diğerleri, 1993). Fosfor-Azot (P-N) iskeletinde alkoksi gruplarını içeren polifosfazenler *in vivo* kemik üretiminde biyo-çözünür destek olarak kullanılmaktadır. Lif formundaki bu polimerlerin alkoksi grupları Ca^{2+} iyonlarını bağlar ve lifler hastanın kemik üreten hücreleri olan osteoblastlarla birlikte sayıca çoğalır. Osteoblastlar çoğaldıkça ve lifler arasındaki boşluğu kapattıkça polimer parçalanır. Bu polifosfazenler belirli bir oranda hidroliz olacak ve dayanırlıklarını muhafaza edecek şekilde tasarlanmıştır (Atkins ve diğerleri, 2010: 393-394).

Güncel kemik tedavilerinde kullanılan otogreftleme (kendi dokusundan greftleme) ve allogreftleme (yabancı dokudan greftleme) işlemleri, istenen şeklin verilememesi, verici bölgedeki hastalık hali ve ters bağışıklık reaksiyonlara sebep olma riski nedeniyle ideal bulunmamaktadır (Nichol, 2015). Bu nedenle daha iyi bir çözüm için yapılan araştırmalarla, hücreleri besleyen ve zarar görmüş bağ ve tendonların yerini tutabilecek biyo-çözünür polimer yapılar sentezlenmeye çalışılmıştır (Place, Evans ve Stevens, 2009). Kalsiyum fosfat temelli seramiklerden olan polifosfazen-hidroksiapatit (HAP) gibi alternatif materyaller kemik mineraline ve biyoişlevliliğine yakın yapısından dolayı tercih edilebilmektedir (Greish ve diğerleri, 2005). Amino asit ester ve/veya poli(laktit)ler (PLLA ve PDLA) içeren polifosfazenlerden oluşturulan polimerik yapı iskeletinin tamamen

biyoçözünür olduğu ve yeni dokuların büyümesi için geçici matriks olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Conconi ve diğerleri, 2006).

Polifosfazenlerin immünolojik adjuvan özellikleri üzerine hayvanlar kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu bileşiklerin çeşitli bakteri ve viral aşı antijenlerine karşı bağışıklık cevabın kalitesini ve süresini artıracak şekilde etki ettiği ortaya konulmuştur (Eng ve diğerleri, 2010). Örneğin Poli[di(sodyumkarboksilatofenoksi)fosfazen] (PCPP) tuzu, boğmaca toksini, pnömokokal yüzey proteini A, formalinin aktive edilmiş PR8 influenza virüsü, HBsAg ve HIV-1 gibi çeşitli antijenlerle kombine edilebilen, bir mukoza yardımcı maddesidir (Bose ve diğerleri, 2019). PCPP'nin yanında, yüksek moleküler ağırlıkta, suda çözünür yapıdaki poli[di(sodyumkarboksilatoetilfenoksi)fosfazen] (PCEP)'in aşı uygulamalarında, çeşitli viral ve bakteriyel antijenlerle birlikte fare ve domuzlara uygulandığında uzun süreli bağışıklık cevabını arttırdığı belirtilmiştir (Magiri, Lai, Huang, Mutwiri ve Wilson, 2019). PCPP ve PCEP'in antijenlerin yokluğunda bile çözünebilir bağışıklık reseptör proteinlerine karşı güçlü avidite gösterdiği ortaya konulmuştur. Suda çözünebilir PCEP ile PCPP'in genel yapısı Şekil 2.4'te verilmiştir (Magiri, Mutwiri ve Wilson, 2018).



Şekil 2.4. PCPP ve PCEP'in yapısı (Magiri ve diğerleri, 2018)

İyonik yapıdaki PCPP ve PCEP'in Hepatit C (HCV E2), grip (H1N1), İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) (gp120), Ebola Virüsü (EBOV GP) ve Respiratuar Sinsisyal Virüsü sF alt birimi aşısı (RSV) antijenlerine karşı güçlü etkileşim gösterdiği belirtilmiştir (Andrianov, 2018: 27-49).

Polifosfazenlerin tıpta tedavi amaçlı kullanımına dair bir diğer örnek farelerin çevresel sinirlerinin onarımında (Nicoli-Aldini ve diğerleri, 1997), kobayın orta kulak kanallarında basınç dengeleyici (D'Eredita, Marsh, Lora ve Kazahaya, 2002) olarak kullanımındadır.

Brandt ve Jedlinski (1985)'nin siklotrifosfazen türevleri üzerinde yapmış olduğu *in vivo* çalışmalarla bu bileşiklerin antitümör etkisinin olduğu belirtilmiştir. 2001 yılında ise Brandt ve arkadaşları, DNA ile etkileşime girebilen karbokatyonlara dönüşebilen 1-aziridinil grubunu içeren fosfazenlerin sitostatik özellikleri nedeniyle kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli olduğunu ortaya koymuştur (Brandt ve diğerleri, 2001).

Fosfazenlerin biyomedikal alanında kullanılırken dikkat edilen önemli konulardan biri biyogüvenirliğidir. Poli[bis(etil 4-amino-bütiro)fosfazen]nin 3T3 fibroblast ve HepG2 epitelyal hücre hatları kullanılarak yapılan elüsyon testi sonucunda, elüatların iki hücre hattında da hücre canlılığına etki etmediği görülmüştür. Buradan bu bileşiklerin hücrelere karşı toksik olmadığı ve güvenilir, çözünür biyomalzeme olarak kullanılabileceği yorumu yapılmıştır (Gümüşderelioğlu ve Gür, 2002).

Poli[bis(oktafloropentoksi)fosfazen] (OFP) bileşiklerinin kan ile temas eden tıbbi cihazlarda kullanılmak için güvenilir olduğu, bileşiklerin antimikrobiyal ve antitrombotik özellikleri araştırılarak ortaya konulmuştur. OFP'den üretilen filmlerle yapılan testler bu bileşiklerin Stafilokok bakteriyel adhezyonunu ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini, trombosit adhezyonunu da azaltarak kan pıhtılaşmasına direnç oluşturduğunu göstermiştir (Xu ve diğerleri, 2018). Aynı zamanda nano boyuttaki polifosfazenlerle yüzeyi kaplanmış olan modifiye stentlerin daha iyi vasküler iyileşme özellikleri (neointimal hiperplazi ve inflamasyonda azalma) gösterdiği ortaya konulmuştur (Koppara ve diğerleri, 2016).

2.4.2. Doku mühendisliğinde kullanımı

Doku mühendisliği vücuttaki eksik ya da zarar görmüş doku ve organların tamiri ya da yerine konulması için alternatif yollar geliştiren kimya, biyoloji ve mühendislik gibi farklı disiplinleri içeren bir alandır (Khan ve diğerleri, 2018).

Yapılan çalışmalar, P-N (Fosfor-Azot) iskeletinin biyoçözünürlülüğü ve muazzam çeşitlilikte olabilen yapısı ile polifosfazenlerin kemik ve iskelet doku dâhil farklı doku

tiplerinde kullanımının mümkün olabileceğini göstermiştir. Fosfazenlerin kemik onarımındaki özgün işlevi, osteoblast büyümesini desteklemek ve kemik-polimer matrisinin şekillenmesini sağlamaktır. Bir osteojenik hücre hattı olan MC3TS-E1 hücreleri kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda hücreler polimer matrise ekilerek hücre adhezyonu, büyümesi ve polimer parçalanması incelenmiştir. Çalışma sonunda imidazolil ve etil glisinato süstitüe polifosfazenlerin MC3TS-E1 hücrelerinin büyümesini desteklediği görülmüştür. Aynı zamanda polifosfazenlerdeki imidazolil yan gruplarının artırılmasının hücre büyümesinde azalmaya ve polimer yapısında bozulmaya sebep olduğu görülürken, etil glisinato süstitüe yan gruplarının artırılmasının ise hücre büyümesini ve polimer bozulmasını artırdığı ortaya kondu. Böylece polifosfazenlerin yan gruplarının içeriği ve sayısı değiştirilerek hücre büyümesinin ayarlanabileceği gösterildi (Laurencin ve diğerleri, 1993). Son yıllarda kemik üretiminde polifosfazenlerin kullanımında hangi yan gruplarının kullanımının ideal olacağına ilişkin pek çok araştırma yapılmıştır. Kemik dokusunun yüzey işlevselliğinin fosfazen iskeletine bağlanan polietilen glikol (PEG) ve galaktoz yan grupları ile zenginleştirildiği gösterilirken (Heyde ve diğerleri, 2007), fenilalanin etil ester başta olmak üzere lösin ve valin temelli polifosfazen-nanohidroksiapatit mikroküreciklerinin kemik doku mühendisliği için uygun olduğu ortaya konulmuştur (Nukavarapu ve diğerleri, 2008).

Polifosfazenlerin yan gruplarının doğası, bileşiklerin bozulma durumunu da belirlemektedir. Yan grup olarak amino asit esterler, glukosil, glisil, laktat veya imidazolil birimlerin eklenmesinin polifosfazenlerin biyolojik parçalanmasını sağladığı görülmüştür (Gunatillake ve Adhikari, 2003). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda fosfazen membranların sentetik membranlara göre daha iyi iyileşme sonuçları gösterdiği ortaya konulmuştur (Khalid, Ali ve Akram, 2018 ve Khan ve diğerleri, 2018).

Kemik üretiminde malzemeye verilen gözeneklilik yapısı, malzemenin biyoyumumluluğu ve mekanik özelliği kadar önemlidir (Karageorgiou ve Kaplan, 2005).

Chun, Lim, Hong ve Park and Song (2009)'un yaptığı bir çalışmada üretilen poliorganofosfazen (POP)-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) konjugatının tavşan mezenşimal kök hücrelerinin farklılaşmasını sağlayan fonksiyonları geliştirdiği ortaya konulmuştur. Bu konjugat kullanılarak enjekte edilebilir, ısıya duyarlı ve biyo-çözünür hidrojeller geliştirilmiş ve POP-GRGDS'nin mezenşimal kök hücreleri indüklemek için

hücre dağıtım materyali olarak kullanılma potansiyeli olduğu gösterilmiştir (Chun ve diğerleri, 2009). Enjekte edilebilir hidrojel­lerin mekaniksel özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarındaki kullanımı sınırlı görülse de, mekaniksel yapılarını kuvvetlendirici ajanlarla bu sınırlamalar aşılabılır. Ancak bu ajanların polimerin biyo-çözünürlüğünü olumsuz yönde etkilemesinin önüne geçilmesi için yan grupların oranlarının değiştirildiği çalışmalar yapılmıştır (Zhang, 2015).

Kemik dokusu dışında polifosfazenler, sinir dokusunun rejenerasyonunda (Langone ve diğerleri, 1995), damar endotel hücrelerinin proliferasyonunda (Conconi ve diğerleri, 2004), antitrombojenik ve hemo-uyumluluk gösteren biyo-protetik kalp kapakçığının üretiminde (Gordy, Ung, Fritz ve Denk, 2011) kullanılabileceği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Nanoteknolojideki gelişmeler hedef dokulardaki doğal ekstraselüler matriksin çok iyi taklit edilebilmesini imkân kılmıştır. Özellikle ekstrasellüler matriksin yüzey işaretleriyle uygun bir şekilde birleşebilen fosfazen bileşiklerinin sentezlenmesinin, gelecekte daha karmaşık dokuların geliştirilmesini sağlayacağı düşünülmektedir (Deng ve diğerleri, 2010).

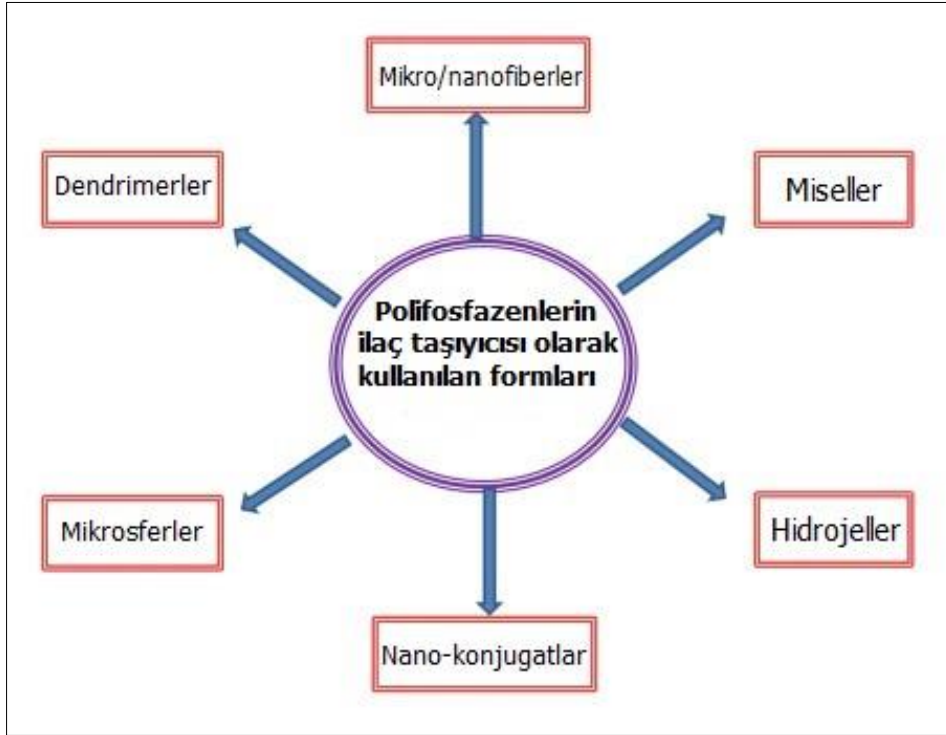
2.4.3. İlaç taşıma sistemlerinde kullanımı

Polifosfazenlerin tıptaki bir diğer kullanım alanı ilaç taşıma sistemleridir (Atkins ve diğerleri 2010: 393-394). Fosfazen bileşikleri antitümör ajanların katı matriks ya da mikroküre kontrollü salınımında kullanılabilmektedir (Goedemoed, 1990: 189-203).

Tıbbi biyoloji ve medikal teknolojideki önemli konulardan bir diğeri pH, sıcaklık, iyon gücü ve yüküne cevap olarak şekil ve geçirgenliğini değiştirebilen ‘duyarlı membran’ların üretilmesidir (Allcock, 2006a). Kontrollü ilaç taşıma sistemlerinde, ilaçların önceden ayarlanmış oranlarda, belirlenen süre içerisinde ulaştırılması, böylece geleneksel ilaçların eksikliklerinin giderilmesi amaçlanmaktadır. Ancak diyabet ve kalp ritim bozuklukları gibi bazı hastalıklarda ilaç vücuttaki pH’a göre cevap vermektedir. Bu nedenle polimerik omurgasında daha az asidik ya da bazik grupların bulunduğu polimerler üretilmiştir (Balamuralidhara ve diğerleri, 2011).

Bazı genetik hastalıklarda, viral vektörlerin tedavi edici genin taşınmasındaki verimliliği kanıtlanmış olsa da, viral olmayan seçenekler de araştırılmaya devam etmektedir. En kolay yöntem plazmit DNA'nın doğrudan hedef hücreye girişi olarak görülse de bu yaklaşım çok sayıda plazmit DNA gerektirmesi ve sadece belli dokular için kullanılabiliyor olmasıyla sınırlıdır. Bu nedenle bazı virüslerin memeli hücrelerine giriş şekli örnek alınarak sentetik virüsler inşa edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada genel aşamalar nükleik asitin korunumu, hücreyle teması, nükleik asitin sitozol ve çekirdek içine transferi ve konak hücredeki genom ile birleşmesi olarak ele alınmış ve bu aşamalarda kullanılabilecek histidin ya da imidazol içeren polimer, peptid ve lipitlere yönelik araştırmalar yapılmıştır. Gen tedavisinde, nükleik asit taşıyıcı olarak tercih edilebilecek histidine zengin polimerlere örnek olarak Poli(DMAEA/His(Boc)-OMe)fosfazen (PDHP) verilebilir (Midoux, Pichon, Yaouanc ve Jaffrès, 2009). Yang ve diğerleri, (2008a) tarafından sentezlenen imidazolce zengin poli(imidazol/DMAEA)fosfazen (PIDP)'de olduğu gibi, PDHP'nin de yüksek transfeksiyon verimliliğine sahip olduğu gösterilmiştir. 293T insan hücre hatları ile yapılan metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) çalışmalarında PDHP'nin düşük sitotoksosite gösterdiği, bu nedenle PDHP'nin gen taşıma potansiyeli olan, katyonik bir polimer olduğu belirtilmiştir (Yang ve diğerleri, 2008b). Biyoçözünür yapıda galaktoz grubu taşıyan poli(2-(2-aminoetoksi)etoksi)fosfazen (Gal-PAEP) bileşiklerine ilişkin yapılan çalışmada, bu bileşiklerin tümörde seçici gen ifadesi gösterdiği, Gal-PAEP/DNA kompleks nanopartiküllerinin tedavi edici gen taşınımı için ideal araç olabileceği belirtilmiştir. Bu nanopartiküllerin *in vitro* transfeksiyon verimliliği BEL-7402 insan hepatoma hücre hattı ve HeLa insan rahim ağzı kanser hücre hatlarında araştırılmış ve verimliliğin Gal-PAEP/DNA oranına bağlı olduğu ortaya konulmuştur. (Yang, Zhang, Chen, Gu ve Li, 2010).

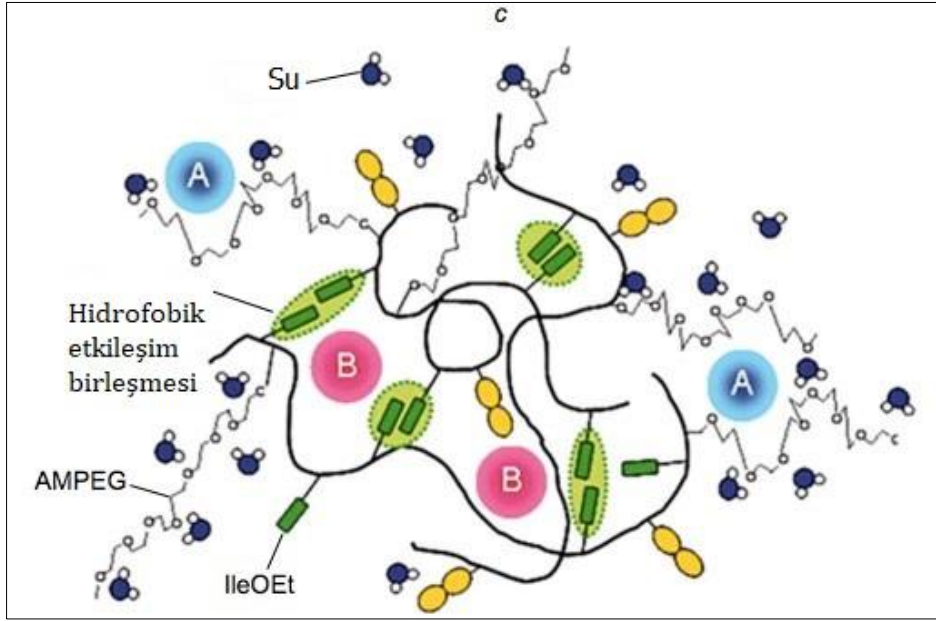
Polifosfazenlerin ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabileceği formlar genel başlıklarıyla Şekil 2.5'de gösterilmiştir. Polifosfazenler ilaç taşıma matrislerinde genellikle pellet ya da film olarak kullanılmaktadır. Fosfazenlerin çeşitli çözücülerde çözünbilmesi nedeniyle çoğunlukla çözücü döküm yöntemi ile tabletleri ve filmleri üretilmektedir. Bunun dışında çözücü buharlaştırma, mikro kapsülleme gibi emülsiyon çözücü buharlaştırma ve spreyle kurutma yöntemleri de kullanılmaktadır (Khan ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.5. Polifosfazenlerin ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilen formları (Khan ve diğerleri, 2018)

Enjekte edilebilen ve ısıya duyarlı bir poliorganofosfazenin antikanser ilacı olan 5-Flourourasilin taşınması için uygun olduğu Lee, Chun, Heo ve Song (2009) tarafından gösterilmiştir. Bu polifosfazenin diyagramı Şekil 2.6’da verilmiştir ve şekildeki (A) hidrofilik polietilen glikolu (AMPEG), (B) ise hidrofobik izolösün (IleOEt) alanları göstermektedir (Lee ve diğerleri, 2009).

Farelerde yapılan bir araştırmada primaquine ve dihidroartemisinin dağıtımında polifosfazenlerin nanotaşıyıcı olarak ilaca dirençli sıtmanın alternatif tedavisinde kullanabileceği ortaya konulmuştur (Kumar, Singh, Murthy ve Bhardwaj, 2015).



Şekil 2.6. Hidrofobik L-izolösün etil ester alanı ile hidrofilik α -amino- ω -methoksi-poli(etilen glikol) alanı içeren hidrojel şematik diyagramı (Lee ve diğerleri, 2009)

Fosfazenlerin biyomedikal alanda kullanımı cazipliğini korumasına rağmen, hala bazı uygulamalar açısından aşılamayan zorluklar bulunmaktadır. Örneğin kombinasyon tedavilerinde, ikili ilaç uygulamalarında ve ilaç direncinin geri çevrilmesi gibi hususlarda da çok işlevli polifosfazenlerin kullanımı arzu edilmektedir (Khan ve diğerleri, 2018).

2.4.4. Batarya ve yakıt pili teknolojilerinde kullanımı

Polifosfazenlerin iyon geçirken özelliği lityum temelli bataryalarda enerji depolama ve yakıt pili ile süperkapasitörlerde enerji üretimi uygulamalarında kullanılmaktadır (Klein, Welna, Weikel, Allcock ve Runt, 2007; Allcock ve Wood, 2006b). Yüksek verimde alev geciktirici özellikteki pentaflorosiklotrifosfazenlerin (PFPN) şarj edilebilir lityum-iyon (LiI) bataryalar için güvenilir bir koruma maddesi olabileceği L. Xia, Y. Xia ve Liu, (2017) tarafından ortaya konulmuştur. Aynı zamanda şarj deşarj sonuçları PFPN'nin katkı maddesi olarak ideal bir elektrokimyasal uyumluluk sergilediğini göstermiştir. PFPN'lerin araştırılan diğer katkı maddelerine göre en iyi alev geciktirici özellikte olduğu yapılan diğer çalışmalarda da desteklenmiştir (Xia ve diğerleri, 2017). Anot olarak karbon malzemelerinin kullanıldığı LiI bataryalar uzun kullanım ömrü, yüksek enerji yoğunluğu ve voltaj sebebiyle oldukça başarılı görülmektedir. Ancak bu bataryaların kısa devre ve aşırı şarj durumunda karşılaşılan yangın ve patlama kazaları, karbonat temelli

elektrolitlerin yanıcılığından kaynaklanabileceğini gösterdiğinden, yüksek performanslı ve yanmayan yeni malzemeler üzerinde çalışmalara teşvik etmiştir (Wang, Yasukawa ve Kasuya, 2001).

Lityum temelli bataryaların günümüz araç teknolojilerinde kullanımı da yaygınlaştıkça, bataryaların güvenliğine ilişkin çalışmalar hızlanmıştır. Fosfazenlerin yangına dayanıklı olmasından dolayı tek başına elektrolit olarak kullanılması arzu edilirken, yüksek LiPF_6 çözünürlüğü ve düşük viskozite özelliğinden dolayı genelde karbonatlarla birlikte katkı maddesi ya da birlikte çözücü olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle daha yüksek termal ve elektrokimyasal yeteneklere sahip fosfazenlerin üretilmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir (Rollins ve diğerleri, 2014).

Proton değişim membranlı yakıt pillerinde (PEMFC) kullanılacak polimer elektrolit malzemelerin, mekanik ve elektrokimyasal açıdan stabil olması, yakıt hücresinin iki yarısını fiziksel olarak ayırarak yakıt ile oksidanın karışmasını önleyen bariyer görevi görmesi, yüksek iyonik iletkenliğe sahip olması ve yalıtkan yapıda bulunması beklenmektedir. Polifosfazenlerin klasik hidrokarbon temelli polimerlere göre termal ve kimyasal açıdan daha stabil yapıda olması gibi avantajları proton değişim membranı (PEM) olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu konuda yapılan ilk araştırmalarda sülfonik asit ile işlevleştirilmiş polifosfazenler kullanılmıştır (Allcock ve Wood, 2006b). Daha sonra yapılan çalışmalarda inorganik-organik yapıda, hibrit, yüksek proton iletkenliği ve düşük yakıt geçişini sağlayan yeni membranların üretiminde siklik fosfazenlerin kullanılabileceği gösterilmiştir (Fei ve diğerleri, 2008; Fei ve Allcock, 2010).

Polifosfazen temelli iyon değişim membranının doğrudan bir metanol sıvı yakıt pilinde kullanımını araştıran Carter, Wycisk, Yoo ve Pintauro (2002), yüksek verimli sonuçlara ulaşmıştır. Bir metanol yakıt pilinde anot ile katotu ayıran membranın yüksek protonik iletkenlik göstermesi ve düşük metanol geçişi yapması beklendiğinden, poliakrilonitril ile karıştırılmış ve ardından ultra viyole (UV) çapraz bağlanmış sülfonat poli[bis(3-metilfenoksi)fosfazen] (SPOP)'un hâlihazırda kullanılan membranlardan biri olan Nafion 117'den yaklaşık on kat daha düşük düşük metanol geçiş göstermesi önemli bulunmuştur (Carter ve diğerleri, 2002).

2.4.5. Alevlendirmeyi geciktirici ve önleyici materyal olarak kullanımı

Fosfazenlerin alevlenmeyi geciktirici özellikteki iki elementi (fosfor ve azot) içermesi, bu bileşiklerin yanmayı geciktiren ya da önleyen materyal olarak kullanımına ilişkin araştırmaları tetiklemiştir (Allen, 1991). 1986 yılında yangına dayanaklı materyal üretimine ilişkin yapılan bir çalışmada, heksaklorosiklotrifosfazenlerin trifloroetanol ve çeşitli fenollerin sodyum tuzları ile reaksiyonu sonucu sentezlenen siklik fosfazen sıvılarının, kritik hidrolik sıvı uygulamalarındaki yangının ilerleme tehlikesini önleme potansiyeli olduğu ortaya konulmuştur (Singler, Deome, Dunn ve Bieber, 1986).

Siklo ve polifosfazenlerin yangına dayanaklı uygulamalarda kullanımına ilişkin çalışmalarda iki temel yaklaşım ele alınmıştır; birincisi destekleyici olarak kullanılması, ikincisi ise özünde aleve dirençli materyal olarak bulunmaları. Siklofosfazenler alev geciktirici katkı maddesi olarak poliüretanlarla, hidrolik sıvılarla, laminatlardaki fenolik reçinelerle, selüloz fiberlerle ve polistiren gibi pek çok materyalle birlikte kullanılmıştır. Aleve dirençli fosfazenlerin hazırlanmasında iki sentez yöntemi kullanılmaktadır; Allcock tarafından yaklaşık 300 polimer üretiminde kullanılan termal halka açılma polimerizasyonu ve DeJager tarafından kullanılan yoğunlaşma polimerizasyonu (Allen, 1991).

Aktif amin grupları içeren heksaklorosiklotrifosfazenlerden üretilen polifosfazenlerin (PBFA) epoksi reçinesinde alev geciktirici katkı madde olarak kullanılabileceği ve duman oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (Yang ve diğerleri, 2019).

2.4.6. Diğer kullanım alanları

Polifosfazenlerin optik materyal olarak kullanımına ilişkin pek çok çalışma yapılmıştır. Yıllardır düz zincirli fosfazenlerin, sıvı kristalin, non linear-optik ve fotokromik içerikteki yan gruplarla sentezi yapılmış ve bu maddelerin optik özellikleri araştırılmıştır (Dembek ve diğerleri, 1990; Allcock ve Kim, 1991; Olshavsky ve Allcock, 1995). Cho ve Allcock'un 2007 yılında yaptığı çalışmada siklotrifosfazenlerin optik anahtarlama uygulamalarında kullanıma elverişli olduğu gösterilmiştir (Cho ve Allcock, 2007; Allcock, 2006a).

Eu^{+3} ilaveli kalkon içeren siklofosfazenlerin daha yüksek dielektrik sabitine ve iletkenlik değerlerine sahip olduğu gösterilmiş olup, çok işlevli elektronik ve optoelektronik cihazlarda kullanım için elverişli olduğu önerilmiştir (Koran ve diğerleri, 2016).

Multikromoforik materyallerin üretiminde floresan bileşikleri bulunduran fosfazenler kullanılabilir. Altı ya da sekiz üyeli halkaya sahip halkalı fosfazenler, benzen motifine yakın bir görünüm sergileyebilir ve böylece supramoleküler sistemlerin tasarımı için kullanılabilirler. Yapılan bir çalışmada fosfazen halkası kullanılarak hekzamerik ve oktametik subfitalosiyenin türevleri sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Sonuç olarak bu bileşiklerin, mavi-yeşil bölge gibi uygun dalgaboyu ve yüksek floresans kuantum verim değeri nedeniyle, ışık yayan elektrolüminesans cihazları için uygun olabileceği ortaya konulmuştur (Çoşut, Yeşilot, Durmuş ve Kılıç, 2013). Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-AES) gibi metal katyonlarının tespitinde kullanılan yöntemler büyük boyutlu örnek gerektirdiğinden ve masraflı olduğundan, metal katyonlarının floresans yöntemiyle tespitine yönelik çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Yüksek floresans kuantum verimi gösteren borondipirometen (BODIPY) boyası ile ikame edilen ve triazol halkası ile bağlanmış siklotrifosfazenlerin farklı metal iyonlarına karşı floresans kemosensör davranışları incelenmiş ve Fe^{2+} iyonu için ideal seviyede hassas ve seçici özellikte olduğu ortaya konulmuştur (Çetindere, Tümay, Kılıç, Durmuş ve Yeşilot, 2016). Aynı zamanda BODIPY reaktif son grubunun tekli oksijen üreterek Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*'u öldürebildiği, bu nedenle BODIPY içeren siklotrifosfazenlerin antimikrobiyal yüzey geliştirmede kullanılabileceği belirtilmiştir (Şenkuytu, Öztürk, Aydınoğlu, Tanıverdi Eçik ve Okutan, 2019).

Hekzaklorosiklotrifosfazen ile dallanmış polietileneminin polimerizasyonu ile oluşan fosfazen bileşikler kullanılarak poliamin temelli siklofosfazen nanofiltrasyon membranları üretilmektedir. Nanomembran teknolojisinin içilebilir su temini, düşük enerji tüketimi, boya çıkarma ve farmasötik bileşiklerin izolasyonu gibi çeşitli alanlarda kullanımı yaygınlaşmaktadır (You ve diğerleri, 2019).

Polifosfazen temelli nanoparçacıklar görüntüleme doğruluğu ve renal klerensi vb. konularda avantajlara sahip olduğundan, bilgisayarlı tomografi (CT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), fotoakustik tomografi (PA) ve floresans gibi görüntüleme

tekniklerinde kontrast maddesi olarak kullanılmasının uygun olduğu belirtilmiştir (Hajfathalian, Bouché ve Cormode, 2018).

Floroalkoksi ve fenoksi pendant gruplarını içeren siklotrifosfazen ve siklotetrafosfazenler, yüksek termal stabiliteye sahip olmaları ve yangın dayanıklı olmaları sebebiyle 1960’lardan bu yanda hidrolitik sıvı ve yağlayıcı olarak kullanılmaktadır (Keller ve Saba, 1996).

Klasik olarak kauçuk, silikon kauçuk ve poliizobtilenden oluşan elastomerler biyomedikal ve mühendislikte büyük rol oynayan yumuşak malzemelerdir. Ancak elastomerlerin zorlayıcı koşullarda kullanımını mümkün kılmak için bazı ek özelliklere ihtiyaç vardır. Örneğin yüksek enerjili radyasyona dayanıklı polimerlerin üretilmesi, lipidlerin emilimine veya proteinlerin birikmesine karşı direnç gösteren kardiyovasküler cihazların geliştirilmesi gibi amaçlarla poli(organo)fosfazenleri içeren elastomerler kullanılmıştır. Fosfazen kullanılan elastomerler genel olarak halojen içeren fosfazen elastomerler (floroalkoksi türevleri ve kloroalkoksi türevleri), halojensiz fosfazen elastomerler ve blok ile graft kopolimerler olarak gruplandırılabilir (Allcock, 2012a).

2.5. Fosfazenlerin Biyolojik Aktiviteleri

Halkalı fosfazenlerin antimikrobiyal, antitümör ve sitotoksik aktiviteleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen siklotrifosfazen tuzlarının biyolojik aktiviteleri çok fazla araştırılmamıştır. Fosfazenyum tuzlarının apolar ve polar organik çözücülerde iyi çözünüyor olması farmakolojik çalışmalar açısından önemlidir (Karadağ, 2018).

2.5.1. Fosfazenlerin antimikrobiyal özellikleri

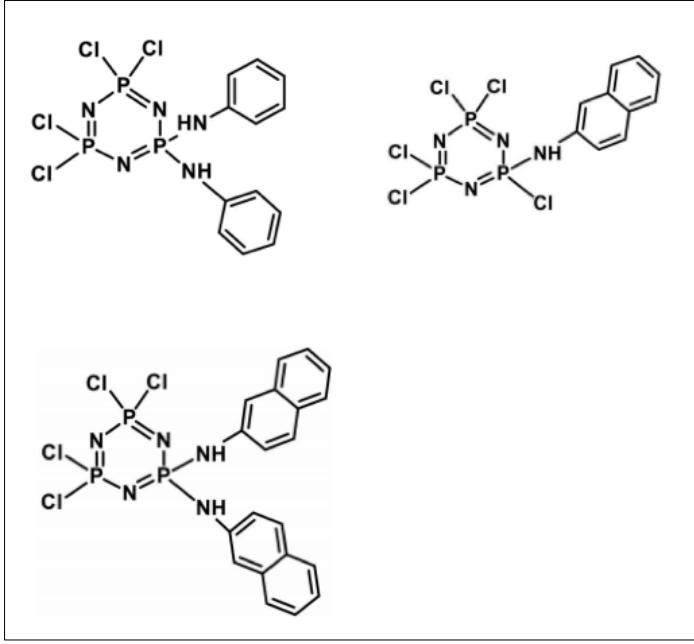
Yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine yönelik ihtiyaç ile birlikte mevcut antibiyotiklerin ilaç taşıma özeliklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar da önem arz etmektedir. Fosfazenlerin biyo-uyumlu, biyo-çözünür ve toksik olmayan atıklara parçalanması özelliğinden yararlanılarak antibiyotik taşıma sistemlerinde kullanılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Örneğin idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılan bir antibiyotik olan trimetoprim (TPM) mikrosferinde çapraz bağlayıcı olarak

heksaklorosiklotrifosfazen gruplarının kullanımının uygun olduğu önerilmiştir (H. Ozay ve O. Ozay, 2014).

Antibiyotik içeren ve biyolojik olarak çözünebilir olan polifosfazenlere ilişkin pek çok çalışma yapılmıştır. Tian ve diğerleri (2013)'nin yapmış olduğu bir çalışmada ciprofloxacin ya da norfloxacin ihtiva eden ve çeşitli aminoasit etil ester (fenilalanin, alanin, glisin) ile süstitüe polifosfazenlerin hidroliz duyarlılığı, pH davranışı ve antibiyotik salınım profili incelenmiştir. Bulundurduğu yan gruplardan dolayı çözünebilirliği artırılmış ve antibiyotik salınım oranı ayarlanabilmiş olan polifosfazenlerin *E. coli*'ye karşı 37 °C'de 6 haftalık *in vitro* hidroliz testi yapılmıştır. Hidroliz testi sonucunda antibiyotiğin salındığı süre boyunca antibakteriyel özelliğini sağladığı ve alanin etil ester ya da glisin etil ester ikame eden polifosfazenlerin daha hızlı bozunma ve antibiyotik salınım faaliyeti gösterdiği ifade edilmiştir. Bu polimerlerin antibakteriyel biyomalzeme üretiminde, ameliyat sonrası enfeksiyonların önlenmesi amacıyla malzemelerin kaplamasında ya da karışımında kullanıma uygun olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca daha hızlı antibiyotik salma yeteneği gösteren polifosfazenleri içeren nano ya da mikroküreciklerin kullanımının yara örtüsü için uygun olacağı önerilmiştir (Tian ve diğerleri, 2013).

Fosfazenlerin antitüberküloz etkisine yönelik yapılan çalışmalarda, ferrosenil içeren siklotrifosfazenlerin ve bis-diamino ile bis-dialkoksi bisferrosenil-2-trans-6-dispirosiklotetrafosfazenlerin *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bakterisine karşı biyolojik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Asmafiliz ve diğerleri, 2009; Elmas ve diğerleri, 2017).

P. aeruginosa, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilen bazı siklofosfazenlerin yapısı Şekil 2.7'de verilmiştir (Yıldırım ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.7. *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren halkalı fosfazenlerin yapısı (Yıldırım ve diğerleri, 2018)

2.5.2. Fosfazenlerin antioksidan özellikleri

Hücredeki metabolizma faaliyetleri sonucunda oluşan reaktif oksijen türlerinin (serbest radikaller) membran lipitleri, nükleik asitler ve protein gibi hücre yapılarına vereceği hasarı önlemekte görev alan mekanizmalara antioksidanlar denir. Antioksidanlar, oksidatif strese sebep olan maddeleri ortamdan uzaklaştırarak, hasara sebebiyet veren mekanizmaların başlamasını engelleyerek ve oluşan hasarı onararak etki eder (Özcan, Erdal, Çakırca ve Yönden, 2015).

Literatürde organik maddeler için antioksidan olarak kullanılabilecek bazı fosfazenler (hekzakis(2,5-di-tert-alkilhidroksifenoksi)siklotrifosfazatrien ve oktakis(3,5-di-tertalkil-4-hidroksifenoksi)siklotetrafosfazatetraen) tanımlanmıştır. Bu fosfazenler amino grubu ile engellenmiş fenolik gruplarla süstitüe edilmiştir ve kararsız organik maddelerin oksijenle temasından oluşabilecek polimerizasyon ürünlerinin önlenmesini ve oksidasyondan korunumu için kullanılabilmektedir. Bu fosfazen bileşikleri aynı zamanda içten yanmalı motorlarda kullanılan hidrokarbon yakıtların stabilize edilmesi için de uygundur (Goins ve Li, 1992).

Antioksidan özelliği bulunan fosfazenlere bir diğer örnek olarak organometalik veya inorganik metal tuzlarını içeren fosfazenler verilebilir. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı ve

oksidatif olarak stabil siklofosfazenlerin üretilmesine yönelik çalışmalarda bu bileşikleri içeren malzemelerin jet uçağı, türbin ve dizel motorlarda kullanımını sağlamak amaçlanmıştır (Nader ve Inbasekaran, 1993).

Ferulik asit içeren polifosfazenlerin bulunduğu malzemeye serbest radikallerden korunma özelliğı kazandırdığı ve bu malzemelerin özellikle yüksek mukavemet içeren sert doku yapıları için kullanılabileceğı belirtilmiştir (Morozowich, Nichol, Mondschein ve Allcock, 2012a). Polifosfazen iskeletine bağı farklı amino esterler ile birlikte ikame edilmiş ferulik asit içeren polimerlerin antioksidan etkileri araştırılarak, bu bileşiklerin yapay vücut sıvısına (SBF) maruz kaldığında apatit (kemik dokuda bulunan kalsiyum fosfat minerali) mineralleşmesi yetenekleri araştırılmıştır. Bu çalışmada mineralleşme sürecinin polimerin hidrofobik/hidrofilik özelliğine bağı olduğu ve bu özelliğın de farklı yan gruplarla sağlanabileceğı ortaya konulmuştur (Morozowich, Nichol ve Allcock, 2012b).

Oktaklorosiklotetrafosfazenlerden bir dizi reaksiyon sonucu oluşan substitüe ferrosenil siklotetrafosfazen bileşikleriyle yapılan antioksidan aktivite tayininde, bileşiklerin DPPH serbest radikalini süpürücü etkisi incelenmiş ve herhangi bir antioksidan aktivite ortaya konulamamıştır (Aydın, 2018).

2.5.3. Fosfazenlerin antikanser özellikleri

Dünya genelinde kemoterapik kanser tedavisinin yaklaşık %50'sinde platin temelli ilaçlar kullanılmaktadır (Galanski, Jakupiec ve Keppler, 2005). Ancak platin temelli ilaçların tüm kanser tiplerinde eşit etkiye sahip olmaması ve kanser hücre popölasyonlarının somatik evrim süreciyle zaman içinde tedaviye direnç kazanabiliyor olması nedeniyle (Chabner ve Roberts 2005; Johnstone, Park ve Lippard, 2014) yeni antikanser ajanlarının geliştirilmesi önem kazanmaktadır. Aynı zamanda, birlikte, çeşitli kombinasyonlarda kullanılabilen bu ilaçların son derece toksik olması sebebiyle de daha seçici, kansere özel moleküler hedefli ajanların geliştirilmesi amaçlanmaktadır (Hurley, 2002).

Platin temelli ilaçların tedavi sürecinde bir takım yan etkileri de beraberinde getirdiğı bilinmektedir (Wong ve Giandomenico, 1999). Çünkü antikanser ilaçlarının çoğunun 1 000 Da'dan küçük molekülü ilaçlar olması bu ilaçların sadece tümör hücrelerine değil normal doku ve hücrelere de saldırarak nefrotoksisite, nörotoksisite ve kardiyotoksisite

gibi etkilere sebep olduğu bilinmektedir. Bu toksik etkiler sebebiyle kemoterapide doz ayarlamaya gidilmesi gerekir ki bu durum tedavinin etkililiğini azaltmaktadır. Küçük moleküllü kemoterapik ajanların bu sınırlılığını ortadan kaldırmak için polimerik ilaç taşıma sistemleri (Drug Delivery Systems; DDS) geliştirilmektedir. Kontrollü ve hedefli ilaç salım sistemleri olarak ikiye ayrılabilir olan polimerik ilaç taşıma sistemleri, suda çözünabilirliği ve plazmada uzun ömürlülüğü sağlayarak ilaçlara tümör seçiciliği özelliği kazandırır. Bu sistemlerin (DDS) tümör seçicilik özelliği hücrelerdeki belirli bir antijene ya da reseptöre duyarlı olması durumunda aktif tümör hedefleme olarak adlandırılırken, pasif tümör hedefleyen polimerik DDS'lerde ilaç taşıyıcı molekül ya da nanoparçacığın büyüklüğü önem taşır. Son yıllarda, aktif ve pasif tümör hedefleme için birçok geleneksel organik polimerin ilaç taşıyıcısı olarak kullanımına ilişkin çalışmalarda bulunulmuştur. Ancak bu organik polimerlerin biyo-uyumluluk ve biyo-çözünürlük özelliklerinin yeterince uygun olmaması, istenen hedefe doğru zamanda kontrollü salımının sağlanmasında kısıtları olduğu görülmüştür. Bu nedenle polifosfazenlerin geleneksel organik polimerlerde bulunmayan fizikokimyasal çeşitliliğe ve tümör hedefleme özelliğine sahip olması, yeni polimerik ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilecek elastomer ve membranların geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Örneğin paklitaksel gibi hidrofobik antikanser ilaçlar için polifosfazen miselleri ve mikrosferleri ideal bir ilaç taşıyıcı sistemidir. (Sohn ve Jun, 2009: 249–255). Genel olarak miseller vücutta daha uzun süre kalarak terapatik etmenin bölgede toplanabilmesini ve çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlüğünün artmasını sağlar (Sezgin, Yüksel ve Baykara, 2003).

Antitümör ilaçların çoğu hücre içindeki aktivitesini DNA'yı hedef alarak, replikasyon ve mitozu erteleyerek ya da apoptozu uyarak gerçekleştirir. Bundan dolayı bu ilaçların DNA ile etkileşime geçme özelliği önem arz etmektedir (Palmer ve diğerleri, 2012: 304-306, 314, 329-331). Kanserin kötü huylu hücre bölünmesi ve tekrarlı DNA replikasyonu ile oluştuğu bilindiğinden, antikanser ilaçlarının geliştirilmesinde ele alınan önemli konulardan biri DNA ile etkileşime geçen moleküllerin kullanımınıdır. Bu nedenle siklotrifosfazenlerin DNA ile etkileşim gösterdiğini ve antikanser ajan olarak kullanımının uygun olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (Yenilmez Çiftçi ve diğerleri, 2016).

Baek, Cho, Lee ve Shon (2000)'nin yapmış olduğu bir araştırmada bazı suda çözünen siklotrifosfazenlerin lökosit L1210 ve bazı insan kanser hücre hatlarında yapılan

çalışmalarında, aminofosfazenlerin cisplatin ve karboplatinden daha yüksek antitümör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Hekzaklorosiklotrifosfazen ile antikanser özellikteki kuersetin (QCT: 3,3',4',5'-7-pentahidroksiflavone)'in polimerizasyonu ile oluşan inorganik-organik hibrit yapıdaki polifosfazen nanoküreler, model olarak kullanılan akriflavin ile yapılan deneyler sonucunda kontrollü ilaç salımında kullanılabileceği ortaya konulmuştur. Fosfor atomuna bağlı olan Cl atomları (P-Cl bağı reaktivitesi) bu bileşiklere, uygun şartlar altında amin, alkol ve fenol gibi organik gruplarla yer değiştirme reaksiyonu yapma özelliği kazandırdığından, ortaya çıkan organik yan gruba sahip olan inorganik-organik hibrit yapı, geniş yüzey alanına sahiptir. Bu alanın geniş olması da ilaç, boya, metal vb. maddelerin emilim kapasitesinin artmasını sağlamaktadır. Özellikle ilacın istenilen bölgeye salınımı ve tedavi edici konsantrasyonun ayarlanması mümkün kılınarak ilacın olası yan etkilerinin de önüne geçilebilmekte, biyouyumlu ve biyoçözünür özellikte olmaları sebebiyle de toksik olmayan fosfat ve amonyuma parçalanabilmektedir. (Örüm ve Demircioğlu, 2018; Tibbitt, Dahlman ve Langer, 2016).

Organometalik bileşiklerin polifosfazenlerle birleştirilmesiyle ortaya çıkan metalloilaç komplekslerinin antitümör etkilerine yönelik yapılan çalışmalarda, organ deformasyonu gibi istenmeyen etkilerin üstesinden gelinebildiği ve bu komplekslerin ilaç taşınımı için gelecek vaat ettiği gösterilmiştir (Hackl ve diğerleri, 2017).

2.6. Enfeksiyon Hastalıkları ve Etmenleri

Enfeksiyon hastalıklarının özellikle tarımın insan hayatına girmesiyle birlikte son 11 000 yıl içinde ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir (Wolfe, Dunavan ve Diamond, 2007). Yüzyıllardır bu hastalıkların bir kısmı ortadan kaldırılabılırken sıtma gibi bazı bulaşıcı enfeksiyonlar günümüzde hala milyonlarca insanın hayatını etkilemektedir (Becker, 1989: 1).

Büyük salgın hastalıklarının tarihçesine baktığımızda, en etkili enfeksiyon salgınlarından biri olan ve “Kara Ölüm” olarak anılan büyük vebanın 1300’lü yıllarda başladığı bilinmektedir. Yakın tarihe baktığımızda ise 1918 yılında baş gösteren İspanyol gribi salgınının en az 25 milyon insanın ölümüne sebep olduğu bilinmektedir (Lederberg, 2000).

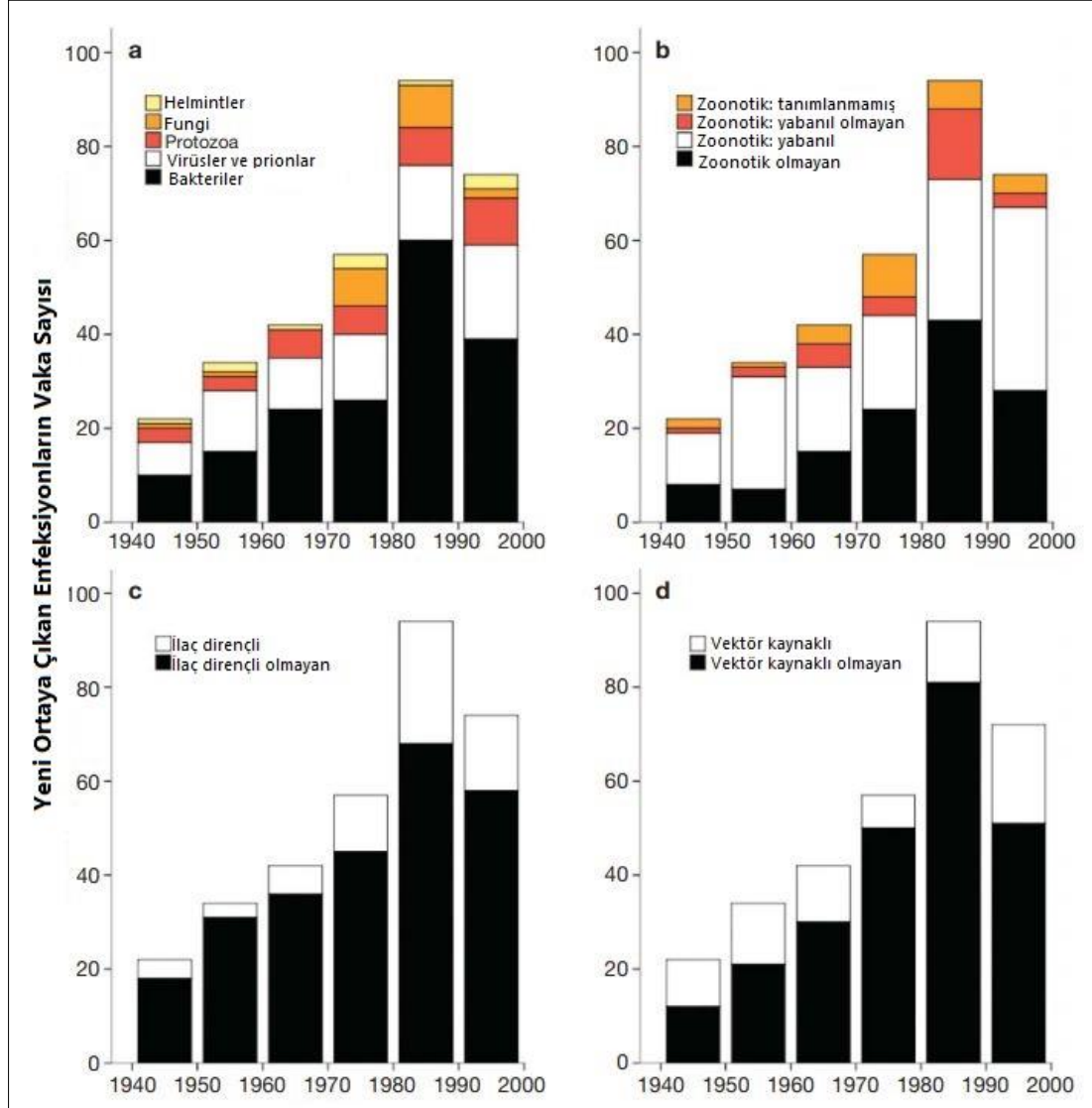
Enfeksiyon hastalıkları ve mikroorganizmaların tanımlanmasına yönelik ilk çalışmalarda, Anton van Leeuwenhoek 1683 yılında bakterileri, dış plağını mikroskopta incelerken keşfetmiş ve gördüğü organizmaları “minik hayvancıklar” olarak adlandırmıştır. Yaklaşık 200 yıl sonra, 1868 yılında ise Louis Pasteur, bulaşıcı hastalıklara “mikrop” adını verdiği canlıların sebep olduğunu ifade etmiştir. Bu yıllarda Joseph Lister’in yaraları temizlemekte kullandığı karbolik asit de ilk kullanılan antiseptik uygulamalardan sayılmaktadır (Lederberg, 2000).

Edward Jenner 1796 yılında aşı tekniğini, ilk defa çiçek hastalığına karşı geliştirmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nun 1900’lü yıllarda çiçek aşısını kullanarak başlattığı program ile de 1979 yılında çiçek hastalığı dünyadan silinmiştir. Günümüzde de enfeksiyon hastalıklarıyla mücadelede, örneğin kızamık, kızamıkçık, grip gibi hastalıkların yayılmasını engellemek için aşı politikaları uygulanmaktadır (Lederberg, 2000; Becker, 1989: 1).

Günümüzdeki ilk defa görülmeye başlayan enfeksiyon hastalıklar çeşitli mikroorganizmalar ve virüslerden kaynaklanabilmektedir. Yakın geçmişte adını duymaya başladığımız bazı enfeksiyonlara sebep olan virüslere örnek olarak Marburg virüs, norovirüs, Nipah virüs, Napa virüs, Powassan (POW) virüs, kuş gribi virüsü ve Batı Nil virüsü verilebilir (Turkington ve Ashby, 2017: xiv). Bu enfeksiyonların yeni ortaya çıkmasında farklı sebepler bulunmaktadır. Örneğin kuş gribinde, avian influenza virüsünün konakçısı hayvan olduğu bilindiği halde insanda da enfeksiyon oluşturduğu görülmüştür. Bir diğer örnekte de Batı Nil virüsünün normalde bulunduğu coğrafyanın dışında görülerek ensefalite sebep olmasıdır (Erdemir, Uysal, Akman ve Çırlak, 2011).

Yeni ortaya çıkan enfeksiyon hastalıklarının 1940’lı yıllardan bu yana (a) hastalık etmenlerine, (b) iletim tipine, (c) ilaç dirençliliğine ve (d) iletim moduna göre dağılımı Şekil 2.8’de verilmiştir. Yeni enfeksiyon hastalıklarına ilişkin vakalarda yer alan patojenlerin çoğunun bakteriler olduğu görülmektedir ve bu enfeksiyon vakalarının sayısı 1980’lerde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Şekil 2.8’e göre yeni ortaya çıkan enfeksiyonların etmeninin %60,3’ünün zoonotik patojenler (insan dışı, hayvan kaynaklı) olduğu bildirilmektedir. 2000’li yıllarda yeni ortaya çıkan enfeksiyon hastalıklarının ise %28,8’inin vektör kaynaklı olduğu görülmektedir. Özellikle 1990’lı yıllardan sonra meydana gelen iklim anormalliklerinin, çevresel koşullara duyarlı olan vektörler için

enfeksiyon hastalıklarını tetiklemiş olabileceği düşünülmektedir. Bunun dışında antibiyotik dirençli mikroorganizmalardan kaynaklı enfeksiyonlarda da yıllar içinde artış olduğu görülmektedir (Jones ve diğerleri, 2008).



Şekil 2.8. Enfeksiyon hastalıklarının 1940 - 2000 yılları arasındaki vaka sayıları (Jones ve diğerleri, 2008)

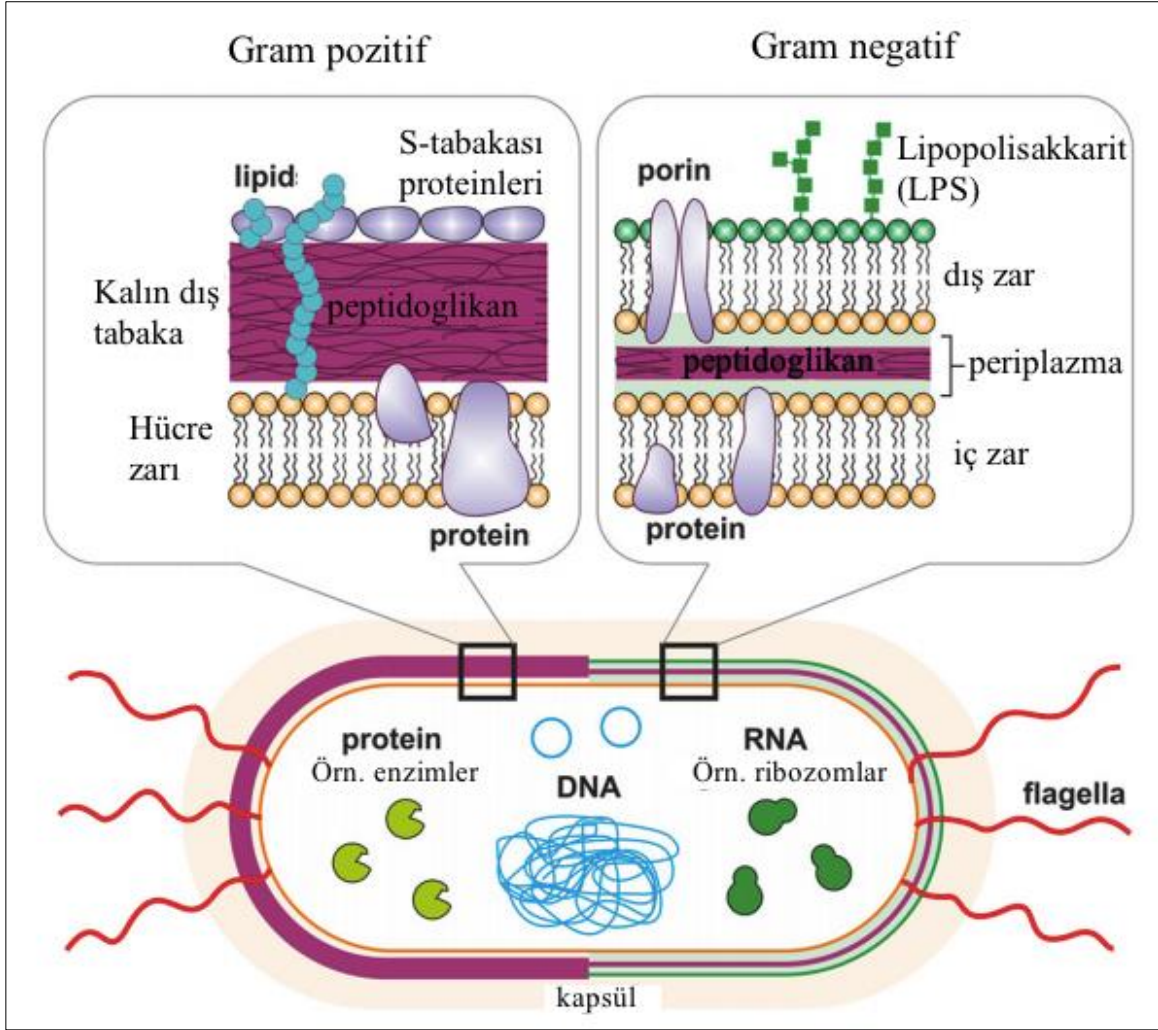
Ülkemizde de son dönemde görülen enfeksiyon hastalıkları salgınlarına baktığımızda 2002 yılı itibariyle Kırım-Kongo kanamalı ateşinin 10 000'in üzerinde, 2009 yılından sonra domuz gripinin 200 000'in üzerinde, norovirüsün ise 2016 yılı itibariyle 75 000'in üzerinde kişiyi etkilediği kaydedilmiştir (Ergönül, 2016).

2.6.1. Bakteriler

Bakteriler tek hücreli, dünya yüzeyinde hemen hemen tüm ortamlarda yaşayabilen mikroskopik canlılardır. Morfolojik olarak, zarlı bir çekirdek yapısı ve hücre içi organel bulundurmaması ile prokaryotik yaşam formuna sahiptir. Bakterilerin metabolik kapasiteleri de son derece çeşitlidir, her türlü organik bileşiği ve bazı inorganik bileşikleri besin maddesi olarak kullanabilmektedir (Rogers, 2011: 3-9).

Bakterilerin morfolojik ve metabolik özelliklerine ilişkin bilgilerin çoğu enfeksiyon etmeni olan patojen bakteriler üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bakteriler ökaryotik canlılara göre daha basit olmalarına rağmen büyüklükleri, şekilleri ve yaşam ortamıyla çeşitlilik göstermektedir. Şekil açısından bakteriler genel olarak üç formda bulunur; kok, çubuk ve kavisli (spiral, vibrio). Büyüklüklerine bakıldığında ise en küçük bakterinin 0,1 – 0,25 μm çap ölçüsüyle *Mycoplasma pneumonia* olduğu bilinmektedir. Bir kok bakterisinin (Örneğin *S. aureus*) ortalama çapı yaklaşık 1 μm 'dir, çubuk formdaki bir bakterinin (Örneğin *E. coli*) ise ortalama uzunluğu 2 μm , çapı 0,5 μm 'dir (Rogers, 2011: 3-9).

Bakteriler için en kullanışlı boyama reaksiyonu olan Gram boyama, 1884 yılında Hans Christian Gram tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde kullanılan iki boya ile birlikte bakteriler, hücre yüzeyi yapılarındaki farklılıktan dolayı farklı renklerde görünüm sergiler. Bu iki farklı morfolojiden dolayı bakteriler Gram pozitif ve Gram negatif olarak sınıflandırılır (Rogers, 2011: 3-9). Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı, lipid yapıdaki hücre zarını çevreleyen kalın bir peptidoglikan tabakası içerirken, Gram negatif bakteriler, iki hücre zarı arasına sıkıştırılmış çok daha ince bir peptidoglikan tabakasına sahiptir. Gram negatif bakterilerde dış hücre zarı, endotoksin olarak da bilinen lipopolisakkaritler (LPS)'nin yanı sıra porinler gibi proteinler içermektedir. Ayrıca her iki bakteri türünde de ortak olarak, iç zarlarında çeşitli proteinler bulunabilir ve flagellaya sahip olabilir. Gram pozitif ve negatif bakterilerin genel hücre yapısı Şekil 2.9'da gösterilmiştir (Ahmed, Rushworth, Hirst ve Millner, 2014).



Şekil 2.9. Gram pozitif ve Gram negatif bakteri yapısı (Ahmed ve diğerleri, 2014)

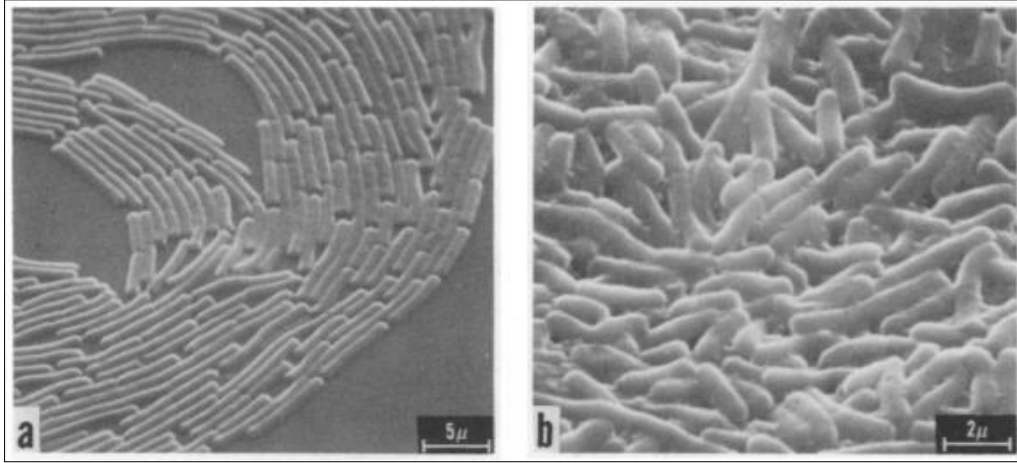
İnsanlar deride, ağızda ve bağırsaklarda bulunan çok sayıda bakteri ile yakın ilişki içinde yaşamaktadır. Bu canlıların bir kısmının insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Bağırsak florasında yaşayıp, patojenitesi olmayan ya da düşük patojeniteye sahip olan, besin takviyesi olarak alınıp bağırsak florasının dengesinin sağlanmasına yardımcı olan “probiyotik bakteriler” yararlı mikroorganizmalara örnek olarak verilebilir (Alvarez-Olmos ve Oberhelman, 2001). Ayrıca topraktaki azot döngüsünün sağlanmasında, ölü bitki ve hayvanların yıkımında, süt ürünleri gibi çeşitli gıda ürünlerinin ve deri üretimi gibi çeşitli sanayi ürünlerinin eldesinde kullanılmaktadır (Turkington ve Ashby, 2017: 27). Ancak bakteriler tarih boyunca insan sağlığını etkileyen enfeksiyonların büyük bir kısmından da sorumlu olmuştur. Bu enfeksiyonlar fırsatçı patojen ya da patojen bakterilerden kaynaklanmaktadır (Aminov, 2017) ve bu tez çalışmasında da kullanılan bazı patojen bakteriler ve mayalarla ilgili aşağıda bilgi verilmiştir.

Bacillus cereus

Gram pozitif, çubuk formunda, farklı sıcaklıklarda ve farklı pH'da büyüeyebilen ve spor oluşturabilen bir bakteridir (El-Arabi ve Griffiths, 2013). Genellikle 3-8 mm çapında, büyük, gri koloniler oluştururlar (Marrollo, 2016: 6). *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* ve *B. thuringiensis* türlerine benzerlik gösteren bu bakteri, doğal olarak toprakta bulunduğundan sebze, süt ve et ürünlerinden sıklıkla izole edilebilir. Aerobik ya da anaerobik ortamda, genellikle 10-50 °C arasında ürerken, bazı suşları buzdolabında da üreyebilir ki bu durum yiyeceklerin raf ömrü ve korunması konusunda endişe oluşturur. İnsanda, kusma tipinde veya ishal tipinde gıda zehirlenmesine sebep olabilir.

B. cereus'un gıda kaynaklı salgınlarından sorumlu üç tip enterotoksin tanımlanmıştır. Bu enterotoksinlerden ikisi üç bileşenli bir proteinken, diğeri tek bileşenli CytK olarak isimlendirilen bir proteindir (Granum, 2005: 409, 415). Bunun dışında katalaz, hemoliz enzim aktiviteleri gösterir ve lizozime karşı dirençlidir (Pontieri, 2016: 17).

B. cereus'un koloni çeperinden (a) ve koloni merkezinden taramalı elektron mikroskobu ile çekilen görüntüleri Resim 2.1'de verilmiştir (Afrikian, St Julian ve Bulla, 1973).

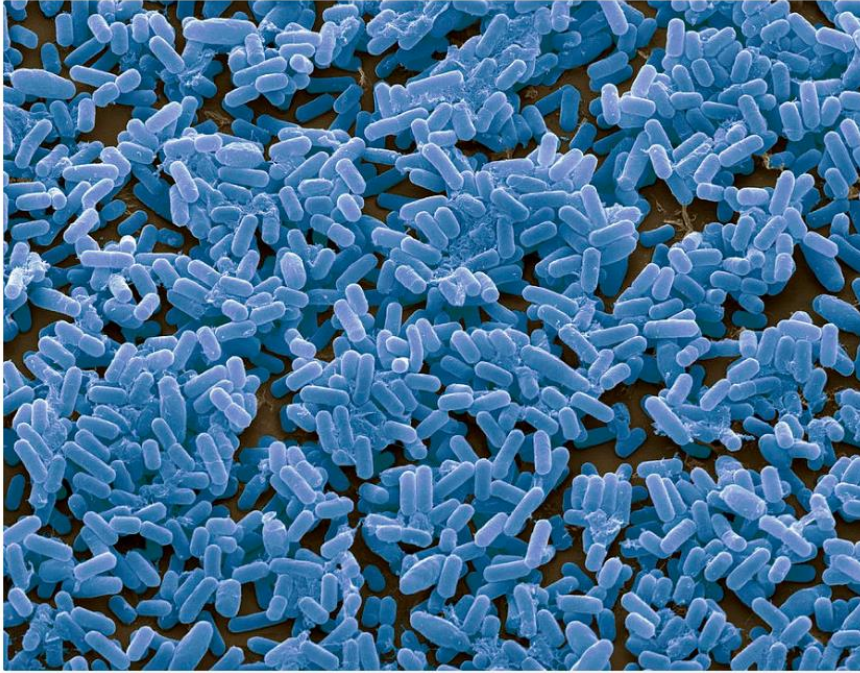


Resim 2.1. *B. cereus* elektron mikroskobu görüntüleri (Afrikian ve diğerleri, 1973)

Çoğu *B. cereus* suşu β -laktamaz üretmesi sebebiyle penisilin ve sefalosporinlere karşı direnç gösterir. Bunun dışında karbapenem, makrolid ve tetrasiklinlere karşı duyarsız olduğu bilinmektedir. *B. cereus* enfeksiyonlarının tedavisinde en çok tercih edilen antibiyotik vankomisindir. *B. cereus* kaynaklı yara enfeksiyonlarında da siprofloksasinin kullanımının uygun olduğu belirtilmiştir (Marrollo, 2016: 6-8).

Bacillus subtilis

Gram pozitif ve çubuk formunda olan bu bakteri türü zorunlu aerobik ya da fakültatif anaerobiktir. *B. subtilis*, kolayca topraktan izole edilebilen, özellikleri en iyi tanımlanmış bakterilerdendir. Endüstride, proteaz başta olmak üzere pek çok enzimin üretimi için kullanılmaktadır. Zorlu çevre koşullarına dayanıklı endospor formu mevcuttur ve bu sporülasyon evresindeki metabolik değişiklikler sayesinde proteaz ve α -amilaz gibi ticari açıdan önemli proteinleri sentezler. Rekombinant DNA teknolojisi başta olmak üzere moleküler biyoloji ve fizyoloji çalışmalarında model organizma olarak kullanımı uygundur ve *E. coli*'den sonra tüm nükleotid dizisi tanımlanan ikinci canlı organizmadır. (Harwood, 1989; Pant, 2015; Granum, 2017: v). *B. subtilis*'in renklendirilmiş taramalı elektron mikroskobu görüntüsü Resim 2.2'de gösterilmiştir.



Resim 2.2. *B. subtilis* elektron mikroskobu görüntüleri (URL-1, 2019)

B. subtilis suşlarının insanlarda kontakt lensler ile göz enfeksiyonu oluşturduğu ve bazı gıda zehirlenmesi vakalarına sebep olduğu bilinmektedir (De Boer Sietske, 1991).

B. subtilis ve diğer spor oluşturan *Bacillus* türleri probiyotik ve profilaktik olarak kullanılabilir. Ayrıca *B. subtilis* suşları aşı antijenleri ve bazı insan proteinlerinin üretimi için elverişlidir. *B. subtilis* tarafından üretilen proteinler Çizelge 2.2'de verilmiştir. *B. subtilis* subtilin antibiyotiğinin üretiminde, büyüme hormonu, interferon,

proinsülin, doku plazminojen aktivatoru üretiminde, çeşitli mikroorganizmalara karşı geliştirilen aşı antijenlerinde, örneğin pnömolisin, P1, ompP2 üretiminde kullanılmaktadır. Bunun dışında çeşitli vitaminlerin (Örneğin biyotin, tiamin, folik asit) ve yararlı kimyasalların üretiminde de kullanılabileceği gösterilmiş, ancak bunlar ticarileşmemiştir (Zeigler ve Perkins, 2008: 319-321).

Çizelge 2.2. *B. subtilis* tarafından üretilen protein örnekleri (Zeigler ve Perkins, 2008: 321)

Sınıf	Protein
Aşı antijenleri	Pnömolisin (<i>Streptococcus pneumoniae</i> için)
	P1 (<i>Neisseria meningitides</i> için)
	OmpP2 (<i>Haemophilus influenzae</i> için)
	PT alt üniteleri (<i>Bordetella pertussis</i> için)
İnsan proteinleri	Proinsülin
	Büyüme hormonu
	İnterferon
	Doku plazminojen aktivatoru
Antibiyotik	Subtilin

Enterococcus faecalis

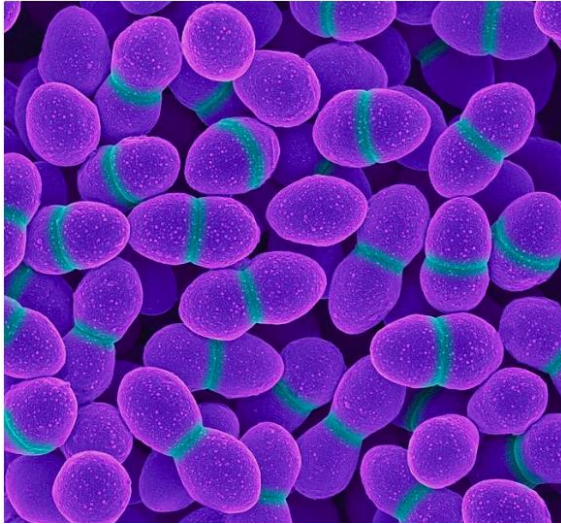
Gram pozitif, oval şekilde ve fakültatif anaerobik olan bu bakteri tek, çiftler halinde veya kısa, uzun zincirler oluşturacak şekilde bulunabilir. İnsan bağırsağı, ağız boşluğu ve vajina kanalının doğal florasında bulunmaktadır. *E. faecalis* insan enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ından sorumludur. Enterokoklar insanda çeşitli enfeksiyonlara sebep olur ancak yaygın olarak karşılaşılan enfeksiyonlara örnek olarak idrar yolları, kan dolaşımı, endokardiyum, safra yolları, yanık yaraları ve kök kanal sistemi verilebilir. Önemli virülans faktörleri arasında, jelatinaz, serin proteinaz enzimleri, enterokokal yüzey proteini (Esp) ile feromona duyarlı plazmitler tarafından kodlanan sitolizin/hemolizin toksini bulunmaktadır. Sitolizin toksini pro-inflamatuvar özelliktedir ve diğer Gram pozitif bakterilere karşı da bakteriosin etki göstermektedir (Love, 2001; Fischetti ve Ryan, 2008: 303-304; Arias ve Murray, 2015: 2329-2320).

E. faecalis suşlarının %50-65'i bir çeşit hücre dışı metalloendopeptidaz olan coccolizin enzimini üretir ve bu enzim bir vazoaktif peptid olan endotelinin inaktivasyonunda rol oynar. Bir diğer virülans faktörü ise lipoteikoik asittir ve tümör nekroz faktörü (TNF) ile

interferonun üretimini azaltarak bağışıklık yanıtının düzenlenmesine etki eder (Winn ve diğerleri, 2006: 701).

E. faecalis kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için kombinasyon antibiyotik tedavisi ve genellikle ampisilin ile birlikte seftriakson tercih edilmektedir. Ancak seftriaksonun vankomisine dirençli enterokokların kolonileşmesini teşvik etmesi sebebiyle bu tedavi yöntemi de çok güvenilir görünmemektedir ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirmesi gerekmektedir. *E. faecalis* suşlarının vankomisin dirençliliğinin altı farklı fenotipi bulunmaktadır; VanA, VanB, VanC, VanD, VanE ve VanG. Antibiyotik dirençli *E. faecalis* suşları süt ve et ürünlerinde bulunabilmektedir (Beganovic ve diğerleri, 2018; Taban, Dogan Halkman ve Halkman, 2014: 655). *E. faecalis* suşlarının %28'i kloramfenikole, %99'u ise ciprofloksasine karşı direnç gösterir (Fischetti ve Ryan, 2008: 303-304).

E. faecalis'in 3 000X büyütülmüş, renklendirilmiş taramalı elektron mikroskobu görüntüsü Resim 2.3'te gösterilmiştir.



Resim 2.3. *E. faecalis* taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (URL-2, 2019).

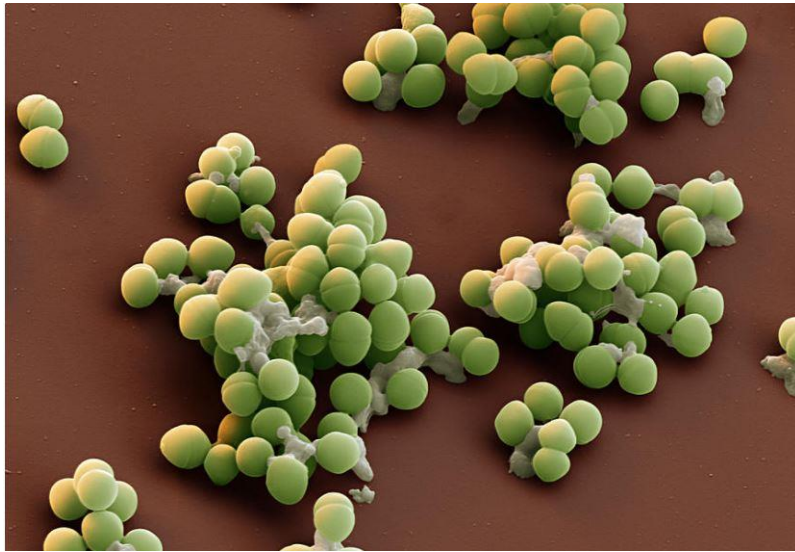
Enterococcus hirae

Gram pozitif ve oval yapıdadır, kutup oluşturarak bölünür ve çoğalır (Koch, 1995: 20).

Bu enterokok türünün çeşitli hayvanlarda (özellikle fare ve kuşlar) enfeksiyona sebep olduğu bilinmekle birlikte, insanlarda da enfeksiyona sebep olduğuna ilişkin nadir de olsa

vakalar bulunmaktadır. Oluşturduğu enfeksiyonlarda hücre duvarı yapısında bulunan peptidoglikan ile lipoteioik asit enflamatuvar yanıt oluşmasını uyarmaktadır. Aynı zamanda kapsül yapısı, sitolizin enzimi ve süperoksit oluşturması da enflamatuvar oluşumunu tetikler. Tavuklarda büyüme depresyonu olarak bilinen bir hastalığa sebep olur. Ayrıca kedi, köpek, at, sığır ve domuz yavrularında ishale sebep olduğu bilinmektedir ve *E. hirae* suşlarının sebep olduğu ishale ilgili tedavi seçenekleri henüz tanımlanmamıştır. İnsanda sebep olduğu enfeksiyonlara bakıldığında ise, doğal kapakçık endokarditine ve son dönem böbrek yetmezliği hastalarında diyalize bağlı septisemiye sebep olabildiği gösterilmiştir. *E. hirae* ATCC 8043 suşunun karmaşık bir beslenme gereksinimi bulunmaktadır ve gıda endüstrisinde vitamin, amino asitler için biyoassay organizması olarak kullanılmaktadır (Gilad ve diğerleri, 1998; Poyart ve diğerleri, 2002; Stewart, 2013: 200-201; Winn ve diğerleri, 2006: 702).

E. hirae bakterilerinin 10 000X büyütmedeki renklendirilmiş taramalı elekton mikroskobu görüntüsü Resim 2.4'te verilmiştir (URL-3, 2019).



Resim 2.4. *E. hirae* bakterilerinin elektron mikroskobu görüntüsü (URL-3, 2019)

Staphylococcus aureus

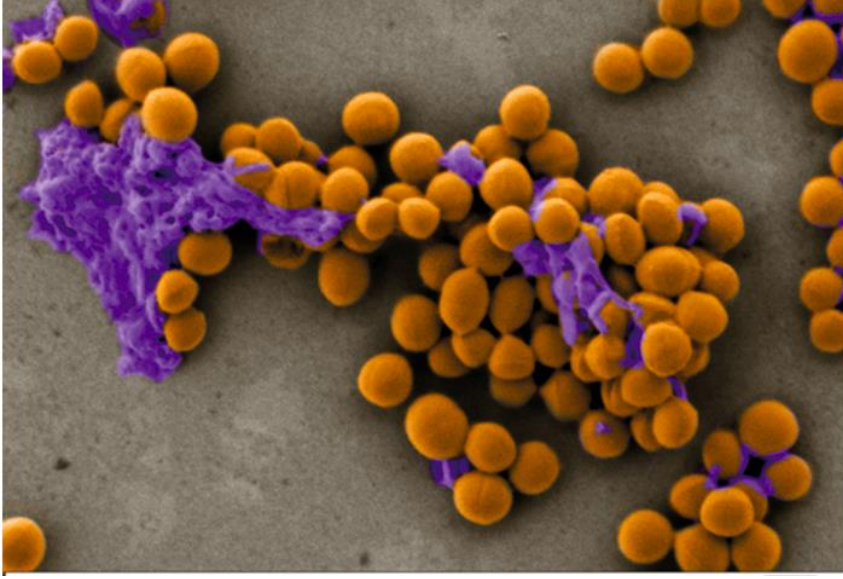
Stafilokoklar içerisinde klinik açıdan büyük öneme sahip, Gram pozitif ve oval formda bir türdür. Mannitolü anaerobik olarak fermente eder, katalaz ve koagülaz pozitifdir, sarı pigmentli koloniler oluşturur (Yousef ve Carlstrom, 2003: 121). Dolaşım sistemi

enfeksiyonlarından cilt enfeksiyonlarına, farklı sistemler üzerinde ciddi ya da hafif enfeksiyonlara sebep olabilmektedir (Monson, 2011: 316-329).

S. aureus bakterisinin sebep olduğu bakteriyemi (septisemi), yüksek ölüm oranına sahip yaygın bir hastalıktır (Jenkins, Price, Sabel, Mehler ve Burman, 2008). İnsanda nazofarenks başta olmak üzere deri, vajina ve bağırsak sistemi florasında bulunur. Ayrıca önemli bir gıda kaynaklı enfeksiyon etmenidir. Bu bakteriler hücre duvarı yapısındaki peptidoglikana kovalent olarak bağlanan teikoik asit üretirler. Yüksek şarjlı bu hücre duvarı yapısı, bakterilerin cansız yüzeylerde ve burunda kolonileşmesine yardımcı olur. Virülans etmenleri ve genleri arasında koagülaz enzim aktivitesi (*coa*), topaklanma faktörleri (*clfA* ve *clfB*), ekstraselüler matriks bağlanma proteinleri, fibronektin bağlanma protein A (*fnbA*), α -hemolizin (*hla*), lipaz (*lip*), protein A (*spa*), von Willebrand faktör-bağlayıcı protein (*vWbp*) ve fenol çözücü moleküller (*psms* genleri) bulunur. Bunların dışında konakçı hücrelerin zarına doğrudan zarar verebilen toksinler (örneğin Toksik şok sendromu toksini) ve süperantijenler üretebilmektedir. Böylece fagositik aktiviteyi baskılayarak konakçının bağışıklık sistemine karşı koyabilmekte ve kolonileşebilmektedir (Becker, 2018: 14-24; Hu, Wang, Fang, Okamura ve Ono, 2018: 39).

S. aureus, günümüzde pek çok antimikrobiyal ajana karşı direnç göstermesi sebebiyle de dikkat çekmektedir. *S. aureus* izolatlarının çoğunluğu günümüzde β -laktamaz enzim aktivitesiyle penisiline karşı direnç göstermektedir. *S. aureus* suşlarının β -laktamlara karşı dirençliliğini sağlayan iki mekanizma bulunmaktadır; birincisi *blaZ* geni tarafından kodlanan β -laktamaz enzim aktivitesidir ve isoksazolil-penisilin dışındaki penisilinlere dirençliliği sağlar, ikincisi ise *mecA* ve *mecC* gen aktiviteleri ile üretilen alternatif penisilin-bağlanma proteini ile hedef bölge değişiminin sağlanmasıdır ve tüm penisilin türlerine karşı dirençliliği sağlar. *S. aureus* bunun yanında tetrasiklinler, makrolidler, aminoglikozitler, metisilin gibi pek çok ajana karşı da direnç gösterebilmektedir (Febler, Li, Kadlec, Wang ve Schwarz, 2018: 57-58; Monson, 2011: 316-329).

1 μ m ölçekteki renklendirilmiş taramalı elektron mikroskobu görüntüsünde, sarı-turuncu renkli kok biçimindeki hücreler *S. aureus* bakterilerini, mor boyalı alanlar ise ekzopolisakkariti göstermektedir (Resim 2.5) (URL-4, 2019).



Resim 2.5. *S. aureus*'un taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (URL-4, 2019)

Escherichia coli

Çubuk şeklinde, Gram negatif bir bakteridir, spor oluşturmaz ve genellikle bir kapsül ya da mikrokapsül bulundurur. Fermentasyon ve solunum metabolizmasına sahip fakültatif anaerobik bakterilerdir. Optimum 37 °C'de ve çok çeşitli kültür besiyerlerinde ya da sentetik besiyerlerinde büyüebilir, katı besiyerlerindeki kolonileri pigmentsizdir. Bazı suşları polisakkarit slime üretir. Hücre duvarında yer alan LPS somatik antijenleri, H kirpik antijenleri, F fimbria antijenleri ve kapsül oluşturan suşlarda bulunan K antijenleri ile serotiplendirilmesi yapılabilir (Bedir, 2016; Sussman, 1997: 1-10).

Patojenik olan *E. coli* suşları çok sayıdaki virülans faktörü (toksinler, sideroforlar, adhezin yapıları vb.) ile bağırsak ve ekstraintestinal sistem rahatsızlıklarına sebep olmaktadır. (Johnson, 2002: 57). *E. coli* insan bağırsak florasında doğal olarak bulunur ve önemli bir pıhtılaşma faktörü olan K₂ vitamininin sentezinde rol alır (Reygaert, 2017: 82). Ancak, üropatojenik *E. coli* suşları bağırsakta herhangi bir tehdit oluşturmazken idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. Örneğin hemolitik üremik sendromun korkulan ajanıdır. K antijeni oluşturan türlerden *E. coli* O157:H7 suşu, ürettiği shigatoksinler ile hemorajik kolite sebep olabilmektedir. Vero sitotoksin üreten *E. coli* türleri de benzer şekilde ishal ve hemorajik kolit oluşturmaktadır. Enteroagregatif olan *E. coli* türleri ise fimbriaları ile bağırsaklarda mikrovilluslara tutunarak ve ısıya dayanıklı enterotoksinleri sayesinde mukus artışına ve biyofilm oluşumuna sebep olur. Bu şekilde nihayetinde kansız

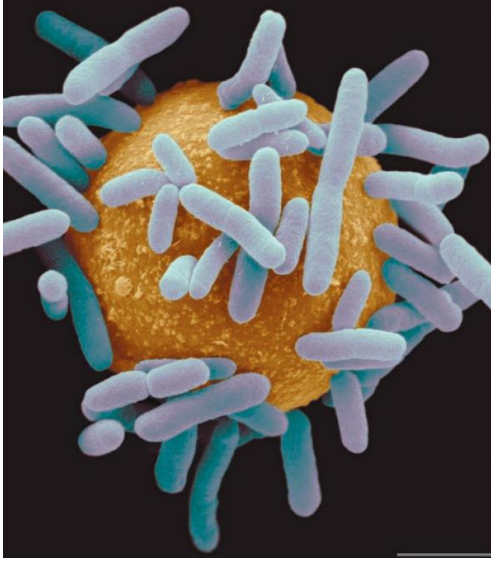
ishal meydana getirebilir. Bunun dışında *E. coli* türlerinin yaygın bir şekilde açık yaralardan septisemiye yol açtığı, nadir de olsa kalbin iç astarında kolonileşerek endokardit oluşumuna ve yeni doğanlarda menenjitte neden olduğu bilinmektedir (Sahl, Morris ve Rasko, 2013: 21-35; Johnson ve Russo, 2002; Sussman, 1997: 15, 24; Reygaert, 2017: 81-86).

Pekçok *E. coli* suşu β -laktamaz aktivitesi sebebiyle penisilin ve sefalosporinlere karşı direnç gösterir ve antibiyotiklere dirençli olan *E. coli* suşlarının da giderek yaygınlaştığı bilinmektedir (Bedir, 2016). Özellikle klinik araştırmacılar karbapenem dirençli *E. coli* suşlarının yaygınlaşmasından endişelenmektedir. *E. coli* suşlarında bulunan direnç genlerine örnekler, Çizelge 2.3’de verilmiştir. *E. coli* bakterilerinin kromozomal DNA’larında bulunan *ampC*, *amrA*, *ompF* vb. genlerin yanında, plazmitlerinde bulunan *bla*, *aac*, *ant*, *aph*, *tetA*, *tetB* genleri de farklı mekanizmalarda antimikrobiyallere karşı direnç oluşturmaya sebep olur (Reygaert, 2017: 87).

Çizelge 2.3. *E. coli* suşlarında bulunan direnç genleri ve mekanizmaları (Reygaert, 2017: 87)

Gen	Antimikrobiyal ajan	Direnç mekanizması
<i>ampC</i> , plazmitteki <i>bla</i> genleri	β -laktamlar, penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar	β -laktamaz enzim aktivitesi, Aktif pompalama
Plazmitteki <i>aac</i> , <i>ant</i> , <i>aph</i> <i>amrA</i> , <i>mdtEF (tolC)</i>	Aminoglikozitler, gentamisin, tobramisin	Aminoglikozit modifiye enzimler, Hedefin değişimi (16S rRNA) Aktif pompalama
<i>ompF</i> , plazmitteki <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	Tetrasiklinler	Sınırlı alım, Aktif pompalama
<i>ompF</i> , <i>acrAB (tolC)</i>	Kloramfenikol	Sınırlı alım, Aktif pompalama
<i>ompF</i> <i>gyrA</i> <i>parC</i> <i>acrAB (tolC)</i>	Florokinolonlar, siprofloksasin, norfloksasin	Sınırlı alım, Hedefin değişimi (DNA giraz) Hedefin değişimi (topoizomera IV) Aktif pompalama
TMP- <i>dhfr</i> SXT- <i>dhps</i>	Metabolik yolak inhibitörleri, Trimetoprim- Sulfametoksazol	Hedef enzim modifikasyonu

E. coli'nin DNA dizisinin tamamı aydınlatılmış ve 1997 yılında yayınlanmıştır (Lukjancenko, 2010). *E. coli* bakterisinin (mavi renkli, çubuk formu) renklendirilmiş taramalı elektron mikroskobu görüntüsü Resim 2.6'da verilmiştir (Kaláb, Yang ve Chabot, 2008).



Resim 2.6. *E. coli*'nin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Kaláb ve diğerleri, 2008)

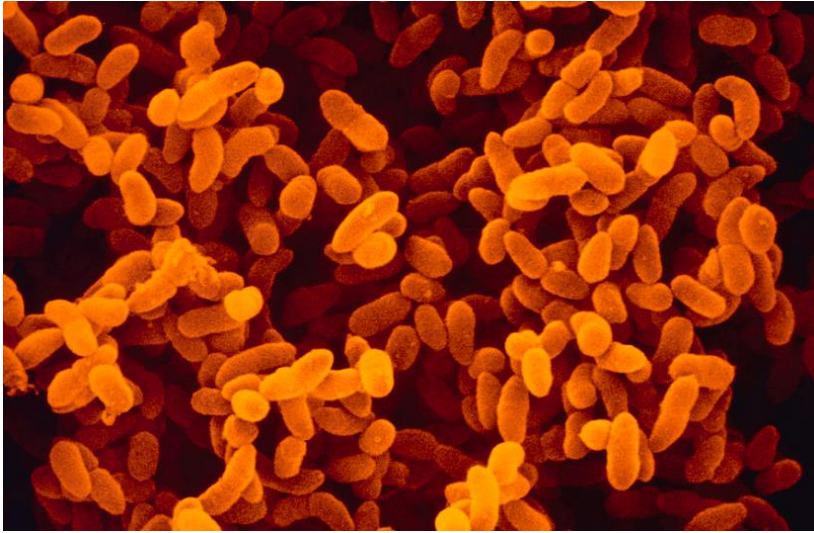
Klebsiella pneumoniae

Gram negatif, çubuk şekilli, insan bağırsak ve solunum kanallarının florasında bulunan, enterobakterlerdendir. Fırsatçı patojen olduğundan, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde veya hastane ortamındaki hastalarda septisemiye ve pnömoniye sebep olabilir (Acton, 2013: 37). Laktozu fermente edebilmektedir ve optimum 37 °C'de büyüebilmektedir. Kanlı agarda büyük, beyaz-gri renkli, ıslak mukoid koloniler oluştururken, MacConkey agarda pembe, sümüksü koloniler şeklinde büyür. Oksidaz negatiftir (Hostetler, 2013: 595)

K. pneumoniae uzun süre toplum kökenli pnömoninin olası bir nedeni olarak kabul edilmesine rağmen günümüzde Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'da toplum kökenli pnömoninin nadir rastlanan etkenlerindendir (Yu ve diğerleri, 2007). Ancak bakım gören hastalarda en sık karşılaşılan pnömoni sebeplerindendir. Bunun yanında sıklıkla idrar yolu enfeksiyonları ile karaciğer apsesine yol açmaktadır. *K. pneumoniae* penisilin özellikli β -laktamaz aktivitesi nedeniyle doğal olarak ampisiline karşı dirençlidir (Finkelstein, 2012: 37). Ayrıca geniş spektrumlu antibiyotiklere ve karpenemlere karşı direnç mekanizmaları geliştiren bir bakteridir (Gasink, Edelstein, Lautenbach, Synnestvedt ve Fishman, 2009).

K. pneumoniae suşlarının virülans faktörlerinin başında, mukoid koloni oluşumunu sağlayan polisakkarit kapsülü (Örneğin K1 ve K2) gelmektedir. Kapsül yapısı bakteriyi bağışıklık sistemi mekanizmalarından (fagositoz, liziz vb.) korur. Bunun dışında konak hücreye yapışmasını sağlayan tip 1 pili gibi çeşitli fimbrial tipler üretebilmektedir. Diğer enterobakterlere benzer şekilde hücre duvarı yapısı, endotoksinleri, ekzotoksinleri de virülans faktörleri arasında yer almaktadır (Donnenberg, 2015: 251; Moxley, 2013: 74).

K. pneumoniae bakterisinin 35 mm’de 1 970X büyütmeyle çekilen taramalı elektron mikroskobu görüntüsü Resim 2.7’de verilmiştir.



Resim 2.7. *K. pneumoniae* elektron mikroskobu görüntüsü (URL-5, 2019)

Proteus vulgaris

Enterobacteriaceae familyası ile ilişkili, Gram negatif, çubuk şekilli bir bakteridir (Donnenberg, 2015: 2516). Kapsülü bulunmaz, laktozu fermente etmezken maltozu ve sükrozu fermente edebilmektedir (Parija, 2009: 274-276). İndol pozitifdir. Sıcaklığa karşı duyarlıdır, 1 saat 55 °C nemli ısıda ve genel dezenfektanlarla öldürülebilir. Çok sayıda izolatın olduğu bir kültürde tanımlaması, O antijenleri ve H antijenleri kullanılarak yapılabilir (Kushwaha, Babu ve Juneja, 2014: 238-242). *P. vulgaris*’in renklendirilmiş taramalı elektron mikroskobu görüntüsü 17 000X büyütme ile Resim 2.8’de gösterilmiştir (URL-6, 2019).



Resim 2.8. *P. vulgaris* elektron mikroskobu görüntüsü (URL-6, 2019)

P. vulgaris, doğal olarak toprak ve kirli sularda yayılım gösterir ve insan bağırsak florasında bulunur. Önemli bir fırsatçı patojendir, özellikle hastane ortamında, yaşlı hatalarda, psikiyatrik ve felçli hastalarda, yoğun bakımda tedavi gören kişilerde, genel olarak bağışıklık sistemi baskılanmış olan kişilerde enfeksiyon oluşturur. Fimbria, filagella bulundurması ve üreaz, IgA proteaz, amino asit deaminaz, hemolizin, endotoksin aktivitelerine sahip olması önemli virülans faktörlerindendir ve bu faktörler aracılığıyla özellikle idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olabilmektedir. Ancak bunlar dışında solunum yolu, deri, göz, kulak, burun, boğaz ve kontamine etler yoluyla bağırsak enfeksiyonlarına yol açtığı bilinmektedir. Aynı zamanda yığın halinde koloni oluşturması da, sebep olduğu enfeksiyonlarda rol oynamaktadır (Rozalski, Sidorczyk, ve Kotelko, 1997).

P. vulgaris, yara enfeksiyonları gibi hastane kaynaklı enfeksiyonlara da sebep olmaktadır. Genel olarak enfeksiyonlarının ilk aşaması bakterinin fimbriyasıyla konakçı hücrelere tutunmasıyla başlar. Üroepitelyal hücrelere tutunmayla birlikte interlökin-6 ve interlökin-8 salınımı uyarılır, epitelyal hücrelerin apoptoza gitmesine neden olur (Parija, 2009: 274-276).

Pseudomonas aeruginosa

Hastane enfeksiyonlarının önemli etmenlerinden olan Gram negatif, çubuk şekilli, fırsatçı patojen bir bakteridir. Aerobik mikroorganizmalardır, glikozu fermente etmezler. Hareketlidir ve beslenme gereksinimleri açısından çok yönlüdür. Optimum olarak 37 °C’de

büyümelerine rağmen, farklı sıcaklıklarda da (Örneğin 42 °C’de) büyüebildiği tespit edilmiştir. Çok farklı çevre koşullarında, toprak ve suda, hayvan, bitki ve insan konakçılarında büyüyeabilmektedir. En güncel antibiyotiklere bile direnç göstermesi sebebiyle klinik açısından önemli bir patojendir (Hancock ve Speert, 2000; Arai, 2011; Pham ve diğerleri, 2015; Gandhi, Baum, Hare ve Caughey, 2004: 35-36). *P. aeruginosa* farklı besiyerlerinde büyüyeabilmektedir. Kanlı agarda büyüdüğünde karakteristik bir görünüm sergiler; çevresel yayılan, metalik parlaklıkta, büyük gri koloniler oluşturur ve β -hemoliziz aktivitesi gösterir. MacConkey besiyerinde ise yeşil pigmentli ya da metal parlaklığında koloniler oluşturur. Oksidaz pozitifdir (Winn ve diğerleri, 2006: 319-320).

P. aeruginosa, sağlıklı konakta nadiren akciğer enfeksiyonlarına sebep olsa da kistik fibrozis gibi bağışıklık sistemi zayıflamış olan hastalarda önemli bir pnömoni etkenidir. Solunum enfeksiyonları dışında idrar yolu, deri ve yumuşak doku, kulak, göz, kemik ve eklem enfeksiyonlarına, menenjitte ve beyin apsesine sebep olduğu ortaya konulmuştur (Gandhi ve diğerleri, 2004: 35-36). Bilinen virülans faktörleri Çizelge 2.4’de verilmiştir. Virülans faktörleri arasında, epitelyal reseptörlere bağlanmayı sağlayan adhezin molekülleri (pili, nöraminidaz, aljinat), eksoenzimler (proteaz, fosfolipaz C, elastaz, hemolizin ve DNaz), bağışıklık yanıtına etki eden lökositin, oksidatif strese sebep olan piyosyanin ve konakta kolonize olup yayılmasını sağlayan ekzotoksin A bulunur. Ayrıca ekstrasellüler polisakkarit üreterek biyofilm oluşturur (Tang ve diğerleri, 1996; Molinari, Guzman, Pesce ve Schito, 1993; Winn ve diğerleri, 2006: 319-320).

Çizelge 2.4. *P. aeruginosa* bakterisinin virülans faktörleri (Winn ve diğerleri, 2006: 319-320)

Virülans faktör	Biyolojik etkisi
Pili	Konakçıdaki epitel hücre yüzeyinde bulunan GM-1 gangliyosit reseptörlerine tutunmayı sağlar.
Nöraminidaz	Pilin tutunumunu kolaylaştırmak için GM-1 gangliyosit reseptörlerindeki siyalik asit kalıntılarını temizler.
Aljinat	Konakçının akciğer epitel hücrelerine yapışmasını ve biyofilm oluşturmalarını sağlayan polisakkarit kapsüldür. Ayrıca antibiyotiklere ve bağışıklık sistemine karşı korunmayı sağlar.
Lipopolisakkarit	Endotoksin üreterek sepsise sebep olur.

Çizelge 2.4. (devam) *P. aeruginosa* bakterisinin virülans faktörleri (Winn ve diğerleri, 2006: 319-320)

Virülans faktör	Biyolojik etkisi
Ekzotoksin A	Doku yıkımı ve protein sentezinin inhibe edilmesinde rol oynar, makrofaj aktivitesini bozar.
Enterotoksin	Gastrointestinal aktiviteyi bozarak ishale sebep olur.
Ekzoenzim S	Protein sentezini inhibe eder.
Fosfolipaz C	Sitoplazmik zarı parçalar.
Elastaz	İmmünoglobülinleri parçalar, nötrofil aktivitesini bozar.
Lökositin	Nötrofil ve lenfosit aktivitesini bozar.
Piyosiyenin	Solunum sistemi aktivitesini bozar, dokularda oksidatif strese sebep olur ve diğer bakterileri baskılar.

P. aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotik sınıflarına örnek olarak aminoglikozitler (Örneğin gentamisin), florokinolonlar, antipsödomonal penisilinler (Örneğin tikarsilin), üçüncü ve dördüncü nesil sefalosporinler (Örneğin seftazidim) ve aztreonam (monobaktam) verilebilir.

P. aeruginosa bakterisinin 10 cm genişliğindeki alanda 4 950X büyütmeyle alınan taramalı elektron mikroskobu görüntüsü Resim 2.9’da verilmiştir (URL-7, 2019).



Resim 2.9. *P. aeruginosa* bakterisinin elektron mikroskobu görüntüsü (URL-7, 2019)

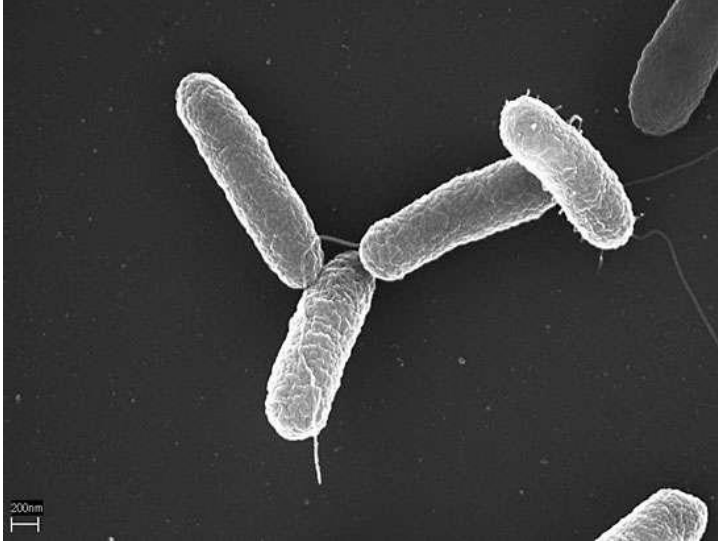
Salmonella typhimurium

Bu serotipin tam ismi *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium olarak tanımlanmıştır (Alakomi ve Saarela, 2009). Gram negatif, çubuk şekilli, fakültatif anaerobik olan *Salmonella* türleri, kontamine gıdalarla bulaşması durumunda ciddi karın ağrısı, ishal ve ateşle seyreden bağırsak enfeksiyonlarına neden olur (Malorny ve diğerleri, 2009).

Salmonella typhimurium olumsuz koşullar altında çeşitli stres proteinleri üretir. Örneğin oldukça düşük pH ortamında (pH 4-5) asit tolerans yanıtı (ATR) oluşturur (Moxley, 2013: 75-78). Bağırsakta kolonileşmesini sağlayacak tip 1 fimbria gibi yüzey yapıları üretmektedir (Curtiss ve diğerleri, 2012: 192). Bunun için en az 13 fimbrial operon kodladığı keşfedilmiştir; *agf*, *fim*, *pef*, *lpf*, *bcf*, *saf*, *stb*, *stc*, *std*, *sth*, *sti* ve *stj*. Bu genlerden *pef* virülans plazmiti (pSLT) üzerinde yer alır. Bu fimbrialar sayesinde bağırsaktaki mukozal epitelyal hücrelere tutunabilir. Fimbrial adhezinler bağıl hidrofobik yapıdadır ve bu özellikleri nedeniyle fagositik hücrelerin zarlarıyla da ilişki kurabilir. Adhezinler, mikroorganizmalar mukozal yüzeyde bulunduğunda virülans etki gösterirler. Bunların dışında diğer virülans faktörleri arasında enterotoksinler, sideroforlar (Örneğin glikozillenmiş enterobaktin türevi olan salmochelin) bulunmaktadır (Moxley, 2013: 75-78).

Zoonotik olan suşlarının ampisilin, kloramfenikol, streptomisin ve tetrasikline karşı direnç gösterdiği bilinmektedir (Mølbak ve diğerleri, 1999). *S. typhimurium* suşlarındaki belirli faj tipleri (Örneğin DT104), çoklu antimikrobiyal direnç oluşumunu sağlayan genomik adalar bulundurmaktadır (Prescott, 2013: 42).

S. typhimurium'un 200 nm ölçekte çekilmiş elektron mikroskobu görüntüsü Resim 2.10'da verilmiştir (Brinkmann, 2005).



Resim 2.10. *S. typhimurium*'un elektron mikroskobu görüntüsü (Brinkmann, 2005)

2.6.2. Mayalar

Mayalar, bakterilere benzer şekilde üretilen, değiştirilen ve tüm genom dizi analizi yapılmış olan ökaryotik canlılardır. Özellikle ökaryotik proteinlere yönelik çalışmalarda bakterilere kıyasla daha kullanışlı olmasıyla klonlama çalışmalarında tercih edilebilmektedir. Tarihsel süreç içinde ise ekmek yapımından, aşı ve ilaç üretimine kadar pek çok alanda kullanılmaktadır (Klug, Cummings ve Spencer, 2006/2011).

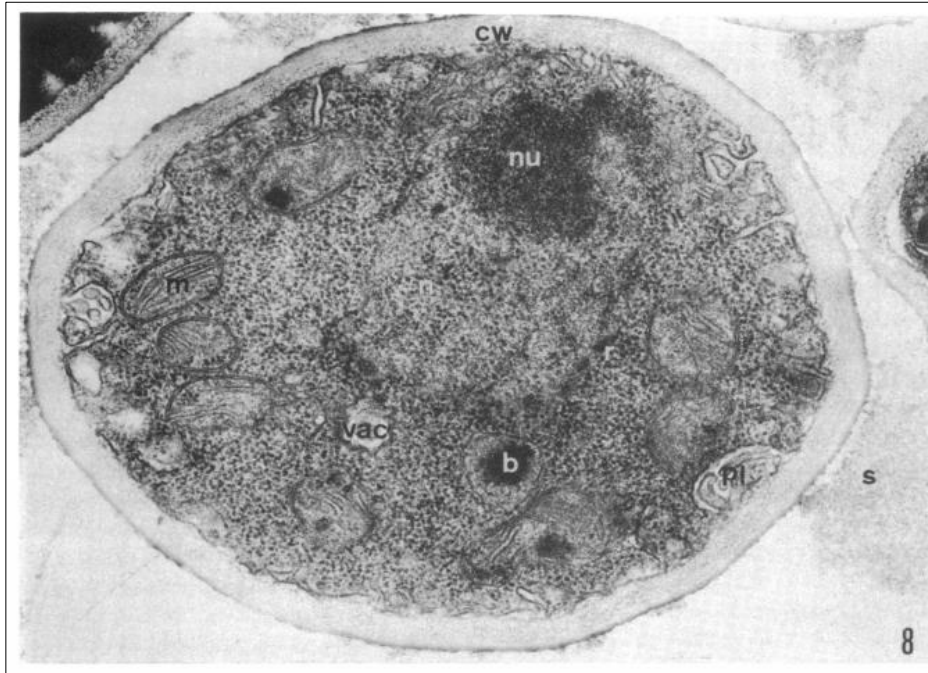
Maya enfeksiyonları, gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. *C. albicans*'ın sebep olduğu yaygın kandidiyazis hastalığı ile birlikte non albicans türlerden *C. krusei* ve *C. glabrata* türlerinin hayat tehdit edici düzeyde enfeksiyonlara sebep olduğu bilinmektedir. Özellikle antifungal ajanlardan azol dirençli olan mayaların önemli birer tehdit olduğu değerlendirilmektedir (Prasad, 2017: 1, 2).

Candida

Candida farklı çevre koşullarında yaşayabilen, birbirine benzeşmeyen yaklaşık 150 türü bulunan ve genellikle tek hücreli maya olarak büyüyen bir fungi cinsidir. Bazı türleri hif, psödohif gibi farklı formlarda da büyüebilmektedir. Özellikle baskılanmış bağışıklık sistemi olan kişiler için önemli bir insan patojenidir (Moran, Coleman ve Sullivan, 2011).

Yuvarlak ile oval form arasında bulunan *Candida* türlerinin büyüklükleri 2-10 µm arasında değişmektedir ve tomurcuklanarak üreyebilmektedir. *Candida* türleri genel kültür ortamlarında, 25-35 °C arasında büyümektedir. Besiyerine şeker ve yağ ilave edilmesi durumunda büyümeleri artırılabilir. Onlarca *Candida* türünden sadece birkaçının insanda enfeksiyon oluşturduğu bilinmektedir. Pekçok *Candida* türünün 37 °C’de dahi büyüymiyor olması onların insan patojeni olmasında engel oluşturmaktadır (Bendel, 2016: 1060-1061).

Resim 2.11’de bir *C. albicans* hücresinin hücre duvarı (cw), hücre duvarına yakın duran plazmalemması (pl, hücre zarı), çekirdeği (nu), mitokondrisi (m), bir vakuol (vac) ve yoğun bir cisim (b) transmisyon elektron mikroskobu ile 34 500x büyütmeyle gösterilmiştir (De Nollin ve Borgers, 1975).



Resim 2.11. *C. albicans* hücresinin transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (De Nollin ve Borgers, 1975)

Candida albicans ve *Candida tropicalis* türleri bağırsak florasından izole edilen maya türlerindendir (Giuliano, Barza, Jacobus ve Gorbach, 1987). Mayalar bağırsak florasında yaşayan mikroorganizmaların yaklaşık %0,1’ini oluşturmaktadır (Alkan, 2012). İnsanda en yoğun bulunduğu yerler ise deri ve vajina florasıdır. *Candidalar* hücre duvarında kitin, mannoprotein, glukan, lipit ve protein bulunduran mayalardır. Ayrıca endotelial ve epitelial hücrelere tutunmalarını sağlayan çeşitli yüzey molekülleri bulundurlar. Örneğin

C. tropicalis suşlarında bir fibronektin reseptörü epitelyal tutunmayı sağlamaktadır. Ürettikleri slime faktör konakçının savunma elemanlarına karşı koymasını sağlayarak kolonileşmelerine yardımcı olur. Bunun dışında *Candida albicans*'ın ürettiği fosfolipaz enzimi, hücre zarında bulunan fosfolipitlerin yıkımında, proteinaz enzimi ise konakçıdaki koruyucu proteinlerin yıkımını sağlayarak enfeksiyon oluşturabilir. Bunun dışında biyofilm oluşturmaları, blastaspor ve germ tüp oluşumu, maya ve hif formunda değişim yapabiliyor olması (dimorfizm) ve hif formunun insan vücudunda makrofajları etkisiz hale getirmesi de *Candida*'nın virulansını sağlayan etmenlerdendir (Ay, 2004; Bendel, 2016: 1060-1061; Berdan, 2016).

Candida kaynaklı insan enfeksiyonlarında sıklıkla *C. albicans* hastalık etmeni olarak tanımlanırken, özellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde *C. tropicalis* de büyük oranda enfeksiyondan sorumlu tutulmaktadır. Bunun yanında *C. parapsilosis* hastane enfeksiyonu etmeni olarak, *C. krusei* ise sistemik enfeksiyonlara sebep olmasıyla dikkat çekmektedir. *Candida* türleri ile oluşan enfeksiyonlara örnek olarak, kandidemi, yaygın kandidiyazis, pulmoner kandidiyazis, gastrointestinal kandidiyazis, oral kandidiyazis (doğal flora kökenli) ve menenjit, beyin apsesi gibi sinir sistemi enfeksiyonları verilebilir. Kandidiyazisin teşhisi kan ve diğer örneklerden alınan kültürlerle ya da antijen, antikor, β -D glukoz tanıtma testi, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile mümkündür. *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal ilaçlar polienler (örneğin Amfoterisin B deoksikolat), flusitrosin, azoller (örneğin imidazol, triazol) ve ekinokandinler (örneğin kaspofungin, mikofungin) olarak gruplandırılabilir (Ay, 2004; Berdan, 2016; Uppuluri, Khan ve Edwards, 2017: 15).

C. albicans'ın antifungal ilaçların etkililiğini azaltacak mekanizmaları bulunduğuna bilinmektedir. Patojen funguslardan kaynaklı enfeksiyonların tedavisi güç olduğundan *Candida*'ların patojen biyolojisinin aydınlatılması, yeni nesil ilaç ve aşların keşfedilmesi için önemlidir. *C. albicans* genetik olarak değiştirmeye yatkın olması sebebiyle, patojen fungusleri çalışmak için ideal bir model organizmadır (Srivastav, Nair ve Natarajan, 2017: 370; Prasad, 2017: 1, 2).

2.7. Antimikrobiyal Maddeler

Antimikrobiyal ilaçlar ya da antibiyotikler genel olarak mikroorganizmalara karşı biyolojik aktivite gösteren ajanlar olarak tanımlanır (Molinari, 2014).

2.7.1. Antimikrobiyal maddelerin tarihçesi

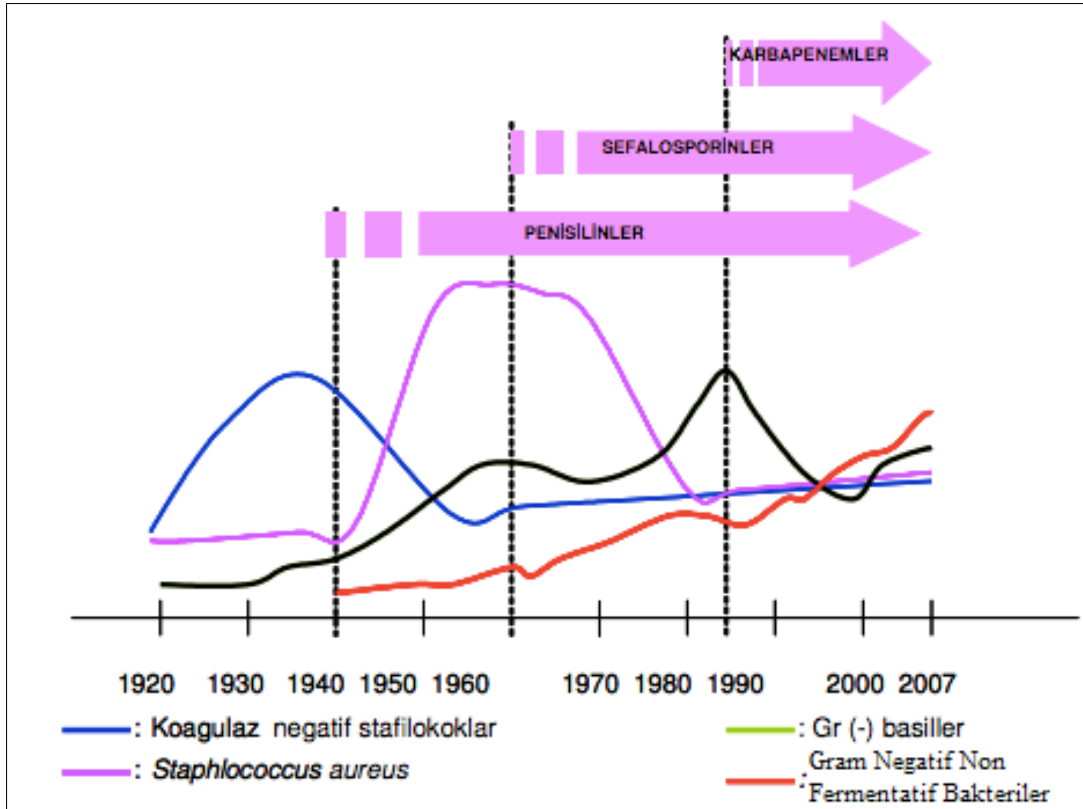
Antimikrobiyal ajanların modern dönemi, Paul Ehrlich ve Sahachiro Hata'nın 1909 yılında birlikte keşfettiği “arsfenamin” ya da ilk isimlendirildiği adıyla “606. bileşik” ile başlamıştır. Bu ilaç 1910'da Salvarsan ticari ismi altında sifiliz ve uyku hastalıklarının tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve etki mekanizması tam olarak bilinmese de 1940'lara kadar yaygın olarak antimikrobiyal ilaç olarak kullanılmıştır. Ehrlich'in bu başarısının ardından 1900'lü yılların başında çok sayıda bileşik, antimikrobiyal potansiyeli için araştırılmıştır. Penisilin ilk kez 1896'da bir Fransız tıp öğrencisi Ernest Duchesne tarafından keşfedilmesine rağmen, *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini gözlemleyen Alexander Fleming tarafından penisilin olarak adlandırılmıştır (Radecka, Martin ve Hill, 2015: 1).

Araştırmacılar enfeksiyon tedavisinin tarihçesini 3 bölüme ayırarak ele almaktadır: penisilin öncesi dönem, penisilin dönemi ve penisilin sonrası dönem (Bryskier, 2005: 1). Penisilinden sonra 1945 yılında sefalosporinler ilk olarak İtalya'da kanalizasyon suyundaki *Cephalosporium acremonium*'dan izole edilmiştir ve ilk keşfinde sadece Gram negatif bakterilere karşı etki gösterdiği ifade edilmiştir. Bu kültür örnekleriyle yıllar içinde yapılan çalışmalar sonucunda hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili olan antibiyotik ilaçlar üretilebilmiştir (Radecka ve diğerleri, 2015: 2).

Doğal ürünler ve türevleri ilaçların en önemli kaynakları olmasına rağmen, 1990'larda ilaç endüstrisi, özellikle küçük molekülleri üretmek için kombinatoriyal kimyaya yönelmiştir (Giltrap, 2018: 5). Modern tıptaki enfeksiyon hastalıklarıyla mücadelede, yeni geliştirilen antimikrobiyal ajanlar ise bakteriyolojik olmaktan ziyade kimyasaldır. Tedavi edici özellikte olduğu saptanan antimikrobiyal maddeler sıvı kültürlerden ekstraksiyon yoluyla ya da sentez ve yarı sentetik yöntemiyle elde edilmektedir. Bu nedenle artık kimyasal yapısı ile farmakolojik ve toksikolojik özellikleri bilinmeyen ilaçlar geliştirmek mümkün değildir (Bryskier, 2005: 1).

Antibakteriyel ilaçlar 60 yıldan uzun bir süredir enfeksiyonların tedavisi için elzem olarak görülmüş ve gerekliliği, uygunluğu tartışılmaksızın toplumda ve hastane ortamında sıklıkla kullanılmıştır (Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2014). Ancak penisilin kullanılmaya başlandığı 1940'lı yıllardan sonra penisilin dirençli stafilokok suşlarının bulunduğu tespit

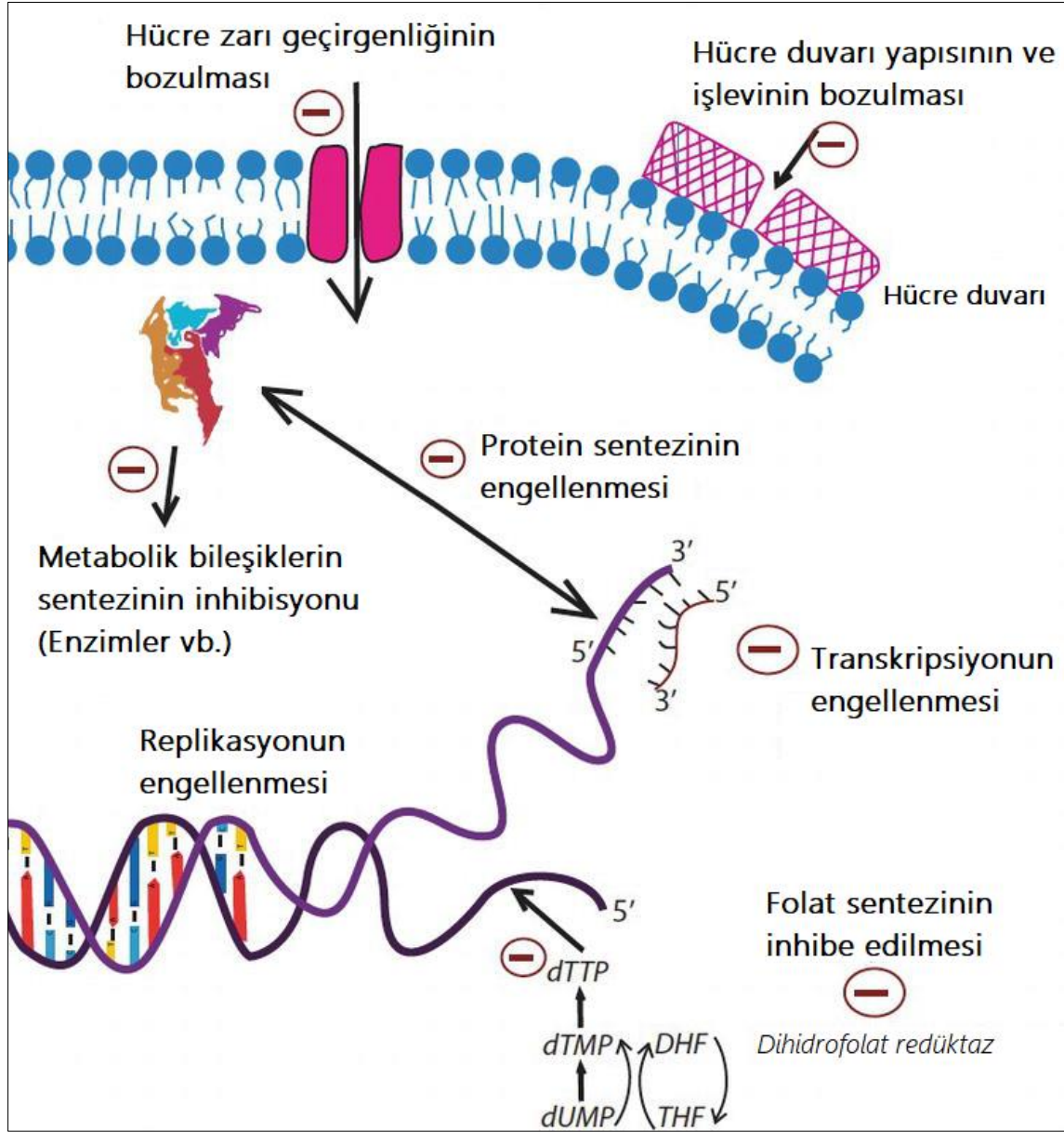
edilmiştir. Bunu izleyen yıllarda da metisiline dirençli *S. aureus* suşlarından kaynaklı hastane enfeksiyonları baş göstermiştir. Bunun üzerine 1960'lı yıllarda sefalosporinler kullanılmaya başlanmış ve yaklaşık 10 yıl sonra β -laktamlara karşı direnç gösteren Gram negatif basillerin önemli birer hastane enfeksiyonu etmeni haline geldiği bildirilmiştir. Bakterilerin antibiyotik direnç mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarla, bakterilerin direnç özelliği göstermelerini sağlayan genleri aktarabildiği tespit edilmiş ve 1990'lı yıllarla birlikte karbapenemler de kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 2.10) (Kavruk, 2007). Önemli antibiyotik gruplarına karşı oluşan bu dirençliliğin artmasından dolayı günümüzde yeni antibiyotiklere acil ihtiyaç duyulduğu ifade edilmektedir (Molinari, 2014).



Şekil 2.10. Hastane enfeksiyonu etmenleri ve tedavisinde kullanılan antibiyotikler (Kavruk, 2007)

2.7.2. Antimikrobiyal ilaçların etki mekanizması

Antimikrobiyal ilaçların etki ve direnç mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar hala devam etmekle birlikte, etki mekanizmaları en iyi bilinen ilaçlara örnek olarak β -laktamlar, florokinolonlar, mupirosin ve fosfomisin verilebilir (Bryskier, 2005: 105). Etki mekanizmalarına göre antimikrobiyal ilaçlar beş sınıf altında toplanmaktadır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Antimikrobiyal ilaç etki mekanizmaları (Kırmusaoğlu, Gareayaghi ve Kocazeybek, 2019)

1. *Hücre duvarı sentezine etki edenler*: Penisilin, sefalosparinler, monobaktamlar ve karbapenemlerin bulunduğu β -laktamlar, siklosein, ristosetin, basitrasin ve vankomisin bu ilaçlara örnek verilebilir. Bu ilaçlar bakteri hücre duvarının yapısında bulunan peptidoglikanların sentezinde rol oynayan penisilin bağlanma proteini (PBP) gibi öncül molekülleri hedef alır. β -laktam grubu antibiyotikler günümüzde kullanılan antibiyotiklerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. β -laktamlar etkisini PBP'ye bağlanarak gösterirken, β -laktamaz inhibitörleri β -laktamaz enzimine bağlanarak β -laktam'ın enzimatik inaktivasyonuna engel olur. Hücre duvarına etki eden bir diğer antibiyotik grubu glikopeptitler, peptidoglikan tabakaları arasındaki çapraz bağlamayı

inhibe eder. Antifungal ilaçlardan polioksinler, fungusların hücre duvarındaki kitin sentezini, ekinokadinler ise yine hücre duvarı yapısında bulunan glukmanın sentezini inhibe ederek etki gösterir.

2. *Sitoplazma zarının geçirgenliğini bozanlar:* Deterjan görevi yaparak, bakteri hücre zarının geçirgenliğini bozan bu antimikrobiyal ilaçlara örnek olarak polimiksinler, gramisidin, nistatin, kandisein, amfoterisin B, ketokonazol, diğer antifungal imidazoller ve trizoller verilebilir. Bu antibiyotikler peptidoglikan tabakanın kalınlığından dolayı Gram pozitif bakterilerde çok etkili olamazken, Gram negatif bakterilere karşı daha etkili olurlar. Bakteriyel hücre zarını inhibe eden polimiksinler ve piruvil transferazı inaktive eden fosfomisinler antibakteriyel ilaçlardır. Funguslarda da polienler hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına sebep olur.
3. *Genetik materyale etki edenler:* Bu ilaçlar RNA sentezine ve bakteriyel DNA giraz enzimini inhibe ederek DNA sentezine etki eder. DNA girazın α alt birimine bağlanarak enzim aktivitesini inhibe eden florokinolonlar, RNA polimeraza etki göstererek protein sentezini inhibe eden rifampin, doxorubisin ve bleomycin bu ilaçlara örnek verilebilir. Bir nükleotit analogu olan 5-florositozin de nükleik asit sentezine müdahale eden antifungal ilaçlardır.
4. *Ribozomlarda protein sentezine etki edenler:* Ribozomun 30S ve 50S alt birimlerini hedef alarak protein sentezini inhibe ederler. 30S ribozomal alt birimi hedef alan antibiyotiklerden aminoglikozitler, ribozomun 30S biriminden peptit zincirinin erken salınmasına neden olurken, tetrasiklinler polipeptit zincirinin uzamasını engeller, glisinsiklinler ise 30S birimine bağlanarak protein sentezinin başlamasına mani olur. 50S ribozomal alt birimi hedef alan antibiyotiklerden ise; oksazolidonlar 50S ribozomal alt birimde protein sentezinin başlamasını baskılar, klindamisin ve makrolidler polipeptit uzamasını engeller, kloramfenikol peptidil transferaz aktivitesini inhibe ederek zincirin uzamamasına sebep olur.
5. *Folik asit metabolizmasını inhibe edenler:* Bu etki mekanizmasına sahip antibiyotiklerden trimetoprim ve sülf ilaçlarının kombine kullanımıyla, folik asit metabolizmasında rol oynayan dihidrofolat redüktaz ve dihidropteroat sentetaz enzimleri inhibe edilmektedir (Kapoor, Saigal ve Elongovan, 2017; Burnett ve Richi, 2019: 132-133; Madigan, Martinko, Stahl ve Clark, 2012: 84-756; Topal, Uslu Şenel, Arslan Topal ve Öbek, 2015).

Antimikrobiyal maddeler aynı zamanda bakterilerin çoğalmasını öldürmeden engelleyenler “bakteriostatik” ve bakterileri öldürenler “bakterisidal” olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Bir ilaç ayarlandığı doza göre hem bakteriostatik hem de bakterisidal olabilir. Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK), bir antimikrobiyalın bakteri büyümesini inhibe ettiğinin gözlemlendiği en düşük konsantrasyondur ve *in vitro* olarak tespit edilebilir. Minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) da aynı şekilde sıvı dilüsyon gibi *in vitro* testler ile tespit edilebilir ve antimikrobiyalın bakterilerin %99.9’unu öldürdüğü saptanan en düşük konsantrasyondur. Eğer bir antimikrobiyal ilacın MBK değerinin MİK değerine oranı 4 ile 6 arasındaysa bakterisidal olarak tanımlanabilir. Eğer bu oran 6’nın üstündeyse bakterisidal ile toksik olmayan dozun ayarlanması zor olacağından güvenilir değerlendirilmemektedir. Bir antimikrobiyalın maksimum ilaç verimliliği için bakterisidal değerinin en yüksek olduğu konsantrasyonun MİK değerine oranının 4-8 katı olması önerilmektedir. Bakterisidal ve bakteriostatik ilaçlara ilişkin örnekler Çizelge 2.5’de verilmiştir. Penisilin, sefalosporin, aminoglikozit, florokinolon sınıfı ilaçlar bakterisidal etki gösterirken, tetrasiklin, makrolid, linkosamid sınıfı ilaçlar bakteriostatik olarak etki ederler (Dunning, 2002: 116-117).

Çizelge 2.5. Bakterisidal ve bakteriostatik ilaçlar (Dunning, 2002: 117)

Antimikrobiyal ajanlar	İlaç
Bakterisidal ilaçlar	Penisilinler, sefalosporinler, aminoglikozitler, florokinolonlar, metronidazol, trimetoprim/sülfonamid, rifampin, vankomisin.
Bakteriostatik ilaçlar	Tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler (eritromisin, tilosin), linkosamidler (linkomisin, klindamisin).

2.7.3. Antimikrobiyal direnç

Antimikrobiyal direnç, bir antimikrobiyal ajanın öldürücü veya inhibe edici etkisini zayıflatmasıyla meydana gelir. Mikroorganizmaların olumsuz çevre şartlarına uyum sağlama yeteneği sonucunda antimikrobiyal direncin geliştiği bilinmekle birlikte, antibiyotiklerin gereksiz ve yoğun kullanımı sonucunda da çoklu dirence sahip mikroorganizmalar ortaya çıkmıştır (Yüce, 2001). Çoklu ilaç direncine sahip olan mikroorganizmalar (multi drug resistance organism, MDRO) bir veya daha fazla antimikrobiyal madde sınıfına dirençli olan mikroorganizmalar olarak tanımlanır.

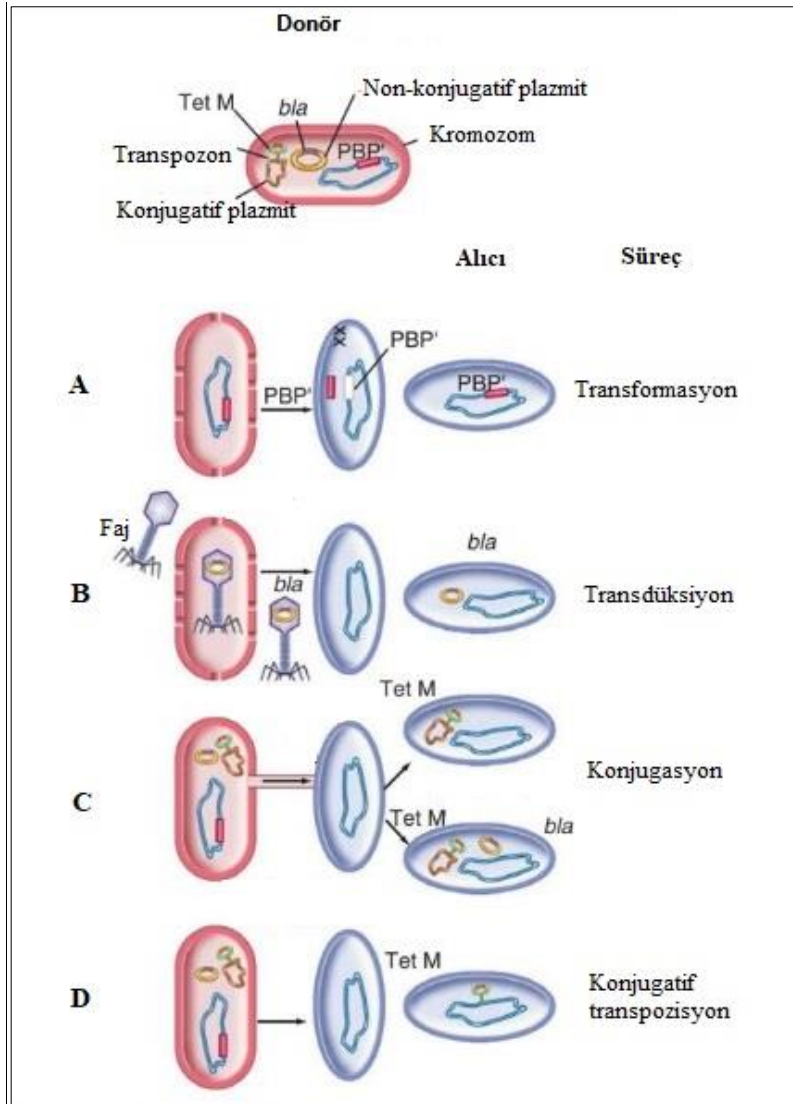
Metisiline dirençli *S. aureus*, vankomisine dirençli enterokoklar ve bazı Gram negatif basiller başta olmak üzere çoklu dirence sahip organizmalar önemli enfeksiyon etkilerine sahiptir ve özellikle bir sağlık merkezinde MDRO'ların ortaya çıkmasından tüm sağlık hizmeti düzenlemeleri etkilenir. Çoğu durumda, MDRO enfeksiyonlarının klinik belirtileri, ilaca duyarlı patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara benzer. Bununla birlikte, MDRO enfeksiyonlarına sahip hastaları tedavi etme seçenekleri son derece sınırlıdır (Siegel ve diğerleri, 2006). Örneğin MDRO sınıfına giren Gram negatif basil bakterilerden, geniş spektrumlu β -laktamaz üreten *K. pneumonia* salgınının, bir yenidoğan yoğun bakım ünitesinde ölüm oranını ve hastanede yatış süresini ciddi anlamda etkilediği belgelenmiştir (Stone ve diğerleri, 2003). *K. pneumonia* dışında Gram negatif basilli bakterilerden *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* (Kallen ve Srinivasan, 2010), Gram pozitif bakterilerden ise *E. faecium*, *S. aureus* çoklu ilaç direncine sahip bakterilere örnek gösterilebilir (Alexopoulou ve diğerleri, 2013).

Antimikrobiyal ilaçlara karşı mikroorganizmaların oluşturduğu dirençler üç şekilde gerçekleşebilir:

- a. *Doğal direnç*: Mikroorganizmanın, antimikrobiyal ilaca karşı genetik özelliklerinden kaynaklı olarak direnç göstermesidir.
- b. *Kazanılmış direnç*: Dirençli bir mikroorganizmadan konjugasyon ve transformasyon vb. yolla ya da kendiliğinden, direnci olmayan mikroorganizmadaki kromozomal, transpozon ve plazmit DNA'sında meydana gelen değişikliklerle oluşur.
- c. *Çapraz direnç*: Mikroorganizmanın bir antimikrobiyal ajana birden fazla direnç mekanizması bulundurması ve benzer mekanizmaya sahip olan diğer ilaçlara da dirençli olmasıdır (Kayaş, 2019; Yüce, 2001).

Antibiyotik üreten mikroorganizmalarda, antibiyotik madde çoğunlukla büyümenin son evrelerinde, uyku ya da spor oluşumundan önce üretilmektedir. Bakterinin kendisinin de ürettiği antibiyotiğe karşı doğal direnç geni bulunmaktadır. Bir mikrobiyal toplulukta mikroorganizmalar yabancı DNA'ya sürekli maruz kaldığından, bakteriler genomlarını ekzojen DNA, faj ya da plazmitlerin insersiyonundan korumak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Plazmitler, kendiliğinden replike olma yeteneğine sahip olarak, genetik değişim ve dirençlilik geninin yayılımı konusunda önemli rol oynar. Antibiyotik direncinin moleküler yayılım mekanizmaları üç antibiyotik direnç geni içeren bir donör hücre ele

alınarak Şekil 2.12’de açıklanmıştır. Bu donör bakteride penisilin bağlama proteinini kodlayan *PBP'* geni bakteriyal kromozomda, β -laktamaz geni (*bla*) küçük non-konjugatif plazmit üzerinde ve tetrasiklin direnç belirleyici Tet M, konjugatif büyük bir plazmit üzerindeki transpozonda bulunduğu varsayılmıştır. Şekil 2.12-A’da kromozom üzerindeki homolog genler rekombinasyon enzimleri ile transfer edilir ve transformasyon ile genetik değişiklik gerçekleşir. Şekil 2.12-B’de genellikle küçük plazmitlerden bakteriyofaj dönüşümüyle, transdüksiyon yoluyla dirençlilik geni aktarılır. Şekil 2.12-C’de donör hücre ile alıcı hücre arasında fiziksel bir temas oluşmasıyla, konjugasyon ile gen aktarımı yapılabilir. Şekil 2.12-D’de ise kendi rekombinasyon enzimlerine sahip olan transpozonlar, homolog olmayan DNA dizilerine transpoze olarak antibiyotik direnç geninin yayılımını sağlayabilir (Opal ve Pop-Vicas, 2015: 235-236).



Şekil 2.12. Antibiyotik dirençlilik geninin yayılımı ve rekombinasyonuna ilişkin örnekler (Opal ve Pop-Vicas, 2015: 236)

Antimikrobiyal ilaçlara karşı gösterilen direnç mekanizmaları genel olarak aşağıdaki başlıklarda toplanabilir:

1. İlacın enzimatik yollarla işlevsiz hale getirilmesi: Bakterilerde oluşan dirençliliğin genel yaygın sebebi enzimatik inhibisyonudur. Gram negatif bakteri enfeksiyonlarını tedavi etmekteki sorunlardan biri olan β -laktamaz aktivitesi buna örnek verilebilir.
2. İlacın bağlandığı bölgede meydana gelen değişiklikler: Çoğu antibiyotik bakterideki protein sentezi sürecine etki ettiğinden, ribozom bileşenlerinin yapısında meydana gelen değişiklikler ilacın aktivitesini engeller.
3. Hücre zarı geçirgenliğinde azalma: Bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikanın yapısında bulunan PBP'de ve Gram negatif bakterilerin hücre duvarının dışındaki hücre zarının lipopolisakkarit yapısında meydana gelen değişiklikler hücre zarı geçirgenliğini etkileyerek ilacın hücre içine geçişine engel olur.
4. İlacın aktif pompalama ile dışarı atılması: Proton bağımlı olan bu sistemde antibiyotik ilacın hücre içinden dışarı atılmasını sağlayan beş protein ailesi görev alır. Bu proteinler büyük kolaylaştırıcılar (MF), küçük çoklu ilaç direnç (SMR), direnç nodülasyonu hücre bölünmesi (RND), ATP-bağlama kaseti (ABC) ve çoklu-ilac toksik bileşik çıkarıcı proteinlerdir.
5. Bakteri tarafından alternatif bir metabolik yolun geliştirilmesi (de Sousa Oliveira, de Lima, Cobacho, Dias ve Franco, 2016: 24-29; Kayış, 2019; Yüce, 2001).

Önemli antibiyotiklerin (tetrasiklin, aminoglikozit, sefalosporin vb.) keşfinin yapıldığı “Altın Çağ” olarak adlandırılan 1960’lardan sonra, mikrobiyal dirençlilikte artış gözlemlenmiş ve etkisini kaybeden bu antibiyotiklerin yerine yeni antimikrobiyal ajanların keşfine yönelik çalışmalara hız verilmiştir. Bu amaçla antimikrobiyal aktivite potansiyeli bulunan çeşitli ekstratların ve bileşiklerin *in vitro* incelemesi yapılmaktadır (Balouiri ve diğerleri, 2016).

Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC)’nin 2013 yılında yayımladığı raporda antibiyotiklere dirençli olan *Clostridium difficile* ve *Neisseria gonorrhea* enfeksiyonlarının en acil sağlık sorunlardan biri olduğu belirtilmiş ve akademik dünyanın dikkati antimikrobiyal dirençlilik mevzusuna çekilmiştir (Perry, Westman ve Wright, 2014). CDC’nin 2013’deki raporuna göre her yıl Gram pozitif bakterilerden *Streptococcus pneumoniae*’nin dirençli suşlarıyla enfekte olan hasta sayısı yaklaşık 1 200 000 kişi

(toplam vakaların %88.9'u) iken ölümlerle sonuçlanan vaka sayısı 7 000 civarındadır. Aynı raporda Gram negatif bakterilerden geniş spektrumlu β -laktamaz üreten Enterobakter türlerinin hemen hemen tüm penisilin ve sefalosporinlere dirençli olduğu belirtilmiştir. Bu türler arasında bulunan antibiyotik dirençli *K. pneumonia* ve *E. coli* suşlarından kaynaklı enfeksiyonların ölüm sayısı toplamda tahmini 1 700 olarak ifade edilmiştir (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2013: 7, 15, 20, 21, 51, 52).

2.7.4. Yeni antimikrobiyal ajanların keşfi

Antimikrobiyal direncin önlemi için yapılan akademik ve klinik çalışmalar devam ederken (Brown ve Wright, 2016), yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi de son yıllarda önem kazanmaya başlamıştır (Fields, Lee ve McConnell, 2017; Thabit, Crandon ve Nicolau, 2014). Mevcut antimikrobiyal ilaçların kimyasal modifikasyonunun yanında, kombinatoriyal kimyanın da kullanımıyla yeni ilaçların sentezi mümkün olabilmektedir. Yeni ilaçların ya da modifiye edilen ilaçların klinik öncesinde antimikrobiyal aktivitelerinin taranması, toksisite testlerinin yapılması ve temel antimikrobiyal spektrumun tanımlanması gerekmektedir. Klinik öncesindeki çalışmalar sonucunda Faz I'de ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmaları, ilaç etkileşimi çalışmaları, direnç prevalansı ve duyarlılığına ilişkin mikrobiyolojik testler yapılmaktadır. Faz II'de en fazla 1 000 kişilik hasta grubunda rastgele seçimli, kör ve iç geçerliliği hedefleyen klinik çalışmalar yapılırken, ilacın etkileşimleri ve organ yetmezliği etkileri araştırılır. Faz IIIa'da daha geniş hasta gruplarına yapılan testlerin ve deneysel kullanım sonucu elde edilen duyarlılık sonuçlarının klinik bulgularla ilişkisi ortaya konur. Faz IIIb'de ise ilacın kullanım endikasyonları genişletilir ve diğer lisanslı ürünlerle karşılaştırması yapılarak önceki fazlarda yapılan test sonuçlarına göre sınıflandırılır. Son olarak Faz IV'de ise lisansı alınan ilacın nadir etkileşim ve toksisitesine ilişkin klinik testler yapılır. Yeni antibiyotik geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda fazlar Çizelge 2.6'da verilmiştir (Bax, Gabbay, Phillips ve the Witley Park Study Group, 2000).

Çizelge 2.6. Yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi sürecindeki fazlar (Bax ve diğerleri, 2000)

Faz	Tanım
Keşif ve klinik öncesi	- Yeni ilaçların sentezi ve eskilerinin kimyasal modifikasyonu - Kombinatoryal kimyanın kullanımının artması - Biyolojik materyalin antimikrobiyal aktivite için taramasının yapılması ve moleküler yöntemler - İlaç kimyası, yapı-aktivite ilişkileri ve toksisite testlerini içeren hayvan farmakoloji çalışmaları - Temel antimikrobiyal spektrumun tanımlanması
I	- Sağlıklı gönüllülerde insan farmakolojisi çalışmaları - Farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmaları - İlaç etkileşimi çalışmaları - Mikrobiyoloji çalışmaları (direnç prevelansı ve mekanizmaları, duyarlılık test yöntemleri, kalite kontrol suşlarının MİK performansına göre zon büyüklüğü ile karşılaştırılması, geçici sınır değerlerin belirlenmesi)
II	- İnsan farmakolojisi çalışmaları (Yaygın, istenmeyen etkileri içeren) - İlk, küçük (1 000 hastaya kadar) prospektif, rastgele seçimli, karşılaştırmalı, kör, iç geçerliliği hedefleyen çalışmalar - Etkileşimler, organ yetmezliği etkileri
IIIa	- Daha geniş kitlelerle (10 000 hastaya kadar) dış geçerliliği genişletmek için kullanılan özel gruplar dâhil yapılan testler - Deneysel kullanımlar - Organizmaların ve duyarlılık sonuçlarının hastalardan toplanması ve klinik sonuçlarla ilişkisinin ortaya konularak klinik, kesin kırılım noktasının ortaya konulması - Test sonuçlarının analizi [protokol başına (per protokol) tedavi amacına yönelik (intent to treat), alt küme analizler vb.]
IIIb	- Özel hasta tipleri dâhil kullanım endikasyonlarının genişletilmesi, - Diğer lisanslı ilaçlarla karşılaştırmaların yapılması. Faz II ve III'deki testlerin I ve III'deki raporlarına dayanılarak ürünün sınıflandırılması
IV	- Lisans sonrası, nadir etkileşim ya da toksisitenin tanımlandığı hasta gruplarıyla yapılan klinik testler - Direnç sürveyansı

Yeni antibiyotiklere olan ihtiyaç belirgin olsa da son aşamalarda klinik çalışmaların yürütüldüğü ve onaylandığı az sayıda yeni antibiyotik bulunmaktadır. Bunun bir sebebi

ilaç şirketlerinin bu konuya yatırım eğilimlerinin eksik olmasından kaynaklanmaktadır. Ancak son yıllarda kurulan Avrupa Birliği Yenilikçi İlaçlar Girişimi gibi oluşumlarla yeni nesil antimikrobiyal ilaç keşfinde hızlanmalar olması beklenmektedir (Hughes ve Karlen, 2014). Bunun dışında klinik öncesi çalışmalarda bu ajanların istenilen düzeyde antibakteriyal etki göstermemesi, oluşan antibakteriyal etkinin yanlış yorumlanması ve yüksek seviyede dirençlilik gösterilmesi gibi hususlar klinik öncesi çalışmalarda araştırmacıların sonraki aşamalara ilerlemesini engelleyebilmektedir (Silver, 2014).

Antimikrobiyal ajanların çeşitli özellikleri ve mikrobiyal duyarlılıkları göz önünde bulundurulduğunda ideal bir antimikrobiyal ajanın şu özelliklere sahip olması beklenmektedir:

1. *Vücut sıvısında çözünürlük:* Dolaşıma katılarak enfeksiyon mikroorganizmalarına ulaşması, topikal uygulananların ise yaralı doku sıvılarında çözünür olması gerekir.
2. *Seçici ve sabit toksisite:* Mikroorganizmalar için toksik olan konsantrasyon ile konak için toksik olan konsantrasyon arasında büyük bir fark bulunmalıdır. Ayrıca yiyecek alımı ve diğer metabolik hastalıklar varlığında değişken toksisite göstermemelidir.
3. *Kararlılığı:* Vücut sıvılarında belirli bir konsantrasyonunda korunması, yavaş bozunmasının sağlanması gerekir.
4. *Alerjik olmaması:* Konakta alerjik reaksiyona sebep olmaması gerekmektedir.
5. *Direnç gösterilmemesi:* Eğer varsa ajana dirençli az sayıda mikroorganizma olması tercih edilir.
6. *Uzun raf ömrü:* Özel koşullar gerektirmeden korunma süresinin uzun olması gerekir.
7. *Uygun maliyet:* Hastalara ulaşımı için düşük maliyetli olmalıdır (Black, 2012: 377, 378).

2.7.5. Antimikrobiyal aktivite tespit yöntemleri

Antimikrobiyal aktivitenin ve duyarlılığın belirlenmesi hastalıkların epidemiyolojisi, tedavisi ve yeni ilaçların keşfi için önemlidir. (Balouiri, Sadiki ve Ibensouda, 2016). Bu testlerin amacı, önemli patojenlerdeki olası ilaç direncini tespit etmek ve belirli enfeksiyonlar için en çok tercih edilen ilaçlara karşı antimikrobiyal duyarlılığı sağlamaktır (Jorgensen ve Ferraro, 2009).

Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılığı araştırılırken kullanılabilecek yöntemler aşağıda verilmiştir:

a. *Difüzyon Yöntemleri*

- i. *Agar disk difüzyon yöntemi*: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından onaylanan standartlar için bakteri ve mayalarda kullanılan, 1940'larda geliştirilen testtir. Antibiyotik diskleri, ekim yapılmış agar yüzeyine yerleştirildiğinde, antibiyotik molekülleri diskten agar içerisine dağılır. Bu sırada test organizması bölünmeye başlar ve büyüme kritik kütleyle doğru ilerler. Büyümenin durduğu bölge kenarı, organizmayı engelleyebilen antibiyotik konsantrasyonunun ezici bir hücre kütesine ulaştığı kritik zamanda oluşur.
- ii. *Agar kuyu difüzyon yöntemi*: Mikrobiyal ekstratların ve bitkilerin antimikrobiyal aktivite tayininde sıklıkla kullanılan, disk-difüzyon yöntemine benzer şekilde, agarda 6-8 mm. çapında bir delik (kuyu) veya hazne açılarak yapılan testtir. Bitki ekstratları için sıklıkla kullanılmaktadır. Filtre kağıdından yapılan diskler ya da doğrudan besiyerinde açılan deliklere konsantrasyonu bilinen test bileşiği uygulanarak inkübasyon süresi sonunda inhibisyon zonu ölçümü yapılır.
- iii. *Antimikrobiyal gradient yöntemi (Etest)*: Hem agar disk difüzyonu hem de agar dilüsyon yönteminin bir arada kullanıldığı yenilikçi bir yöntemdir. İki ilaç arasındaki antimikrobiyal etkileşimin (kombine etkinin) araştırılmasında kullanılabilir.
- iv. *Agar plug difüzyon yöntemi*: Disk difüzyon yöntemine benzer olan bu yöntem genellikle mikroorganizmalar arasındaki karşılıklı etkiyi araştırmak için kullanılır.
- v. *Çapraz çizgi yöntemi*: Mikroorganizmaların karşılıklı etkilerinin seri bir şekilde taranması için kullanılmaktadır.
- vi. *Zehirli gıda yöntemi*: Çoğunlukla küflere karşı antifungal etkiyi analiz etmek için kullanılan bir testtir.

b. Dilüsyon Yöntemleri

- i. *Sıvı dilüsyon yöntemi*: MİK, MBK, MFK değerinin tespiti için kullanılan en uygun yöntemlerden olup, eş hacimdeki antibiyotik/antimikrobiyal ajan içeren kaplara mikroorganizmanın inoküle edilmesini içermektedir. Bu yöntemde bulanıklık bakteriyel yoğunluğu gösterdiğinden, inhibisyon derecesi besiyerinin bulanıklığının spektrofotometrik ölçümü ile elde edilir (Balouri ve diğerleri, 2016; Rios, 1988; Wanger, 2007: 55, 56, 58; Aqil ve diğerleri, 2010:472).

- ii. *Agar dilüsyon yöntemi*: Bu test ile bir antimikrobiyal ajanın/antibiyotiğin MİK değeri tespit edilebilir. Çalışmada her plak, farklı konsantrasyonda ilaç içerecek şekilde dilüsyon yapılarak agar besiyerine karıştırılır.
- c. *İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) – Biyootografi*
 - i. *Direkt biyootografi*: Antifungal maddelerin tespiti için kullanılan en kolay yöntemdir ve *Aspergillus* gibi spor üreten funguslar için de tutarlı sonuçlar vermektedir.
 - ii. *Agar difüzyon (Agar temas) yöntemi*: Çok az kullanılan bu yöntemde antimikrobiyal ajan kromatogramdan, daha önce mikroorganizma ile aşılınmış bir agar plakaya difüzyon yoluyla transfer edilir.
 - iii. *Agar overlay (immersiyon biyootografi)*: Önceki iki yöntemin karışımı olan bu test tüm mikroorganizmalara uygulanabilir.
- d. *Zaman-öldürme testi*: Zamana bağlı ya da konsantrasyona bağlı antimikrobiyal etkinin saptanmasını sağlayan testtir. Antimikrobiyal ajanın bakterisidal ya da fungisidal etkisinin tespiti için kullanılmaktadır. Konsantrasyona bağlı öldürme özelliği olan antimikrobiyal ajan/antibiyotiklerde konsantrasyon arttıkça bakterisidal etki artarken, zamana bağlı öldürme özelliği bulunan antimikrobiyal ajanların konsantrasyonu MİK değeri üzerindeyken artmaz ve MİK değerinden az olduğu durumda mikroorganizmalar yeniden üremeye başlayabilir (Hmed, Sofy, Sharafl ve El-DougDoug, 2017).
- e. *ATP biyoluminesans yöntemi*: Bakteri ve mayaların adenosin trifosfat (ATP) üretme kapasitelerine dayanan ve incelenen örnekteki mikroorganizma sayısının belirlenmesinde ve analizinde kullanılan bir testtir.
- f. *Akış sitoflorometrik yöntem*: Akış sitometrisinin uçucu yağların antibakteriyal etkisinin tespitinde propidium iyodür (PI) ile kombine edilerek kullanılabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Balouri ve diğerleri, 2016; Gür, 2016; Köksal, 2010; Turantaş, 1996).

2.8. Kanser ve Etkenleri

Kanser, her yıl dünyada 8,2 milyon insanın öldüğü ve tüm ölümlerin yaklaşık %13'üne tekabül ettiği önemli bir halk sağlığı sorunudur (Koc ve diğerleri, 2018).

Kanser genellikle hücrelerin bölünüp büyümesini kontrol eden mekanizmalarda meydana gelen kayıplar, hatalar sonucu oluşur. Hücresel düzenlemedeki aksaklıklar genetik bozukluklar ile tümör oluşturan kimyasal, virüs gibi dış etmenlerin etkisiyle oluşabilmektedir. Kanserleşmeye sebep olan değişiklikler çok basamaklıdır ve genel olarak aşağıdaki başlıklarda sıralanabilir:

- Büyüme sinyalleri açısından kendi kendine yetme
- Büyümeyi durdurucu sinyallere karşı duyarsızlık
- Apoptoza girmeme
- Sınırsız replikasyon potansiyeli
- Dokulara yayılma ve metastaz
- Sürekli anjiyogenez (damar oluşumu)

Kanserin genetik temeline bakıldığında, üç gen grubunun kanser oluşmasında rolü olduğu görülmektedir. Bunlar proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve koruyucu genlerdir. Proto-onkogenler, hücrenin büyümesini ve çoğalmasındaki sinyal iletim yollarında görev alan molekülleri kodlar ve bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, hücre çoğalmasının kontrol dışına çıkmasına neden olur. Tümör baskılayıcı genler apoptoz başta olmak üzere, hücre döngüsü ve çoğalmasıyla ilişkili sinyal yollarında görev alan proteinleri ifade ederken, koruyucu genler ise DNA replikasyonunda meydana gelebilecek hasarların tamirinde görev alacak enzimlerin üretimini sağlar. Proto-onkogenlerde meydana gelen nokta mutasyonu ve kromozomal translokasyonlar genetik olarak baskın kalıtılırken, tümör baskılayıcı genler ile koruyucu genler üzerindeki mutasyonlar (delesyon, nokta mutasyonu ve metilleme) çekiniktir (Çizelge 2.7) (Lodish ve diğerleri, 2008/2011).

Çizelge 2.7. Kanser oluşmasına sebep olan gen sınıfları (Lodish ve diğerleri, 2008/2011)

Gen	Genin işlevi	Mutasyon	Mutasyonun etkisi
Proto-onkogenler	Hücre çoğalmasını sağlayan anti-apoptotik proteinleri, sinyal iletim yollarında görev alan molekülleri ve transkripsiyon faktörlerin üretimi	- Nokta mutasyon - Kromozomal translokasyon	Genetik açıdan baskın olan mutasyonlar hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olur.

Çizelge 2.7. (devam) Kanserin oluşmasına sebep olan gen sınıfları (Lodish ve diğerleri, 2008/2011)

Gen	Genin işlevi	• Mutasyon	Mutasyonun etkisi
Tümör baskılayıcı genler	Apoptozda görev alan proteinleri, hücre döngüsü kontrol noktası proteinleri ve hücre çoğalmasını engelleyen diğer sinyal yolları moleküllerin ifadesi	• Delesyon • Nokta mutasyon • Metilasyon	Mutasyonlar genetik açıdan çekiniktir ve bulunduğu gende işlev kaybına sebep olarak kontrolsüz hücre çoğalmasına izin verir.
Koruyucu genler	DNA hasarının tamirinde görev alan enzimlerin üretimi	• Delesyon • Nokta mutasyon • Metilasyon	Çekinik olan bu mutasyonlar, mutasyonların birikimine izin verir.

Genetik etmenlerinin yanında, kanserlerin çoğunun çevre şartlarıyla ilgisi olduğuna inanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de yapılan bir araştırmada, kanser ile mesleki çalışma koşulları arasındaki ilişki ortaya konulmuş ve her yıl yaklaşık 24.000 kişinin (tüm kanser ölümlerinin %4'ü) mesleki çalışma koşullardan kaynaklı kanser sebebiyle hayatını kaybettiği belirtilmiştir (Schulte, 2011). Belirli organlarda kanserleşmeye sebep olduğu kanıtlanan kimyasallara örnek olarak şunlar verilebilir; asbestin gastroenterik sistem, gırtlak ve akciğer, vinil klorürün beyin ve karaciğer, benzenin hematopoetik doku, arseniğin ve hardal gazının akciğer kanserine sebep olması (Warshawsky ve Landolph, 2006: 4-5).

Genetik ve çevresel şartlar yanında epigenetik mekanizmalar da gen ifadesini etkilemesi yönüyle kanserin gelişiminde rol oynamaktadır. Örneğin genin promotör bölgesindeki CpG adalarının aşırı metilasyonu ile histon modifikasyonları (Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon), çevresel etmenlerin de etkisiyle tümör oluşumu ve karsinogenezele sonuçlanabilmektedir. Bunun yanında epigenetik etmenler kanser tanısında kullanışlı olabilmektedir. Kanser erken teşhisinde CpG adalarının metillenme durumu biyo-işaretçi olarak kullanılabilir (İzmirli, 2013).

2.8.1. Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde ana amaç, hastanın sağlıklı hücrelerine zarar vermeden tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını baskılamak ve nihai olarak tümör hücrelerini

öldürmektir (Erkurt, Kuku, Kaya ve Aydoğdu, 2009). Kanser tedavisinde genel olarak aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır:

- a. Cerrahi müdahale ile kanserli doku vücuttan çıkarılır.
- b. Kemoterapi ile hızla çoğalan kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılmasını engellemek için antikanser ilaçlar kullanılır.
- c. Işın tedavisinde tümör hücrelerini öldürmek ya da küçültmek için yüksek dozda radyasyon kullanılır.
- d. İmmünoterapi, hastanın kanserle mücadele eden bağışıklık sistemine yardımcı olur.
- e. Hormon tedavisi, özellikle prostat kanseri ve meme kanseri gibi tümör gelişimi için hormonları kullanan kanser türlerinde kullanılır.
- f. Lazer tedavisinde yüksek yoğunlu lazer ışığı ile tümör hücrelerinin ya da henüz kanserleşmemiş hücrelerin baskılanması ve öldürülmesi sağlanır.
- g. Hedefli tedavi yönteminde tümör hücrelerinin çoğalmasını ve yayılmasını etkileyecek bileşenler hedef alınır.
- h. Kök hücre nakli (Önercan, 2019).

Modern kanser kemoterapisinin kökeni kimyasal silah olarak kullanılan azot hardallarına dayanmaktadır. Antikanser ilaçların yarı-sentetik ya da tamamen sentetik olarak geliştirilmesine yönelik çalışmalar uzun yıllardır devam etmektedir. Bunun yanında bitkiler, mikroorganizmalar ve son yıllarda da deniz canlıları sitotoksik antikanser ilaçlarının ana kaynağı durumundadır. Keşiflerinin ilk yıllarında pek çok antikanser ilacı tümör hücrelerinin bölünme mekanizmalarını baskılayarak öldürmeyi hedeflemektedir. Ancak bu yaklaşımla sentezlenen ilaçlar seçici değildir ve genellikle tümör hücreleri ile birlikte sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Ancak son yıllarda antikanser ilaçların toksisite sorununu aşmak için hedefli ilaçlar geliştirmeye başlanmıştır (Avendano ve Menendez, 2015: 6, 8, 13).

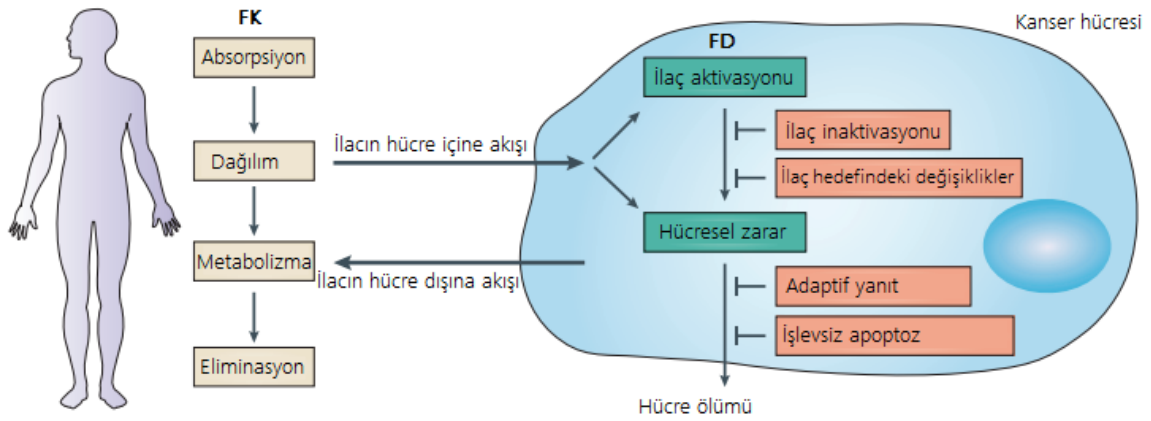
Antikanser ilaçların genel sınıflandırması ve etki mekanizmaları şu şekilde yapılabilir:

- a. *Antimetabolitler*: Bu ilaçlar nükleik asit biyosentezine müdahale eder. Örneğin; üridilik asit sentez inhibitörleri, ribonükleotid redüktaz inhibitörleri, timidilik asit biyosentez inhibitörleri, dihidrofolat redüktaz inhibitörleri, DNA sentezi son aşamalarının inhibitörleri ve antimetabolit enzimler.

- b. *DNA etkileşimli antikanser ilaçlar*: Ayrıntılı bilgi için (Bkz: 2.9. DNA-İlaç Etkileşimi başlığı)
- i. *DNA alkillayıcı ajanlar*: Örneğin dacarbazine ve temozolomide bu sınıfa girmektedir.
 - ii. *Çapraz bağlanan ajanlar*: Aziridinler, epoksitler, metansülfanatlar ve platinyum kompleksleri bu ilaçlara örnek verilebilir.
 - iii. *DNA'nın küçük oluşuna bağlanan ilaçlar*: Netropsin, distamisin, mitomisin ve irifolven DNA'nın küçük oluşu ile etkileşen antikanser ilaçlardandır.
 - iv. *İnterkalatör ajanlar*: Tek ya da çift fonksiyonlu interkalatör antikanser ajanlar mevcuttur. Örneğin ellipticine ve analogları, aktinomisin, doxorubisin vb.
 - v. *Topoizomerez I ve II inhibitörleri*: Örneğin camptothecin, acridine türevleri, topotecan ve etoposide bu sınıfa girmektedir.
- c. *Hormon mekanizmasını düzenleyen antikanser ilaçlar*: Antiöstrojenler, androjen ilişkili antitümör ajanlar, aromataz inhibitörleri, steroid sülfataz inhibitörleri bunlara örnek verilebilir.
- d. *Radikal türlerle etki eden antikanser ilaçlar*: Radikal ve diğer reaktif oksijen türleri ile hücre zarı fosfolipit peroksidasyonu, DNA zincir kırığı ve DNA bazlarının oksidasyonuna sebep olan ilaçlara örnek olarak; anthrasiklinler, mitoksantron, aktinomisin D, bleomycin, enedin antibiyotikleri ve tirapazamin verilebilir.
- e. *Epigenetik ajanlar*: Susturulmuş genlerin yeniden aktivasyonunu sağlayacak olan DNA metiltransferaz inhibitörleri, histon ve diğer protein deasetilazların inhibitörleri (örneğin hidroksamik asit, siklik tetrapeptit) ile histon metilasyon düzenleyicileri epigenetik mekanizmaları düzenleyerek tedavi etmeyi amaçlar.
- f. *Tübülün ve mikrotübülleri hedef alan ilaçlar*: Mikrotübül polimerizasyonunu inhibe edenler, vinka alkaloidleri, taksanlar ve mitotik kinesin inhibitörleri bu tür ilaçlara örnek verilebilir.
- g. *Kinaz inhibitörleri*: Tümör hücresinin büyümesinde ve çoğalmasında rol oynayan sinyal mekanizmalarının engellenmesini hedefleyen bu ilaçlara örnek olarak tirozin kinaz inhibitörleri, serin-treonin kinaz, Ras/Raf/MEK sinyal yolu inhibitörleri verilebilir (Thurston, 2006: 29-114; Avendano ve Menendez, 2015: 23-391).

Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçların, başta antimetabolitler, alkillayıcı ilaçlar ve antrasiklinlerin yan etkilerinden biri böbrek hücrelerine zarar vermesi, nefrotoksisiteye sebep olmasıdır. Bu nefrotoksisite hastalarda serum elektrolit düzensizliğinden böbrek

yetmezliğine kadar farklı boyutlarda komplikasyonlara sebep olabilmektedir (Erkurt ve diğerleri, 2009). Antikanser ilaçların çeşitli dokularda sebep olduğu toksisitenin yanında geleneksel ve hedefli antikanser ilaçlara karşı oluşan direnç, kanser tedavisinde başarısız olmanın ana sebeplerinden biridir. Antikanser ilaçların absorpsiyonu, dağılımı, metabolizması ve eliminasyonu gibi farmakokinetik (FK) etmenleri, ilacın tümör hücrelerine ulaşan miktarını sınırlamaktadır. İlacın tümör hücresindeki etkisi de farmakodinamik (FD) olarak adlandırılır ve ilacın hücre içindeki aktivasyonu genel olarak FD etmenlerle ilişkilidir. Antikanser ilacın hücre içine zayıf ya da aşırı akışı, ilacın aktivasyon eksikliği, ilacın hedefindeki ifade seviyesinde meydana gelen değişiklikler, ilacın etkisine karşı oluşturulan adaptif yanıt ve işlevsiz apoptoz nedeniyle ilacın beklenen etkisi görülemeyebilmektedir (Şekil 2.13) (Holohan, Van Schaeybroeck, Longley ve Johnston, 2013).



Şekil 2.13. Antikanser ilaç direncinin genel mekanizması (Holohan ve diğerleri, 2013)

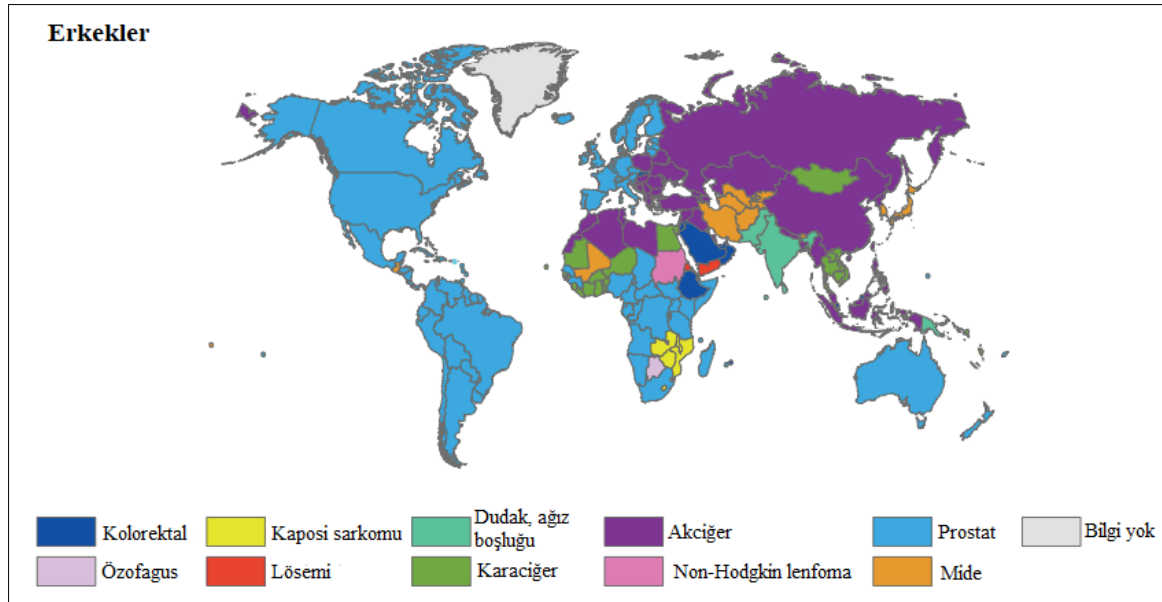
İlk nesil antikanser ilaçlar keşfedildiğinde moleküler hedefleri bilinmezken, modern ve yeni ilaçların geliştirilmesinde ise öncelikle hastalığın moleküler mekanizması anlaşılmalı çalışılmakta ve buna uygun moleküler hedefi içeren ilaçlar tasarlanmaktadır. İnsan genom dizisinin tamamlanması ve hastalıkların moleküler temelini aydınlatılmasıyla, tedavide hedef alınabilecek çok sayıda hücresel bileşen belirlenebilmektedir (Link, 2019: 88).

2.8.2. Kanser Türleri

Kanser tek bir hastalık olmayıp, hastalıklar bütünü olarak tanımlanabilir. Genele bakıldığında 100'den fazla kanser tipi bulunmaktadır ve çoğu kanser organ ya da hücre

tipine göre isimlendirilmektedir. Genel olarak kategorilendirilmek istenirse kanserler, karsinom, sarkom, lösemi, lenfoma ve myeloma, merkezi sinir sistemi kanserleri olarak gruplandırılabilir (Nee, 2013: 1).

En sık görülen kanser türlerine ülke bazlı bakıldığında, özellikle erkeklerde büyük farklılıkların bulunduğu görülmektedir. Erkeklerde en sık görülen kanser türü Amerika kıtasında, Avustralya ve Batı Avrupa’da prostat kanseri iken, İran, Afganistan’da mide kanseri, Hindistan ve Pakistan’da dudak ve ağız boşluğu kanseridir. Erkeklerde Asya genelinde ve ülkemizde en sık görülen kanser türü ise akciğerdir (Şekil 2.14) (Torre, Siegel, Ward ve Jemal, 2015b).



Şekil 2.14. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri (Torre ve diğerleri, 2015b).

Ekonomik olarak gelişmiş ülkelerdeki tüm kanserler için insidans oranları hem erkek hem de kadınlarda, ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelere göre yaklaşık iki kat daha yüksektir. Jemal ve diğerleri (2011)’nin yaptığı bir çalışmada, dünya genelinde yeni tanısı konulacak kanser vakaları ve en çok ölüm vakasının beklendiği kanser türlerine göre tahminleri cinsiyet bazlı sıralanmıştır. Bu çalışmaya göre kadınlarda meme kanserinin, erkeklerde ise akciğer ve bronş kanserlerinin hem yeni tanıda, hem de ölüm sayısında birinci sırada olacağı tahmin edilmektedir. Kadınlardaki kansere bağlı ölümlerde meme kanserini akciğer ve bronş kanseri ile kolon ve rektum kanserleri takip ederken, erkeklerde ikinci ve üçüncü sırada karaciğer ve mide kanserine yer verilmiştir (Çizelge 2.8).

Çizelge 2.8. Dünya genelinde, yeni kanser tanısında ve ölüm vakalarında kanser türleri (Jemal ve diğerleri, 2011)

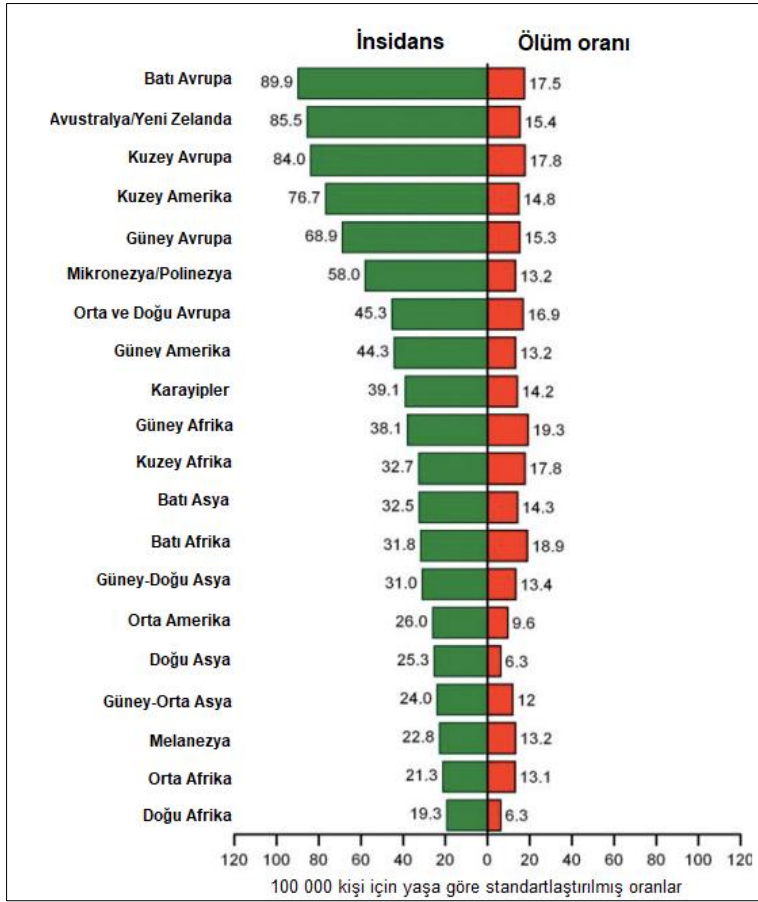
Sıra	Tahmini Yeni Vakalar		Tahmini Ölüm Vakaları	
	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek
1	Meme	Akciğer ve bronş	Meme	Akciğer ve bronş
2	Kolon ve rektum	Prostat	Akciğer ve bronş	Karaciğer
3	Rahim ağzı	Kolon ve rektum	Kolon ve rektum	Mide
4	Akciğer ve bronş	Mide	Rahim ağzı	Kolon ve rektum
5	Mide	Karaciğer	Mide	Özofagus
6	Rahim	Özofagus	Karaciğer	Prostat
7	Karaciğer	İdrar torbası	Yumurtalık	Lösemi
8	Yumurtalık	Non-Hodgkin lenfoma	Özofagus	Pankreas
9	Tiroid	Lösemi	Pankreas	İdrar torbası
10	Non-Hodgkin lenfoma	Ağız boşluğu	Lösemi	Non-Hodgkin lenfoma

Meme kanseri

Meme kanseri, her gün farklı kesimlerden binlerce kadına teşhisi konulan bir kanser türüdür (Youlden ve diğerleri, 2012). 185 ülkede, 36 kanser türüne yönelik yapılan istatistiki bir çalışmada, 2018 yılında 2 000 000'un üzerinde kişiye meme kanseri teşhisi konulduğu ve yaklaşık 600 000 kişinin meme kanseri sebebiyle hayatını kaybettiği belirtilmiştir. Bu verilerle meme kanseri, hem tanı hem de ölüm oranı açısından akciğer kanserinin ardından en yüksek 2. kanser türü konumundadır (Bray ve diğerleri, 2018). Yaşa göre standartlaştırılmış 2008 yılı meme kanseri insidansı ve ölüm oranları bölgesel olarak Şekil 2.15'te verilmiştir. Meme kanseri için insidansın en yüksek olduğu bölge Batı Avrupa görünürken, ölüm oranının en yüksek olduğu bölge ise Güney Afrika olmuştur (Jemal ve diğerleri, 2011; Ferlay ve diğerleri, 2010).

Son yıllarda metastatik meme kanserinin tanı ve tedavisinde büyük ilerlemeler katedilmiş olmasına rağmen, mevcut tedavi yöntemlerine karşı dirençli kanser hücrelerinin bulunması, bu kanserin kadınlar arasındaki en yüksek ölüm oranına sahip kanser türü olarak kalmasına sebep olmuştur (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison ve Clarke, 2003). Ülkemizde de meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve yıllar içinde teşhis ve ölüm oranı artmaktadır. Ayrıca meme kanseri konusunda yeterli farkındalığın sağlanamaması ve tanı tarama programlarının çok başarılı uygulanamaması sebebiyle erken evredeki tanı oranının düşük olduğu görülmektedir (Özmen, 2013).

Meme bezi gelişimi ve farklılaşmasında rol oynayan etmenler (hormonlar vb.) meme kanseri riskini etkiler (Warshawsky ve Landolph, 2006: 353) ve kanser, normal meme hücrelerinin hiperplazi, premalign değişim ve in situ karsinom aşamalarını içeren bir süreç sonunda ortaya çıkar. Meme kanserinin oluşumu ve ilerleyişine ilişkin yapılan çalışmalarda, onkogenlerde meydana gelen mutasyonların tümör yayılımı ve metastazla ilişkisi bulunurken, ailesel meme kanserinde tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen çekinik değişimlerin primer lezyon oluşumuna sebep olduğu görülmüştür. Meme kanserinin çok aşamalı karsinogenezine ilişkin model Şekil 2.16’da verilmiştir (Beckmann, Niederacher, Schnürch, Gusterson ve Bender, 1997).

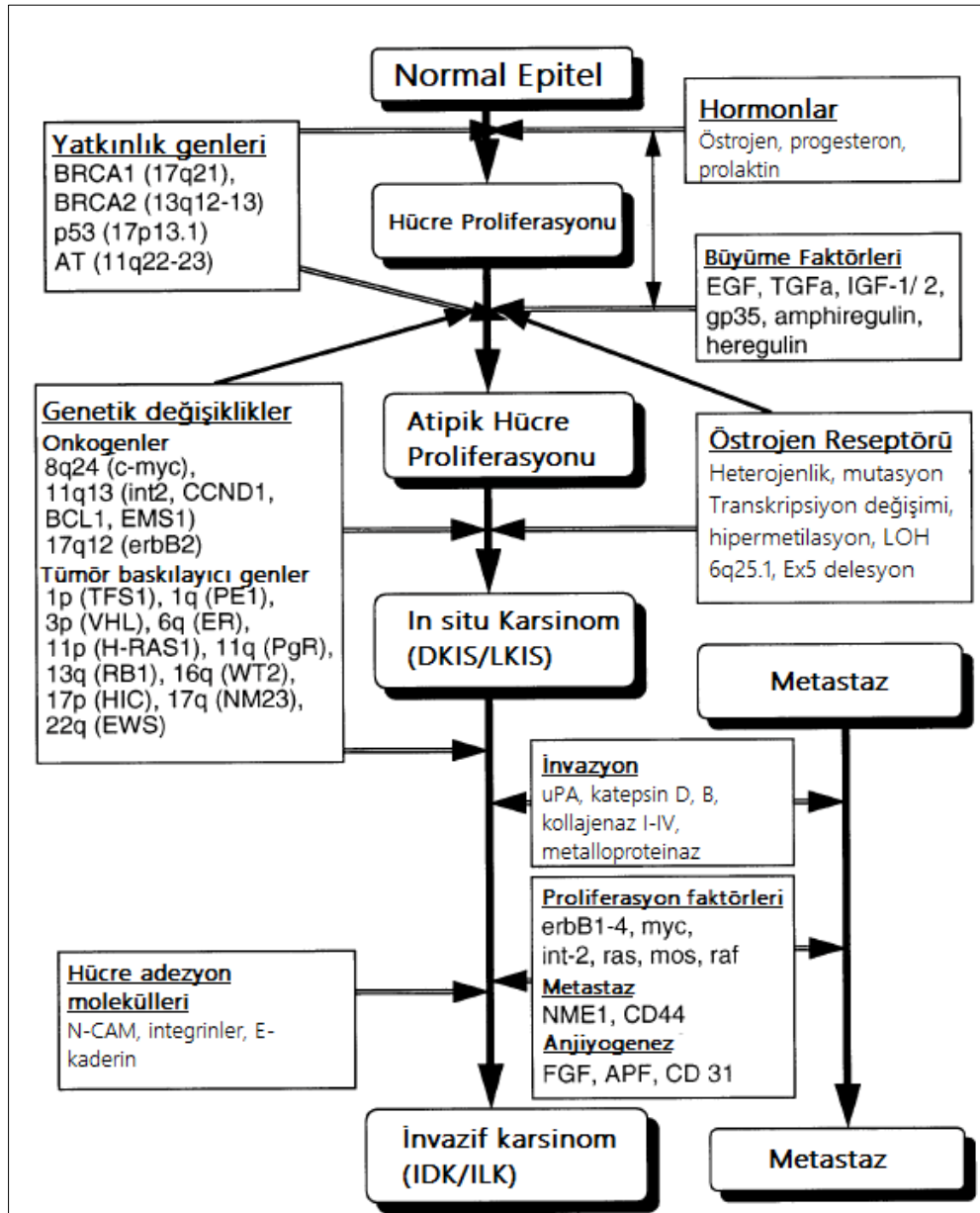


Şekil 2.15. Yaşa göre standartlaştırılmış 2008 yılı meme kanseri insidansı ve ölüm oranları (Jemal ve diğerleri, 2011)

Meme kanseri vakalarının %5-10'u kalıtsal sebeple (ailesel) meydana gelmektedir. Ailesel meme kanserinde, eşey hücrelerde, hücrenin kontrollü büyümesinde rol oynayan bazı koruyucu genlerde mutasyon meydana geldiği görülmektedir. Ailesel meme kanserinde bu yatkınlık genleri *BRCA1* ve *BRCA2* olarak tespit edilmiştir ve eşey hücrelerde bu genlerde mutasyon bulunduran bireylerde, meme kanseri tanı riskinin %50-80 olduğu belirtilmiştir

(Öztürk, 2006). Bunun dışında diğer yüksek risk faktörleri yoğun meme dokusu, erken menarş, geç menopoza, hamileliğin olmaması ve ilk hamileliğin geç olması, hormon değişim terapisi, menopoza sonrası obezite ve alkol kullanımı olarak belirtilmiştir (Henderson, 2015: 4).

Meme kanserindeki mevcut kemoterapi stratejilerinin 10 yıllık hayatta kalma şansını 50 yaşın altındaki kadınlar için %11, 50 yaşın üstündekiler için ise sadece %3 artırdığı görülmüştür. Bu haliyle meme kanseri için kemoterapide kullanılan ilaçların yeterince başarılı olmadığı değerlendirilmektedir (Farquhar, Marjoribanks, Lethaby ve Azhar, 2016).



Şekil 2.16. Meme kanserinin çok aşamalı karsinogenezine ilişkin şema (Beckmann, Niederacher, Schnürch, Gusterson ve Bender, 1997)

2.9. DNA-İlaç Etkileşimi

Patojenik enfeksiyonlardan genetik bozukluklara, nükleik asitler ilaçların hedefi olmuştur. DNA ile etkileşen ilaçlarda, nükleik asitteki kilit bölgeleri hedefleyen küçük moleküller aracılığıyla hücrel süreçlere etki edilir ve tedavi sağlanır. Bu nedenle özgün nükleik asit dizilerine bağlanan ilaçların geliştirilmesi hem akademik hem de farmakolojik çalışmaların odağında olmuştur (Wanunu ve Tor, 2012: ix).

2.9.1. DNA-ilaç etkileşim mekanizmaları

Küçük moleküller DNA'ya kovalent ya da kovalent olmayan yollarla bağlanabilir (Waring, 1981). DNA-ilaç etkileşiminin çalışıldığı ilk yıllardan bu yana bu moleküllerin bir kısmının kovalent bağ ile DNA'ya bağlandığı (örneğin platinyum antitümör ajanları) bilinirken, bir kısmının da bağ yapmadan etkileşime girdiği düşünülmektedir (Neidle, 1979). DNA'ya kovalent bağlanmayan ilaçlar, kovalent bağlananlara göre daha az sitotoksiktir.

DNA ile etkileşime giren maddeler genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

1. *Alkilleyici ajanlar:* DNA'ya kovalent olarak bağlanırlar. Dacarbazine, temozolomide gibi antikanser ilaçlar alkilleyici ajanlara örnek olarak verilebilir. Bu ajanlar DNA'ya guanin ile reaksiyona girerek etkileşime girer. Aynı zamanda DNA'ya metil vb. alkil grubu ekleyerek yanlış kodlamaya sebep olmaktadır. Alkilleyici ilaçlar üç mekanizmada DNA ile etkileşime geçmektedir. Birinci mekanizmada alkilleyici ajan bir alkil grubunu DNA bazlarına bağlayarak DNA'nın tamir enzimleri tarafından parçalanmasına sebep olur. İkinci mekanizmada alkilleyici ajanlar iki DNA dizisinin çapraz bağlanmasına sebep olur, böylece DNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonu önlenmiş olur. Üçüncü mekanizmada ise alkilleyici ajanlar, mutasyona sebep olan nükleotidlerde yanlış eşleşme vb. hatalara sebep olarak hücreyi apoptoza sürükleyebilir.
2. *Çapraz bağlanan ajanlar:* Sisplatin, karboplatin gibi platinyum kompleksleri bu sınıfa girer. Bu ajanlar da DNA'ya kovalent etkileşimle, iplik içi (intrastrand) ya da iplikler arası (interstand) çapraz bağlanır.
3. *İnterkalatör ajanlar:* Bu ajanlar kovalent olmayan bir şekilde DNA ile etkileşir. İnterkalatör ajanlar Watson-Crick hidrojen bağlarını kırmaz, heliks yapısında

konformasyon değişikliğine sebep olur. DNA'ya bağlanmayı da yük transferi, hidrojen bağları ve elektrostatik kuvvetlerle gerçekleştirir. İnterkalasyon mekanizmasıyla etki eden ilaçlara örnek olarak antrasiklinler (doxorubicin, epirubicin ve daunorubicin) verilebilir. İnterkalatör ilaçların moleküler etki mekanizmasının iki ihtimalle gerçekleşmiş olabileceği önerilmektedir; birincisi ilacın DNA'nın dışında, düzensiz bir değişim olmasını bekleyerek araya girmesi, ikincisi ise ilacın boşluğun oluşmasını uyarması ve araya sokulması. Bu ajanlar aynı zamanda topoizomerez I ve topoizomerez II enzim aktivitesini inhibe ederek hücre ölümüne sebep olmaktadır.

4. *DNA zincir kırıcılar:* Bazı maddeler interkalatör olarak DNA baz çiftlerinin arasında girdikten sonra oluşturdıkları radikaller ile zincirin kırılmasına sebep olabilir. Bu mekanizmadaki ilaçlara örnek olarak bleomycin ve enediyan antibiyotikleri verilebilir.
5. *DNA oluklarına bağlananlar:* DNA'nın büyük ve küçük oluklarına bağlanan maddeler/ilaçlar genellikle nükleotid bazlarındaki fonksiyonel gruplarla H bağı yaparak etkileşime girer. Küçük oluğa bağlanan ilaçlar genellikle dar kavisli şekle sahiptir ve küçük oluğun kavisine izohelikal olduğu için van der Waals etkileşimiyle oluğa bağlanabilir. Oluğa bağlanan moleküller genellikle adenin-timince zengin dizilere bağlanır. Bunun, adenin-timince zengin bölgelerin guanin-sitozince zengin oluk bölgelerine göre daha dar olmasının sterik açıdan avantajı olmasından ve daha iyi van der Waals etkileşimine girecek şekilde adenin-timin bölgelerinin elektronegatif cep oluşturma eğilimi bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Duocarmycin, netropsin bu tür ilaçlara örnek verilebilir. Büyük oluğa bağlanan ve akridin türevlerini içeren oligonükleotidlerin bağlanma durumu, üçlü sarmal yapı oluşturmaları, absorpsiyon, floresans spektroskopisi ve ayakizi deneyleri ile gösterilebilmektedir.
6. *Dıştan bağlanma:* Bu bağlanma elektrostatik olarak gerçekleşir. Bu etkileşim genellikle ligandın, ligand molekülleri arasındaki şarj-şarj itici gücünü azaltmak için anyonik DNA omurgası üzerinde daha yüksek dereceli kümeler oluşturmaları durumunda ortaya çıkar. Mg^{2+} gibi katyonlar ve metal kompleksleri DNA ile bu şekilde etkileşmektedir (Nussbaumer, Bonnabry, Veuthey ve Fleury-Souverain, 2011; Çeken Toptancı, G. Kızıl ve M. Kızıl, 2016; Sirajuddin, Ali ve Badshah, 2013; Li ve Crothers, 1969; Wilhelm ve diğerleri, 2012; Sun ve diğerleri, 1989; Kelly, Tossi, McConnell ve OhUigin, 1985).

DNA sadece kodlanmış DNA dizilerden oluşmamıştır, aynı zamanda DNA'ya bağlayan proteinleri de taşıyan bir iskeledir. Bu nedenle DNA etkileşimine giren ilaçların, DNA

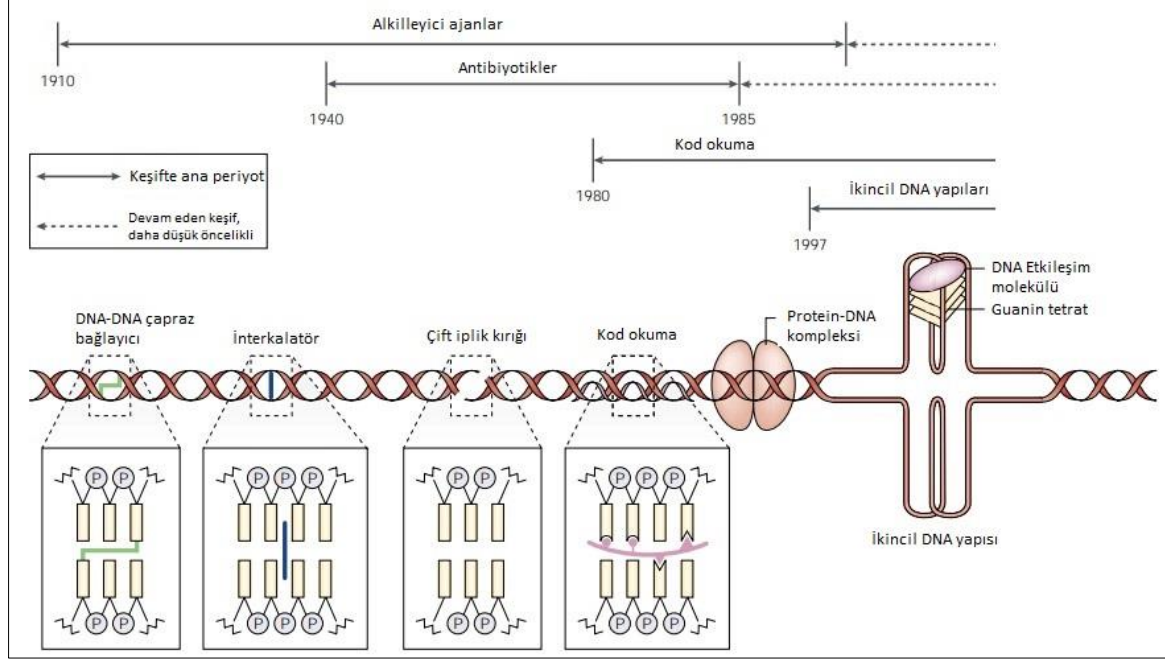
paketlemesi, replikasyon, rekombinasyon, transkripsiyon ve onarım gibi normal hücresel gelişimin sağlanmasında görev alan bu proteinler ile ilgili süreçlere müdahale etmesi beklenir. Bazı DNA etkileşimli ilaçların etki mekanizmaları ve tedavisinde kullanıldığı kanser türleri Çizelge 2.9’da verilmiştir (Hurley, 2002).

Çizelge 2.9. DNA etkili bazı ilaçların ayrıntılı etki mekanizmaları ve tedavisinde kullanıldığı kanser türlerine örnekler (Hurley, 2002)

İlaç	Etki mekanizması	Klinik kullanımına örnek
Siklofosfamid	DNA’ya iplikler arası (interstrand) çapraz bağlanır.	Nöroblastoma, retinoblastoma, non-Hodgkin lenfoma, meme ve küçük hücreli akciğer kanseri
Mitomycin C		Mide ve gastrointestinal sistem kanserleri
Melphalan		Multipl miyelom
Sisplatin	DNA’ya iplik içi (intrastrand) çapraz bağlanır.	Testis, yumurtalık, baş ve boyun kanserleri
Doxorubicin	Topoizomeraz II-DNA ayrılma kompleksini düzenler.	Rabdomiyosarkom, endometriyal kanser, meme kanseri, yetişkin akut lösemi, mide ve rahim ağzı kanseri
Etoposid		Testis, küçük hücreli akciğer kanseri
Mitoksantron		Lösemi, meme, yumurtalık, prostat kanseri
SN-38	Topoizomeraz I-DNA kompleksini düzenler.	Kolon kanseri
Et-743	Ksenobiyotiklerin hücreden atılmasını sağlayan, dolayısıyla ilaçların hücre içi konsantrasyonunu ayarlayan P-glikoprotein (p-gp)’i sentezleyen MDR-1 geninin (Başar, 2006) tersine çevrilmesini sağlar.	Sarkomalar
Actinomycin D	DNA yönlendirmeli RNA sentezini inhibe eder.	Yumuşak doku sarkomalar, Ewing’s sarkoma, Wilms Tümörü

Özellikle kanser ilaç çalışmalarında DNA’nın hedef alındığı çalışmaların tarihçesi Şekil 2.17’de gösterilmiştir. 1910’lardan günümüze DNA ile etkileşime giren ajanların keşfi ile

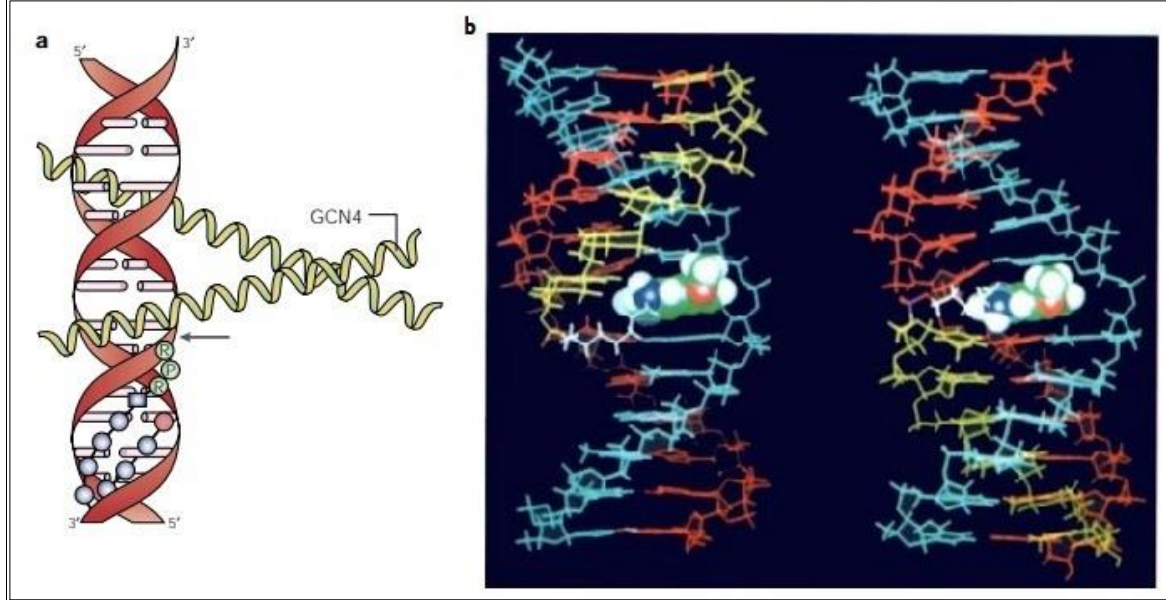
ilgili zaman çizelgesinde, DNA üzerinde oluşabilecek modifikasyonlara sebep olan moleküller (çapraz bağlayıcılar, interkalatörler, çift iplik kırıcılar, kod okuyucular) ile DNA sarmalıyla ilişkili topoizomerez II gibi proteinler ve G-dörtlü gibi ikincil DNA yapıları gösterilmiştir (Hurley, 2002).



Şekil 2.17. DNA ile etkileşime giren moleküller ve DNA ile moleküler etkileşimleri (Hurley, 2002)

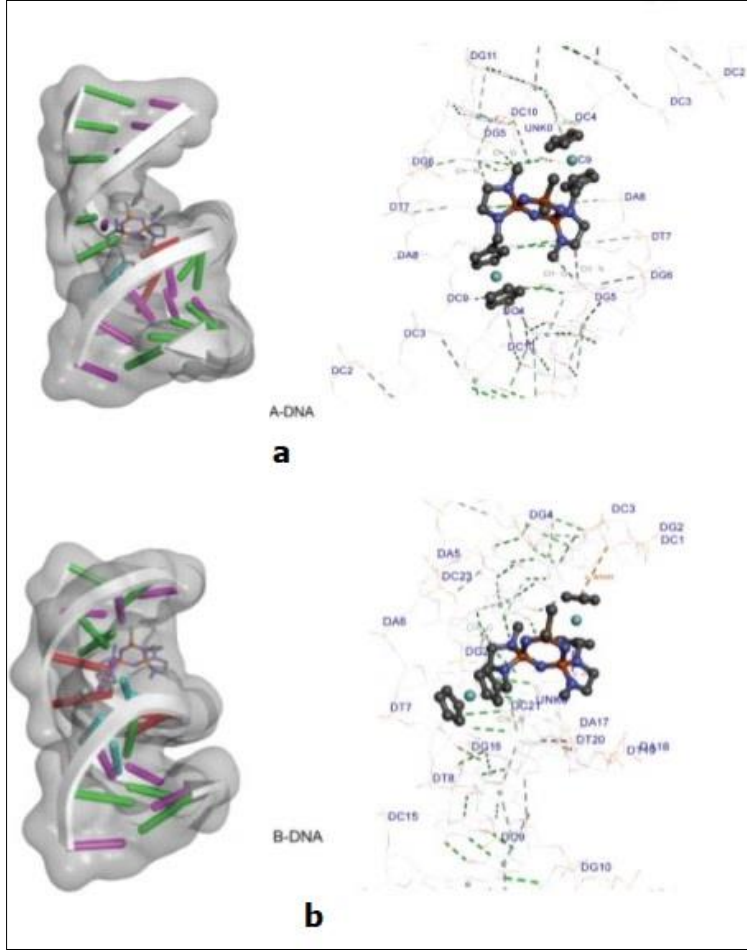
Antikanser ilaçlardan biri olan doxorubisin bir antibiyotiktir ve 1960'lardan bu yana kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Hurley, 2002). Küçük bir molekül olan actinomycin D'nin 1964 yılında DNA etkileşiminde dizi seçici olabileceği gösterildiğinden bu yana (Reich ve Goldberg, 1964), önce DNA'nın küçük oluşunu tanıyan polipirol antibiyotikler (distamycin A ve netropsin) (Nelson, 2007), ardından büyük oluşu tanıyan ve Hoogsteen veya tersine Hoogsteen hidrojen bağları ile üçlü DNA sarmalları oluşturabilen oligonükleotidler keşfedildi (Thuong ve Hélène, 1993). DNA'nın küçük oluşuyla etkileşime giren moleküllere örnek Şekil 2.18-a'da (Hurley, 2002), büyük oluşuyla etkileşen moleküller ise Şekil 2.18-b'de gösterilmiştir. Şekil 2.18-a'ya göre poliamit polipeptit kuyruğu (RPR) küçük oluk ile etkileşerek transkripsiyon faktörünün (GCN4) DNA'ya bağlanmasını sterik olarak önler, bu nedenle GCN4 büyük oluktan bağlanır. RPR ile GCN4 arasındaki sterik çatışmanın aynı anda bağlanmayı önlediği ok ile gösterilmiştir (Hurley, 2002). Şekil 2.18-b'de bir interkalasyon ajanı olan 9-amino-6-kloro-2-

metoksiakridinin DNA'nın büyük oluğu ile etkileşimi ve oluşan üçlü sarmal yapının moleküler modellemesi gösterilmiştir (Thuong ve Hélène, 1993).



Şekil 2.18. a) GCN4'ün DNA'ya büyük oluktan bağlanması (Hurley, 2002). b) 9-amino-6-kloro-2-metoksiakridinin DNA'nın büyük oluğu ile etkileşimi ve oluşan üçlü sarmal yapının moleküler modellemesi (Thuong ve Hélène, 1993)

Bileşiklerin DNA ile etkileşiminde hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler ve enerji durumlarının görülmesi için çeşitli moleküler analizler yapılmaktadır. Tümer ve diğerleri (2018)'in yapmış olduğu bir çalışmada dispiroferrosenilfosfazen bileşiğinin moleküler yerleştirilmiş pozları ve bileşiğin A-DNA (a) ve B-DNA (b) ile bağlanma etkileşimleri gösterilmiştir (Şekil 2.19). Şekil 2.19'da bileşiklerin ikili sarmalın ana oluğu içine bağlandığı görülmektedir (Tümer ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.19. Dispiroferrosenilfosfazen bileşiğinin moleküler yerleştirilmiş pozları ve bileşiğin A-DNA (a) ve B-DNA (b) ile bağlanma etkileşimleri (Tümer ve diğerleri, 2018)

2.9.2. DNA-ilaç etkileşiminin tespitinde kullanılan yöntemler

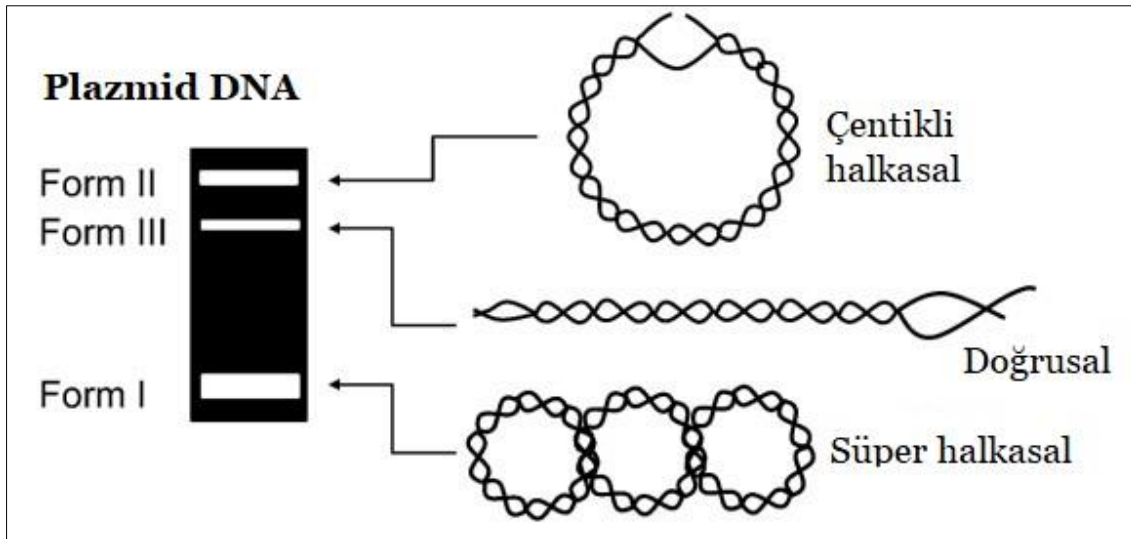
Son yıllarda ilaç potansiyeli bulunan doğal veya sentetik küçük moleküllerin DNA ile etkileşimine ilişkin çok sayıda çalışma yapılmakta, böylece ilaç etkisinin moleküler mekanizmalarını aydınlatmak ve özgün DNA hedefli ilaç tasarlamak hedeflenmektedir (Li, Ma, C. Yang, Guo ve X. Yang, 2005). Antikanser ilaçların DNA bağlanmasına ilişkin yapılan *in vitro* çalışmalarla bileşiklerin DNA ile nasıl etkileşime girdiği aydınlatılmaya başlanmıştır. *In vitro* çalışmalarla DNA etkileşiminin DNA interkalasyon, DNA oluk bağlanma ya da topoizomerazların inhibisyonu yoluyla olma durumu ortaya konulabilirken, hücre temelli çalışmalarla da bileşiğin doğrudan hücredeki DNA üzerindeki etkisi gösterilebilmektedir (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007).

DNA'nın arasına giren maddeler (interkalatör ajanlar) DNA bazları arasına girerek DNA'nın uzunluğunu artırır ve sarmal bükümün azalmasına neden olur. Bu maddeler antikanser, anti-sıtma, antibiyotik, antifungal, antineoplastik ilaçlarda kullanılmasına rağmen hepsi genotoksik etki göstermez. Genellikle bazik, katyonik ve elektrofilik grup bulunduranlar genotoksisiteye sahiptir. DNA oluşuna bağlanan maddeler ise DNA konformasyonunda büyük değişikliklere sebep olmaz ve genellikle küçük oluşa moleküller arası etkileşimle bağlanan, hilal şekilli moleküllerdir. DNA-ilaç etkileşimine giren ilaçlar genellikle interkalatör ajanlar ve oluşa bağlanan bileşikler olarak sınıflandırılrsa da antrasiklinler hem interkalatif birimlere hem de oluşa bağlanan yan zincire sahiptir (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007).

Bir maddenin DNA'ya olan etkisini ortaya koymak ve ne tür bir etkileşme olduğunu (interkalasyon, elektrostatik bağlanma, çapraz bağlanma) araştırmak için kullanılan bazı yöntemler aşağıda kısaca açıklanmıştır:

1. *UV-görünür bölge (visible) absorpsiyon spektroskopisi*: Küçük moleküllerin DNA ile etkileşimini ortaya koymak için yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. DNA-madde kompleksinin absorbansta meydana getirdiği değişiklikler (hipokromik ve hiperkromik etki) yorumlanarak bağlanmanın çeşidi hakkında fikir edinilebilir (Arjmand, Parveen, Afzal, Toupet ve Ben Hadda, 2012).
2. *Floresans emisyon spektroskopisi*: Çoğunlukla küçük ligand moleküllerin DNA'ya bağlanma durumu araştırılırken kullanılır. Yüksek duyarlılıkta ve seçicilikte, geniş doğrusal konsantrasyon aralığında çalışma imkânı tanır (Sirajuddin, Ali ve Badshah, 2013).
3. *Dönüşümlü voltametri*: Özellikle metal bileşiklerinin DNA'ya interkalasyonu araştırılırken UV-görünür bölge spektroskopi ile birlikte kullanılır (Sirajuddin ve diğerleri, 2013).
4. *Viskozimetri*: Araştırılan DNA-madde (ilaç) kompleksinde interkalasyon olma durumunda DNA'nın boyunun değişmesine dayanarak ölçüm yapılan bir yöntemdir (Caymaz, 2019).
5. *DNA erime noktası değişimi*: DNA içine molekülün interkalasyon yapma durumunda heliks sarmalının stabilitesi değiştiğinden erime sıcaklığında da değişiklik meydana gelir. Bu değişim UV absorpsiyonu kullanılarak tespit edilebilir (Kumar, Turner ve Asuncion, 1993).

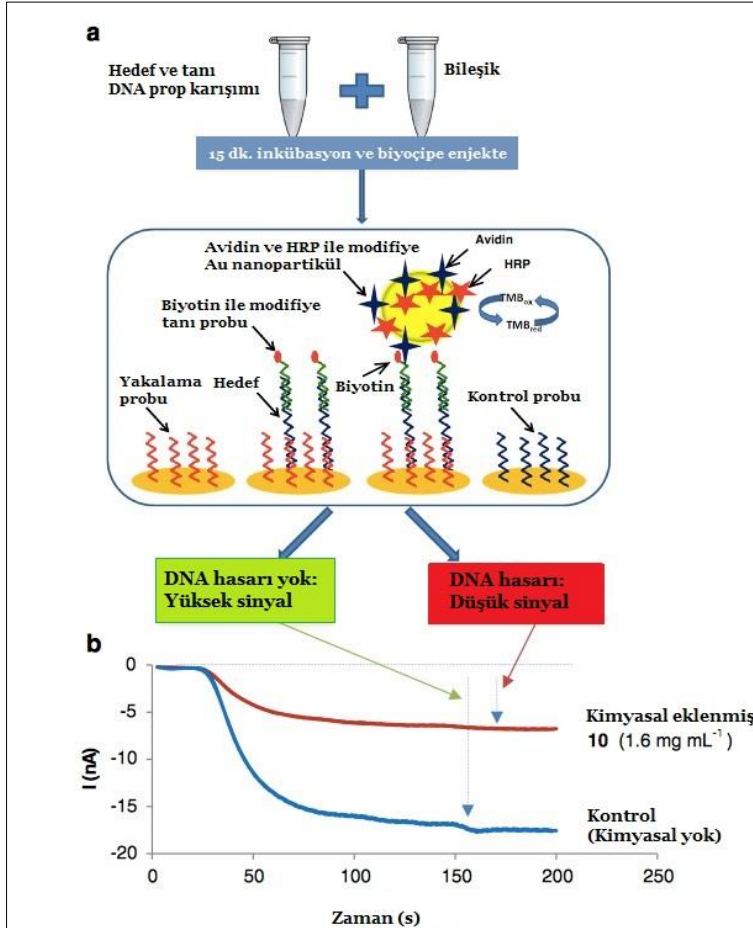
6. *Agaroz Jel Elektroforezi*: Radyoizotop kullanımı ya da ultrasantifüjleme gibi teknikler gerektirmeyen bu yöntemde özellikle plazmit DNA'ların kütleindeki değişimler jeldeki DNA göçünün tahmin edilmesiyle ortaya konulabilir (Meyers, Sanchez, Elwell ve Falkow, 1976). Plazmit DNA'nın ilaç ya da madde gibi dış bir etki tarafından kesilmesi durumunda süpersarmal yapısında değişiklik meydana gelir ve bu konformasyon değişiklikleri elektroforezdeki göç hızını etkileyeceğinden jelde gözlemlenebilir. Bir plazmit DNA'nın farklı konformasyonlarının agaroz jel elektroforezinde görüntülenme durumu Şekil 2.20'de gösterilmiştir. Plazmit DNA'nın normal süpersarmal formu elektroforezde en uzağa göç edendir ve Form I olarak gösterilir. DNA'nın tek zincirindeki kırılma Form II ile gösterilen "Çentikli, açık halkasal form"un oluşmasını, iki zincirin kırılması ise Form III ile gösterilen doğrusal formun oluşmasına neden olur (Caymaz, 2019). Jel elektroforezi aynı zamanda topoizomerez çalışmaları için de kullanılabilir. Bu çalışmalarda insan tipi topoizomerez I (Topo I) ile muamele edilen süpersarmal plazmitin bileşik varlığındaki görünümü araştırılır, jeldeki süpersarmal ya da doğrusal görünüm Topo I'in bileşik tarafından inhibe edilme durumuyla ilgili bilgi verir. Bu inhibisyon katalitik yolla (nonkovalent) ya da zehirlenme yoluyla olabilir. Eğer bileşiğin konsantrasyonuna bağlı olarak DNA'nın çentikli formu (Form II) artıyorsa bileşiğin bir topoizomerez I zehiri olduğu yorumlanabilir (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007).



Şekil 2.20. Plazmit DNA'nın farklı konformasyonlarının agaroz jel görüntüsü (Caymaz, 2019)

7. *Elektrokimyasal DNA biyosensörleri*: Bu yöntemle, özellikle DNA-ilaç etkileşimine yönelik çalışmalarda, DNA'nın bir bazında meydana gelen değişiklikler tespit edilerek

DNA-ilaç etkileşim yapısı hakkında bilgi edinilir (Turan, 2009). Örnek olarak, Yenilmez Çiftçi ve diğerleri (2017) tarafından yapılan paraben süstitüe siklotrifosfazenlerin DNA zararına ilişkin elektrokimyasal biyosensör çalışmasının şeması Şekil 2.21’de verilmiştir. Paraben süstitüe siklotrifosfazenlerin DNA etkileşimini, altın nanopartiküller ve otomatik elektrokimyasal biyosensör (MiSens®) kullanılarak çalışılmasına ilişkin genel şema (a) ve biyosensör test sonucunda elde edilen amperometrik ham veri sonuçları (b) gösterilmiştir (Şekil 2.21). Literatürdeki potansiyostat cihazları kullanılarak manuel olarak yapılan biyosensör testlerinin aksine, mikrokışkanların kullanıldığı otomatik biyosensörlerin birkaç bileşiğin / ilacın kısa sürede hızlı ve kolay bir şekilde analiz edilmesini sağlaması nedeniyle daha kullanışlı olduğu öne sürülmektedir.



Şekil 2.21. (a) Otomatik elektrokimyasal biyosensör (MiSens®) çalışmasına ilişkin genel şema ve (b) amperometrik ham veri sonuçları (Yenilmez Çiftçi, 2017).

Son yıllarda küçük moleküllerin moleküler etkileşimlerini ve biyolojik aktivitelerini araştırmak için yeni tarama teknolojileri geliştirilmektedir. Örneğin küçük mikroarraylerin kullanıldığı sistemler ile sadece DNA ile ligand arasındaki etkileşim değil, çoklu

etkileşimleri araştırmak mümkün kılınmıştır. Bunun yanında DNA madde etkileşimini incelemek için matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS), tanımlı bir diziye bağlanma anifitesini belirlemek için ise floresans interkalatör yer değiştirme assay (FID) yöntemleri de kullanılmaktadır (Nelson, Ferguson ve Denny, 2007).

Yeni keşfedilen bir bileşiğin hücrel DNA'yı hedef aldığından şüpheleniliyorsa yukarıda bahsedilen *in vitro* deneyler ile hızlıca DNA etkileşimi ortaya konulabilir. Örneğin bileşiğin UV-görünür bölge absorpsiyonu, DNA varlığında kırmızı bir kayma gösterirse daha kesin bir yöntem için DNA termal denatürasyon çalışmaları uygulanabilir. Bir bileşiğin DNA ile etkileştiği ortaya konulduktan sonra ise bu etkileşimin nasıl olduğuna yorum getirmek gerekir. Bunun için de DNA'nın uzunluğunda meydana gelen değişikliği ortaya koyabilen viskozite ölçümleri yapılabilir (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007).

Bir bileşiğin DNA'ya bağlandığı ortaya konulduktan sonra hangi özel DNA dizisine bağlandığı, elektrik doğrusal dikroizm veya DNaz ayakizi çalışmasıyla ortaya konulabilir (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007).

DNA oluşuna bağlanan yeni bileşiklerin ilaçlarının geliştirilmesine ilişkin yapılan çalışmalarda bir takım moleküler özelliklere dikkat edilir. Örneğin DNA sarmalının küçük oluşunu tamamlayıcı hilal yapısı, elektrostatik etkileşimi ve çözünürlüğü artırmak için pozitif yüklü uçlar, dizi tanıma için H bağı donör/reseptörleri ve termodinamik optimizasyonun sağlanması için esnek bir yapıya ihtiyaç duyulur. Oluğa bağlanan ilaçlarda AT oluşuna bağlanmak daha dar genişlikte, daha az sayıda H bağı ile bağlanma gerektirdiğinden daha sıkı bir bağlanma imkanı sunar ve GC ya da karışık baz çiftlerine sahip oluklara göre daha çok tercih edilebilir (Wilson ve diğerleri, 2005).

2.10. Hücre proliferasyonunun tespiti

Tümörlerin gelişim mekanizmalarının aydınlatılması için hücre proliferasyon hızının tespit edilmesi önemlidir ve bu amaçla sitotoksik aktivite çalışmaları yapılmaktadır. Toksik etkisi araştırılmak istenen maddenin, uygun hücre kültürü kullanılarak, hücre büyüme oranı ve hücrelere verilen zarar durumunun tespitine yönelik yapılan testler “sitotoksikite testleri” olarak adlandırılır (Aslantürk, 2010). Hücre proliferasyon hızının tespitini sağlayan testler

genel olarak, DNA sentezinin (timidin analoglarının DNA'ya katılımının izlenmesi), hücre proliferasyon işaretçilerinin (prolifere hücre çekirdek antijeni için antikörlerin kullanılması), metabolik aktivitenin (MTT gibi tetrazolyum tuzlarının hücre içinde parçalanması) ve ATP varlığının ölçümüne dayanmaktadır (Terzioğlu, Keskin ve Yanıkkaya Demirel, 2013).

Memeli hücrelerdeki sitotoksik aktivite çalışmaları için kolorimetrik testlerle çeşitli hücre sayımı yöntemleri kullanılmaktadır (Mosmann, 1983). Sitotoksikite çalışmalarında kullanılan bazı toksisite göstergeleri birçok hücre içi mekanizma için ortak olan bir toksik bitim noktasının tespitini sağlar. Örneğin hücre kültüründeki değişiklikler kaplama verimi analizi ile, hücre morfolojisindeki değişiklikler faz kontrast mikroskobu ile, hücre proliferasyonundaki değişiklikler hücre sayımı ile, metabolik aktivitedeki değişiklikler enzim aktivitesinin ölçümü ile, hücrenin enerji durumu mitokondri üzerinden değerlendirilerek metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) testi ile tespit edilebilir. Sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılan bazı göstergeler Çizelge 2.10'da verilmiştir (Barile, 2008: 175 – 202).

Çizelge 2.10. Kültür hücrelerinde toksisitenin değerlendirilmesinde kullanılan temel sitotoksik kriterler (Barile, 2008: 175 – 202)

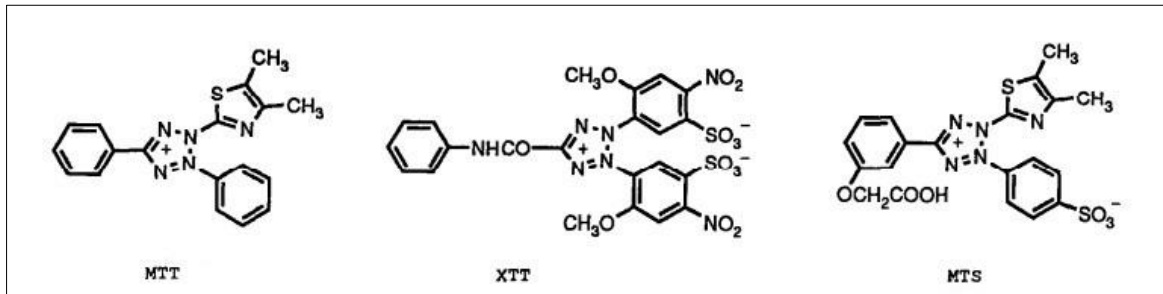
Kriter	Kültür hücrelerinde akut toksisitenin belirlenmesinde kullanılan yöntemler
1 Hücre kültürü özellikleri	Kaplama verimi, fenotipik görünüm kaybı, PDL (popülasyon doubling level)
2 Morfoloji	Faz kontrast mikroskobu analizi
3 Proliferasyon	Hücre sayımı, mitoz frekansı, DNA sentezi
4 Metabolizma	Glikoliziz, protein ve lipit sentezi, enzim aktivitesi
5 Sitoplazmik membran	Markerların (işaretçiler) hücre içine sızması, boyaların tutunması
6 Mitokondri	Mitokondriyal bütünlük, hücre canlılığı (Örneğin metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT)).
7 Lizozom	Boyaların içe alınması (Örneğin Nötr Kırmızı Alım (NRU) testi).
8 Kromozomal değerlendirme	Karyotipik analiz (Örneğin kardeş kromatid değişimi)

Sitotoksik aktivite için kolorimetrik testlerin kullanılmasının avantajı herhangi bir radyoizotop kullanılmasına gerek olmaması ve hızlı, kesin sonuçlara ulaşılabilmesidir. Boyama yöntemleri ile canlı hücre oranları saptanabilir ancak işlem süresini kısaltmak ve

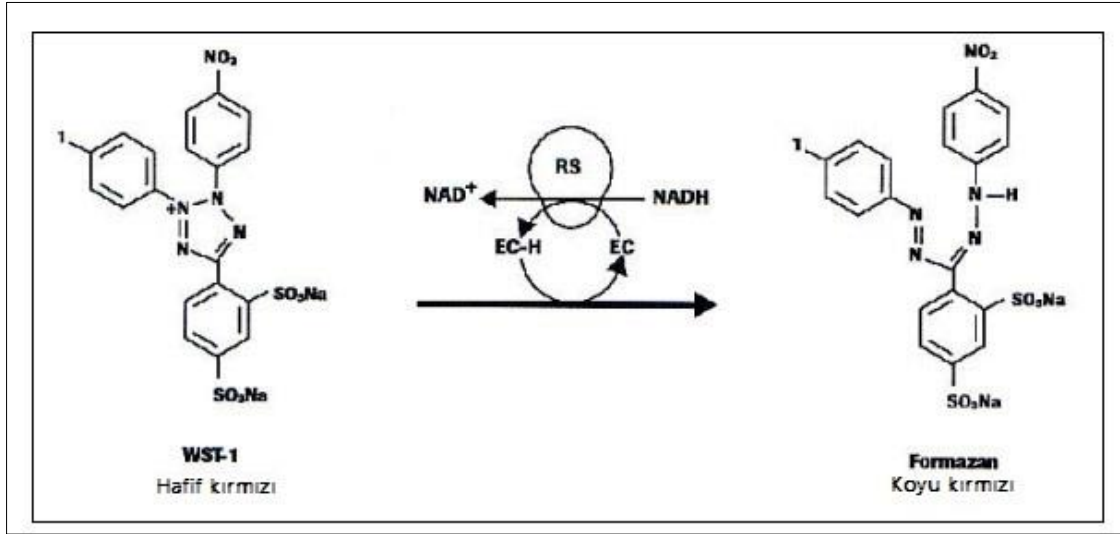
yıkama adımlarından kaçınmak için çok hücreli tarama spektrofotometrileri (ELISA okuyucular) kullanılmaktadır (Mosmann, 1983).

Tetrazolyum tuzu, çeşitli dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesini ölçme yeteneğine sahip olduğu için (Slater, Sawyer ve Sträuli, 1963), memeli hücrelerinin canlılığının ve proliferasyonunun kantitatif kolorimetrik testler ile tespitinde kullanılmaktadır. Aktif tetrazolyum tuzlarının ancak canlı hücrelerdeki aktif mitokondriler tarafından yıkılmasına dayanan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi 1983 yılında geliştirilmiştir. Bu testte MTT'nin canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimi ile formazana dönüştüğü ve normalde sarı renkte olan MTT'nin formazanın koyu mavi-mor rengine dönüştüğü görülmüştür. Bu renk değişiminin optik yoğunluğu ölçülerek hücrelerin canlılığı ile ilgili bilgi edinilebilmektedir. MTT sadece yaşayan hücreler tarafından parçalanırken ölü hücreler ve eritrositler tarafından parçalanamamaktadır (Mosmann, 1983).

MTT testine benzer şekilde farklı tetrazolyum tuzları içeren XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid), WST-1, WST-8 (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum) ve MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum) gibi başka kolorimetrik yöntemler geliştirilmiştir (Tokur ve Aksoy, 2017). MTT, XTT ve MTS bileşiklerinin yapısı (Şekil 2.22) (Barltop, Owen, A. H. Cory ve J. G. Cory, 1991: 611–614) ile WST-1'nin indirgenme mekanizması (Şekil 2.23) (K. M. Kim, S. B. Lee, S. H. Lee, Y. K. Lee ve K. N. Kim, 2005) ilgili şekillerde gösterilmiştir.

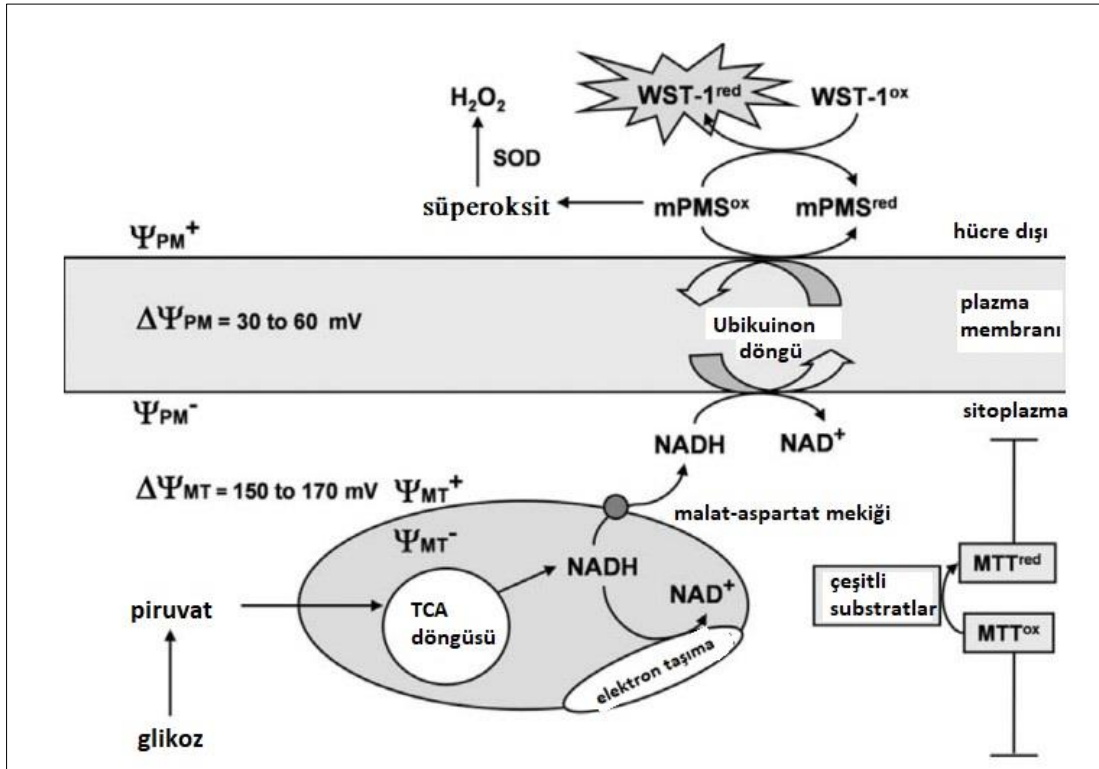


Şekil 2.22. MTT, XTT, MTS bileşiklerinin yapısı (Barltop ve diğerleri, 1991: 611-614)



Şekil 2.23. WST-1 tetrazolyum tuzunun parçalanarak formazana dönüşmesi (Kim ve diğerleri, 2005)

Tetrazolyum tuzlarının hücre içindeki indirgenme mekanizması Şekil 2.24'te gösterilmiştir. MTT tuzu hücre içindeki çeşitli indirgeyiciler tarafından indirgenirken, WST-1, transplazma zarı elektron taşıma sistemi 1-metoksiPMS ile indirgenir. WST-1'nin hücrel indirgeyicisi mitokondriyal sitrik asit döngüsünde ortaya çıkan nikotinamid adenin dinükleotit (NADH)'dır (Berridge, Herst ve Tan, 2005).

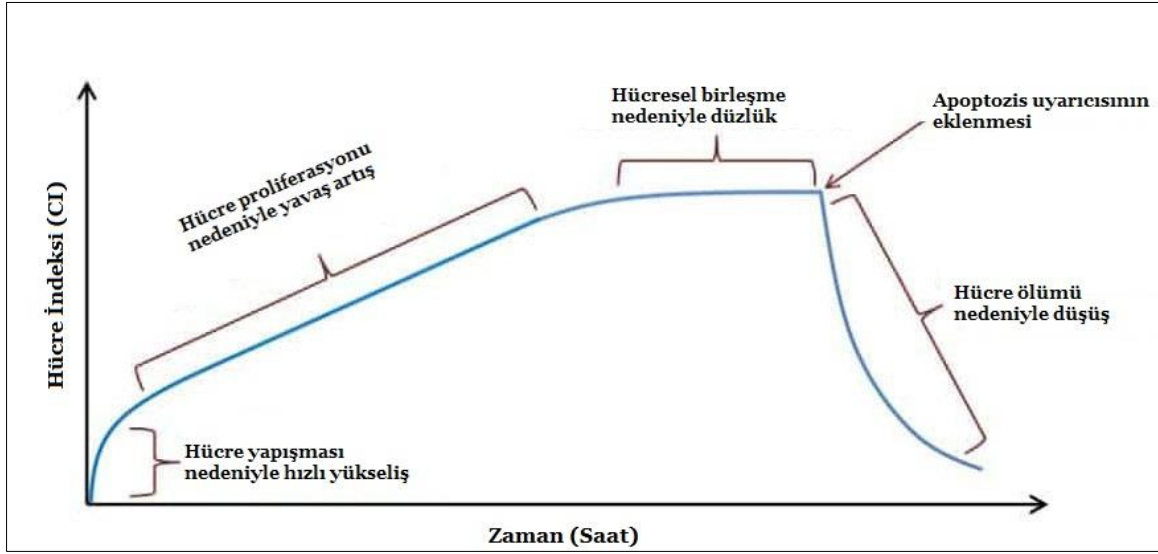


Şekil 2.24. MTT ve WST-1'nin hücre içindeki indirgeme mekanizmasını gösteren şema (Berridge ve diğerleri, 2005)

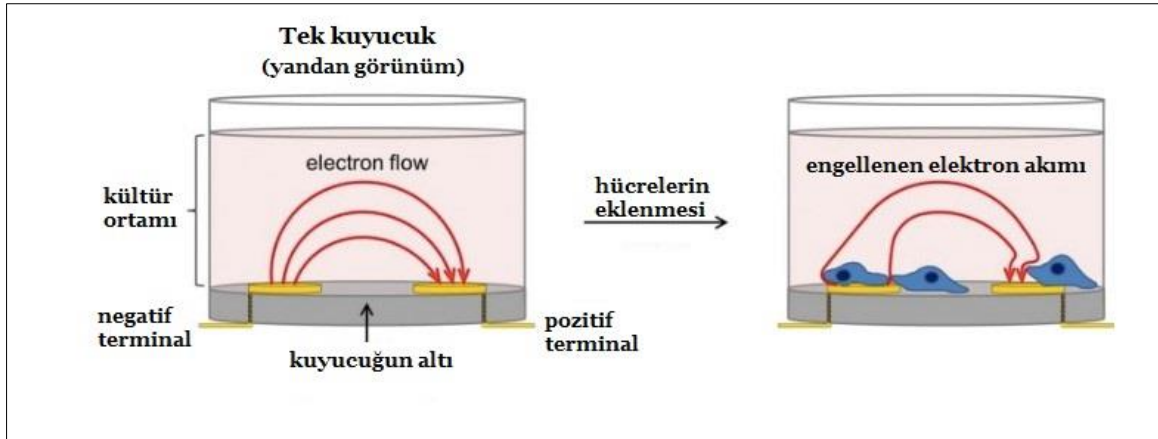
Tetrazolyum tuzlarının kullanılması dışında, sitotoksik aktiviteyi tayin etmekte kullanılan diğer kantitatif yöntemlere örnek aşağıda verilmiştir:

- a. *ATP kantitatif hücre canlılığı testi*: Hücredeki ATP miktarının ölçümüne dayalı olarak hücre sayısının belirlenmesini sağlayan bir homojen luminesans (ışıldamalı) yöntemidir.
- b. *Resazurin indirgenme testi*: Canlı hücrelerin, bir redoks boyası olan resazurini resofurine indirgemesi ve bunun florometrik olarak ölçülmesine dayanır.
- c. *LDH salınımı testi*: Hücre zarı bütünlüğünün tespitine dayalı bu testte, lizise uğrayan hücrelerden salınan laktat dehidrogenaz (LDH), laktatı ve NAD^+ substrat olarak kullanıp NADH'ın üretilmesinde rol oynar. LDH salınımı enzimatik deneyle ve floresan sinyali kullanılarak tespit edilir.
- d. *Kaspaz-3/7 testleri*: Kaspaz-3 ve Kaspaz-7 aktivitesi, apoptozis işaretçisi olarak değerlendirilip, florometrik ya da lüminesans (ışıldamalı) yöntemlerle ölçülebilir (Riss ve Moravec, 2004; Güleş ve Eren, 2008).

Sitotoksikite çalışmaları için kullanılan bir diğer yöntem, hücre proliferasyonunu da tayin etmeyi sağlayan Gerçek Zamanlı Hücre Analizi'dir. Bu analiz E-plakların üzerindeki hücrelerin varlığının, elektrot-çözelti arayüzündeki lokal iyonik ortamı etkilemesi ve empedansın artmasına yol açmasına dayanmaktadır. Ölçülen elektriksel empedanstaki değişiklikten türetilen bir parametre olan hücre indeksi (CI) gerçek zamanlı bir grafikte gösterilerek yorumlanır (Şekil 2.25). Hücrelerin yokluğunda, elektrik akımı kültür ortamı içinde serbestçe akıp elektrotlar arasındaki devreyi tamamlarken, hücreler kuyucuklara eklendiğinde elektrotlara yapışır ve çoğaldıkça akım akışını engeller (Şekil 2.26). Böylece hücre sayısı, hücre boyutu, morfolojisi ve hücre-substrat bağlanma kalitesine ilişkin son derece hassas bilgiler elde edilebilir (Keogh, 2010; Ramis ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.25. Gerçek Zamanlı Hücre Analizinde hücre indeksi-zaman grafiği eğiminde empedans aşamaları ve hücresel davranışı (URL-8, 2019)



Şekil 2.26. Gerçek Zamanlı Hücre Analizindeki hücre inhibisyonunun ölçüm mekanizması (URL-8, 2019)

2.11. Apoptoz ve Nekroz

Bir hücrenin ölümü, hücre zarı bütünlüğünün geri dönüşümsüz olarak parçalanması olarak tanımlanabilir. Memelilerde morfolojik özelliklerine göre üç tip hücre ölüm tipi tanımlanmıştır; apoptoz, otofaji ve nekroz (Golstein ve Kroemer, 2007). Bu tez çalışmasında üstünde durulmuş olması sebebiyle apoptoz ve nekroz mekanizmaları hakkında bilgi verilecektir.

2.11.1. Apoptoz

Apoptoz ya da bir diğer ismiyle programlanmış hücre ölümü, embriyonik gelişimde ve yetişkin bireylerin doku rejenerasyonunda önemli rol oynayan bir mekanizmadır. Apoptozun çeşitli fizyolojik işlevlerdeki rolünün çok kritik olduğu bilinmektedir. Örneğin sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler, hücre içi patojenlere ve kanser hücrelerine doğal ve adaptif bağışıklık yanıtıyla tepki vermek için hedef hücrelerin apoptoza girmesini uyarır. Böylece hücrel stres ya da yaralanmadan kaynaklı genetik hataların oluşmasını engeller ve genomik bütünlüğün korunmasına hizmet eder, bu açıdan önemli bir tümör gözetimi mekanizması oluşturur (Ravi ve Bedi, 2003: 1).

Apoptoz homeostazla ve kanser, edinilmiş immün yetmezlik sendromu ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Steller, 1995). Apoptoz, aktif ve doğal olarak programlanmıştır, fizyolojik ya da patolojik çeşitli çevresel uyarıcılar tarafından başlatılabilmekte veya inhibe edilebilmektedir (Kerr, Wyllie ve Currie, 1972). Apoptoz süreci belirgin morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal reaktörlerle karakterize edilir (Elmore, 2007). Apoptozun ilk aşamasında hücreler küçülür ve hücre çekirdeği yoğunlaşır. Ardından hücre, hücre zarıyla çevrili parçalar halinde parçalanır. Bir hücredeki apoptoz belirteçleri, kaspaz protein ailesinin aktivasyonu, poli ADP-Riboz polimeraz bölünmesi ve DNA fragmentasyonudur (Lakhani ve diğerleri, 2006). Hücrelerin programlı ölümünün yanında hayatta kalması için de çeşitli uyarılara ihtiyacı bulunur ve bu uyarılara genel olarak “trofik faktörler”, bir diğer adıyla “hayatta kalma sinyalleri” adı verilmektedir (Lodish ve diğerleri, 2008/2011).

Apoptozu başlatan üç yoldan söz edilmektedir, bunlar: hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri tarafından yönlendirilen “dışsal yolak”, mitokondrinin aracılık ettiği “içsel yolak” ve granzim/perforin yolağıdır. Tüm yolaklarda hücrel bileşenleri parçalayan kaspazlar rol oynamaktadır (Yıldırım, Koçak ve Cing Yıldırım, 2012). Bu yolaklarda rol oynayan proteinlerin bir kısmı Çizelge 2.11’de verilmiştir. Ölüm reseptörü yolağında tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesi önemli rol oynar. TNF reseptör ailesinin üyeleri sitozince-zengin hücre dışı ölüm domaini adı verilen yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik domaine sahiptir ve domainler ölüm sinyalinin hücre dışından hücre içine aktarılmasından sorumludur. Mitokondriyal yolakta görev alan Bcl2 protein ailesi üyeleri ise mitokondriyal zarın geçirgenliğini düzenleyerek sitokrom C (Cyt c)’nin

salınımını kontrol eder. Yaklaşık 25 üyeye sahip olan Bcl2 protein ailesi pro-apoptotik ya da anti-apoptotik olarak rol oynayabilir. Puma ve Noxa proteinleri p53 aracılı apoptozda, pro-apoptik olarak görev alır. Myc onkoproteini p53 bağımlı ve bağımsız apoptozda aracıdır (Elmore, 2007).

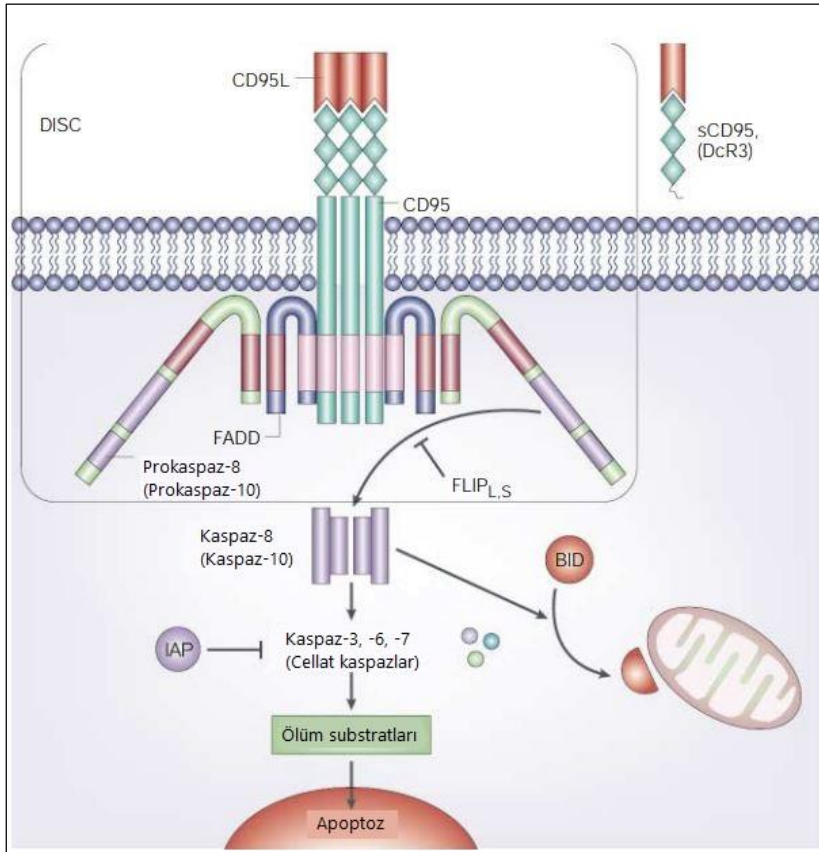
Çizelge 2.11. Apoptozda rol alan proteinlerden bazıları (Elmore, 2007)

Apoptoz yolağı	Proteinin kısaltması	Protein
Ölüm reseptörü yolağı (dış yolak)	TNF- α	Tümör nekroz faktörü alfa
	TNFR1	Tümör nekroz faktörü reseptörü 1
	FasL	Yağ asidi sentetaz ligandı
	FasR	Yağ asidi sentetaz reseptörü
	Apo3L	Apo3 ligandı
	Apo2L	Apo2 ligandı
	DR3	Ölüm reseptörü 3
	DR4	Ölüm reseptörü 4
	DR5	Ölüm reseptörü 5
	FADD	Fas ile ilişkili ölüm domaini
	TRADD	TNF reseptörü-ilişkili ölüm domaini
	RIP	Reseptör aktive edici protein
	DED	Ölüm etkileyici domaini
	FLIP	FLICE inhibe edici protein
Mitokondriyal yolak (iç yolak)	Smac/DIABLO	İkinci mitokondri türevli kaspaz aktivatör/düşük pI'ya sahip doğrudan IAP bağlama protein
	HtrA2/Omi	Yüksek sıcaklık ihtiyaç proteinini
	IAP	Apoptoz inhibitör proteinleri
	Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör
	AIF	Apoptoz indükleyici faktör
	Bcl-2	B-hücre lenfoma proteinini 2
	BAX	BCL2 ilişkili X proteinini
	CAD	Kaspazla aktifleşen DNAaz
	BAK	BCL2 antagonisti öldürücü 1
	BID	BH3 etkileşim domain ölüm reseptörü
	BAD	BCL2 hücre ölümü antagonisti
	BIM	BCL2 etkileşimli protein
	BIK	BCL2 etkileşimli öldürücü
	Puma	BCL2 bağlayıcı komponent 3
	Noxa	Forbol-12-miristat-13-asetat-indükleyici protein 1
	Myc	Onkogen Myc

Ölüm reseptörü yolağı

Ölüm ligandlarının hücre zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanması ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC)'in oluşumunu sağlar. DISC sinyal kompleksinde prokaspaz-8 veya prokaspaz-10, FADD tarafından tutulur ve otokatalitik bölünme ile aktive edilir. Bir ölüm ligandı olan CD95L'nin örnek alındığı ölüm reseptörü yolağına ilişkin şema Şekil 2.27'de verilmiştir. Fas ilişkili yolda kaspaz-8 tarafından BID'in kırılarak mitokondriyal zararın oluşması, ölüm reseptörü yolağı ile mitokondriyal yolak arasındaki karşılıklı bir konuşma olarak değerlendirilmiştir (Igney ve Krammer, 2002).

Ölüm reseptörü yolağında apoptoz, anti-apoptotik proteinler tarafından birkaç aşamada inhibe edilebilmektedir. Şekil 2.27'de apoptozu inhibe eden mekanizmalara ilişkin örnekler verilmiştir. Örneğin, ölüm ligandı CD95L'nin, çözünebilir CD95 (sCD95) veya decoy reseptörü 3 (DcR3) gibi çözünebilir reseptörler ile CD95'e bağlanması önlenabilir. FLIP'ler DISC kompleksine bağlanıp kaspaz-8'in aktivasyonunu önleyebilir; böylece IAP'lerin inhibitörleri, kaspazları inhibe eder (Igney ve Krammer, 2002).

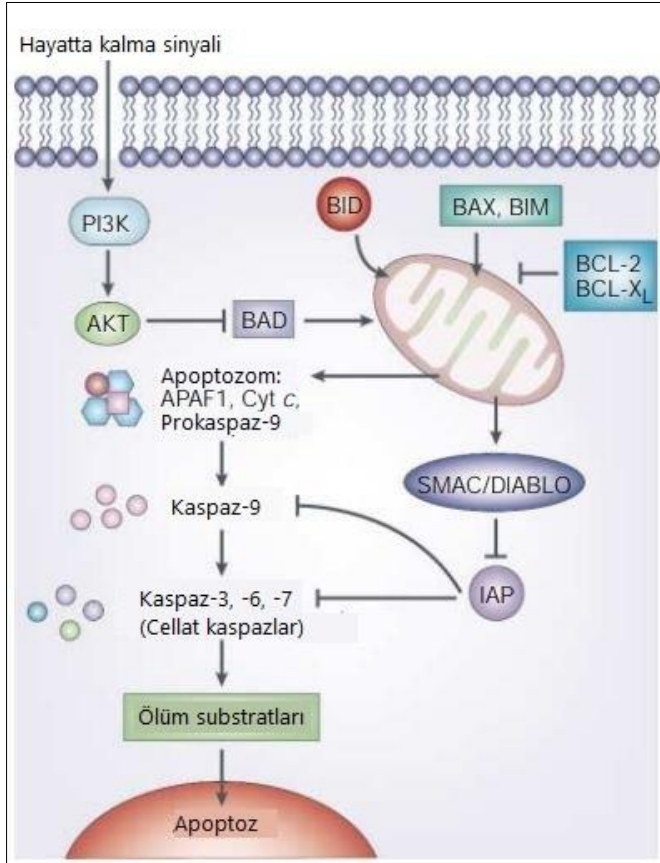


Şekil 2.27. Ölüm reseptörleri yolağında apoptoz (Igney ve Krammer, 2002)

Mitokondriyal yolak

Kemoterapi, ışın tedavisi vb. uyaranlar hücrede mitokondriyal (içsel) yolağı başlatarak apoptoza neden olabilir. Proapoptotik protein ailesi BCL2 (Örneğin BAX, BID, BAD, BIM) bu yolakta önemli sinyal araçlarıdır ve bu araçların mitokondriyi aktiflemesiyle, Cyt c sitozole salınır ve apoptozom oluşturmak üzere apoptotik proteaz aktive edici faktöre (Apaf-1) bağlanır. Apoptozom ile birlikte kaspaz-9 aktive edilir ve diğer uygulayıcı kaspazların aktivitesiyle birlikte apoptoz gerçekleşir (Şekil 2.28) (Igney ve Krammer, 2002).

Mitokondriyal yolaktaki apoptozun inhibe edilmesinde; anti-apoptotik BCL-2, BCL-X_L proteinleri ve Smac/DIABLO tarafından düzenlenen apoptoz inhibitör proteinleri (IAP'ler) görev alır. Bir diğer yol ise sitokin ve büyüme faktörleri gibi hayatta kalma sinyalleriyle fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolunun aktifleştirilmesidir. PI3K, proapoptotik BCL2 familyası üyesi olan BAD'yi fosforile eden ve etkisiz hale getiren AKT'yi aktifleştirir. Bu yol Şekil 2.28'de gösterilmiştir (Igney ve Krammer, 2002).



Şekil 2.28. Mitokondriyal yolakta apoptoz (Igney ve Krammer, 2002)

Perforin/granzim yolağı

Sitotoksik lenfositlerin virüsle enfekte olmuş hücreler ile kanser hücrelerini tanıyıp apoptoz ile yok etmesi ölüm reseptörü yoluyla olabildiği gibi, perforin ve granzim adındaki iki proteinin aktivasyonu ile de gerçekleşebilmektedir. Kanser tedavisinde sitotoksik lenfositlerin aktivitesinden yararlanarak immün temelli tedavi yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu nedenle sitotoksik T hücreleri ve rekombinant antikorlar gibi antitümör sitotoksitesini destekleyen yeni kanser tedavileri, perforin/granzim etki yolundan yararlanmaktadır (Elmore, 2007; Voskoboinik, Whisstock ve Trapani, 2015; Lodish ve diğerleri, 2008/2011).

Perforin/granzim yolağında, hücre zarı yüzeyinde 10-20 nm'lik por oluşumunu sağlayan perforin aracılığıyla açılan porlardan (Şekil 2.29-B), tümör hücreleri ve virüsle enfekte olmuş hücelere sitotoksik etki gösterecek olan sitoplazmik granüller salgılanır. Şekil 2.29'da bu yolak alternatif yolları ile birlikte şu şekilde açıklanmıştır; sitotoksik T hücrelerindeki granüllerde perforin ve granzim depolanmıştır ve T hücresine antijen bağlanmasıyla birlikte bu granüller sinaptik yarığa boşaltılır (A-a). Aktif granzimler bazik proteinlerdir ve granüller içinde negatif yüklü kondroitin sülfat proteoglikanlarla birlikte depolanır. Bu nedenle granüller pH'nı nötr olduğu sinaptik yarığa bırakıldığında granzimler kondroitin sülfat proteoglikandan ayrışır. Granzim B yüzeyindeki korunmuş katyonik domainler hedef hücredeki negatif yüklü zara bağlanıp, endositik veziküllerle hücre içine girebilir. Yeterli sayıdaki perforin ise hücre dışındaki Ca^{2+} ile karşılaşınca hedef hücre zarının lipitinde porların oluşumunu sağlar (A-c). Ancak perforinden kaynaklı bir bozukluk olması durumunda granzimler hücre içine endozomal kaçakçılığı olarak da bilinen endosomolizis ile girebilir (A-b). Bu granüllerde bulunan serin proteazlardan granzim B, proteinleri aspartat kalıntılarına parçalayarak prokaspaz-10'u aktifleştirir. Kaspazların aktifleşmesiyle programlı hücre ölümü gerçekleşebildiği gibi (B), başka bir yolda ise granzim B'nin BID'in yarılmasını sağladığı ve mitokondriden Cyt c'nin salınımı ile mitokondriyal yolun kullanılabildiği ortaya konulmuştur (A-d). Bunun dışında granüllerde bulunan diğer granzimlerin kaspazdan bağımsız diğer hücre ölüm yollarını uyurabildiği görülmüştür (A-e). (Voskoboinik, Smyth ve Trapani, 2006; Elmore, 2007; Lodish ve diğerleri, 2008/2011).

uyarır, kaspaz-12 endoplazmik-özgü apoptozu uyarır ve kaspaz-14 yetişkin dokularda bulunmazken embriyonik dokularda yüksek miktarda ifade edilmektedir (Elmore, 2007; Rastogi, Richa ve Sinha, 2009).

Kaspazlar başlangıçta inaktif zimojenik öncüler olarak üretilirken, çeşitli hücre ölümü uyarıcılarına (apoptotik sinyal kaskadının başında bulunan dimerleştirici adaptör proteinler vb.) cevap olarak aktifleşir. Kaspazlar aynı zamanda translasyon sonrası fosforilasyon ve ubiquitasyon gibi modifikasyonlarla da aktifleşme durumu ayarlanabilir (Parrish, Freel ve Kornbluth, 2013).

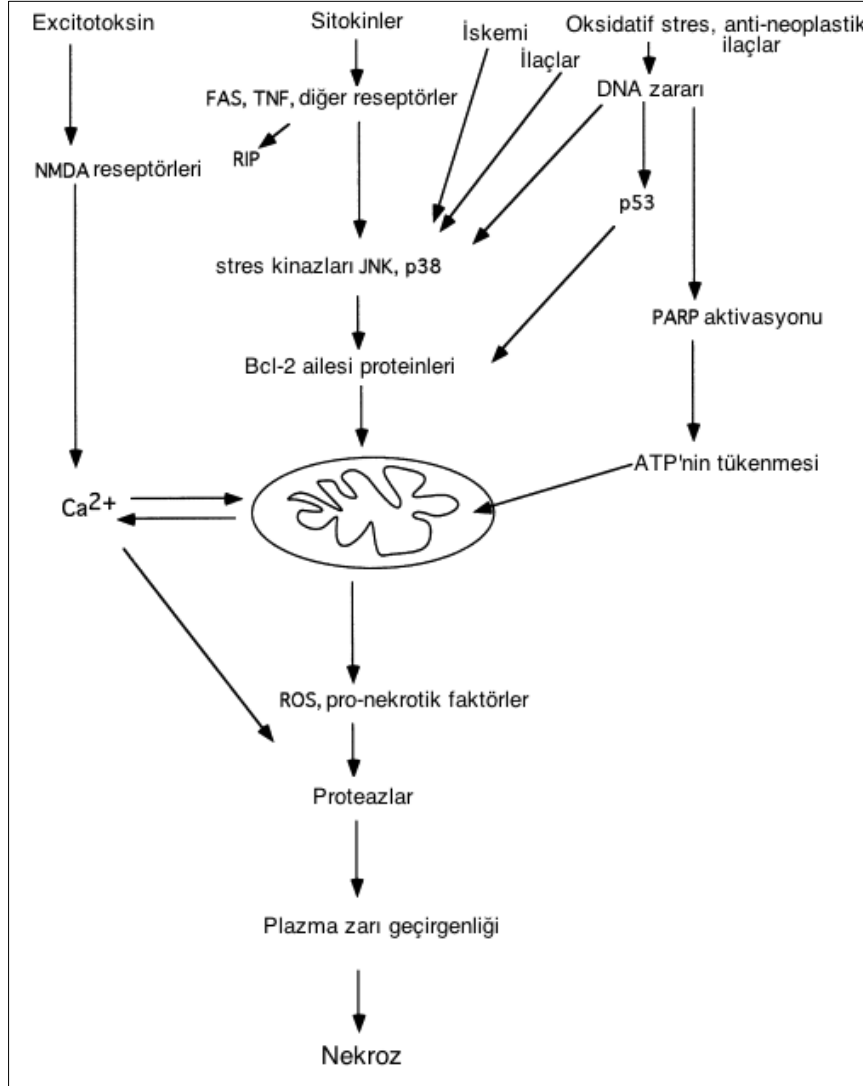
Uygulayıcı kaspazlardan kaspaz-3 ve kaspaz-7 apoptozda aynı zamanda görev alırken farklı rolleri bulunmaktadır. Kaspaz-3 DNA parçalanmasını ve morfolojik değişiklikleri kontrol ederken, kaspaz-7 daha çok hücre yaşamının kaybında rol oynar. Ancak her iki kaspazın da birlikte çalışması apoptoz için önemlidir (Lakhani ve diğerleri, 2006).

2.11.2. Nekroz

Apoptoz veya otofajinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin inhibe edilmesi, hücre ölümü tipinin nekroz olarak değişmesine sebep olabilmektedir. Genel olarak nekroz, genetik olarak kontrol edilmeyen ve rastgele meydana gelen bir ölüm şekli olarak tanımlanmaktadır (Golstein ve Kroemer, 2007).

Nekrozun muhtemel moleküler mekanizması Şekil 2.30'da açıklanmıştır. Nekroz, çeşitli reseptörler, sitokinler, ilaçlar ve DNA hasarı ile uyarılabilmektedir. Nekrozu tetikleyen reseptörler arasında TNF reseptörleri, FAS ve TRAIL reseptörleri, purinojenik reseptörler ve eksitoreseptörler (Örneğin NMDA) bulunur. Reseptörün aracılı olduğu nekrozda Ca^{2+} ikinci haberci olarak rol alır. Bu nedenle bu yolda Ca^{2+} akışının engellenmesi eksitotoksinlerin neden olduğu nekrozu önleyebilir. Bir diğer yolda, büyük DNA kırılmaları, PARP aktivasyonunu uyarak ATP tüketimine sebep olur ve enerji eksikliği nedeniyle nekroza yol açabilir. Radyasyon ya da antikanser ilaçları ile doğrudan oluşan DNA hasarları ile oksidatif stres (örneğin iskemi vb) yoluyla dolaylı yoldan oluşan DNA hasarları da nekrozu tetikleyebilir. Reseptörlerin uyarılması, oksidatif stres ve DNA hasarının hem apoptoz hem de nekroz mekanizmalarını uyarması, bu iki ölüm şeklinde de JNK ve p38'in bulunduğu stres kinazlarının yer alması dikkat çekmektedir. Ancak bu

aktivasyonların hangi durumlarda apoptoza ya da nekroza yol açabildiği henüz açık değildir. Ancak kinazların aktivasyonu ile tetiklenen mitokondriyal hasarın derecesinin hücre kaderini belirliyor olabileceği düşünülmektedir (Proskuryakov, Konoplyannikov ve Gabai, 2003).



Şekil 2.30. Nekrozun moleküler mekanizması (Proskuryakov ve diğerleri, 2003)

Nekroz, uzun süre boyunca programlı hücre ölümü olan apoptoza alternatif olarak kabul edilmiştir. Nekrozun ekstrem koşullarda meydana geldiği bilinmektedir. Ancak son çalışmalar nekrozun normal koşullarda ve programlanmış olarak da meydana gelebildiğini göstermektedir. Aynı çevresel koşullar, örneğin sitokinler, ısı, radyasyon vb. uyaranlar bir hücre popülasyonunda hem apoptoza hem de nekroza sebep olabilmektedir. Bu nedenle kinaz kaskadları, ölüm reseptörleri ve mitokondrideki sinyal yolları her iki ölüm mekanizmasında da rol aldığından, bu yollarda yapılacak değişikliklerle apoptoz ile

nekroz arasında geçişi sağlamak mümkün olabilmektedir. Örneğin apoptozun başlatıldığı hücrelerin, enerji seviyeleri hızla tehlikeye girdiğinde nekroz tarafından ölmeye zorlandığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu nedenle hücre içindeki ATP seviyesi değiştirilerek, apoptotik uyarıların nekroza sebep olması sağlanabilmektedir. Bağışıklık yanıtı, embriyogenez ya da normal doku rejenerasyonunda hücrelerin nekroza uğradığına dair örnekler tespit edildiğinden, nekrozun programlanmış hücre ölümünün özgün bir fazı olduğu düşünülmüştür. Bundan yola çıkarak nekroz ve apoptoz arasındaki ince dengenin bozulmasının bazı hastalıkların gelişiminde önemli bir unsur olabileceği düşünülmektedir. Nekrotik hücre ölümüyle ilgili patogenezi bulunan hastalıklara örnekler Çizelge 2.12’de verilmiştir (Proskuryakov ve diğerleri, 2003; Nicotera ve Melino, 2004).

Çizelge 2.12. Nekrotik hücre ölümüyle ilişkili hastalıklar (Proskuryakov ve diğerleri, 2003)

Hastalık	Hücreler/uyarıcılar
Enfeksiyon	Lenfostiler/HIV virüsü Karaciğer hücreleri/ <i>Mycobacterium avium</i> Nötrofiller/ <i>Shigella flexneri</i> Makrofajlar/ <i>Salmonella typhi</i>
Alzheimer hastalığı	Nöronlar
Creutzfeldt–Jakob hastalığı	Nöronlar
Epilepsi	Nöronlar
İnflamatuvar hastalıklar	Adacık hücreleri/diyabet Nötrofiller, Endoteryal hücreler/inflamatuvar sitokinler Karaciğer hücreleri
İskemi	Çeşitli hücreler

Apoptoz ile nekrozun mekanizmalarındaki bu benzerliklerin yanında, meydana getirdiği sonuçlarda farklılıklar görülmektedir. Örneğin nekrozda hücre zarı zarar gördüğünden, sitozolik bileşenler hücre dışı boşluğa dökülüp inflamatuvar yanıtı sebep olabilirken, apoptoz sırasında sitozolik ürünler, zarlarla güvenli bir şekilde izole edilir ve makrofajlar tarafından yok edilir. Nekrotik bir hücrenin hücre zarı geçirgenliğinin artması gibi kendine özgü morfolojik özellikleri bulunmaktadır (Proskuryakov, Konoplyannikov ve Gabai, 2003). Genel olarak nekrozun morfolojik özellikleri ve sonuçları açısından apoptozdan farkları Çizelge 2.13’de verilmiştir (Coşkun ve Özgür, 2011).

Çizelge 2.13. Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (Coşkun ve Özgür, 2011)

Özellik	Nekroz	Apoptoz
Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri	- Hücre zarı bütünlüğü bozulur. - Hücre şişer. - Büyük vakuoller meydana gelir. - Hücre içi organeller parçalanır. - İyon dengesi bozulur. - Fosfatidil serin translokasyonu görülmez. - Enerji (ATP) gerekli değildir. - DNA rastgele parçalanır.	- Hücre zarı bozulmaz. - Hücre büzülür. - Kromatin yoğunlaşması gerçekleşir. - Organeller parçalanmaz. - Fosfatidil serin translokasyonu meydana gelir. - Enerji (ATP) gereklidir. - DNA kırıkları merdiven şeklindedir.
Hücre ölümü sonucu	- Hücreler toplu halde ölür. - Hücre parçalanır ve lizozomal enzimler hücre dışına salınır. - İnflamatuvara sebep olur.	- Hücreler teker teker ya da birkaç tanesi bir arada ölür. - Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. - İnflamatuvara sebep olmaz.

2.11.3. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün tespiti

Hücre canlılığı ve proliferasyonunu ölçmeye dayanan testler dışında, hücre ölümünün gerçekleştiği mekanizmaların da aydınlatılması önem taşımaktadır. Canlı hücreler ile apoptotik, nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan yöntemlere aşağıdaki testler örnek olarak verilebilir:

- Hemotoksilen-eozin (HE) boyama:* Bu boyama ile kromatin boyandığından, çekirdeklerin morfolojisine göre değerlendirme yapılabilir.
- Giemsa boyama:* HE boyamaya benzer şekilde çekirdek morfolojisine bakılarak apoptotik hücreler belirlenebilir.
- Floresan mikroskopi:* DNA'ya bağlanabilen floresan boyaların kromatini görünür kılmasıyla apoptotik hücreler belirlenebilir. Hücre kültürü çalışmalarında tüm hücreleri boyayan Hoechst 33342 boyası ile sadece ölü hücreleri boyayan propidiyum iyodür (PI) beraber kullanılır.

- d. *Diğer mikroskopik yöntemler:* Elektron mikroskopi ile hücre zarı ve çekirdek zarı bütünlüğünün incelenmesi, faz kontrast mikroskopi ile ise apoptotik hücrelerde gelişen cepçiklerin ve sekonder nekroz durumlarının oluş aşamalarının izlenmesi mümkün olabilmektedir.
- e. *Annexin V yöntemi:* Normal hücre zarının iç yüzeyinde olan fosfatidilserinin apoptotik hücrelerde zarın dış yüzüne transloke olması esasına dayanarak kullanılır. Annexin V proteini, apoptotik hücre zarı dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserine bağlanabilir ve floresan bir madde ile işaretlendiğinde hücreler akım sitometri ile ölçülebilir.
- f. *TUNEL (TdT-dUTP nick-end-etiketleme) yöntemi:* Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak, apoptotik fragmentasyon sonrasında oluşan DNA kırıklarının *in situ* olarak işaretlenmesi sağlanır. Ardından enzimatik veya floresan yöntemlerle görüntülenerek apoptotik hücreler diğerlerinden ayırt edilebilir.
- g. *M30 antijen tanıma yöntemi:* Kaspazların sitokeratin 18'i kırması ile ortaya açığa çıkan antijenik bölgenin immünohistokimyasal olarak boyanması ile apoptotik hücreler tayin edilir.
- h. *Tripan mavisi boyama:* Tripan mavisinin canlı hücrelere toksik olmamasından yararlanılarak, hücre kültüründeki nekrotik hücrelerin sayımı ışık mikroskopunda yapılabilir.
- i. *SDS-PAGE ve Western blotlama:* Apoptozla ilişkili proteinlerin (Örneğin *bcl-2*), kaspaz gibi enzimlerle kırılma durumunun tespiti için kullanılabilir (Güleş ve Eren, 2008; Ark, 2017: 109-121; Fricker ve Tolkovsky, 2011: 307-312).

Açıklanan bu yöntemlerin çeşitli avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Hücre zarının geçirgenlik işlevini kaybetmesine dayalı olan yöntemler (örneğin PI boyama) uygulamada pratik ve masrafsız olmasına rağmen, apoptotik hücrelerin tanımlamada başarısız olabilmektedir. Apoptotik hücreleri teşhis etmek karmaşıktır ve bu yöntemler tek başına kullanıldığında apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kesin bir sonuç vermemektedir. Biyotin ya da digoxigenin ile konjuge nükleotidler kullanılarak DNA zincir kırıklarının tespitine dayalı bir tekniğin ise apoptotik hücre ölümü tespitinde daha özgün sonuçlar verdiği ifade edilmektedir. Çünkü apoptotik hücrelerde çok sayıda DNA zincir kırığı bulunmaktadır ve bu durum onların nekrotik hücrelerden ayırt edilmesini kolaylaştırır (Darzynkiewicz, Li ve Gong, 2009: 459).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal bileşikler, sarf malzemeler ve cihazlara ilişkin bilgiler bu başlıkta verilmiştir.

3.1.1. Fosfazen bileşikleri

Bu çalışmada oktaklorosiklotetrafosfazen ($N_4P_4Cl_8$) ile N/O donör atomlu bidentat ligandın sodyum tuzunun ($FeCH_2NHCH_2CH_2CH_2ONa$) 1:1 mol oranındaki tepkimeleri sonucunda sentezlenen mono-ferrosenil-2-*cis*-4-dikloro-ansa- (2,4-ansa; 3) ve *N*-mono-ferrosenil-propanoksi- (spiro; 4) siklotetrafosfazen bileşiklerinin değişik gruplarla; pirolidin (3a, 4a), piperidin (3b, 4b), morfolin (3c, 4c), 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD) (3d, 4d), 4-florobenzil-*N'*-metilpropan-1,3-diamin (3e, 4e), *N*-4-florobenzil-*N'*-metiletan-1,2-diamin (4f), 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit (3g, 4g), 2,2-dimetil-1,3-propanedioksit (3h, 4h) tepkimesi sonucunda oluşan kısmen ve tamamen süstitüe fosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesi, DNA etkileşimi, sitotoksik aktivitesi ve apoptik, nekrotik etkisi araştırılmıştır. Bu bileşikler Prof. Dr. Zeynel KILIÇ, Doç. Dr. Gamze ELMAS, Doç. Dr. Aytuğ OKUMUŞ ve Dr. Arzu BİNİCİ tarafından ilk defa sentezlenmiş olup, Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü'nde kütle spektrofotometrisi, element analizi, X-ışını kırınım vb. tekniklerle bileşiklerin kimyasal, moleküler ve kristal yapıları incelenmiştir.

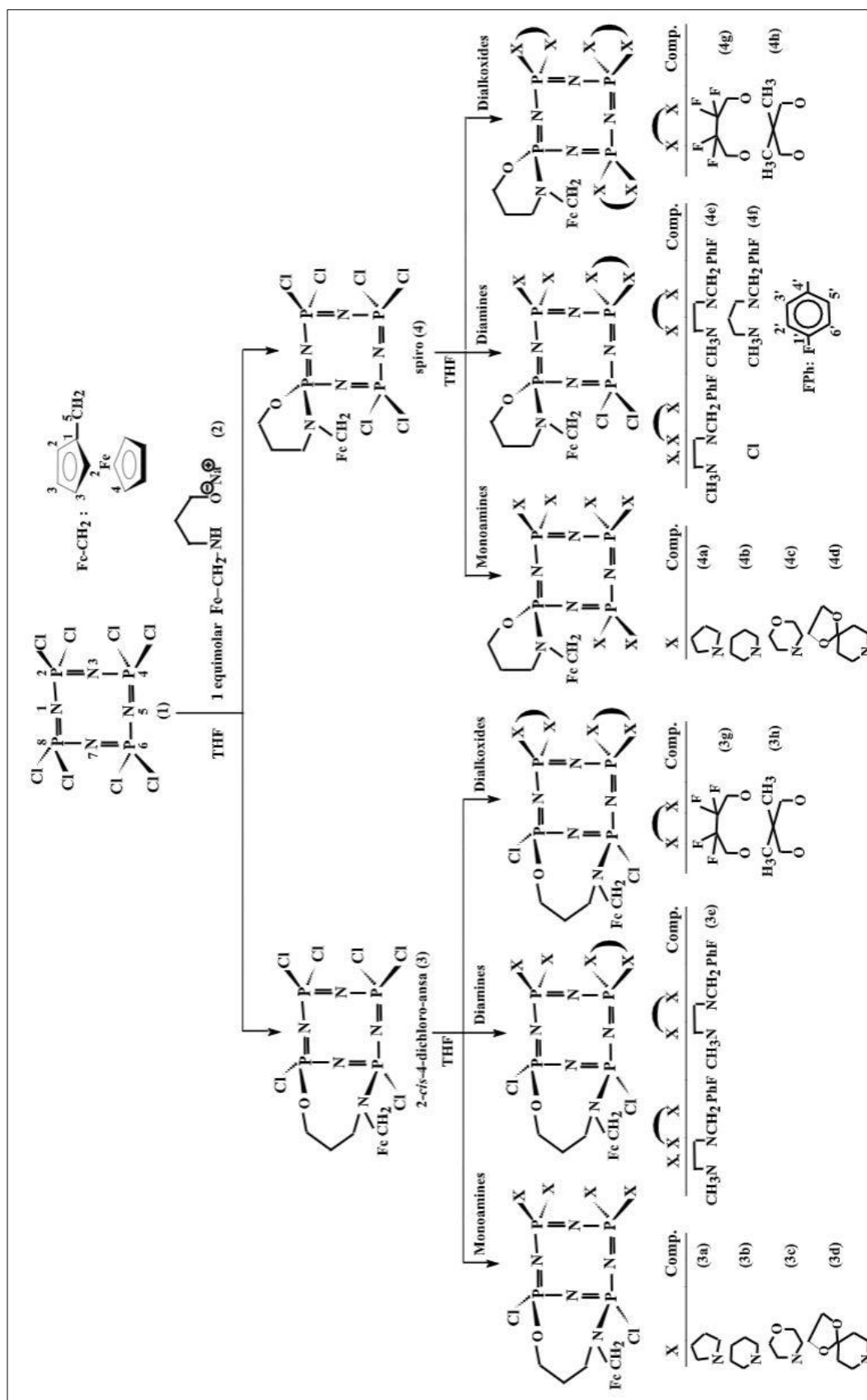
Biyolojik aktiviteleri bu tez kapsamında araştırılan 16 bileşik kısaca 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3g, 3h, 4, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h olarak isimlendirilmiş olup açık isimleri Çizelge 3.1'de, kimyasal yapıları ile sentez aşamaları ise Şekil 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Fosfazen bileşiklerinin isimleri

	Bileşiğin kısa adı	Süstitüent	Bileşiğin ismi
1	3a	Pirolidin	Tetrapirolidino2,4-ansa- 2- <i>cis</i> -4-diklorosiklotetrafosfazen
2	3b	Piperidin	Tetrapiperidino2,4-ansa- 2- <i>cis</i> -4-diklorosiklotetrafosfazen

Çizelge 3.1. (devam) Fosfazen bileşiklerinin isimleri

	Bileşğin kısa adı	Süstituent	Bileşğin ismi
3	3c	Morfolin	Tetramorfolino2,4-ansa- 2-cis-4-diklorosiklotetrafosfazen
4	3d	1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD)	Tetra1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan 2,4-ansa- 2-cis-4-diklorosiklotetrafosfazen
5	3e	4-florobenzil- <i>N'</i> -metilpropan-1,3-diamino-	<i>N</i> -4-florobenzil- <i>N'</i> -metilpropan-1,3-diamino-2,4-ansa- 2-cis-4-diklorosiklotetrafosfazen
6	3g	Sodyum 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütanedioksit	2,4-Ansa-2-cis-4-dikloro-bis(2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksi)siklotetrafosfazen
7	3h	2,2-dimetil-1,3-propanedioksit	2,4-Ansa-2-cis-4-dikloro-bis(2,2-dimetil-1,3-propandioksi)siklotetrafosfazen
8	Spiro-4		<i>N</i> -Mono-ferrosenil-propanoksi- <i>N</i> /O spiro-hekzaklorosiklotetrafosfazen
9	4a	Pirolidin	<i>N</i> -Mono-ferrosenil-propanoksi- <i>N</i> /O spiro-hekzapirolidinosiklotetrafosfazen
10	4b	Piperidin	<i>N</i> -Mono-ferrosenil-propanoksi- <i>N</i> /O spiro-hekzapiperidinosiklotetrafosfazen
11	4c	Morfolin	<i>N</i> -Mono-ferrosenil-propanoksi- <i>N</i> /O spiro-hekzamorfolinosiklotetrafosfazen
12	4d	1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD)	<i>N</i> -Mono-ferrosenil-propanoksi- <i>N</i> /O spiro-hekza1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekanosiklotetrafosfazen
13	4e	<i>N</i> -4-florobenzil- <i>N'</i> -metilpropan-1,3-diamino	<i>N</i> -Mono-ferrosenil-propanoksi- <i>N</i> /O spiro- <i>N</i> -4-florobenzil- <i>N'</i> -metilpropan-1,3-diamino-tetraklorosiklotetrafosfazen
14	4f	<i>N</i> -4-florobenzil- <i>N'</i> -metiletan-1,2-diamino	<i>N</i> -Mono-ferrosenil-propanoksi- <i>N</i> /O spiro- <i>N</i> -4-florobenzil- <i>N'</i> -metiletan-1,2-diamino-tetraklorosiklotetrafosfazen
15	4g	Sodyum 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-butanedioksit ile tam süstitüe	<i>N</i> -Mono-ferrosenil-propanoksi- <i>N</i> /O spiro-tris(2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksi)siklotetrafosfazen
16	4h	Sodyum 2,2-dimetil-1,3-propanedioksit ile tam süstitüe	<i>N</i> -Mono-ferrosenil-propanoksi- <i>N</i> /O spiro-tris(2,2-dimetil-1,3-propandioksi)siklotetrafosfazen



Şekil 3.1. Bu araştırmada kullanılan siklotetrafosfazen türevlerinin sentez aşamaları ve kimyasal yapıları

3.1.2. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar ve kimyasal malzemeler

Bu çalışmada ele alınan mono-ferrosenil-2-*cis*-4-dikloro-ansa- (2,4-ansa; **3**) ve *N*-mono-ferrosenil-propanoksi- (spiro; **4**) siklotetrafosfazen bileşiklerinin değişik gruplarla; piriolidin (**3a**, **4a**), piperidin (**3b**, **4b**), morfolin (**3c**, **4c**), 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD) (**3d**, **4d**), 4-florobenzil-*N*-metilpropan-1,3-diamin (**3e**, **4e**), *N*-4-florobenzil-*N*-metiletan-1,2-diamin (**4f**), 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit (**3g**, **4g**), 2,2-dimetil-1,3-propanedioksit (**3h**, **4h**) tepkimesi sonucunda oluşan 16 siklotetrafosfazen bileşiğinin antimikrobiyal aktivitelerinin tespitine yönelik çalışmalar Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Siklotetrafosfazen bileşiklerinin antibakteriyal aktivitelerinin araştırılması için 11 farklı bakteri, antifungal etkilerinin araştırılması için ise 3 maya suşu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bakterilerin isimleri ve kültür bilgileri şu şekildedir; *Bacillus cereus* NRRL-B-3711, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus hirae* ATCC 9790, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus vulgaris* RSKK 96029, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Bileşiklerin antifungal aktivitelerini test etmek için kullanılan mayalar ise şu şekildedir; *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 13803. Araştırmada kullanılan tüm bakteri ve maya türlerinin ayrıntıları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Bütün bakteriler stoktan alınarak aktifleştirme işlemi için Mueller-Hinton Agar (MHA)'da 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Mayaların aktifleştirilmesi için stoklardan Malt Extract Agar (MEA)'e yapılan ekimler 30 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.2. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar

	Mikroorganizma	Özelliği
1	<i>Bacillus cereus</i> NRRL-B-3711	Gram pozitif bakteri
2	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Gram pozitif bakteri
3	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Gram pozitif bakteri
4	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 9790	Gram pozitif bakteri
5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram pozitif bakteri
6	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram negatif bakteri
7	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Gram negatif bakteri
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Gram negatif bakteri
9	<i>Proteus vulgaris</i> RSKK 96029	Gram negatif bakteri
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram negatif bakteri
11	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Gram negatif bakteri
12	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Maya
13	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Maya
14	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	Maya

Antimikrobiyal aktivitenin tayin edilmesi çalışmalarında kullanılan kimyasal ve sarf malzemelerin listesi Çizelge 3.3'te verilmiştir. Agar kuyu difüzyon ve mikrodilüsyon antimikrobiyal aktivite çalışmalarında besiyeri olarak Mueller - Hinton agar (MHA), Malt extract agar (MEA), Mueller - Hinton broth (MHB) ve Sabouraud dekstroz broth kullanılmıştır. Serum fizyolojik için NaCl, bileşiklerin çözülmesi için 1,4-dioksan kullanılmıştır. Tüm çalışmalarda çeşitli ölçülerde mezür, erlenmayer, cam tüp, beher, 90x15 mm'lik petri kapları, drigalski spatula, halka uçlu öze, bunzen peki, eldiven, şırınga ucu filtre, 10 cc şırınga ve 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan malzemeler

	Malzeme	Markası
1	Mueller - Hinton agar (MHA)	Merck
2	Malt extract agar (MEA)	Merck
3	Mueller - Hinton broth (MHB)	Merck
4	Sabouraud dekstroz broth	Merck
5	Sodyum klorid (NaCl) (Serum fizyolojik için)	Merck
6	1,4 dioksan (Bileşiklerin çözülmesi için)	Sigma-Aldrich
7	Çeşitli cam malzemeler (mezür, erlenmayer, cam tüp, beher vb.)	-
8	Petri kapları (90x15 mm)	LP Italiana
9	Drigalski spatülü	-
10	Halka uçlu öze	-
11	Bunzen beki	-
12	Lateks ve nitril eldiven	-

Çizelge 3.3. (devam) Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan malzemeler

	Malzeme	Markası
13	Minisart şırınga ucu filtre (0,45 µm)	Sartorius
14	10 mL şırınga	-
15	Mikroplaka (96 kuyucuklu)	-

3.1.3. DNA ile etkileşim deneylerinde kullanılan malzemeler

Bileşiklerin DNA ile etkileşiminin araştırılmasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemelerin listesi Çizelge 3.4’te verilmiştir. Agaroz jel elektroforez deneylerinde, bileşiklerin çözülmesi için 1,4 dioksan, gerekli tampon ve çözeltilerin hazırlanması için tris, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), etidyum bromür (EtBr), agaroz, süktroz, bromfenol mavisi kullanılmıştır. Bunun dışında bileşiklerin hazırlanması agaroz jel yükleme işlemleri için mikropipet uçları, mikrosantrifüj tüpleri, minisart şırınga ucu filtre, eldiven, çeşitli büyüklüklerde mezür, erlenmayer, cam tüp, beher ve restriksiyon endonükleaz kesim enzimleri (*Bam*HI ve *Hind*III) ile pBR322 plazmit DNA kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. DNA ile etkileşim deneylerinde kullanılan malzemeler

	Malzeme/Cihaz	Marka
1	1,4 dioksan	Merck
2	Tris	Merck
3	Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Merck
4	Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma
5	Agaroz	Applichem
6	Süktroz	Sigma-Aldrich
7	Bromfenol mavisi	Merck
8	Mikropipet uçları	LP Italiana
9	Mikrosantrifüj tüpleri	LP Italiana
10	Minisart şırınga ucu filtre (0,45 µm)	Sartorius
11	Çeşitli cam malzemeler (mezür, erlenmayer, cam tüp, beher vb.)	-
12	Lateks ve nitril eldiven	-
13	Restriksiyon endonükleaz kesim enzimleri (<i>Bam</i> HI ve <i>Hind</i> III)	Sigma-Aldrich
14	pBR322 plazmit DNA	Sigma-Aldrich

3.1.4. Sitotoksik aktivite deneylerinde kullanılan hücre hatları ve kimyasal malzemeler

L929 fare fibroblast hücreleri Şap Enstitüsü’nden, MCF-7 meme kanseri hücre hatları ise Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hücre Kültürü Bankası’ndan alınmıştır. Sentezlenen

bileşiklerin tamamının sitotoksik aktivitelerini araştırmak amacıyla MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına ve kontrol olarak L929 fare fibroblastlarına WST-1 testi uygulanmıştır. Ayrıca bazı bileşiklere Gerçek Zamanlı Hücre Analizi yapılmış ve tüm bileşikler için ikili boyama yapılarak apoptoz, nekroz durumları araştırılmıştır. Bu çalışmalar Kırıkkale Üniversitesi Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüş olup, kullanılan kimyasal ve sarf malzemelerin listesi Çizelge 3.5'te verilmiştir. Sitotoksikite çalışmalarında 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfo-fenil)-2H tetrazolyum monosodyum tuzu (WST-1), tripsin-EDTA, hücre kültürü kapları, 96 kuyucuklu mikrolakalar, hücre kültür gelişme besiyerleri, Phosphate buffered saline (PBS) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kullanılmıştır. Proliferasyon etki çalışmasında E-plak ve Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi, apoptotik ve nekrotik etki çalışmasında ise Hoescht 33342 ve propidyum iyodür (PI) kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Sitotoksikite ve apoptotik, nekrotik etki deneylerinde kullanılan malzeme listesi

	Malzeme	Marka
1	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfo-fenil)-2H tetrazolyum monosodyum tuzu (WST-1)	Roche
2	Tripsin-EDTA	Biological Industries
3	Hücre kültür kapları	Corning
4	Mikroplaka (96 kuyucuklu)	Corning
5	Hücre kültür gelişme besiyerleri	Biological Industries
6	Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich
7	E-plak	Roche
8	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi	Roche
9	Hoescht 33342	Serva
10	Propidyum iyodür (PI)	Serva
11	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biological Industries

3.1.5. Kullanılan aletler ve cihazlar

Fosfazenlerin biyolojik aktiviteleri çalışılırken kullanılan alet, cihaz ve markaları Çizelge 3.6'da verilmiştir. Tüm çalışmalarda genel olarak, sterilizasyon için otoklov, besiyerleri için farklı sıcaklıklara ayarlanmış olan etüvler, hücre kültürü için karbondioksitli etüv, farklı sıcaklıklara ayarlanmış buzdolabı ve dondurucular, jel görüntüleme cihazı, floresan mikroskobu, steril kabin, buz makinesi, hassas terazi, elektronik tartı, soğutmalı santrifüj, yatay elektroforez tankı ve güç sağlayıcısı, vortex, mikroplaka okuyucu, mikrodalga fırın,

saf su cihazı, ısıtılmalı manyetik karıştırıcı, pH metre, farklı hacimlerde mikropipetler, agaroz jel kasetler ve tarakları kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. Kullanılan alet, cihaz ve markaları

	Alet ve cihazlar	Marka
1	Otoklav	Tomy SX
2	Etüvler	Binder
3	Buzdolabı (+4 °C)	Sanyo
4	Derin dondurucu (-30 °C)	Sanyo
5	Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo
6	Jel görüntüleme cihazı	Biometra Biodoc Analyze
7	Karbondioksitli etüv	Binder CB150
8	Floresan mikroskobu	Leica
9	Steril kabin	Esco
10	Buz makinesi	Hoshizaki
11	Hassas terazi	Sartorius
12	Elektronik tartı	Scaltec
13	Soğutmalı santrifüj	Sigma
14	Yatay elektroforez tankı ve güç sağlayıcı	Biometra
15	Vorteks	Fisons Whirlimixer
16	Mikroplaka (ELISA) okuyucu	BIOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2
17	Mikrodalga fırın	Vestel
18	Saf su cihazı	Jencons
19	Isıtılmalı manyetik karıştırıcı	Electro mag
20	pH metre	Mettler Toledo seven multi
21	Farklı hacimde mikropipetler	Gilson pipetmann
22	Agaroz jel kasetleri ve taraklar	-

3.1.6. Kullanılan çözeltiler

Antimikrobiyal çalışma için kullanılan çözeltiler

- Besiyerleri:* MHA besiyeri, üretici firmanın önerdiği şekilde 34 gr tartılıp 1 lt distile suda çözülmüş, MEA besiyeri ise 48 gr tartılarak 1 lt distile suda çözülmüş, ve her iki besiyeri de otoklavda 121 °C’de 1,5 atm basınçla 15 dk sterilize edilmiştir. Katı besiyerleri otoklavdan çıkarıldıktan sonra 45 °C’ye kadar soğutularak steril kabinde ya da diğer aseptik koşullarda steril petri kaplarına 18-22 mL kadar dökülmüştür. Sıvı besiyerleri ise 10 mL’lik steril cam tüplere alınmıştır. Katı besiyerlerinin katılaşması, sıvı besiyerlerinin ise soğuması beklenerek ardından sterilite kontrolünü sağlamak

amacıyla bir gece etüvde bekletilmiştir. Tüm besiyerleri +4 °C'lik buzdolabında muhafaza edilmiştir.

- b. *Serum fizyolojik*: %0,9 oranında sodyum klorür (NaCl) distile su içerisinde çözülmüş ve ardından otoklavda 121 °C'de 1,5 atm basınçla 15 dk sterilize edilmiştir.

DNA etkileşimi çalışmaları için kullanılan çözeltiler

- a. *0,5M EDTA (pH 8.0)*: 186,12 gr EDTA önce bir miktar distile suda çözülüp, son hacmi 800 mL'ye tamamlanmıştır. pH'ı 8 olana kadar NaOH tableti eklenerek karıştırılmış ve pH ayarlandıktan sonra son hacmi 1 000 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir.
- b. *1 M Tris-HCl*: 12,11 gr Tris hassas terazide tartılıp bir miktar distile suda çözülmüş ve konsantre HCl ile pH 8'e ayarlanmıştır. Ardından son hacim distile su eklenerek 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- c. *TE çözeltisi*: 1 mL 1 M Tris-HCl (pH: 8.0) ile 0,2 mL 0,5 M EDTA (pH: 8.0) karıştırılmış ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir.
- d. *Stok Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH: 8,0)*: Önce 242 gr Tris, 57,1 mL glacial asetik asit ile 0,5 M 100 mL EDTA (pH 8,0) distile su içerisinde çözülmüş ve hacim 1 000 mL'ye tamamlanmıştır.
- e. *TAE yürütme tamponu*: TAE tamponu (x50) tampondan 20 mL alınıp, distile su eklenerek 1 000 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- f. *Agaroz*: %0,8 ve %1'lik agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.
- g. *Yükleme tamponu*: 0,025 gr bromofenol mavisi, 40 g. sükroz, 0,25 gr ksilen siyanol 100 mL distile su içerisinde çözülmüştür.
- h. *Etidyum bromür (EtBr)*: 10 mg/mL derişimde olacak şekilde hazırlanarak ve koyu renkli bir şişeye alınmıştır.

3.2. Yöntem

Siklotetrafosfazen bileşiklerinin biyolojik aktivitelerinin tespitinde kullanılan yöntem ve teknikler açıklanmıştır.

3.2.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Agar kuyu difüzyon yöntemi

Sentezlenen bileşiklerin mikroorganizmalar üzerinde gösterdiği antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için 11 patojen bakteri ve üç maya suşu (Bkz: Çizelge 3.1) kullanılmıştır. Çalışma öncesinde mikroorganizmalar uygun besi ortamında aktifleştirilmiş, konsantrasyonlarının McFarland standardizasyonunun yapılması için, ekim yapılan petri kaplarından öze yardımıyla alınan bakteri ve maya kültürleri steril serum fizyolojik tüplerine aktarılmıştır. Bakteriler için serum fizyolojik tüplerinin yoğunluğu McFarland No: 0,5 (1×10^8 koloni oluşturan birim (kob)/mL), mayalar için ise McFarland No: 0,5 (1×10^7 kob/mL) olacak şekilde ayarlanmıştır.

McFarland standardizasyonu sağlanmış mikroorganizma çözeltilerinden mikropipetle 100 µl alınarak, bakteriler için MHA, mayalar için ise MEA besiyerine drigalski spatula ile yayımı gerçekleştirilmiştir. Bu besiyerlerine steril koşullar altında 6 mm'lik delgeçler ile kuyucuklar açılmıştır. Öncesinde filtreden geçirilerek sterilize edilen 1650 µM konsantrasyondaki siklotetrafosfazen bileşiklerinden bu kuyulara 50 µl eklenmiştir. Ardından inkübasyon için bakteri ekimi yapılan petriler 24 saatliğine 37°C'lik sıcaklığa ayarlanmış etüve, maya ekimi yapılan petriler ise 48 saatliğine 30°C'lik etüve kaldırılmıştır. Bu çalışmanın değerlendirilmesi için gerekli olan kontrol çalışma için ise, pozitif kontrol olarak ampisilin ve kloramfenikol (bakteriler için) ve ketakonazol (mayalar için), negatif kontrol için ise çözücü olarak kullanılan 1,4 dioksan 50 µl kuyulara uygulanmış ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen inkübasyon sürelerinin sonunda petrilerde oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımıyla milimetrik olarak ölçülüp, kaydedilmiştir. Çalışmalar üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Antimikrobiyal etki çalışmaları Perez, Pauli ve Bazerque (1990)'nin geliştirdiği agar kuyu difüzyon yöntemi temel alınarak gerçekleştirilmiş ve Clinical and Laboratory Standards Institute (2019) standartlarına göre değerlendirilmiştir.

Mikrodilüsyon yöntemi

Kuyu difüzyon yöntemiyle yapılan çalışma sonucunda bir petrideki her üç kuyuda da antimikrobiyal aktivite gösteren bileşiklerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK),

minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimum fungusidal konsantrasyon (MFK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Kuyu difüzyon yöntemi sonucunda yüksek antifungal etki gözlemlenmediği için MFK çalışması yapılmamıştır.

Bakteriler için Mueller Hinton broth kullanılarak hazırlanan sıvı besiyerlerinden 100 µl 96 kuyucuklu mikrolakalara eklenmiştir. 1650 µM konsantrasyondaki bileşiklerinden 50 µl ilk kuyucuğa eklenip mikropipet ile karıştırılarak, aynı miktarda geri alınıp ikinci kuyucağa aktarılmıştır. Bu şekilde diğer kuyucuklara konsantrasyonu ½ oranında olacak şekilde dilüsyon gerçekleştirilmiş ve 1650-3,25 µM arasında değişen farklı konsantrasyonlar elde edilmiştir. Bakteri konsantrasyonu serum fizyolojik içerisinde McFarland No: 0,5 (1x10⁸ kob/mL) olarak ayarlanıp 1\10 oranında seyreltilmiş ve mikrolaktaki her bir kuyuya 5 µl eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak sadece bakteri ile besiyeri içeren kuyucuk kullanılırken, negatif kontrol olarak sadece besiyeri bulunan kuyucuk kullanılmıştır. Bakteri olan mikrolakalar 24 saatliğine 37°C'lik etüve kaldırılarak inkübe edilmiştir. Fosfazen bileşiklerin MİK ve MBK değerlerinin belirlenebilmesi için inkübasyon sonrası etüvden çıkarılan mikrolakalardaki 412,5-3,25 µM aralığındaki 8 farklı konsantrasyonu içeren her bir kuyudan 10 µl örnek alınıp MHA içeren petri kaplara ekim yapılmıştır. Ardından 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilen mikroorganizmaların üremeleri kontrol edilmiştir. MBK değeri, mikroorganizma üremesinin olmadığı en düşük konsantrasyon, MİK değeri ise mikroorganizma üremesinin yavaşladığı ilk konsantrasyon olarak kaydedilmiştir. Mikrodilüsyon testleri Zgoda ve Porter (2001)'in yöntemi değiştirilerek, en az iki tekrar çalışılmıştır.

3.2.3. DNA ile etkileşim çalışmaları

Çalışmada kullanılan 16 adet siklotetrafosfazen bileşiği 1,4 dioksan içerisinde çözülerek 1650 µM, 825 µM, 412,5 µM, 206,25 µM, 103 µM, 51,5 µM konsantrasyonlarında plazmit DNA ile 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda bileşiklerin plazmit DNA üzerindeki etkisinin araştırılması için agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Bu çalışmalar Gümüş ve arkadaşları (2009)'nın kullandığı agaroz jel elektroforezi ve restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonu yöntemi temel alınarak gerçekleştirilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi

Fosfazen bileşikleri ile plazmit DNA'nın karışımı bekleme süresinin sonunda %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Bunun için hassas terazide 1 gr agar tartılıp 100 mL 1x TAE içinde çözülmüş ve mikrodalga fırında kaynatılarak homojen hale getirilmiştir. Ardından agaroz jel biraz soğumaya bırakılarak jel kasedine dökülmüş ve uygun taraklar takılarak yükleme kuyucukları oluşturulmuştur. Yaklaşık 30 dk sonrasında jelin polimerizasyonun sağlandığından emin olunup tarak jel kasedinden ayrılmıştır. Jel kaseti agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilerek, jelin üzerini geçecek kadar 1x TAE tamponu eklenmiştir. İlk kuyucuğa kontrol için bileşik ile muamele edilmemiş plazmit DNA (pBR322) yüklenmiş, diğer kuyucuklara ise bileşik-DNA karışımı, yükleme tamponu (bromfenol blue) ile karıştırılarak yüklenmiştir. Örnekler 70 V'luk bir voltaj uygulanarak doğru akımda yürütülmüş ve 180 dk sonunda etidyum bromür ile yaklaşık 3 dk muamele edilerek, bant durumu, görüntüleme cihazında UV ışık altında görüntülenmiştir. Jel görüntülerinin fotoğrafı çekilerek .jpeg formatında bilgisayara kaydedilmiştir.

Restriksiyon endonükleaz (RE) reaksiyonu

Bileşik-plazmit DNA etkileşimi agaroz jel elektroforezinde görüntüledikten sonra, DNA etkileşimi olduğu görülen bileşikler için, DNA'nın hangi bölgelerine bağlandığına yorum getirilebilmesi için *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz (RE) enzim kesimleri yapılmıştır.

pBR322 plazmit DNA, *Bam*HI enziminin bağlanma dizisi olan 5'-G/GATCC-3' dizisine bir bölgede sahip olduğundan, bu bölgeden kesilim gösterir. Böylece *Bam*HI kesimiyle birlikte doğrusal DNA (Form III) oluşur. *Hind*III enzimi ise 5'-A/AGCTT-3' dizisini tanıyarak keser ve *Bam*HI enzim kesiminde olduğu gibi doğrusal DNA oluşur. Bu kesilim durumunu araştırmak için bileşikler ile plazmit DNA'nın 24 saat inkübasyonu sonunda bileşik-DNA karışımı ile *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ayrı ayrı muamele edilmiştir. Bu karışımlar 2 saat 37 °C'de etüvde inkübasyona bırakılmış ve %1 agaroz jelde, 70 V'ta 60 dk yürütülmüştür. Ardından yaklaşık 3 dk etidyum bromür ile muamele edilen karışımlar görüntüleme cihazında, UV ışık altında görüntülenmiş ve bant durumları incelenerek fotoğraflanmıştır.

3.2.4. Sitotoksik aktivite ve apoptotik, nekrotik etki çalışmaları

Çalışılan siklotetrafosfazen bileşiklerinin bazılarının sitotoksik aktive durumunu tayin etmek amacıyla WST-1 testi uygulanmıştır. Çalışmada L929 fare fibroblastları (normal hücreler) ile MCF-7 (ATCC HTB-22) meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Sitotoksik aktivite çalışmalarının tamamı Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bileşiklerin ve hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılacak bileşikler 1,4 dioksanda çözülmeden önce UV ışında 30 dk bekletilerek sterilizasyonu sağlanmıştır.

L929 fare fibroblast hücreleri ile MCF-7 meme kanseri hücre kültürlerinin hazırlanması için, stoklanmış ve dondurulmuş hücre hatları öncelikle 37°C su banyosunda çözdürülmüştür. Ardından hücre organellerinin korunumu için ortama eklenmiş olan DMSO gibi kryoprotektan ajanların uzaklaştırılması amacıyla PBS (Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen fosfat tampon) ile iki kez yıkanmıştır. Hücreler, besiyeri içinde süspanse edilmiş ve %10 FBS, 100 U/mL streptomisin ve 100 µg/mL penisilin içeren RPMI 1640 ortamında flasklara ekilerek 37°C'de %5 CO_2 varlığındaki inkübatörlerde inkübasyona alınmıştır. Besiyerleri belirli aralıklarla değiştirilmiş ve hücrelerin çoğalma hızları ile morfolojik görünümleri ışık mikroskobu ile kontrol edilmiştir.

Hücrelerin ışık mikroskobunda, %80-90 oranında bulunduğu yüzeyi kapladığı görüldüğünde, pasajlama için hücre kültürü ortamından çıkarılıp PBS ile yıkanmış ve tripsin-EDTA ile muamele edilmiştir. Ardından hücreler 15 mL'lik ependorf tüplerine alınarak 2 500 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak hücreler elde edilmiş ve etiketlenen flasklara ekim yapılarak 37°C'de %5 CO_2 içeren etüve alınmıştır.

WST-1 ile sitotoksik aktivitenin belirlenmesi

WST-1, sitotoksisite çalışmalarında kullanılan enzimatik bir testtir ve mitokondriyal dehidrojenaz enziminin tetrazolyum tuzunu formazana dönüştürmesi esasına dayalıdır. Bu dönüşüm sonrasında meydana gelen renk değişiminin belirlenmesiyle bileşiklerin

sitotoksik aktivitesine ilişkin tespitlerde bulunulmuştur. WST-1 testi, Rzayev, Türk ve Söylemez (2012)'in kullandığı yöntem uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Fosfazen bileşikleri ve pozitif kontrol olarak kullanılan antikanser ajan doxorubisinin farklı konsantrasyonları L929 fibroblast ile MCF-7 meme kanseri hücre hatları ile muamele edilmiştir. Öncelikle bu hücre hatlarına ait 5 000 hücre 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve bileşikler ile pozitif kontrol olarak kullanılacak doxorubisinin 12,5-200 µg/mL arasında değişen konsantrasyonları farklı kuyucuklara eklenmiştir. Bu işlem 3 tekrarlı olarak yapılmış ve negatif kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır. Ardından bu kuyucukların her birine üretici firmanın (Roche) talimatı doğrultusunda 5 µl WST-1 çözeltisi eklenmiş ve 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat inkübasyona alınmıştır. WST-1 yöntemi, WST-1'in ihtiva ettiği tetrazolyum bileşiğinin, sağlıklı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan ve proliferasyon sonucu artan dehidrojenaz enzimi tarafından parçalanması esasına dayanır. Bu parçalanma sonucunda meydana gelen renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. Yapılan çalışmada bu renk değişimi ELISA Microplate Reader'da (BioTek) 440 nm dalga boyunda ölçülmüş ve fosfazen bileşiklerinin değerleri negatif kontrol grubu ile kıyaslanarak yüzde cinsinden hücre canlılığı belirlenmiştir. Canlılık yüzdesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = 100 \times \frac{\text{Test bileşiğinin absorbasyon değerlerinin ortalaması}}{\text{Negatif kontrolün absorbasyon değeri}}$$

Farklı konsantrasyonlardaki fosfazen bileşiklerinin L929 fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki hücre inhibisyonu ile antiproliferatif etkisi, Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile test edilmiştir.

İkili boyama (Hoechst 33342, propidiyum iyodür) ile apoptotik nekrotik etkinin araştırılması

İkili boyamada kullanılan boyalardan Hoechst 33342, hücre zarından geçerek DNA'ya bağlanabilen bir boyadır. Hoechst 33342 floresan boyası DNA'ya bağlanarak floresan mikroskobu altında bakıldığında hücre çekirdeğinin koyu mavi renkte görünmesini sağlar. Propidium iyodür (PI) ise hücre zarı hasarlı hücrelere girerek geç apoptotik ve nekrotik ölü hücreleri boyayan bir kimyasaldır (Belloc ve diğerleri, 1994; Ciapetti ve diğerleri, 2000). Bileşiklerin hücrelerde nasıl bir ölüm şekline sebep olduğunu yorumlamak, hücrelerdeki

morfolojik değişiklikleri incelemek için bu iki boyayı içeren ikili boyama yapılmıştır. Fosfazen bileşikleri ile yapılan WST-1 testi sonrasında, çalışma yapılan plaktaki hücrelerin bulunduğu kuyucuklara 50 µl kadar ikili boyama çözeltisi eklenmiş ve karanlıkta 20 dk 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda farklı kuyucuklardan 20 µl kadar örnek temiz bir lam üzerine alınmış, bileşiklerin hücrelerde apoptoz ya da nekroza sebep olma durumunun değerlendirilmesi için floresan mikroskop altında incelenmiştir. Mikroskop altında apoptotik çekirdekli hücreler Hoechst 33342 ile boyanarak mavi renkli ve lekeli bir görünüm sergilerken, nekroza uğrayan hücreler ise membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreleri boyama özelliğindeki propidiyum iyodur (PI) ile boyanarak kırmızı bir çekirdek yapısı göstermiştir. Bu görüntüler 200X’de fotoğraflanarak bilgisayar ortamında kaydedilmiştir. Apoptotik ve nekrotik etkinin ikili boyama ile tespiti Mutlu ve diğerleri (2015)’in çalışmasında verilen yöntemle göre yapılmıştır.

Hücre proliferasyon analizi

Siklotetrafosfazen bileşiklerinin L929 fare fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılığı, sitotoksitesi ve proliferasyonunu üzerindeki etkilerini araştırmak için Gerçek Zamanlı Hücre Analizi yapılmış, bunun için de xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) kullanılmıştır. Üretici firmanın (Roche) talimatları uygulanarak yapılan testte, E-plaktaki kuyucuklarda bulunan hücre kültürlerinin empedans değişiklikleri ölçülmektedir. İnkübatörün altında yer alan altın mikroelektrotlara bağlı hücre sayısı arttıkça elektrot empedansı artar. Bunun yanında, empedans sadece elektrotlara ekli olan hücre sayısından değil, hücre etkileşimi kuvvetinden ve hücre morfolojisinden etkilenir. Böylece hücre canlılığı ve hareket kabiliyeti tespit edilerek, hücre proliferasyonuna ilişkin veriler elde edilmiş olunur. Bu çalışma ile hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve tutunma derecesi gibi biyolojik koşulları temsil eden elektrot empedansı tespit edilmiş ve Hücre İndeksi (CI) değeri olarak kaydedilmiştir. 100 µl DMEM 96 kuyucuklu E-plakın kuyucuklarına eklenip xCELLigence içine yerleştirilmiş ve 10 dk sıcaklığın dengelenmesi için beklenmiştir. 1 dk sonrasında, E-plak sistemden çıkarılmış ve plaktaki kuyucuklara L929 fare fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücreleri (5x10³ hücre/kuyucuk) ekilerek yeniden inkübasyon için sisteme yerleştirilmiştir ve 10 dakika boyunca kuyucuklar okunmuştur. Sonrasında 24 saat boyunca E-plakta hücre büyümesi izlenmiş ve hücreler büyüme fazına ulaştığında, besiyeri E-plaktan uzaklaştırılmıştır. Bileşiklerin farklı konsantrasyonlarını (200-12,5 µg/mL) içeren örnekler son hacim 200 µl olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Ardından, E-

plaka, hücre indeksini ve hücrelerin büyüme durumunu takip etmek amacıyla yaklaşık 72 saat inkübasyona alınmıştır. Gerçek zamanlı hücre analizi kapsamında hücre indeksi RTCA Software Package 1.2 kullanılarak otomatik hesaplanmıştır (Kich ve diğerleri, 2016; Roche Diagnostics GmbH, 2008; Ramis ve diğerleri, 2013).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada tetramerik fosfazen ile N/O donör atomlu ferrosenil bidentat ligandın sodyum tuzunun 1:1 mol oranındaki tepkimeleri sonucunda elde edilen mono-ferrosenil-2-cis-4-dikloro-ansa- (2,4-ansa; 3) ve N-mono-ferrosenil-propanoksi- (spiro; 4) siklotetrafosfazen bileşiklerinin; pirolidin (3a, 4a), piperidin (3b, 4b), morfolin (3c, 4c), 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD) (3d, 4d), 4-florobenzil-N'-metilpropan-1,3-diamin (3e, 4e), N-4-florobenzil-N'-metiletan-1,2-diamin (4f), 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit (3g, 4g), 2,2-dimetil-1,3-propanedioksit (3h, 4h) tepkimesi sonucunda oluşan kısmen ve tamamen süstitüe fosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal aktivite, DNA etkileşimi, sitotoksisite aktiviteleri ve apoptotik, nekrotik etkileri çalışılmıştır.

Elde edilen bileşiklerden 3 bileşiği, çabuk bozunduğundan ve diğer bileşiklere dönüştüğünden, biyolojik aktiviteleri çalışılamamıştır.

4.1. Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan siklotetrafosfazenlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için öncelikle agar kuyucuk difüzyon yöntemi yapılmış, belirli zonlarda aktivite gösterdiği tespit edilen bileşikler için MİK (minimal inhibitör konsantrasyon), MBK (minimal bakterisidal konsantrasyon) ve MFK (minimal fungusidal konsantrasyon) değerleri çalışılmıştır.

4.1.1. Antimikrobiyal aktivite

Sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi 1650 µM konsantrasyonda, 11 bakteri ve üç maya türü kullanılarak agar kuyucuk difüzyon testi ile tespit edilmiş, tüm deneyler üç defa tekrarlanmıştır. Pozitif kontrol için aynı konsantrasyonlarda antibakteriyel ajan olarak ampisilin ve kloramfenikol, antifungal ajan olarak ise ketanozol kullanılmıştır. Bileşiklerin çözücüsü olan 1,4 dioksan, çözücünün antimikrobiyal etkiye neden olup olmadığının tespit edilmesi için negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Yapılan test sonucunda 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3g, 3h, 4, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g ve 4h bileşiklerinin Gram pozitif bakterilere (*E. faecalis* ATCC 29212, *B. subtilis* ATCC 6633,

B. cereus NRRL B-3711, *S. aureus* ATCC 25923, *E. hirae* ATCC 9790) karşı oluşan inhibisyon zon çapları Çizelge 4.1’de, Gram negatif bakterilere (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. vulgaris* RSKK 96029, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhimurium* ATCC 14028 *K. pneumoniae* ATCC 13883) karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapları ise Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çalışmada 1,4 dioksan negatif kontrol, ampisilin ve kloramfenikol pozitif kontrol olarak belirtilmiş, (-) ile belirtilen kuyucuklarda inhibisyon zonu oluşmamış, 3 tekrarlı yapılan deneyin sonuçları “ortalama $\pm$ standart hata” olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.1. Bileşiklerin Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri (İnhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir)

*mm	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. hirae</i> ATCC 9790
3a	-	-	-	-	-
3b	11,5 $\pm$ 0,5	12,7 $\pm$ 0,5	-	-	-
3c	11,0 $\pm$ 0	-	-	-	-
3d	22,0 $\pm$ 3,0	23,3 $\pm$ 1,0	23,3 $\pm$ 1,5	24,3 $\pm$ 1,5	24,0 $\pm$ 2,0
3e	-	-	-	-	-
3g	-	-	-	-	-
3h	18,7 $\pm$ 0,5	19,3 $\pm$ 0,5	10,7 $\pm$ 1,0	25,7 $\pm$ 2,0	19,3 $\pm$ 1,0
4	14,7 $\pm$ 0,5	17,7 $\pm$ 0,5	12,0 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 2,0
4a	-	-	-	-	-
4b	11,7 $\pm$ 1,5	14,3 $\pm$ 1,0	11,3 $\pm$ 1,0	13,7 $\pm$ 0,5	13,7 $\pm$ 0,5
4c	-	-	-	-	-
4d	-	-	-	-	-
4e	-	11,3 $\pm$ 0,5	-	13,0 $\pm$ 0	-
4f	11,7 $\pm$ 0,5	-	-	-	-
4g	10,3 $\pm$ 0,5	21,0 $\pm$ 1,0	-	12,0 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 1,0
4h	23,7 $\pm$ 1,0	24,3 $\pm$ 1,0	19,3 $\pm$ 1,0	23,7 $\pm$ 1,5	20,0 $\pm$ 0
1,4 dioksan	-	-	-	-	-
Ampisilin	27,0 $\pm$ 0	23,0 $\pm$ 1,0	-	44,0 $\pm$ 1,0	9,0 $\pm$ 1,0
Kloramfenikol	20,0 $\pm$ 0	21,0 $\pm$ 0	-	24,0 $\pm$ 1,0	22,0 $\pm$ 1,0

Çizelge 4.2. Bileşiklerin Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri (İnhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir)

*mm	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>P.</i> <i>vulgaris</i> RSKK 96029	<i>P.</i> <i>aeruginos</i> <i>a</i> ATCC 27853	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> ATCC 14028	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 13883
3a	11,3±0,5	11,0±0	-	-	-	-
3b	-	-	11,0±0	12,3±1,0	-	-
3c	-	11,0±0	-	-	-	11,0±0
3d	24,7±1,0	20,0±2,0	26,0±1,0	17,0±0	26,0±0	22,0±0
3e	-	11,3±0,5	13±2,5	-	-	-
3g	-	-	-	-	-	-
3h	18,7±1,0	15,0±1,0	17,0±1,0	17,0±0	19,3±0,5	20,3±0,5
4	14,0±0	13,0±0	13,0±0	13,0±0	13,0±0	12,7±0,5
4a	-	-	-	11,7±0,5	11,7±0,5	-
4b	10,3±1,5	12,3±0,5	15,0±0	13,0±0	10,0±0	12,3±0,5
4c	-	-	-	-	-	-
4d	-	-	-	-	-	-
4e	11,3±0,5	-	11,0±0	11,3±0,5	-	11,0±0
4f	-	-	-	-	-	-
4g	10,0±0,5	14,0±1,0	14,3±0,5	13,3±0,5	12,7±0,5	14,7±1,5
4h	29,0±1,0	20,3±0,5	28,0±3,5	17,3±3,0	27,0±1,0	26,3±1,0
1,4 dioksan	-	-	-	-	-	-
Ampisilin	18,0±0	-	-	60,0±0	19,0±1	-
Kloramfenikol	25,0±0	8,0±0	32,0±1	34,0±0	38,0±1	31,0±1

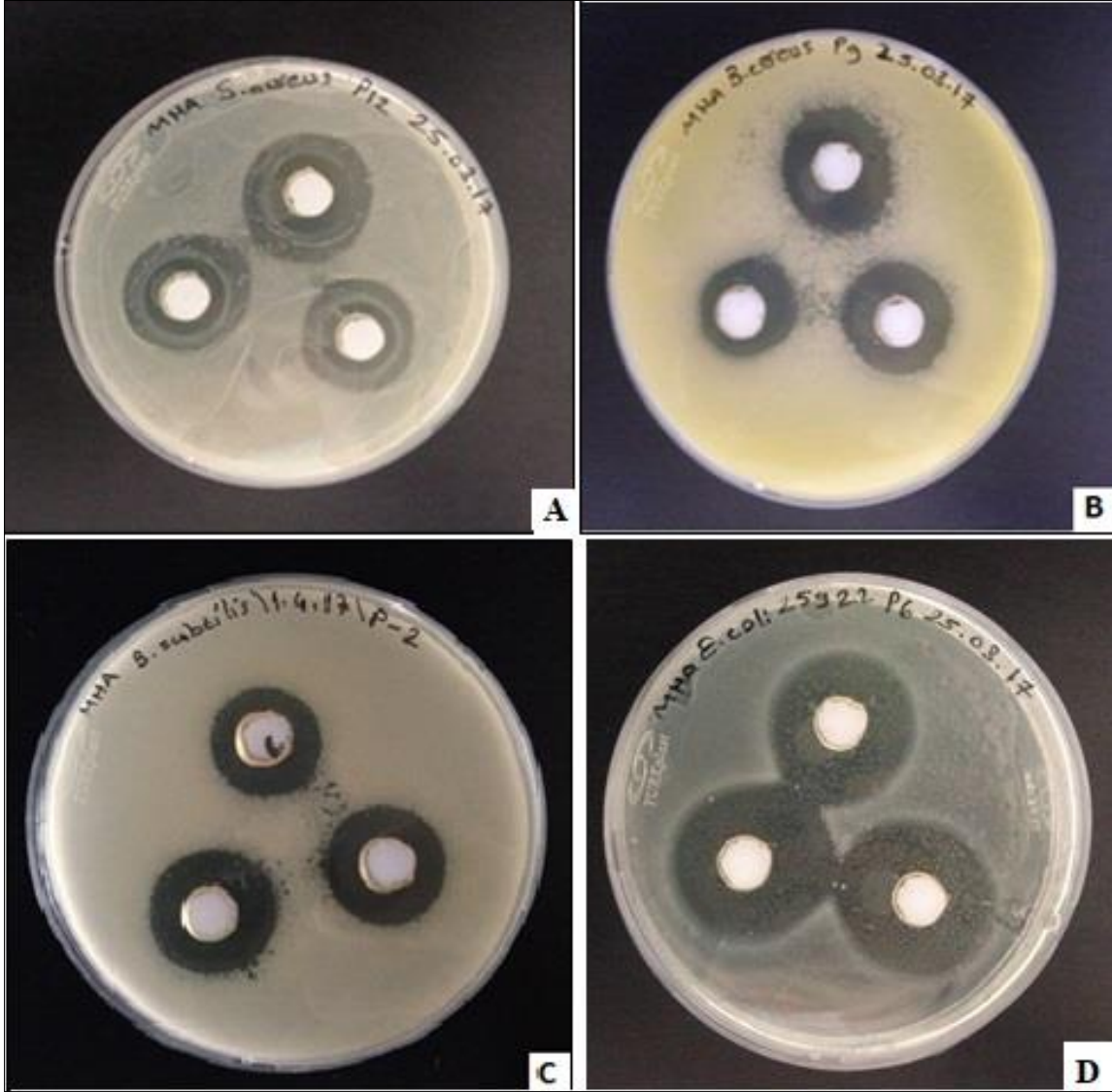
Agar kuyucuk difüzyon test çalışması sonuçlarına göre fosfazen bileşiklerinin 11 bakteri suşu üzerindeki etkileri şu şekilde gözlemlenmiştir; 3a bileşiğinin *E. coli* ATCC 25922 bakterisine 11,3±0,5 mm, *E. coli* ATCC 35218 bakterisine 11,0±0 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu, diğer bakterilerin çoğalmasını ise inhibe etmediği görülmüştür. 3b bileşiği *E. faecalis* ATCC 29212, *B. subtilis*, *P. vulgaris* ve *P. aeruginosa* bakterilerine sırasıyla 11,5±0,5 mm, 12,7±0,5 mm, 11,0±0 mm ve 12,3±1 mm inhibisyon zonu oluşturmuş, diğer yedi bakteri için ise inhibe edici etki göstermemiştir. 3c bileşiği sadece *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* bakterileri için aynı ölçüde, 11,0±0 mm. çapında inhibisyon zonu oluşturmuştur, diğer bakteri suşları için zon olumu gözlemlenmemiştir. 3d bileşiği bu çalışmada kullanılan tüm bakteriler için inhibisyon zonu oluşturmuş olup zon bilgileri şu şekildedir: *E. coli* ATCC 25922 bakterisine 24,7±1,0 mm, *E. coli* ATCC 35218 bakterisine 20,0±2,0 mm, *E. faecalis* bakterisine 22±3 mm, *B. subtilis*

bakterisine $23,3 \pm 1$ mm, *B. cereus* bakterisine $23,3 \pm 1,5$ mm, *P. vulgaris* bakterisine $26,0 \pm 1,0$ mm, *S. aureus* bakterisine $24,3 \pm 1,5$ mm, *P. aeruginosa* bakterisine 17 ± 0 mm, *S. typhimurium* bakterisine $26,0 \pm 0$ mm, *E. hirae* bakterisine $24,0 \pm 2,0$ mm ve *K. pneumoniae* bakterisine $22,0 \pm 0$ mm zon oluşmuştur. 3e bileşiği *E. coli* ATCC 35218 bakterisine $11,3 \pm 0,5$ mm'lik, *P. vulgaris* bakterisine ise $13,0 \pm 2,5$ mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuştur, diğer bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturmamıştır. 3h bileşiği tüm bakteri türleri için inhibisyon zonu oluşturmuş olup, *E. coli* ATCC 25922 bakterisine $18,7 \pm 1,0$ mm, *E. coli* ATCC 35218 bakterisine $15,0 \pm 1,0$ mm, *E. faecalis* bakterisine $18,7 \pm 0,5$ mm, *B. subtilis* bakterisine $19,3 \pm 0,5$ mm, *B. cereus* bakterisine $10,7 \pm 1,0$ mm, *P. vulgaris* bakterisine $17,0 \pm 1,0$ mm, *S. aureus* bakterisine $25,7 \pm 2,0$ mm, *P. aeruginosa* bakterisine $17,0 \pm 0$ mm, *S. typhimurium* bakterisine $19,3 \pm 0,5$ mm, *E. hirae* bakterisine $19,3 \pm 1,0$ mm ve *K. pneumoniae* bakterisine $20,3 \pm 0,5$ mm zon oluşumu gözlemlenmiştir. 4 bileşiği tüm bakteri türleri için inhibisyon zonu oluşturmuştur, zon çapları şu şekildedir: *E. coli* ATCC 25922 bakterisine $14,0 \pm 0$ mm, *E. coli* ATCC 35218 bakterisine 13 ± 0 mm, *E. faecalis* bakterisine $14,7 \pm 0,5$ mm, *B. subtilis* bakterisine $17,7 \pm 0,5$ mm, *B. cereus* bakterisine $12,0 \pm 1,0$ mm, *P. vulgaris* bakterisine $13,0 \pm 0$ mm, *S. aureus* bakterisine $11,0 \pm 1,0$ mm, *P. aeruginosa* bakterisine $13,0 \pm 0$ mm, *S. typhimurium* bakterisine $13,0 \pm 0$ mm, *E. hirae* bakterisine $11,0 \pm 2,0$ mm ve *K. pneumoniae* bakterisine $12,7 \pm 0,5$ mm zon oluşmuştur. 4a bileşiği Gram negatif bakterilerden *P. aeruginosa* ve *S. typhimurium* bakterilerinin ikisi için de $11,7 \pm 0,5$ mm.'lik zon oluşturmuştur, diğer bakterilerde inhibisyon zon oluşumu görülmemiştir. 4b bileşiği çalışılan tüm bakteri türleri için inhibisyon zonu oluşturmuştur, zon çapları şu şekilde tespit edilmiştir: *E. coli* ATCC 25922 bakterisine $10,3 \pm 1,5$ mm, *E. coli* ATCC 35218 bakterisine $12,3 \pm 0,5$ mm, *E. faecalis* bakterisine $11,7 \pm 1,5$ mm, *B. subtilis* bakterisine $14,3 \pm 1,0$ mm, *B. cereus* bakterisine $11,3 \pm 1,0$ mm, *P. vulgaris* bakterisine $15,0 \pm 0$ mm, *S. aureus* bakterisine $13,7 \pm 0,5$ mm, *P. aeruginosa* bakterisine $13,0 \pm 0$ mm, *S. typhimurium* bakterisine $10,0 \pm 0$ mm, *E. hirae* bakterisine $13,7 \pm 0,5$ mm ve *K. pneumoniae* bakterisine $12,3 \pm 0,5$ mm zon oluşmuştur. 4e bileşiği *E. coli* ATCC 25922 ve *B. subtilis* bakterilerine $11,3 \pm 0,5$ mm, *P. vulgaris* bakterisine $11,0 \pm 0$ mm, *S. aureus* bakterisine $13,0 \pm 0$ mm, *P. aeruginosa* bakterisine $11,3 \pm 0,5$ mm, *K. pneumoniae* bakterisine ise $11,0 \pm 0$ mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuştur. 4f bileşiği sadece *E. faecalis* bakterisine $11,7 \pm 0,5$ mm'lik inhibisyonu zonu oluşturmuştur, diğer bakteriler üzerinde zon oluşumu gözlemlenmemiştir. 4g bileşiği *B. cereus* bakterisi hariç çalışılan diğer 10 bakteri için de inhibisyon zonu oluşturmuş olup, inhibisyon zon çapları şu şekildedir; *E. coli* ATCC 25922 bakterisine $10 \pm 0,5$ mm, *E. coli*

ATCC 35218 bakterisine $14,0 \pm 1,0$ mm, *E. faecalis* bakterisine $10,3 \pm 0,5$ mm, *B. subtilis* bakterisine $21,0 \pm 1,0$ mm, *P. vulgaris* bakterisine $14,3 \pm 0,5$ mm, *S. aureus* bakterisine $12,0 \pm 1,0$ mm, *P. aeruginosa* bakterisine $13,3 \pm 0,5$ mm, *S. typhimurium* bakterisine $12,7 \pm 0,5$ mm, *E. hirae* bakterisine $11,0 \pm 1,0$ mm ve *K. pneumoniae* bakterisine $14,7 \pm 1,5$ mm. 4h bileşiği çalışılan tüm Gram pozitif ve Gram negatif bakteri türleri için inhibisyon zonu oluşturmuştur ve zon çapları şu şekilde tespit edilmiştir; *E. coli* ATCC 25922 bakterisine $29,0 \pm 1,0$ mm, *E. coli* ATCC 35218 bakterisine $20,3 \pm 0,5$ mm, *E. faecalis* bakterisine $23,7 \pm 1,0$ mm, *B. subtilis* bakterisine $24,3 \pm 1,0$ mm, *B. cereus* bakterisine $19,3 \pm 1,0$ mm, *P. vulgaris* bakterisine $28,0 \pm 3,5$ mm, *S. aureus* bakterisine $23,7 \pm 1,5$ mm, *P. aeruginosa* bakterisine $17,3 \pm 3,0$ mm, *S. typhimurium* bakterisine $27,0 \pm 1,0$ mm, *E. hirae* bakterisine $20,0 \pm 0$ mm ve *K. pneumoniae* bakterisine $26,3 \pm 1,0$ mm. 3g, 4c ve 4d bileşiklerinin kullanılan mikroorganizmaların hiçbirisi için inhibisyon zonu oluşturmadığı görülmüştür.

3d ve 3h bileşiklerinin tüm bakteri türleri yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. 3h bileşiğinin *S. aureus* bakterisine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları Resim 4.1.'de verilmiştir. 3d bileşiğinin ayrıca *E. coli* ATCC 35218, *B. subtilis*, *B. cereus* (Resim 4.1) ve *E. hirae* bakterilerine karşı pozitif kontrolden daha yüksek seviyede aktivite gösterdiği görülmüştür. Buna ek olarak bu çalışmada kullanılan tüm bakteri türleri üzerinde, 4, 4b bileşiklerinin orta derecede, 4h bileşiğinin ise yüksek derecede antimikrobiyal aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir. 4h maddesinin *E. coli* ATCC 25922 (Resim 4.1), *E. coli* ATCC 35218, *B. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerine karşı oluşturduğu zonların, pozitif kontrollerde kullanılan antibiyotiklere oranla daha fazla olduğu ortaya konulmuştur.

B. cereus dışındaki tüm bakteriler 4g bileşiğine duyarlı olmasına rağmen, bu kimyasala en duyarlı bakteri türü $21,0 \pm 1,0$ inhibisyon zon çapı ile *B. subtilis*'tir (Resim 4.1).



Resim 4.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesini gösteren fotoğraflar (3h bileşiğinin *S. aureus* üzerinde (A), 3d bileşiğinin *B. cereus* üzerinde (B), 4g bileşiğinin *B. subtilis* üzerinde (C), 4h bileşiğinin *E. coli* üzerindeki (D) inhibisyon zonları gösterilmiştir)

Pirolidin sübstütüe bileşiklerden 3a bileşiğinin Gram negatif bakterilerden *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* ATCC 35218 bakterilerine, 4a bileşiğinin ise *P. aeruginosa* ve *S. typhimurium* bakterilerine kısmi antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür.

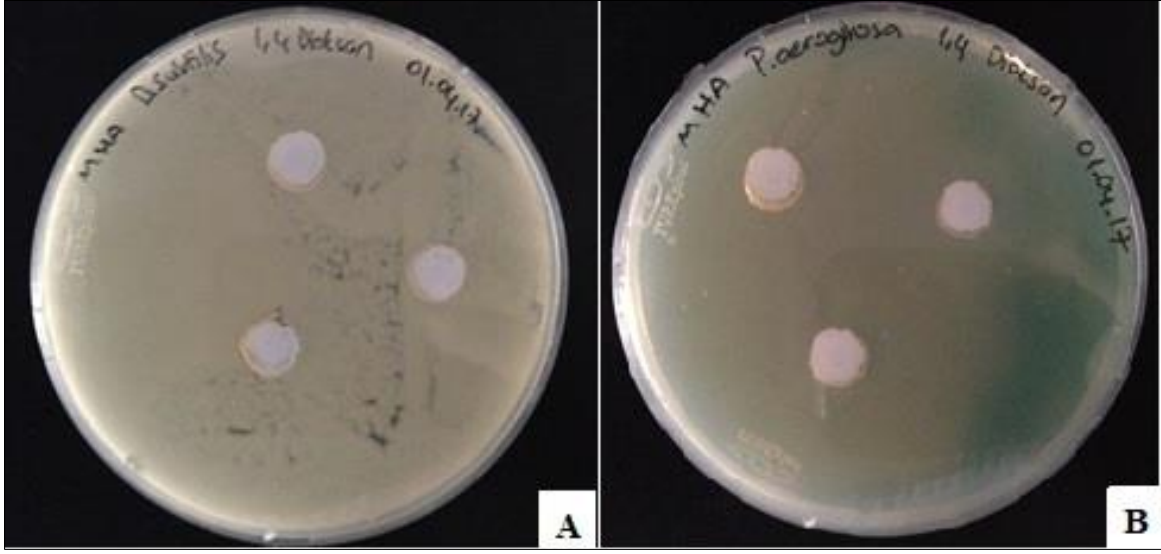
Bileşiklerin mayalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırılırken *C. krusei*, *C. albicans* ve *C. tropicalis* mayaları kullanılmış ve bu mayalardan *C. albicans* ve *C. tropicalis*'e karşı hiçbir fosfazen bileşiğinin inhibisyon zonu oluşturmadığı görülmüştür (Çizelge 4.3). Referans olarak alınan ketakenazol ile kıyaslandığında, 3d ve 3h bileşiklerinin sadece *C. krusei* üzerinde orta derecede (inhibisyon zonları sırasıyla $13,7 \pm 1,0$

mm, $12,0 \pm 0$ mm), 4e bileşiğinin ise yine *C. krusei* üzerinde düşük derecede $9,7 \pm 0,5$ mm antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Çalışmada 1,4 dioksan negatif kontrol, ketakonazol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. (-) ile belirtilenlerde inhibisyon zonu oluşmamıştır ve 3 tekrarlı yapılan deneyin sonuçları ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Bileşiklerin mayalara karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapları mm cinsinden verilmiştir)

*mm	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. tropicalis</i> Y-12968
3a	-	-	-
3b	-	-	-
3c	-	-	-
3d	$13,7 \pm 1,0$	-	-
3e	-	-	-
3g	-	-	-
3h	$12,0 \pm 0$	-	-
4	-	-	-
4a	-	-	-
4b	-	-	-
4c	-	-	-
4d	-	-	-
4e	$9,7 \pm 0,5$	-	-
4f	-	-	-
4g	-	-	-
4h	-	-	-
1,4 dioksan	-	-	-
Ketakonazol	$18,0 \pm 1,0$	$11,0 \pm 1,0$	$34,0 \pm 2,0$

Negatif kontrol olarak çalışılan ve bileşiklerin çözünmesinde kullanılan 1,4 dioksanın ise ele alınan bakteri ve mayalar üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkisi olmadığı, bakteriler üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığı görülmüştür (Resim 4.2).



Resim 4.2. 1,4 dioksanın antimikrobiyal aktivitesi olmadığını gösteren fotoğraflar

4.1.2. Bileşiklerin MİK ve MBK değerleri

Tüm bakterilere karşı zon oluşumunun gözlemlendiği 3d, 3h, 4, 4b ve 4h bileşikleri ile *B. cereus* NRRL B-3711 hariç tüm bakteriler için antimikrobiyal aktivite gösteren 4g bileşiği için, ortalama inhibisyon zon çapları 14 mm'den fazla olan bakteriler için MİK ve MBK değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Ampisilin (amp) ve kloramfenikol (klo) bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışılan fosfazen bileşiklerinin hiçbirisi mayalar üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite göstermediği için bileşiklerin MFK değerleri üzerine çalışma yapılmamıştır.

Çizelge 4.4. Bileşiklerin bakterilere karşı MİK ve MBK değerleri (Sırasıyla MİK ve MBK değerleri μ M cinsinden verilmiştir)

	3d	3h	4	4b	4g	4h	Amp	Klo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25,75 - 25,75	103 - 103				13 - 13	>125	125, >125
<i>E. coli</i> ATCC 35218	25,75 - 25,75	25,75 - 25,75				13 - 13	>125	>125
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	25,75 - 25,75	51,5 - 51,5	51,5 - 51,5			25,75 - 25,75	31,25	62,5, >125
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	13 - 13	51,5 - 51,5	103 - 206	103 - 103	25,75 - 25,75	51,5 - 51,5	62,5	3,91
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	25,75 - 25,75	825 - 825				825 - 825	31,25	125, >125

Çizelge 4.4. (devam) Bileşiklerin bakterilere karşı MİK ve MBK değerleri (Sırasıyla MİK ve MBK değerleri μM cinsinden verilmiştir)

	3d	3h	4	4b	4g	4h	Amp	Klo
<i>P. vulgaris</i> RSKK 96029	13 - 13	25,75 - 25,75		25,75 - 25,75	13 - 13	13 - 13	>125	125
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25,75 - 25,75	51,5 - 51,5				13 - 13	62,5	125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	13 - 13	25,75 - 25,75				13 - 13	>125	>125
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	25,75 - 25,75	51,5 - 51,5				51,5 - 51,5	62,5	125
<i>E. hirae</i> ATCC 9790	51,5 - 51,5	51,5 - 51,5				13 - 13	62,5	62,5, >125
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	13 - 25,75	25,75 - 51,5			6,5 - 6,5	13 - 13	125	15,63

3d bileşiğinin *B. subtilis*, *P. vulgaris* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı MİK ve MBK değerinin 13 μM olduğu, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium* bakterileri için MİK ve MBK değerlerinin 25,75 μM olduğu, *E. hirae* bakterisi için MİK ve MBK değerlerinin 51,5 μM olduğu, *K. pneumoniae* bakterisi için ise MİK değerinin 13 μM , MBK değerinin 25,75 μM olduğu tespit edilmiştir. 3d bileşiğinin çalışılan 11 bakteri türü için de ampisilinden daha iyi MİK değeri gösterdiği, *B. subtilis* bakterisi hariç diğer 10 bakteri için ise kloramfenikolden daha yüksek değere sahip olduğu görülmüştür.

3h bileşiğinin MİK ve MBK değerlerinin *E. coli* ATCC 35218, *P. vulgaris* ve *P. aeruginosa* bakterileri için 25,75 μM (Resim 4.3), *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *S. aureus* ve *E. hirae* bakterileri için 51,5 μM , *E. coli* ATCC 25922 için 103 μM , *B. cereus* için 825 μM olduğu, *K. pneumoniae* için ise MİK değerinin 25,75 μM , MBK değerinin 51,5 μM olduğu (Resim 4.3) tespit edilmiştir. 3h bileşiğinin MİK ve MBK değerleri pozitif kontrol sonuçları ile karşılaştırıldığında, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. hirae* ve *K. pneumoniae* bakterileri için MİK değerlerinin ampisilinden daha yüksek olduğu, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. hirae* için kloramfenikolden daha iyi olduğu ortaya konulmuştur.

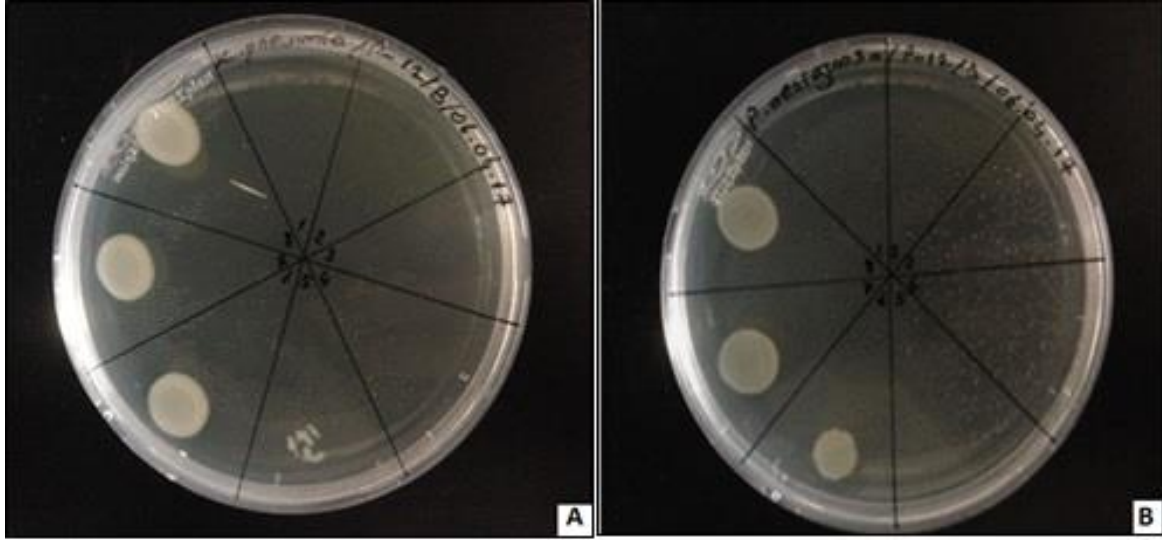
4h bileşiğinin MİK ve MBK değerlerinin *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. hirae* ve *K. pneumoniae* bakterileri için 13 µM, *E. faecalis* için 25,75 µM, *B. subtilis* ve *S. typhimurium* bakterileri için 51,5 µM, *B. cereus* bakterisi için ise 825 µM olduğu tespit edilmiştir. 4h bileşiğinin MİK değerleri ampisilinin MİK değerleri ile karşılaştırıldığında *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. hirae* ve *K. pneumoniae* bakterileri için daha yüksek MİK değerine sahip olduğu, kloramfenikolün MİK değerleri ile karşılaştırıldığında ise *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. hirae* ve *K. pneumoniae* bakterileri için MİK değerinin 4h bileşiğinde daha yüksek olduğu görülmüştür.

4 bileşiğinin *E. faecalis* bakterisine karşı gösterdiği MİK ve MBK değeri 51,5 µM iken, *B. subtilis* bakterisi için MİK değeri 103 µM, MBK değeri 206 µM'dır. 4 bileşiğinin *E. faecalis* için antimikrobiyal aktivite gösterdiği MİK değeri, kloramfenikolden daha yüksektir.

4b bileşiğinin MİK ve MBK değerleri *B. subtilis* ATCC 6633 bakterisi için 103 µM, *P. vulgaris* bakterisi için 25,75 µM olarak bulunmuştur. 4b bileşiğinin *P. vulgaris* bakterisi için MİK ve MBK değerlerinin kloramfenikolden yüksek olduğu görülmüştür.

4g bileşiğinin MİK ve MBK değerlerinin *B. subtilis* bakterisinde 25,75 µM, *P. vulgaris* bakterisinde 13 µM, *K. pneumoniae* bakterisinde ise 6,5 µM olarak tespit edilmiştir. 4g bileşiğinin MİK değerinin *B. subtilis* bakterisi üzerinde ampisilinden, *P. vulgaris* bakterisi üzerinde ampisilin ve kloramfenikolden, *K. pneumoniae* bakterisinde ise ampisilin ve kloramfenikolden daha iyi seviyede olduğu görülmüştür.

2,2 dimetil grubu bulunduran 3h ve 4h bileşiklerinin en az etkili MİK ve MBK değerlerini *B. cereus* bakterisi için 825 µM konsantrasyonda gösterdikleri görülmüştür. 3h bileşiğinin *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* için MİK ve MBK çalışması petri kabı fotoğrafları Resim 4.3'de gösterilmiştir.



Resim 4.3. Bileşiklerin MİK ve MBK değerlerini gösteren fotoğraflar (3h bileşiğinin *K. pneumoniae* üzerindeki MİK ve MBK değerleri sırasıyla 25,75 μ M ve 51,5 μ M (A), 3h bileşiğinin *P. aeruginosa* üzerindeki MİK ve MBK değeri 25,75 μ M (B) gösterilmiştir)

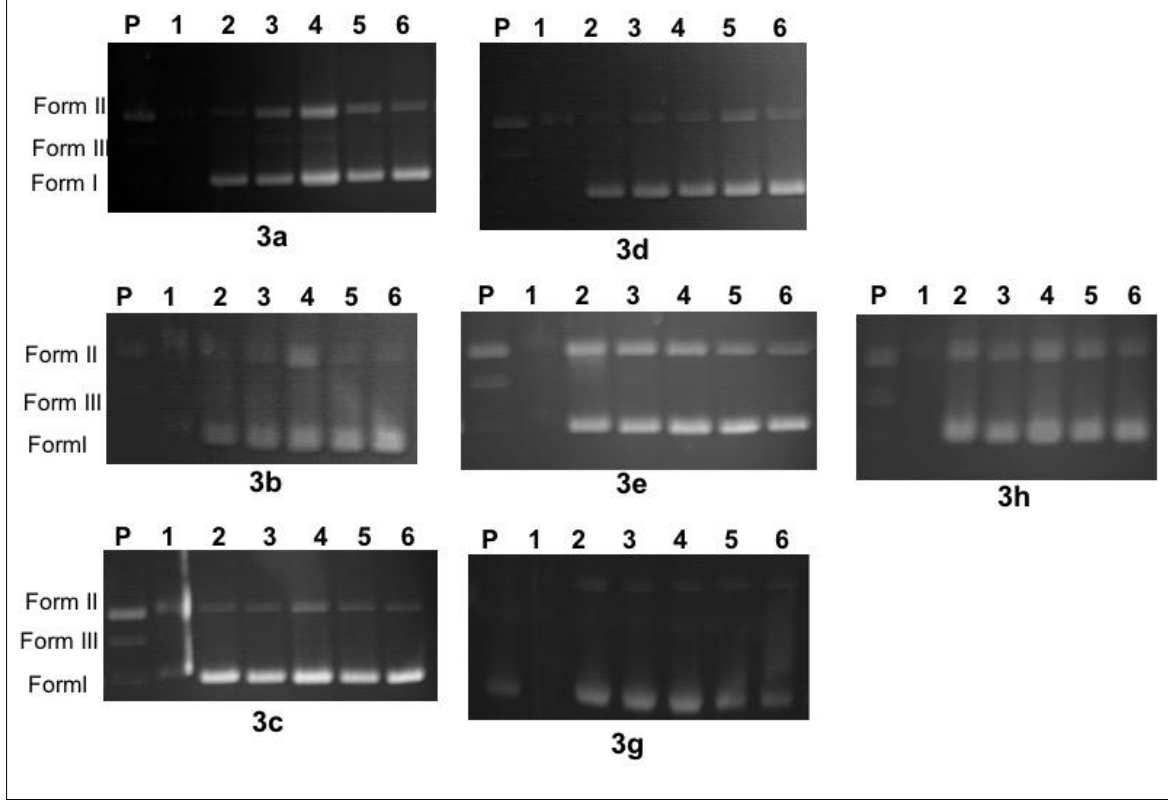
Kontrol çalışması için kullanılan steril kuyucuklardan yapılan ekim sonrasında herhangi bir bakteri üremesi gözlemlenmemiştir. Bileşiklerin 11 bakteri üzerindeki MİK ve MBK değerleri genel olarak incelendiğinde Gram pozitif ve Gram negatif bakteri grupları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir.

4.2. Bileşiklerin Plazmit DNA İle Etkileşimi

Mono-ferrosenil-2-cis-4-dikloro-ansa- (2,4-ansa; 3) ve *N*-mono-ferrosenil-propanoksi- (spiro; 4) siklotetrafosfazen bileşiklerinin; pirolidin (3a, 4a), piperidin (3b, 4b), morfolin (3c, 4c), 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD) (3d, 4d), 4-florobenzil-*N'*-metilpropan-1,3-diamin (3e, 4e), *N*-4-florobenzil-*N'*-metiletan-1,2-diamin (4f), 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit (3g, 4g), 2,2-dimetil-1,3-propanedioksit (3h, 4h) tepkimesi sonucunda oluşan siklotetrafosfazen bileşiklerinin DNA ile etkileşimi çalışmaları agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiş, çalışma sonucunda jeldeki bantların durumu görüntülenerek kaydedilmiştir.

Sentezlenen siklotetrafosfazenlerden ansa halkasına sahip olan 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3g ve 3h bileşiklerinin plazmit DNA ile etkileşimi sonucunda görüntülenen jel fotoğrafları Resim 4.4'te verilmiştir. Bileşik ile muamele edilmeyen plazmit DNA kontrol grubu olarak ilk kuyucuğa yerleştirilmiş ve "P" olarak gösterilmiştir. 1-6 no'lu kuyucuklar sırasıyla: 1650

μM , 825 μM , 412,5 μM , 206,25 μM , 103 μM ve 51,5 μM bileşik konsantrasyonları plazmit DNA karışımı ile yüklenmiştir. Form I kapalı süperhalkasal plazmit DNA bandını, Form II açık halkasal plazmit DNA bandını, Form III doğrusal plazmit DNA bandını göstermektedir (Resim 4.4).



Resim 4.4. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimini gösteren agaroz jel fotoğrafları (P: bileşikle muamele edilmeyen plazmit DNA; 1-6 no'lu kuyucuklar sırasıyla: 1650 μM , 825 μM , 412,5 μM , 206,25 μM , 103 μM ve 51,5 μM konsantrasyonlarındaki bileşik ile 24 saat inkübasyona bırakılmış plazmit DNA; Form I: kapalı süperhalkasal plazmit DNA bandı, Form II: açık halkasal plazmit DNA bandı, Form III: doğrusal plazmit DNA bandı)

Agaroz jel elektroforez yöntemiyle, bileşiklerin süpersarmal plazmit DNA yapısında değişiklik meydana getirme potansiyeli ortaya konulmuştur. Normal şartlar altında bileşik ile etkileşime girmemiş olan plazmit DNA jelde iki formda görüntülenir; daha koyu renkli gözlenen kapalı halkasal (süpersarmal) Form I ve daha zayıf görüntülenen açık halkasal Form II.

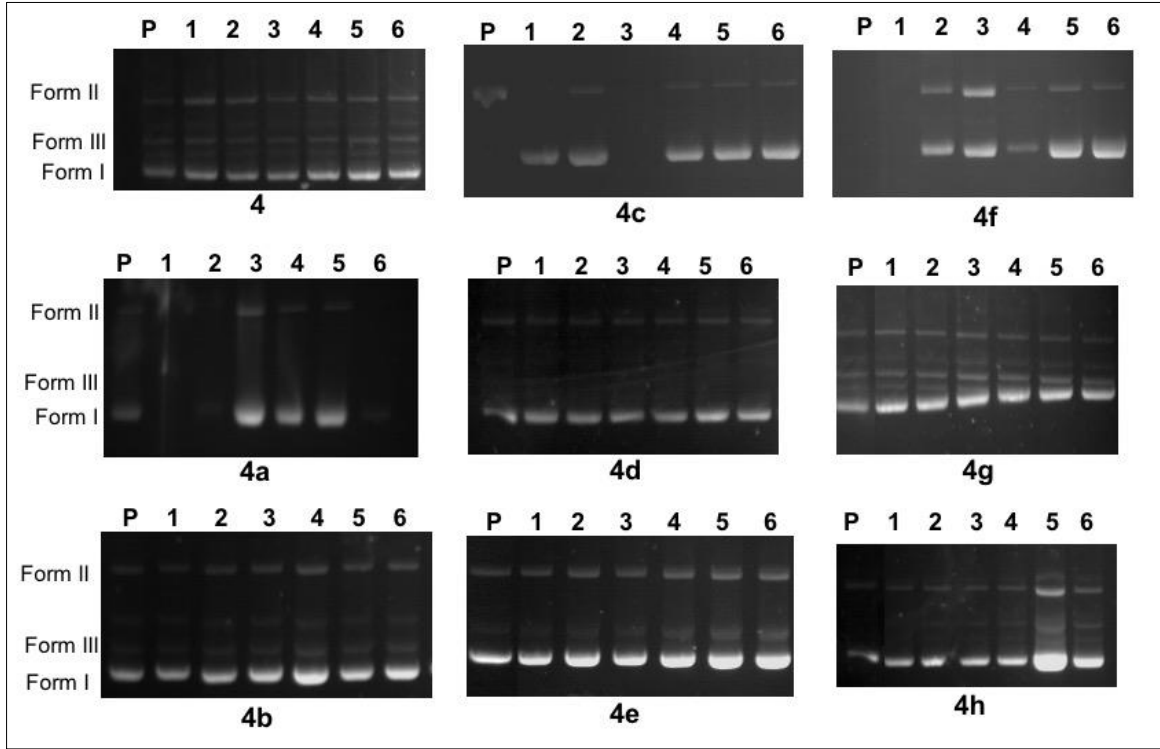
Pirolidin sübstitüe 3a bileşiğinin 1650 μM konsantrasyonunun jel görüntüsünde Form I ve Form II'nin kaybolduğu görülmüştür. Bu durum bileşiğin plazmit DNA'nın görüntülenemeyen küçük parçalara ayrılmasına sebep olmasından kaynaklandığı şeklinde

yorumlanmıştır. Daha düşük konsantrasyonlarda ise doğrusal yapıdaki DNA'nın görüldüğü Form III'ün oluştuğu, Form I ve Form II'nin hareketliliğinde de konsantrasyon azaldıkça düşüş olduğu görülmüştür.

Piperidin süstitüe 3b bileşiğinin plazmit DNA ile etkileşiminde, Form I ve Form II bantlarının hareketliliğinde çok az bir artış gözlemlenirken, konsantrasyon azaldıkça Form I ve Form II'nin yoğunluğu ve hareketliliği hafif artmıştır.

Morfolin süstitüe 3c bileşiğinde Form I'in hareketliliği bileşik konsantrasyonu arttıkça azalmıştır. DASD süstitüe 3d bileşiği ile 2,2-dimetil-1,3-propanedioksit süstitüe 3h bileşiğinde konsantrasyon azaldıkça Form I ve Form II bantlarının yoğunluğu artmıştır. 3d, 3e, 3g ve 3h bileşiklerinde en yüksek konsantrasyonda Form I jelde görüntülenmezken, Form II az yoğunlukta görülmüştür. 3d bileşiğinin Form I bandının hareketliliğinde konsantrasyon azaldıkça az seviyede düşüş görülürken, 3e bileşiğinin düşük konsantrasyonda Form II'nin yoğunluğunda azalma görülmüştür. 3g bileşiğinde ise Form I'in yoğunluğu konsantrasyon azaldıkça artmıştır. 3h bileşiğinin Form I ve Form II hareketliliğinde belirgin bir farklılık görülmemiştir.

Çalışılan bileşiklerden spiro halkasına sahip 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g ve 4h bileşiklerinin plazmit DNA etkileşimi jel fotoğrafları Resim 4.5'te verilmiştir. Bileşikle muamele edilmeyen plazmit DNA "P" ile gösterilmiş olup, 1-6 no'lu kuyucuklar sırasıyla: 1650 μ M, 825 μ M, 412,5 μ M, 206,25 μ M, 103 μ M ve 51,5 μ M bileşik konsantrasyonları-plazmit DNA karışımı ile yüklenmiştir. Form I kapalı süperhalkasal plazmit DNA bandını, Form II açık halkasal plazmit DNA bandını, Form III doğrusal plazmit DNA bandını göstermektedir (Resim 4.5). Pirolidin süstitüe 4a bileşiğinin en yüksek konsantrasyonda plazmit DNA ile etkileşiminde Form I ve Form II jelde görülmezken, Form I'in yoğunluğu ve hareketliliğinde değişiklik gözlemlenmiştir. Spiro halkasına sahip 4b, 4e ve 4h bileşiklerinin agaroz jel görüntülerinde küçük DNA parçacıkları görülmüştür. Bu durum bu bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşiminde DNA kırıklarına sebep olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda bu bileşiklerin konsantrasyonu düşürüldükçe Form I bandının yoğunluğu artmaktadır.



Resim 4.5. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimini gösteren agaroz jel fotoğrafları (P: bileşik ile muamele edilmeyen plazmit DNA; 1-6 no'lu kuyucuklar sırasıyla: 1650 μ M, 825 μ M, 412,5 μ M, 206,25 μ M, 103 μ M ve 51,5 μ M konsantrasyonlarındaki bileşik ile 24 saat inkübasyona bırakılmış plazmit DNA; Form I: kapalı süperhalkasal plazmit DNA bandı, Form II: açık halkasal plazmit DNA bandı, Form III: doğrusal plazmit DNA bandı)

4c ve 4f bileşiklerinin jel görüntülerinde, en yüksek konsantrasyonda Form I'in yoğunluğu azalmıştır. 4d bileşiğinde ise Form I ve Form II'nin hareketliliği ve yoğunluğunda dikkat çekici bir fark olmamıştır.

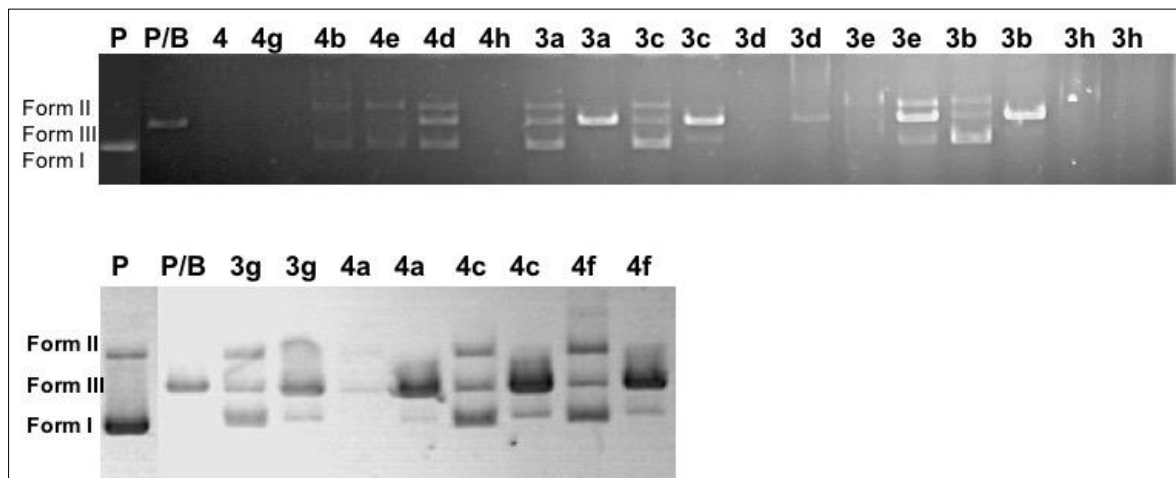
4g bileşiğinin plazmit DNA ile etkileşiminde Form I bandının hareketliliğinin konsantrasyon düştükçe azaldığı ve doğrusal DNA formu olan Form III bandının oluştuğu görülmüştür. Çalışılan bileşikler arasında en iyi DNA kırma aktivitesine sahip olan bileşiğin 4g olduğu tespit edilmiştir.

4.2.1. Bileşiklerin DNA'ya hangi nükleotidlerden bağlandığının gösterilmesi

Sentezlenen bileşiklerin DNA'nın guanin-guanin (G/G) ve/veya adenin-adenin (A/A) bölgelerine bağlanma eğilimi restriksiyon endonükleaz enzimi kesimi ile araştırılmıştır. 4, 4b, 4d, 4e, 4g ve 4h bileşiklerinin en yüksek konsantrasyonu (1650 μ M), 3a, 3c, 3d, 3e, 3b, 3h, 3g, 4a, 4c ve 4f bileşiklerinin ise en yüksek iki konsantrasyonu (1650 μ M ve 825 μ M)

için plazmit DNA karışımlarının *Bam*HI ve *Hind*III enzim kesimi yapılmıştır. *Bam*HI enzimi plazmit DNA'yı 5'-G/GATCC-3' dizisinden, *Hind*III enzimi ise 5'-A/AGCTT-3' dizisinden kesmektedir.

*Bam*HI ve *Hind*III enzim kesimleri sonucu bileşik-DNA karışımlarının jel görüntüleri sırasıyla Resim 4.6 ve Resim 4.7'de verilmiştir. Bileşik ve enzim ile muamele edilmeyen plazmit DNA "P", *Bam*HI ile kesilen plazmit DNA "P/B", *Hind*III ile kesilen plazmit DNA "P/H" olarak gösterilmiştir.

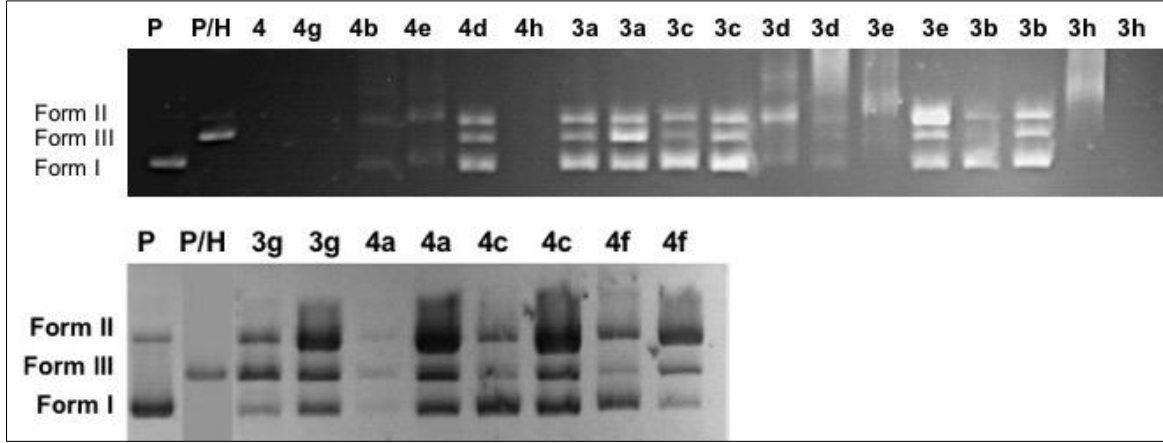


Resim 4.6. Bileşik-DNA karışımının *Bam*HI enzimi ile kesim sonucunda jel elektroforezi fotoğrafları (P: Bileşik ve enzim ile muamele edilmemiş plazmit DNA; P/B: plazmit DNA-*Bam*HI karışımı; 4, 4g, 4b, 4e, 4d ve 4h bileşiklerinin 1650 μ M konsantrasyonla muamele edilmiş plazmit DNA karışımının *Bam*HI enzim kesimi, 3a, 3c, 3d, 3e, 3b, 3h, 3g, 4a, 4c ve 4f bileşiklerinin ise sırasıyla 1650 μ M ve 825 μ M konsantrasyonları ile muamele edilmiş plazmit DNA karışımının *Bam*HI enzim kesimi)

4b ve 4e bileşiklerinin en yüksek konsantrasyon olan 1650 μ M konsantrasyonda plazmit DNA ile etkileşimi, her iki enzim ile inkübe edilip jelde yürütüldüğünde Form I ve Form II bantlar gözlemlenmiştir. Doğrusal DNA olan Form III'ün oluşmaması 4b ve 4e'nin enzim kesimini engellediği ve bu durumda bu bileşiklerin A/A ve G/G bölgelerine bağlanmış olabileceğini göstermektedir.

Çalışılan bileşikler arasında 3a, 3c, 3d, 3e, 3b, 3h, 3g, 4a, 4c, 4d ve 4f bileşiklerinin plazmit DNA ile karışımı sonucunda *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri tarafından kesildiği ve Form III'ün oluştuğu görülmektedir. Bu durumda bu bileşiklerin, *Bam*HI ve *Hind*III

enzimlerinin plazmit DNA'ya bağlanarak kesmesine engel olmadığı, bileşiklerin bu bölgelerden DNA'ya bağlanmadığı sonucu çıkarılmıştır.



Resim 4.7. Bileşik-DNA karışımının *Hind*III enzimi ile kesim sonucunda jel elektroforezi fotoğrafları (P: Bileşik ve enzim ile muamele edilmemiş plazmit DNA; P/H: plazmit DNA- *Hind*III karışımı; 4, 4g, 4b, 4e, 4d ve 4h bileşiklerinin 1650 μ M konsantrasyonla muamele edilmiş plazmit DNA karışımının *Hind*III enzim kesimi, 3a, 3c, 3d, 3e, 3b, 3h, 3g, 4a, 4c ve 4f bileşiklerinin ise sırasıyla 1650 μ M ve 825 μ M konsantrasyonları ile muamele edilmiş plazmit DNA karışımının *Hind*III enzim kesimi)

4.3. Bileşiklerin Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi

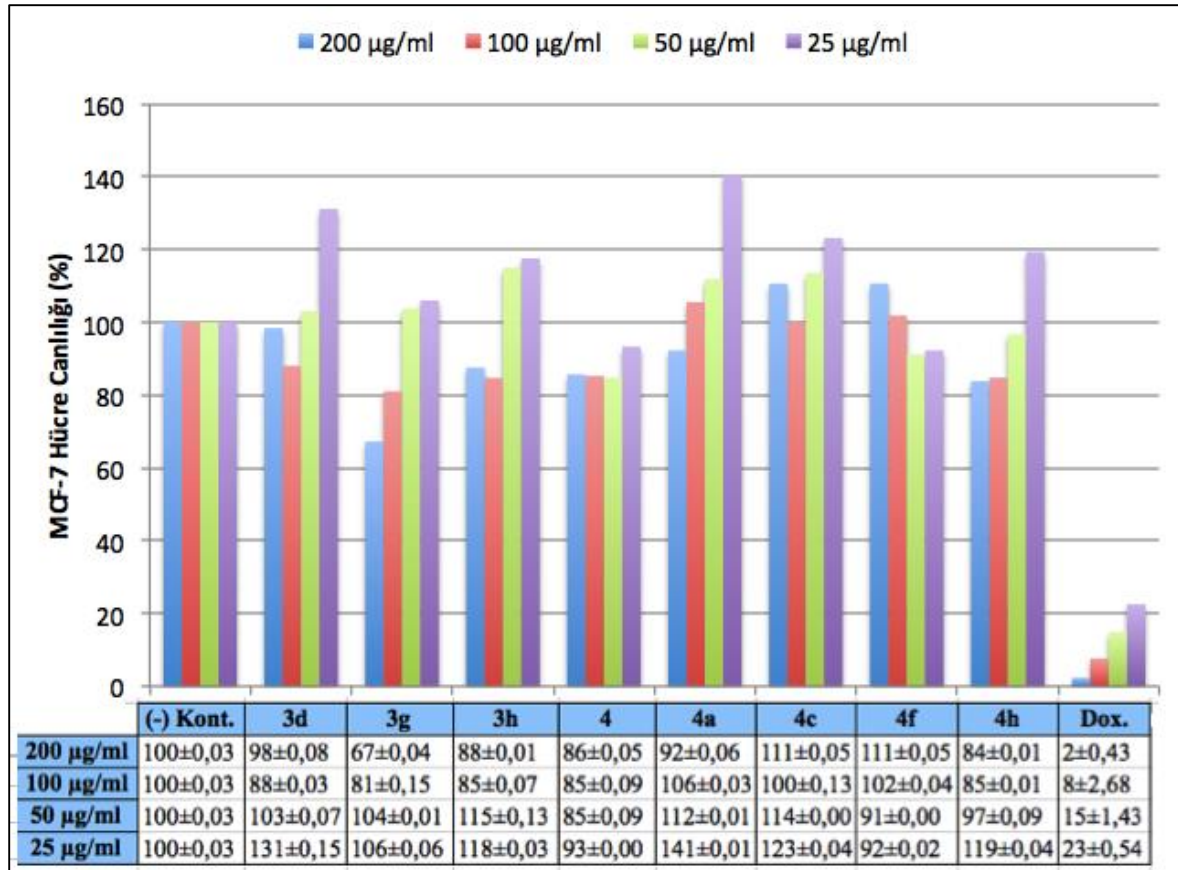
Bileşiklerin sitotoksik aktivitelerinin tayini için WST-1 hücre canlılığı testi, Hoechst 33342 ve PI ile ikili boyama, Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile proliferasyon testi yapılmıştır.

4.3.1. WST-1 testi sonuçları

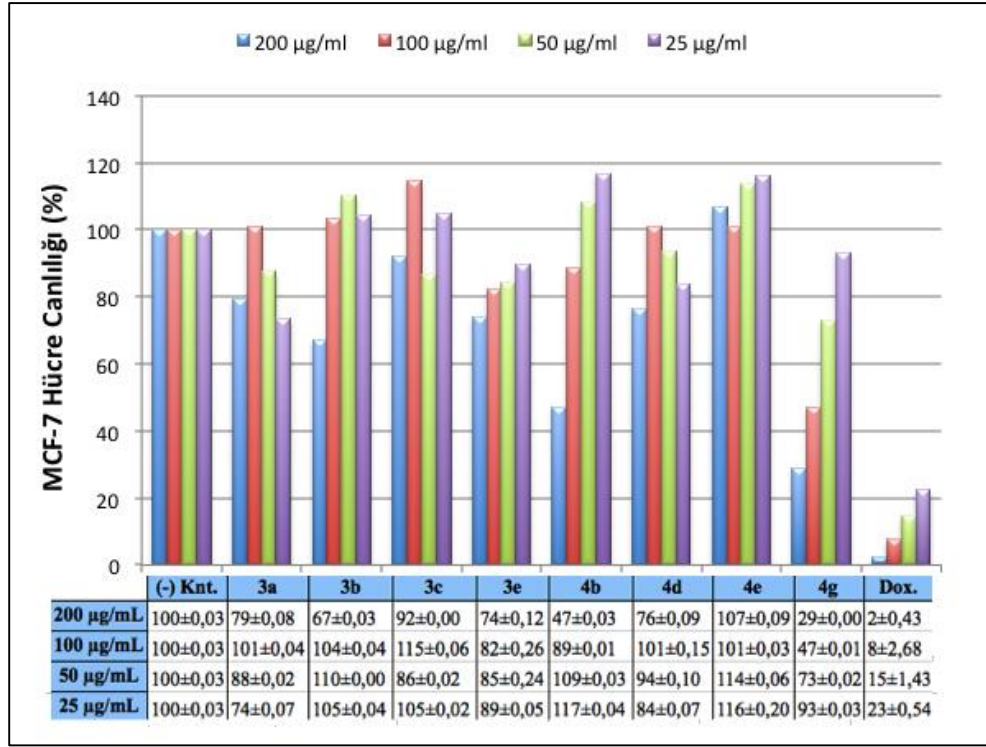
Mono-ferrosenil-2-cis-4-dikloro-ansa- (2,4-ansa; 3) ve *N*-mono-ferrosenil-propanoksi- (spiro; 4) siklotetrafosfazen bileşiklerinin; pirolidin (3a, 4a), piperidin (3b, 4b), morfolin (3c, 4c), 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD) (3d, 4d), 4-florobenzil-*N'*-metilpropan-1,3-diamin (3e, 4e), *N*-4-florobenzil-*N'*-metiletan-1,2-diamin (4f), 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit (3g, 4g), 2,2-dimetil-1,3-propanedioksit (3h, 4h) süstitüe türevlerinin sitotoksik aktivitelerini belirlemek için L929 fibroblast hücreleri (normal hücre grubu) ile MCF-7 meme kanseri hücreleri kullanılarak WST-1 testi yapılmıştır. L929 fibroblast hücrelerinin absorbasyon değerleri ile MCF-7 meme kanseri hücreleri absorbasyon değerleri kullanılarak hücre yaşayabilirliği yüzdesi hesaplanmıştır.

MCF-7 meme kanseri hücreleri için 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f, 4h bileşiklerinin 200-25 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen dört farklı konsantrasyonlarının 24 saat sonrası sonuçları Şekil 4.1'de, 3a, 3b, 3c, 3e, 4b, 4d, 4e ve 4g bileşiklerinin 200-25 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen dört farklı konsantrasyonlarının sonuçları Şekil 4.2'de verilmiştir.

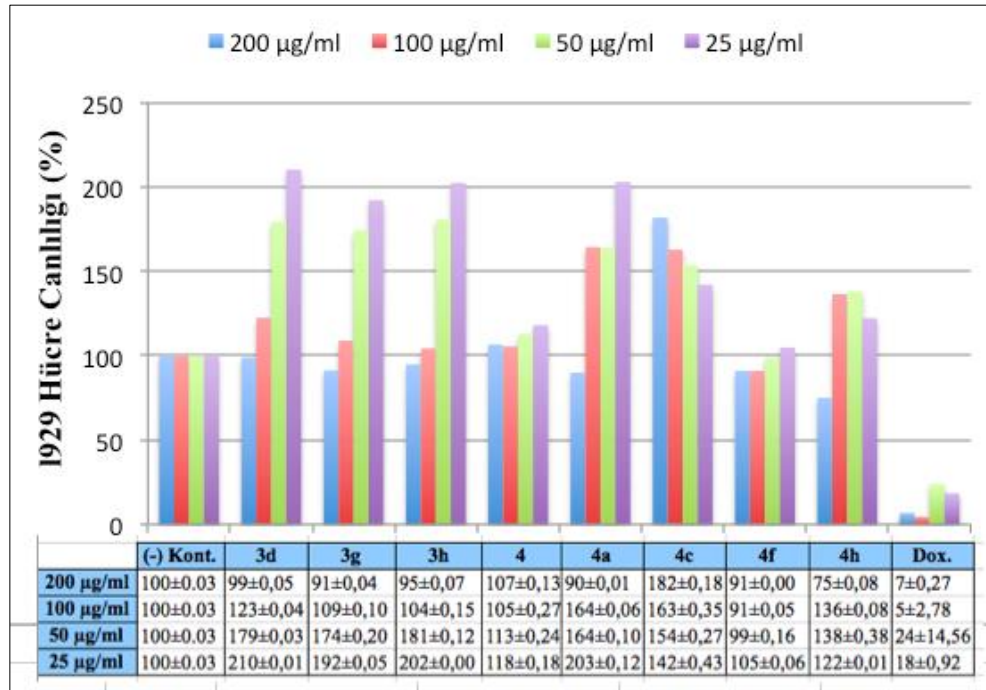
L929 fare fibroblast hücreleri için de 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f, 4h bileşiklerinin 200-25 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen dört farklı konsantrasyonlarının 24 saat sonrası sonuçları Şekil 4.3'te, 3a, 3b, 3c, 3e, 4b, 4d, 4e ve 4g bileşiklerinin 200-25 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen dört farklı konsantrasyonlarının sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir. Tüm deneyler üç tekrarlı yapılmıştır.



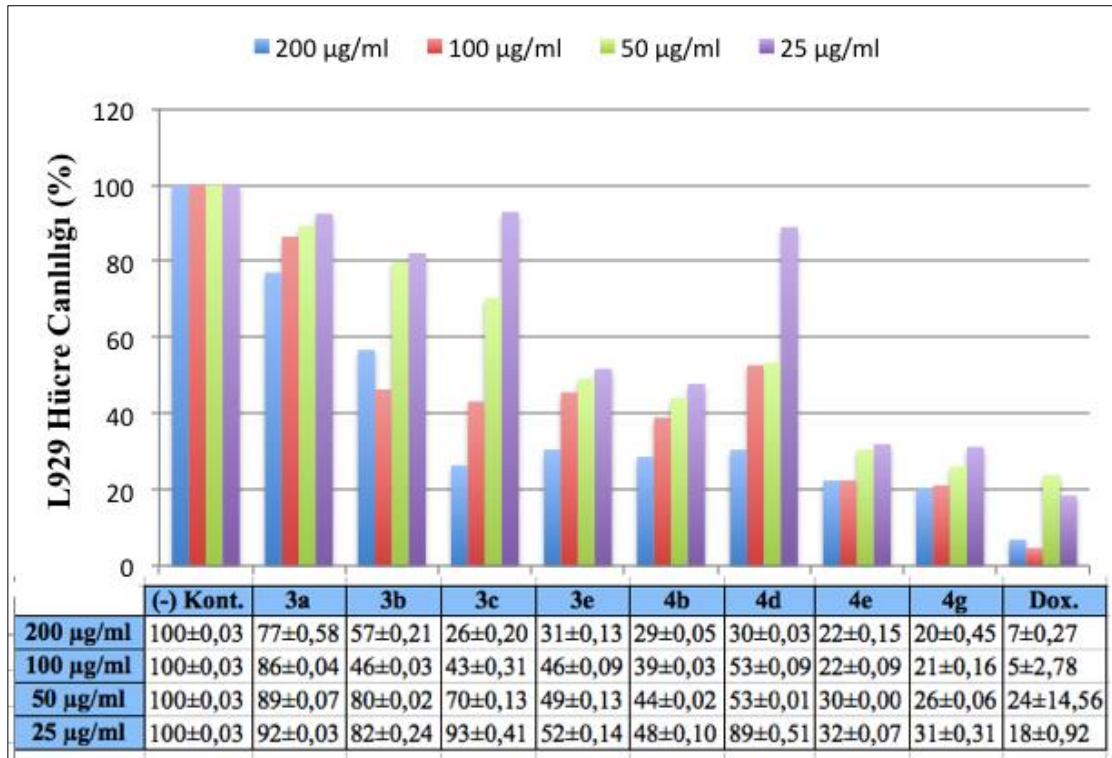
Şekil 4.1. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 3a, 3b, 3c, 3e, 4b, 4d, 4e ve 4g bileşiklerinin doza bağlı sitotoksik aktivitesi (Tümör hücreleri bileşiklerin 200-25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Dox.: Doxorubisin pozitif kontrolü, (-) Kont: negatif kontrolü göstermektedir)



Şekil 4.2. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f ve 4h bileşiklerinin doza bağlı sitotoksik aktivitesi (Tümör hücreleri bileşiklerin 200-25 µg/mL konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Dox.: Doxorubisin pozitif kontrolü, (-) Kont: negatif kontrolü göstermektedir)



Şekil 4.3. L929 fare fibroblast hücrelerinde 3a, 3b, 3c, 3e, 4b, 4d, 4e ve 4g bileşiklerinin doza bağlı sitotoksik aktivitesi (Fibroblast hücreleri bileşiklerin 200-25 µg/mL konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Dox.: Doxorubisin pozitif kontrolü, (-) Kont: negatif kontrolü göstermektedir)



Şekil 4.4. L929 fare fibroblast hücrelerinde 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f ve 4h bileşiklerinin doza bağlı sitotoksik aktivitesi (Fibroblast hücreleri bileşiklerin 200-12,5 µg/mL konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Dox.: Doxorubisin pozitif kontrolü, (-) Kont: negatif kontrolü göstermektedir)

WST-1 testi sonucunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri ISO 10993-5'e göre değerlendirilerek sitotoksik aktiviteye ilişkin yorum yapılmıştır.

MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında yapılan WST-1 test sonuçlarına göre; 4g bileşiği ile muamele edilen sırasıyla 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonları için %47 ve %29 hücre canlılığı tespit edilirken, daha düşük konsantrasyonlarda %70'nin üzerinde hücre canlılığı görülmüştür. Bu nedenle 4g bileşiğinin 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri için sitotoksik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. 4b bileşiğinde sadece 200 µg/mL konsantrasyonunun %47 hücre canlılığı ile sitotoksik etki gösterdiği, daha düşük konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkinin bulunmadığı tespit edilmiştir. 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4d, 4e, 4f, 4h bileşiklerinin çalışılan hiçbir konsantrasyonda MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği değerlendirilmiştir. Bunun yanında piperidin sübstitüe bileşiklerden 3b'nin 100 µg/mL, 50 µg/mL ve 25 µg/mL, 4b'nin ise 50 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde düşük oranda proliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir. 3d ve 3h bileşiklerinin 50-25 µg/mL konsantrasyonları

arasında, hücrelerin proliferasyonunu yüksek oranda artırıcı etki gösterdiği, 3g bileşiğinin 50-25 µg/mL konsantrasyonları arasında proliferasyonu hafif artırdığı, 4a bileşiğinin 100-25 µg/mL konsantrasyonları arasında, 4h'nin ise 25 µg/mL konsantrasyonunda hücre proliferasyonunu arttırdığı ortaya konulmuştur. 4c, 4e ve 4f bileşiklerinin ise çalışılan tüm konsantrasyonlarının hücreler üzerinde proliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

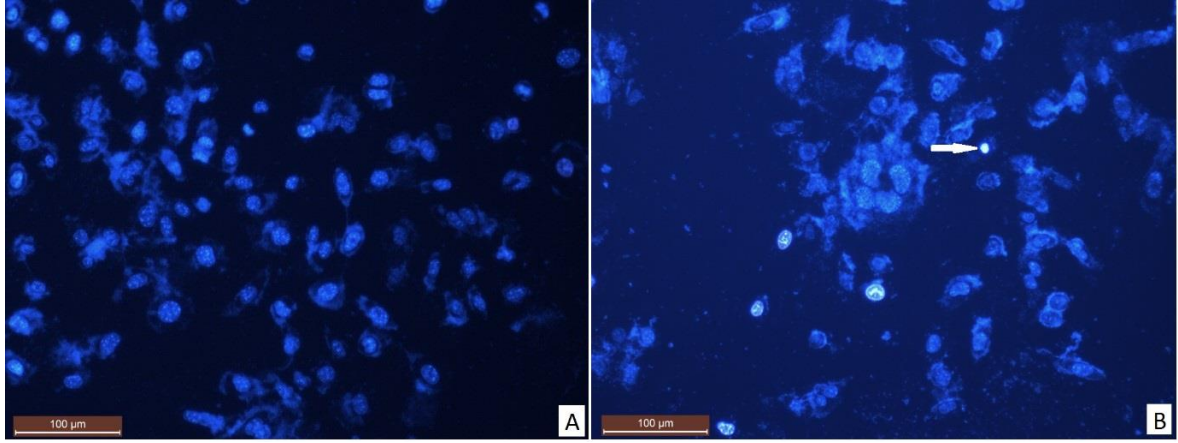
L929 fare fibroblast hücrelerinde yapılan WST-1 testi sonuçlarına göre; 3e bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonunda %31, 100 µg/mL konsantrasyonunda %46, 50 µg/mL konsantrasyonunda %49, 25 µg/mL konsantrasyonunda ise %52 oranında hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bu nedenle 3e bileşiğinde tüm konsantrasyonların bu hücreler için sitotoksik olduğu görülmüştür. 4b bileşiği ile muamele edilen hücrelerde, bileşiğin 200 µg/mL konsantrasyonunda %29, 100 µg/mL konsantrasyonunda %39, 50 µg/mL konsantrasyonunda %44, 25 µg/mL konsantrasyonunda ise %48 canlılık gözlemlenmiştir. 4b bileşiğinin çalışılan tüm konsantrasyonlarının L929 hücreleri için sitotoksik olduğu tespit edilmiştir. 4e bileşiğinin 200 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında %22, 50 µg/mL konsantrasyonda %30, 25 µg/mL konsantrasyonda %32 hücre canlılığı görülmüştür. 4e bileşiğinin tüm konsantrasyonlarda L929 üzerinde sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir. 4g bileşiğinin hücre canlılık yüzdeleri, 200 µg/mL konsantrasyonda %20, 100 µg/mL konsantrasyonda %21, 50 µg/mL konsantrasyonda %26, 25 µg/mL konsantrasyonda %31 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre 4g bileşiğinin çalışılan tüm konsantrasyonlarda L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi bulunduğu ortaya konulmuş olup, 50 µg/mL konsantrasyonda göstermiş olduğu %26'lık canlılık oranı, doxorubisinin 50 µg/mL konsantrasyonda gösterdiği %24'lük canlılık oranına yakın bulunmuştur. 4d bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığı %30, 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında %53 olarak tespit edilmiş olup bu konsantrasyonlarda hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi olduğu, 25 µg/mL konsantrasyonunun ise sitotoksik etkisinin olmadığı görülmüştür. 3b bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonunda %57, 100 µg/mL konsantrasyonunda %46 oranında hücre canlılığı göstererek, bu konsantrasyonlar için sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. 3b bileşiğinin çalışılan daha düşük konsantrasyonlar için sitotoksik aktivitesi gözlemlenmemiştir. 3c bileşiğinin hücre canlılık değerinin 200 µg/mL konsantrasyonda %26, 100 µg/mL konsantrasyonda %43 olduğu tespit edilmiş olup, çalışılan daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etkinin görülmediği belirlenmiştir. 3a, 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f ve 4h bileşiklerinin çalışılan konsantrasyonların hiçbirinde hücre canlılığı yüzdelerinin %70'ten düşük olmadığı, bu nedenle bu bileşiklerin

L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesinin bulunmadığı görülmüştür. Ancak sitotoksikite göstermeyen 3d, 3g, 3h, 4h ve 4a bileşiklerinin 100-25 µg/mL konsantrasyonları arasında tam tersine hücre proliferasyonunu yüksek derecede artırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca 3d, 3g, 3h ve 4a bileşiklerinin proliferasyon etkisinin en yüksek 25 µg/mL konsantrasyonda gösterdiği ortaya konulmuştur. Spiro-4 bileşiğinin tüm konsantrasyonları L929 hücrelerinin proliferasyonunu hafif derecede artırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. 4c bileşiğinin de tüm konsantrasyonlarının proliferasyon etkisi gösterdiği, ancak konsantrasyon azaldıkça proliferasyon etkisinin de azaldığı gözlemlenmiştir.

4.3.2. Apoptotik ve nekrotik etki sonuçları

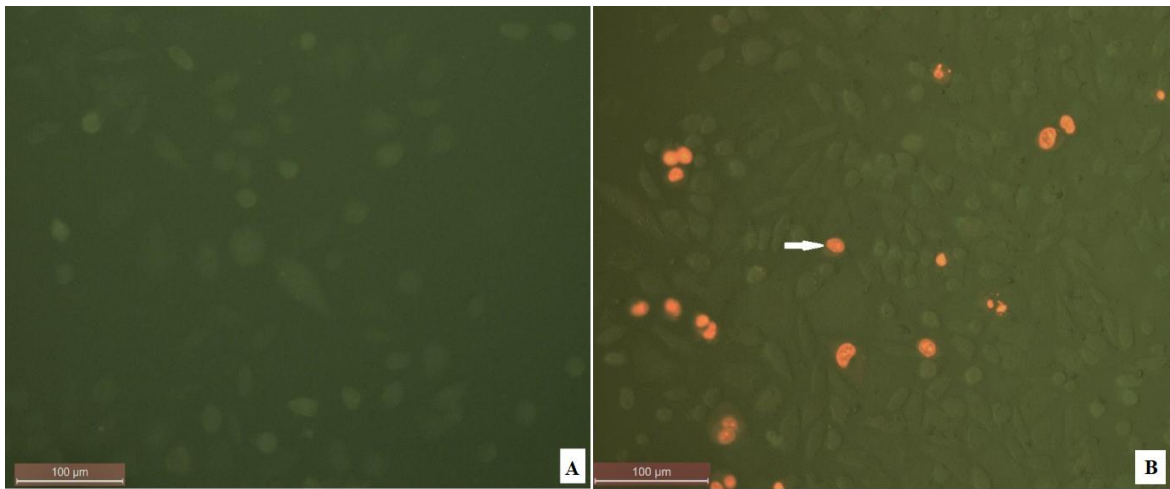
Bileşiklerin L929 fare fibroblast hücreleri ile MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki morfolojik değişiklikler incelenerek, 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f ve 4h bileşiklerinin apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüntülenebilmesi için her iki hücre grubunda da Hoechst 33342 ve PI ile ikili boyama yapılmış ve floresan mikroskobu görüntüleri 100 µm oranda fotoğraflanmıştır (Resim 4.8, Resim 4.9, Resim 4.10 ve Resim 4.11).

Boyama sonrasında yapılan mikroskopik incelemelerde Hoeschst 33342 ile boyanma durumu araştırılmış, L929 fibroblast hücreleri için kontrol grupta morfolojik değişimin olmadığı, apoptotik durumun bulunmadığı gözlemlenmiştir. Resim 4.8’de A ile belirtilen fotoğrafta L929 fibroblast hücrelerinde kontrol grubunda morfolojik değişiklik bulunmazken, B ile belirtilen mikroskopi görüntüsünde 4h bileşiğinin 100 µg/mL konsantrasyonda L929 fibroblast hücreleri ile muamelesi sonrasındaki apoptotik hücre çekirdekleri görülmektedir. Kontrol grubunda hücre çekirdekleri yeşil görülürken, hücreler apoptotik olmayan hücelere göre daha parlak görünümündedir ve morfolojik bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Bileşik ile muamele edilen hücrelerde ise apoptik hücreler ok ile gösterilmiştir ve bu hücreler biçimsiz sınırlara sahip, çekirdekleri bozulmuş bir morfoloji sergilemektedir. (Bkz: Resim 4.8).



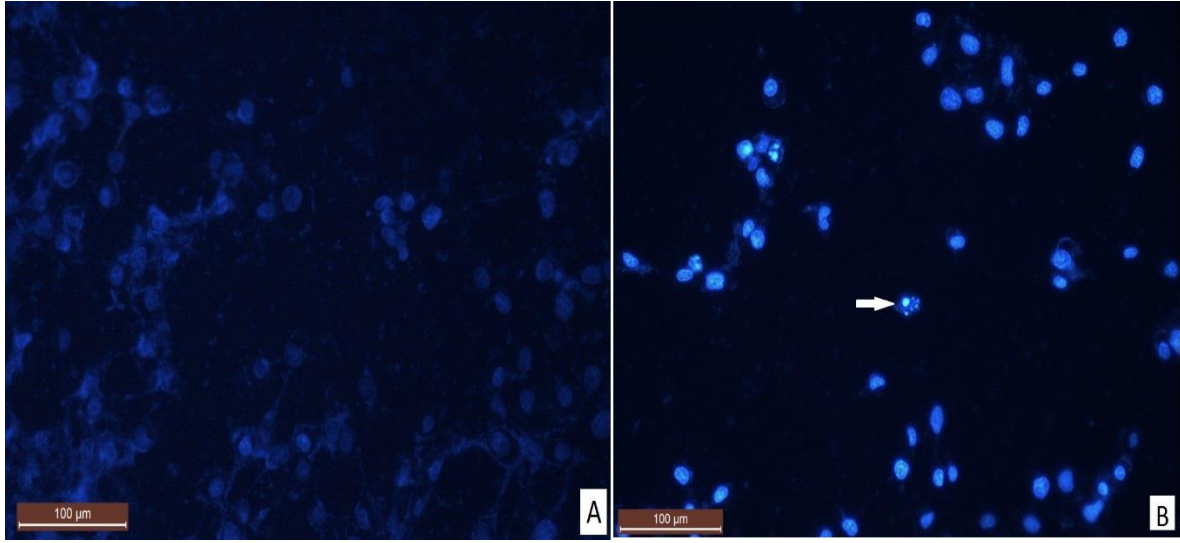
Resim 4.8. L929 fibroblast hücreleri ikili boyama mikroskopi görüntüsü (Bileşik muamele edilmemiş kontrol grubu (A), 4h bileşiğinin 100 µg/mL konsantrasyonu ile muamele edilmiş fibroblast hücreleri (B) ile gösterilmiştir)

Floresan bir molekül olan propidium iyodur (PI) ile yapılan boyamada PI, ölü hücre zarlarını geçerek çekirdeği kırmızı renge boyarken, canlı hücrelerin zarlarını geçememektedir. PI floresan boyası ile boyanan L929 fibroblast hücreleri elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Mikroskobik görüntülere göre kontrol grubunda nekroza uğramış hücre görünümü sergilenmezken, 200 µg/mL konsantrasyondaki 3h bileşiği muamele edilen hücrelerde ise çekirdekleri kırmızıya boyanan, nekroza uğramış hücreler tespit edilmiştir (Resim 4.9). Kontrol grubunda nekrotik hücelere rastlanmazken (Resim 4.9-A), 3h bileşiği ile muamele edildiğinde nekrotik görünüm sergileyen hücreler ok ile gösterilmiştir (Resim 4.9-B). Görüntüler 100 µm oranda, 200X büyütme ile alınmıştır.



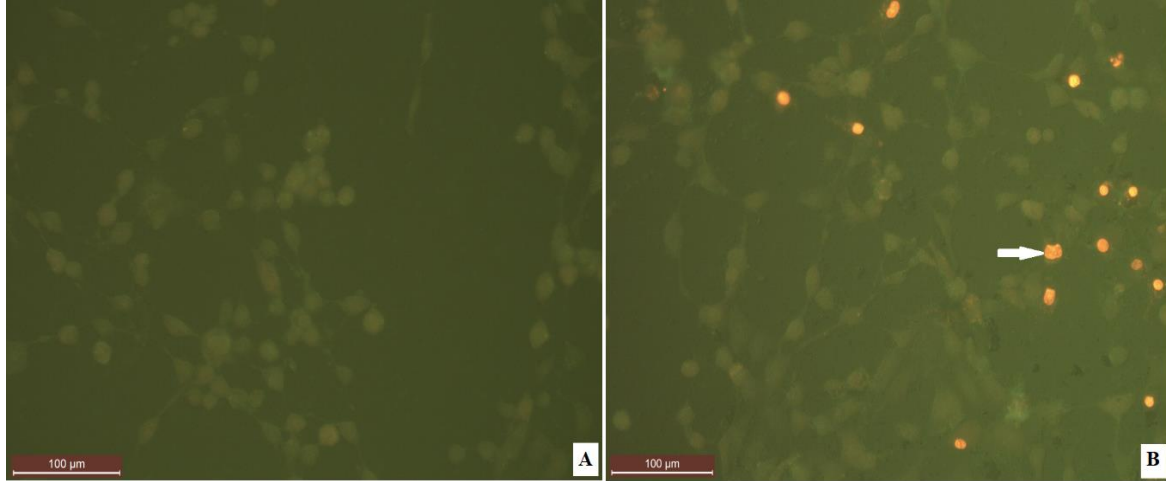
Resim 4.9. L929 fibroblast hücreleri ikili boyama mikroskopi görüntüsü (Bileşik muamele edilmemiş kontrol grubu (A), 3h bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonu ile muamele edilmiş fibroblast hücreleri (B) gösterilmiştir)

İkili boyama sonrasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinin mikroskopik görüntüleri Resim 4.10'da verilmiştir. Mikroskopi görüntüsünde MCF-7 meme kanseri hücre hattında, kontrol grubunda hücrelerde morfolojik değişiklik gözlemlenmezken (Resim 4.10-A), 3g bileşiğinin 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda MCF-7 hücre hattında, koyu mavi ile boyanan apoptotik hücre çekirdekleri okla gösterilmiştir (Resim 4.10-B). Görüntüler 100 μm oranda, 200X büyütme ile alınmıştır.



Resim 4.10. MCF-7 meme kanseri hücreleri ikili boyama mikroskopi görüntüsü (Bileşik ile muamele edilmemiş kontrol grubu (A), 3g bileşiğinin 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu ile muamele edilmiş tümör hücreleri (B) gösterilmiştir)

MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ikili boyaması sonucunda, bileşik ile muamele edilmeyen kontrol grubu (A) ve 4f bileşiğinin 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerin (B) mikroskopi görüntüsü Resim 4.11'de verilmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, kontrol grubunda yeşil ile boyananlar nekrotik olmayan hücrelerdir (Resim 4.11-A). 4f bileşiğinin 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda nekroza uğrayan hücre çekirdekleri ok ile gösterilmiştir (Resim 4.11-B). Görüntüler 100 μm oranda, 200X büyütme ile alınmıştır.



Resim 4.11. MCF-7 meme kanseri hücreleri ikili boyama mikroskopi görüntüsü (Bileşiklerle muamele edilmemiş kontrol grubu (A), 4f bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonu ile muamele edilmiş tümör hücreleri (B) gösterilmiştir)

Sitotoksik aktivitesi çalışılan 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f ve 4h bileşiklerinin 200-12,5 µg/mL arasındaki beş farklı konsantrasyonunun apoptotik hücre indeksi L929 fare fibroblast hücreleri için Çizelge 4.5'te, MCF-7 meme kanseri hücre hatları için Çizelge 4.6'da verilmiştir. 3 tekrarlı yapılan deneyin sonuçları ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.5. Bileşiklerin L929 fibroblast hücrelerinde doza bağlı apoptotik hücre indeksleri

Bileşik	L929 Fibroblast Hücreleri				
	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
3d	1,5 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 1,0
3g	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,0
3h	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 1,5
4	0,5 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,5
4a	2,5 $\pm$ 1,5	1,5 $\pm$ 1,5	2,5 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,5
4c	2,0 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 1,5	1,5 $\pm$ 1,5	2,5 $\pm$ 0,5
4f	3,0 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 1,0	4,0 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 2,5
4h	1,5 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 1,0	0,5 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,5

Çizelge 4.6. Bileşiklerin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı apoptotik hücre indeksleri

Bileşik	MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri				
	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
3d	3,5 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 1,0	4,0 $\pm$ 2,0
3g	2,0 $\pm$ 2,0	6,0 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,0	6,5 $\pm$ 1,5
3h	0,0 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,5	4,5 $\pm$ 2,5	20,0 $\pm$ 0,0	15 $\pm$ 0,0
4	2,0 $\pm$ 1,0	2,0 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 1,0	4,0 $\pm$ 0,0	4,5 $\pm$ 0,5
4a	1,5 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,0	4,5 $\pm$ 0,5	8,0 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 2,5

Çizelge 4.6. (devam) Bileşiklerin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı apoptotik hücre indeksleri

Bileşik	MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri				
	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
4c	1,0±1,0	0,0±0,0	5,0±0,0	2,0±0,0	10,0±0,0
4f	2,0±2,0	1,0±0,0	4,0±0,0	6,0±0,0	5,0±0,0
4h	2,5±0,5	0,5±0,5	4,0±1,0	2,5±0,5	6,0±1,0

Bileşiklerin apoptotik hücre indeksi sonuçlarına göre; 3h bileşiğinin apoptotik hücre indeksleri L929 fibroblast hücre hattı ile MCF-7 meme kanseri hücre hatları için karşılaştırıldığında, bileşiğin uygulandığı sağlıklı L929 fibroblast hücrelerinde apoptotik etki görülmezken, 3h bileşiğinin 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerine karşı sırasıyla 20,0±0 ve 15,0±0 hücre indeksiyle apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir. 4c bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonunun MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde, L929 fibroblast hücrelerine kıyasla daha fazla apoptotik etki gösterdiği görülmüştür. Diğer bileşiklerin apoptotik hücre indeksleri değerlendirildiğinde genel olarak konsantrasyon düştükçe apoptotik etkinin azaldığı görülmüştür. 4a bileşiğinin 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki apoptotik hücre indekslerinin L929 fibroblast hücrelerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 3d, 3g ve 4 bileşiklerinin tüm konsantrasyonlarının apoptotik hücre indekslerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, L929 fibroblast hücrelerine göre daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur.

Sitotoksik aktivitesi çalışılan 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f ve 4h bileşiklerinin 200-12,5 µg/mL arasındaki beş farklı konsantrasyonunun nekrotik hücre indeksi L929 fare fibroblast hücreleri için Çizelge 4.7’de, MCF-7 meme kanseri hücre hatları için Çizelge 4.8’de verilmiştir. 3 tekrarlı yapılan deneyin sonuçları ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.7. Bileşiklerin L929 fibroblast hücrelerinde doza bağlı nekrotik hücre indeksleri

Bileşik	L929 Fibroblast Hücreleri				
	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
3d	8,0±2,0	1,0±0,0	9,0 ± 2,0	13,0 ± 1,0	15,0 ± 0,0
3g	8,5±0,5	4,0±1,0	6,5 ± 1,5	6,0 ± 3,0	2,0 ± 0,0
3h	2,5±1,5	4,5±2,5	2,0 ± 1,0	6,0 ± 1,0	18,5 ± 2,5
4	4,0±3,0	3,5±0,5	3,0 ± 2,0	10,0 ± 0,0	33,0 ± 17,0

Çizelge 4.7. (devam) Bileşiklerin L929 fibroblast hücrelerinde doza bağlı nekrotik hücre indeksleri

Bileşik	L929 Fibroblast Hücreleri				
	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
4a	6,0±4,0	6,0±4,0	18,0 ± 4,0	11,5 ± 1,5	11,5 ± 3,5
4c	2,0±0,0	2,5±0,5	8,5 ± 0,5	19,5 ± 5,5	>50,0 ± 0,0
4f	1,0±0,0	11,0±4,0	14,5 ± 0,5	12,0 ± 0,0	>50,0 ± 0,0
4h	4,5±0,5	6,5±2,5	>50,0 ± 0,0	9,0 ± 4,0	4,5 ± 1,5

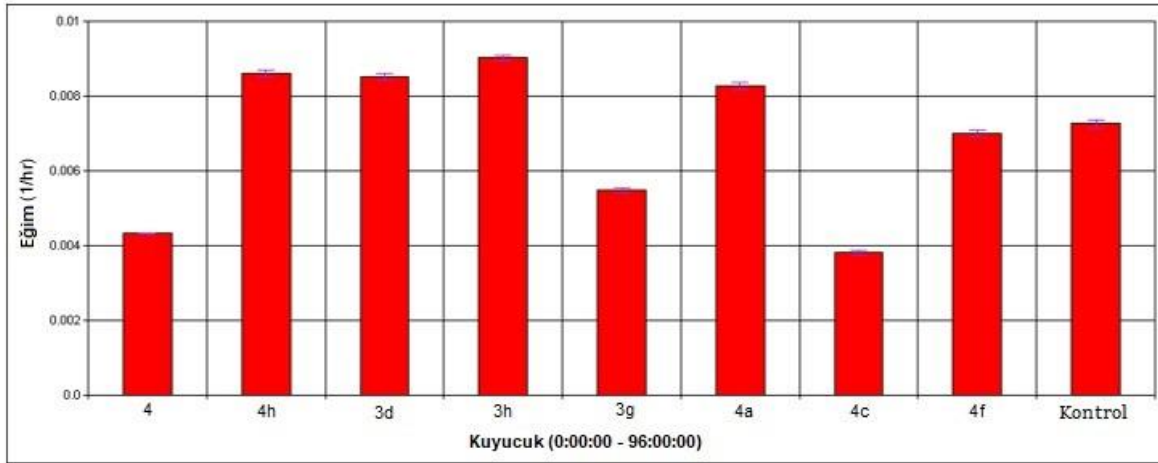
Çizelge 4.8. Bileşiklerin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı nekrotik hücre indeksleri

Bileşik	MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri				
	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
3d	5,0 ± 2,0	6,5 ± 0,5	6,0 ± 1,0	3,0 ± 0,0	4,0 ± 2,0
3g	3,0 ± 2,0	4,0 ± 2,0	6,0 ± 2,0	1,5 ± 0,5	>50,0 ± 0,0
3h	2,5 ± 0,5	2,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	30,0 ± 10,0
4	4,0 ± 1,0	10,0 ± 0,0	2,5 ± 0,5	1,0 ± 0,0	>50 ± 0,0
4a	9,0 ± 1,0	5,0 ± 0,0	8,5 ± 1,5	7,5 ± 2,5	25,0 ± 0,0
4c	3,5 ± 1,5	1,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	>50,0 ± 0,0
4f	2,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	11,0 ± 1,0	16,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0
4h	9,0 ± 1,0	4,0 ± 2,0	3,0 ± 1,0	14,0 ± 2,0	10,0 ± 0,0

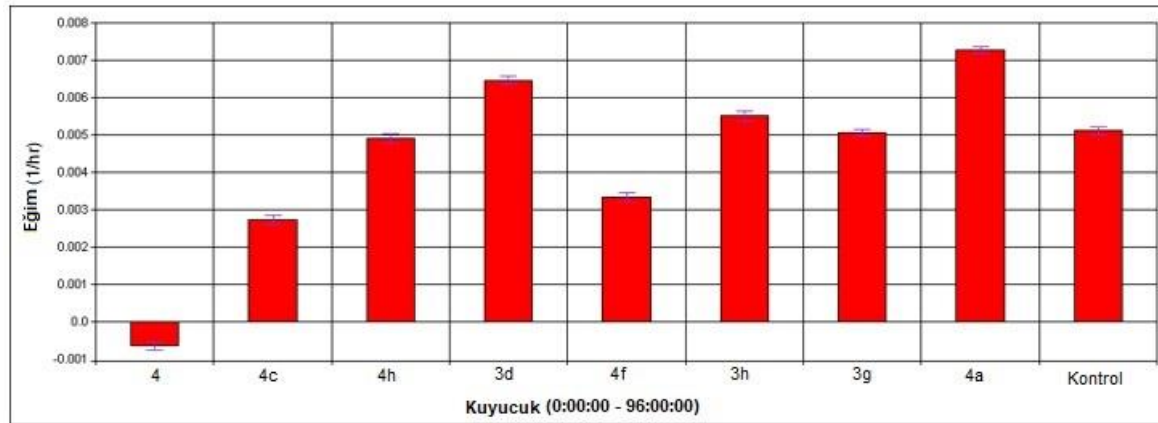
Bileşiklerin nekrotik hücre indeksi sonuçlarına göre; 3d bileşiğinin 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarının L929 fibroblast hücrelerinde sırasıyla 13,0±1 ve 15,0±0 hücre indeksiyle, MCF-7 meme kanseri hücrelerine göre daha yüksek nekrotik hücre indeksine sahip olduğu görülmüştür. 3g bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonunun MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki nekrotik hücre indeksi >50,0±0 bulunmuş olup, L929 fibroblast hücrelerine göre kanser hücrelerinde daha yüksek nekrotik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. 3h bileşiğinin 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarının nekrotik hücre indekslerinin L929 fibroblast hücrelerinde, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin indeksine göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 4 bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonunun MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki nekrotik hücre indeksinin L929 fibroblast hücrelerindeki nekrotik hücre indeksine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. 4f bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonunun nekrotik hücre indeksinin L929 fare fibroblast hücrelerinde, MCF-7 meme kanseri hücrelerine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.3.3. Hücre proliferasyon analizi sonuçları

3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c, 4f ve 4h bileşiklerinin L929 fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki inhibisyon ve antiproliferatif etkileri, Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile araştırılmıştır. Fosfazen bileşiklerinin L929 fibroblast hücre kültüründeki hücre indeksi-zaman grafiğinin eğim grafiği Şekil 4.5’de, MCF-7 meme kanseri hücre kültüründeki hücre indeksi-zaman grafiğinin eğim grafiği Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.5. Bileşiklerin L929 fibroblast hücrelerinde Gerçek Zamanlı Hücre Analizi sonucu (Bileşiklerin 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda “hücre indeksi (CI)-zaman grafiği”nin eğim grafiği verilmiştir)



Şekil 4.6. Bileşiklerin MCF-7 meme kanser hücrelerinde Gerçek Zamanlı Hücre Analizi sonucu (Bileşiklerin 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda “hücre indeksi (CI)-zaman grafiği”nin eğim grafiği verilmiştir)

Çalışma sonucunda spiro-4 bileşiğinin 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu 96 saat tümör hücreleriyle muamele edilince MCF-7 meme kanseri hücre proliferasyonunun düştüğü, L929 fibroblast hücrelerinde de yine bileşiklerle muamele edilmemiş kontrol grubuyla

kıyaslandığında proliferasyonun biraz düştüğü görülmüştür. Morfolin sübstitüe 4c bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonunun 96 saat muamele edildiği L929 ve MCF-7 hücre kültürlerinde proliferasyonun düştüğü görülmüştür. 3g bileşiğinin uygulandığı MCF-7 meme kanseri hücrelerinde proliferasyonun aynı kaldığı, ancak L929 fibroblast hücrelerinde biraz düştüğü, 4f bileşiğinin ise MCF-7 meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu biraz azaltıcı etki gösterdiği ancak L929 hücreleri üzerinde proliferasyon yönünden bir etkisi olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak sekiz bileşiğin her iki hücre hattı üzerindeki bulguları, bileşiklerle muamele edilmemiş olan kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, gözlemlenebilir bir antiproliferatif etkinin bulunmadığı değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fosfazenler tamamen parçalanabilir bir iskelete sahip olmaları, bozunma ürünlerinin toksik olmaması, moleküler ağırlığının kontrol edilebilir oluşu ve yüksek işlevselliğe sahip olması nedeniyle pek çok biyomedikal uygulamada kullanılmaya elverişlidir (Teasdale ve Brüggemann, 2013). Bu çalışmada da yeni üretilmiş N/O donör atomlu oktakloro siklotetrafosfazenlerin, mono-ferrosenil-2-cis-4-dikloro-ansa- (2,4-ansa; 3) ve N-mono-ferrosenil-propanoksi- (spiro; 4) siklotetrafosfazen bileşiklerinin; pirolidin (3a, 4a), piperidin (3b, 4b), morfolin (3c, 4c), 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD) (3d, 4d), 4-florobenzil-N'-metilpropan-1,3-diamin (3e, 4e), N-4-florobenzil-N'-metiletan-1,2-diamin (4f), 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit (3g, 4g), 2,2-dimetil-1,3-propanedioksit (3h, 4h) gruplarıyla reaksiyonu sonucu elde edilmiş 16 bileşiğin biyolojik aktiviteleri çalışılmıştır. Bu amaçla fosfazenlerin antimikrobiyal aktivite, DNA etkileşimleri, sitotoksik etkileri ile apoptotik, nekrotik etkileri çalışılarak, bu bileşiklerin çeşitli biyomedikal ve diğer teknolojik uygulamalarda kullanışlılığına ilişkin veriler sağlanmıştır.

Bir fosfazen bileşiğinin genel olarak antimikrobiyal aktivitesinin, bileşiğin sterik, elektronik ve farmakokinetik özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Mutlu ve diğerleri, 2015). Halkalı fosfazenlerin Cl atomuyla yer değiştirme reaksiyonlarına girmesi bu bileşiklerin antimikrobiyal özelliklere sahip olabileceğine ilişkin araştırmaları doğurmuştur (Başterzi ve diğerleri, 2015).

Siklotrifosfazen içeren monokarbonil kurkumin analoglarının *B. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu fosfazenlerin yapısı incelendiğinde, iki aromatik veya Michael alıcı içinde iki domaine ve karbonil gruplarını çevreleyen doymamış C=C bağlarında aromatik halkalara sahip oldukları belirtilmiştir. Bu siklotetrafosfazen halka yapısının bileşiklere antimikrobiyal davranış kazandırmış olabileceği belirtilmiştir (Gül Şeker, Akbal, Atilla, Avşar ve İbişoğlu, 2018).

Schiff baz ve dioksibifenil grubu içeren siklotrifosfazenlerden OH ve Cl grubu içeren bileşiklerin Gram negatif bakterilerden *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* CIP 53153 ve *E. coli* ATCC 25922 suşlarına yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bu bileşiklerin yaklaşık letal dozları LD₅₀ ciprofloksacin ve gatifloksacin referans alınarak karşılaştırılmış ve sonuçları güvenli aralıkta bulunmuştur. Bu bileşiklerin

aynı zamanda nörotoksisite ve antikonvülsan testleri çalışılmış ve bileşiklerin antikonvülsan aktiviteden ziyade sedatif-hipnotik özelliği gösterdiği belirtilmiştir (Çil ve diğerleri, 2012).

Sperminin içeren siklotrifosfazen bileşiklerinin *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923 bakterilerine ve *C. albicans* ATCC 10231 mayasına karşı sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan antimikrobiyal deneylerinde kayda değer antimikrobiyal aktivite saptanamamıştır (Yıldırım ve diğerleri, 2012). Ancak pirolidin ile ikame edilen spiro bino spiro (sbs) siklofosfazenlerin *C. tropicalis* ATCC 13803 mayasına karşı oldukça aktif antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir (Bilge Koçak ve diğerleri, 2013).

Pirolidin türevleri doğal ve biyolojik olarak aktif olduklarından farmasötik amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (Işıklan ve diğerleri, 2010). Pirolidin bulunduran (N/N)spirosiklotrifosfazenlerin standart antimikrobiyal ajanlardan daha yüksek seviyede *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus* NRRL B-3711, *E. hirae* ATCC 9790 ve *C. albicans* ATCC 10231 mikroorganizmalarına antimikrobiyal etki gösterdiği ifade edilmiştir. Aynı çalışmada pirolidin içeren fosfazen bileşiğinin aynı zamanda DLD-1 kolon kanseri hücrelerine yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Asmafiliz ve diğerleri, 2019).

Yıldız, Yılmaz ve Dölger (2007) tarafından sentezlenen 2,4,4,6,6-pentakloro-2-(4-florofenilamino)-1,3,5,2λ⁵,4λ⁵,6λ⁵-triazatrifosfinin, 2,4,4,6,6-pentakloro-2-(4-klorofenilamino)-1,3,5,2λ⁵,4λ⁵,6λ⁵-triazatrifosfinin ve poli[bis(4-florofenilamino)fosfazen] bileşiklerinin antibakteriyel aktivite çalışmalarında, bileşiklerin *M. smegmatis* CCM 2067, *B. cereus* ATCC 7064 ve *E. coli* ATCC 11230 bakterilerine karşı çok yüksek aktivite gösterdiği ve genel olarak bu bileşiklerin Gram pozitif bakterilere daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur.

Koran, Ozkaya, Özen, Çil ve Arslan (2013)'nin heksakis[(4-(hidroksiimino)2-metoksi)fenoksi]siklotrifosfazen benzoil klorid ve tiofen-2-karbonil klorid reaksiyonuyla sentezlenen iki fosfazen bileşiğinin *E. faecalis* ve *E. coli* bakterilerine karşı, referans olarak kullanılan siproflaksasin kadar etkili olduğu ortaya konulmuştur.

Genel olarak antimikrobiyal aktivite çalışmalarında difüzyon ve dilüsyon yöntemleriyle çalışılan aynı örneklerde bir takım sonuç farklılıkları olduğu ortaya konulmuştur. Örneğin fenol ve kekikten elde edilen bir uçucu yağ kullanılarak *E. coli* bakterisine karşı yapılan çalışmada disk difüzyon yöntemi sonucunda fenolün 42 mm, kekik uçucu yağının ise 41 mm.'lik inhibisyon çapı elde edilerek birbirlerine yakın antimikrobiyal aktivite sergilendiği ortaya konulmuştur. Ancak aynı maddelerin *E. coli* bakterisini inhibe etme durumu dilüsyon yöntemi ile araştırıldığında uçucu yağın (1/3000), fenole (1/1000) göre daha yüksek aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (Pellecuer, Allegrini ve Simeon de Buochberg, 1976). Bu durumdan dolayı suda iyi çözünmeyen örneklerin disk difüzyon vb. yöntemlerinin antimikrobiyal aktivite sonuçlarının çok güvenilir olamayabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple geçmiş çalışmalarda, difüzyon yöntemi ile elde edilen inhibisyon zonlarının referans olarak antibiyotiklerinki ile karşılaştırılması ya da çok ilişkili görünmese de inhibisyon zon çaplarının MİK değerleri ile karşılaştırılması önerilmiştir (Rios ve diğerleri, 1988).

Halkalı fosfazen bileşiklerinde Cl atomunun pozisyonunun sitotoksik aktiviteyi etkilediği, orto- pozisyonundaki bileşiğin meta- pozisyonuna göre daha etkili antitümör aktivite sergilediği gösterilmiştir (Koran ve diğerleri, 2017a).

Ferrosen birimleri içeren fosfazenlerin, bu birimlerin redoks aktif özelliğinden dolayı oksidatif DNA zararına sebep olabildiği, bu nedenle DNA etkileşimi gibi biyolojik aktiviteler gösterdiği ifade edilmiştir (Tümer ve diğerleri, 2014). Hekzaklorosiklotrifosfazenlerden elde edilen ferrosenilfosfazen türevlerinin L929 fibroblast ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarıyla yapılan sitotoksisite çalışmalarında, 4 ve 7 olarak isimlendirilen dispiro ferrosenilsiklotrifosfazen *cis* (mezo) ve *trans* (rasemik) yapıdaki izomerlerinin nekrotik etkisinin DLD-1 kolon kanseri hücrelerine karşı, sağlıklı L929 hücrelerine göre daha çok olduğu gösterilmiştir (Tümer ve diğerleri, 2018).

Sekiz adet Cl atomu bulunan bir heterosiklik halkaya sahip olan oktaklorosiklotetrafosfazenler ($N_4P_4Cl_8$)'in antikanser etkisinin olduğu Yenilmez Çiftçi ve diğerleri, (2016) tarafından ortaya konulmuştur. Yenilmez Çiftçi ve diğerleri, (2016)'nın çalışmasında yan grup olarak DNA'ya zarar verme potansiyeli olduğu önceki araştırmalarda gösterilen (Park, Nah, Lee, Oh ve Gye, 2012; Darbre ve Harvey, 2014), maliyeti düşük, pH değişikliklerine karşı dayanıklı olan parabenler kullanılmıştır.

Biyosensör temelli tarama ve *in vitro* çalışmalar propil ve benzil ikameli bileşiklerin yüksek DNA hasarına sebep olduğunu göstermiştir (Yenilmez Çiftçi ve diğerleri, 2016). Ancak bunun yanında bazı pirolidin ve morfolin içeren oktaklorosiklotetrafosfazenlerin HeLa insan rahim ağzı kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalarda sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etki göstermediği ifade edilmiştir (Işıklan ve diğerleri, 2016).

Pirolidin içeren dispiro bisiklotrifosfazenlerin plazmit DNA'nın konformasyonunda değişikliğe sebep olduğu görülmüştür. Bu etkileşim sonrasında endonükleaz enzimleriyle kesim sonucunda da bileşiğin DNA'ya G/G ve A/A nükleotidlerinden bağlandığı ortaya konulmuştur (Öztürk ve diğerleri, 2019). Aynı şekilde 4-floro/4-nitrobenzil bulunduran dispirosiklotrifosfazenlerin plazmit DNA'nın iki zincirini de kırdığını ve bu bileşiklerin de G/G ve A/A nükleotidlerine bağlandığı gösterilmiştir (İnci Tanrıkulu ve diğerleri, 2019).

Pirolidin ikame eden siklotrifosfazenlerden sentezlenen protik erimiş tuzların (PIL) dolaşımdaki tümör DNA'sı (CT-DNA) ve bovin serum albümin (BSA)'ya bağlanmasına ilişkin yapılan antiproliferatif testler, bu bileşiklerin BSA'ya bağlanırken van der Waals etkileşimi ya da hidrojen bağıyla bağlanma eğilimi gösterdiği, CT-DNA'ya ise oluk bağlanma ile doğrudan bağlandığını göstermiştir. Bu nedenle pirolidin ikame eden siklofosfazenlerin düşük sitotoksik, güçlü apoptotik ve etkili DNA topoizomeras inhibe edici özelliklere sahip, yeni ve daha güçlü antikanser ilaçlarının sentezinde kullanılabileceği önerilmiştir (Akbaş, Karadağ, Aydın, Destegül ve Kılıç, 2017).

Büyük yan grup içeren bazı siklotetrafosfazenlerin de DNA ile etkileşimi agaroz jel elektroforezinde araştırılmış ve 2,6-spiro-ansa-spiro-siklotetrafosfazen ve spiro-bino-spiro-siklotetrafosfazen bileşiklerinin interkalasyon ile DNA baz çiftleri arasına girdiği görülmüştür. Bu bileşiklerin diğer tam süstitüe siklotetrafosfazen bileşiklerine (4a ve 4b) kıyasla, DNA'nın form I ve form II'sinin hareketinde düşüşe sebep olduğu görülmüştür (Mutlu ve diğerleri, 2015).

İnsan fizyolojisinde sempatik sinir sistemi çalışmalarında farmakolojik araç olarak kullanılan bir amino asit olan tiramini içeren metal komplekslerin, DNA'ya küçük oluktan, genellikle AT rezidülerini içeren baz çiftleriyle bağlandığı spektroskopik ve moleküler yerleştirme yöntemleriyle gösterilmiştir (Raman, Sobha ve Mitu, 2012). Bu nedenle tiramin içeren fosfazenlerin DNA etkileşimi araştırılmış ve özellikle pirolidin ve piperidin

bulunduran *spiro*-siklotrifosfazenlerin pBR322 plazmit DNA'nın konformasyonunda değişikliğe sebep olduğu belirtilmiştir (Pektaş ve diğerleri, 2018).

Mono/bis-ferrosenil sübstitüe siklotetrafosfazenlerin Bakır (II) komplekslerinin DNA ile etkileşiminde DNA'nın oksidatif kırılımı aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Zhu, 2011).

Yıldırım ve diğerlerinin (2018) bir çalışmasında floreniliden köprölü heksaklorosiklotrifosfazen bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri araştırılmış, bileşiklerin *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 35218 ve *S. aureus* ATCC 25923 bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada bileşiklerin plazmit DNA etkileşimi agaroz jel elektroforez yöntemiyle araştırılmış ve Form III'ün olduğu belirlenen bileşiklere *Bam*HI, *Hind*III ve *Eco*RI restriksiyon enzimleriyle kesim yapılp, bileşiklerin DNA'ya G/G, A/A ve G/A bölgelerinden bağlandığı tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin bu yönüyle gelecekte antimikrobiyal ve antikanser ajan olarak kullanılma potansiyeli olduğu ifade edilmiştir (Yıldırım ve diğerleri, 2018).

1-aziridinil grubunun siklofosfazenlere antitümör aktivite özelliği kazandırdığı ortaya konulmuştur (Brandt ve Jedlinski, 1985). Aziridinil gruplarının bu aktivitesi siklofosfazenlerin antitümör aktivitelerine ilişkin 1976 yılında yapılan ilk çalışmada ifade edilmiştir. L1210 fare lenfositik lösemi, P388 lösemi hücrelerinde yapılan çalışmalarda CL çifti ya da son derece bazik endosiklik N atomu içeren ($N_3P_3C_{16}$ gibi) sekiz siklofosfazen kullanılmıştır (Labarre, 1982). Aziridinil grubunun alkilasyon yoluyla DNA ile iletişime girebilen karbokasyon formasyonu sonucu sitostatik aktivite gösterdiği varsayılmaktadır ve bu sitostatik aktiviteyi DNA ile etkileşime giren başka gruplar ekleyerek değiştirmek mümkündür. Siwy ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada aldehit ve imin grubu ikame eden siklofosfazenlerin aziridinil kısımlara sahip olan siklofosfazenlere göre daha yüksek sitotoksik aktivite göstermesi dikkati çekmektedir (Siwy ve diğerleri, 2007). Benzer şekilde aziridinil grubu içeren siklofosfazenlerin EAT insan küçük hücreli karsinoma hücre hatlarında yapılan sitotoksik çalışma sonucunda ortaya çıkan DNA hasarı alkali elüsyonu ve etidyum bromür floresans yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda farklı aziridinil gruplarını içeren fosfazenlerin farklı DNA kırılımı gösterdiği tespit edilmiştir. Bu fosfazenlerin toksik yan etkilerinin, tümör hücrelerindeki DNA hasarının uyarılma mekanizmasına benzer olabileceği yorumlanmıştır (Zijlstra, de Jong, van de Grampel, de Vries ve Mulder, 1986). Aziridinil gruplarının DNA ile alkilasyon yolu ile etkileşime

girdiği ve sitotoksik aktivitesinin bu etkileşimden kaynaklandığı yorumlanmaktadır. Ancak bu etkisinin yanında yüksek seviyede birikmiş kemik iliği toksisitesi gibi istenmeyen bir takım yan etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur (Siwy ve diğerleri, 2006). Bu sebeple özel çalışma koşulları gerektirdiğinden, bu tez çalışmasında kullanılan fosfazenlerin sentezinde aziridinil grubu kullanılmamıştır.

Pirolidin ve aziridin dışında spermin ve spermidin yan grupları içeren siklofosfazenlerin antikarsinojenik özellikleri araştırılmıştır (Işıklan ve diğerleri, 2016). Spermin, memeli hücrelerde DNA sentezinde düzenleyici olarak görev alır ve hücre proliferasyonunu inhibe edebilir. Spermine bağlı analogların DNA ile doğrudan etkileşime girebildiği ve gen ifadesindeki protein faktörleriyle etkileşmesinden dolayı gen ifadesini etkileyebildiği belirtilmiştir. Bu bilgiler ışığında HT-29 insan kolon kanseri ve Hep2 epidermoid larenks kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada sperminin içeren siklotrifosfazen bileşiklerinin sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiği belirtilmiştir (Yıldırım ve diğerleri, 2012). P388 lösemi hücrelerinde yapılan çalışmada da iki adet 1,3-diaminopropano grubu ve bir spermino grubu içeren diaziridinosiklofosfazen bileşiklerinin antitümör etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Sassus, Graffeuil, Castera ve Labarre, 1985).

Kalkon fosfazen bileşiklerinin de sitotoksik aktivite gösterdiği keşfedilmiştir. Kalkon çeşitli bitkilerde bulunan bir flavanoid grubudur ve metakalkon ve sofalkon gibi kalkon türevleri tıpta kullanılmaktadır (Koran ve diğerleri, 2017b). Örneğin bir Çin bitkisi olan *Sophora subprostrata*'dan izole edilen sofalkon 20 yılı aşkındır anti-ülser ilacı olarak kullanılmaktadır (Tanaka, Nakamura, Onda, Tazaki ve Hirano, 2009). Dioksibifenil grupları içeren kalkon-siklotrifosfazen bileşiklerinin PC-3 insan prostat kanseri ve LNCaP insan androjen duyarlı prostat kanseri hücre hatlarına, fenil halkasında Cl ve F içeren kalkon-siklotrifosfazenlerin ise A2780 insan yumurtalık kanseri hücre hattına yüksek antitümör aktivite gösterdiği ifade edilmiştir (Görgülü, Koran, Özen, Tekin ve Sandal, 2015; Koran ve diğerleri, 2017a).

Platin (IV) cisplatin ve platin (IV) oksaliplatin türevlerinin Jeffamine süstitüe poli(organo)fosfazenlerle birleştirilmesiyle ortaya çıkan makromoleküler pro-ilaçların, küçük moleküllü platin (Pt) komplekslerine göre hücre içine alınımının daha fazla olduğu ve daha yüksek sitotoksikite gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu polimer-ilaç

konjugatlarının 10-100 nm büyüklüğünde olması da diğer antikanser ilaçlara göre büyük bir avantajdır (Henke ve diğerleri, 2016).

Fosfazenlerin biyolojik aktivitelerinin tayininde, DNA etkileşiminin hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemlerle araştırılması, bileşiklerin DNA ile bağlanma mekanizmasının ve etkisinin teşhisinin tespiti için önemlidir. Böylece bu deneylerin ortaya koyduğu bilgiler ışığında mevcut antikanser ilaçların mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni nesil DNA ile etkileşen antikanser ilaçlarının keşfedilmesi mümkün olmaktadır (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007).

Bu tez çalışmasında ele alınan bileşiklerin biyolojik aktiviteleri, literatürdeki diğer fosfazen bileşiklerinin sonuçları ile karşılaştırılarak, yan grupların etkililiği üzerine yorum yapılmaya çalışılmıştır.

Çalışılan kısmen süstitüe monoferrosenil-siklotetrafosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal etkisinin ortaya konulması için agar kuyu difüzyon ve MİK testleri yapılmıştır. 16 adet bileşiğin agar kuyu difüzyon testi sonucunda, 3d ve 3h bileşiklerinin *C. albicans*, *C. tropicalis* dışındaki çalışılan tüm bakteri ve mayalar için yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. 3d bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218, *B. subtilis* ATCC 663, *B. cereus* NRRL B-37113, *E. hirae* ATCC 9790 bakterilerine karşı pozitif kontrolden daha yüksek seviyede aktivite gösterdiği görülmüştür. 4h bileşiğinin ise sadece mayalarda antimikrobiyal aktivite göstermediği, tüm bakteri türlerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. 3h ve 4h bileşiklerinin 2,2 dimetil grubu içermesi ve bu grubun da karbokasyon oluşturma ihtimali bulunmasından dolayı, bakterilerin DNA'sı ile etkileşime girerek (H bağı oluşturarak) bakteriler üzerinde etkili olmuş olabileceği yorumlanmaktadır. 3d bileşiğinin bulundurduğu DASD grubu ile oksijen grupları kolayca açılıp karbokasyon oluşturabilmektedir.

Çalışılan materyallerden 3a ve 4a bileşiklerinin ihtiva ettiği pirolidin, 3c ve 4c'nin yapısında bulunan morfolin ile 3d ve 4d'nin yapısında bulunan DASD grubuna göre, daha kolay açılan bir halka yapısındadır ve morfolin ile DASD gruplarının aksine alkilleyici ajan potansiyeli taşıyarak DNA ile etkileşime girebildiği bilinmektedir.

Çalışmada kullanılan ve pirolidin süstitüe bileşiklerden 3a, Gram negatif bakterilerden *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* ATCC 35218 bakterilerine, 4a bileşiği ise yine Gram negatif

bakterilerden *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterilerine karşı düşük ölçüde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu durumda pirolidin sübstitüe N/O donör atomlu oktokloro siklotetrafosfazenlerin bu çalışmada kullanılan Gram pozitif bakterilere ve *Candida* türlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği sonucu çıkarılmıştır. Bunun yanında pirolidin sübstitüe bileşiklerin plazmit DNA etkileşimi ile sitotoksik aktivite çalışmalarında, diğer bileşiklere oranla belirgin bir etkililik durumu gözlemlenmemiştir. Ancak Aydın (2015) ve Elmas ve diğerleri (2018) tarafından yapılan çalışmada pirolidin ile sübstitüe siklotetrafosfazen bileşiklerinin *Candida* türü mayalar üzerinde yüksek antifungal etki gösterdiği ve DLD-1 kolon kanser hücre hattı üzerinde referans olarak kullanılan sisplatin kadar etkili olabildiği gösterilmiştir. Aydın (2015) tarafından pirolidin sübstitüe siklotetrafosfazenlerin yüksek düzeyde antifungal özellik gösterdiği, bunun da *Candida* türlerinin hücre duvarı yapısında bulunan proteinlere etki etmesinden kaynaklanabileceği önerilmiştir (Aydın, 2018). Pirolidin sübstitüe dispiro bisiklotrifosfazenler ile yapılan bir diğer çalışmada da DNA etkileşimi sonrası restriksiyon enzimi kesimi ile fosfazen bileşiklerinin DNA'ya G/G ve A/A nükleotidlerinden bağlandığı ve DNA konformasyonunun değişimine sebep olduğu belirtilmiştir. Alkil zincirinde P-NH grubu bulunduran ve pirolidin içeren izopropilaminopentaklorosiklotrifosfazen bileşiğinin *C. krusei* ATCC 6258 mayasına karşı referans olarak kullanılan ketakonazole yakın antifungal etki gösterdiği, ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerine dirençli olan *E. coli* suşlarına da antibakteriyel etki gösterdiği, yapılan agar kuyu difüzyon ve MİK, MBK çalışmalarında ortaya konulmuştur. Ayrıca *S. aureus*, *E. hirae*, *E. faecalis*, *C. tropicalis* ve *C. albicans* türlerinin bu bileşiklere karşı dirençli olduğu belirtilmiştir (Öztürk ve diğerleri, 2019). İlder ve diğerleri (2010), 1b, 2b ve 3b olarak isimlendirdikleri, pirolidin grubu içeren tetrapirolidinofosfazenlerin, başta *S. aureus* ATCC 25923 ve *B. subtilis* ATCC 6633 olmak üzere çoğu test mikroorganizmasına karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ifade etmiştir. Aynı zamanda pUC18 plazmit DNA etkileşimi sonrasında yapılan agaroz jel elektroforezi deneyi ile bu üç bileşiğin DNA'yı kesme aktivitesi bulunduğu ortaya konulmuştur. Elmas ve diğerleri (2012)'nin siklotetrafosfazenlerin biyolojik aktivitesine ilişkin yapılan çalışmada, tetrapirolidino türevi olan bileşiklerin Gram pozitif bakterilere karşı kısmi antimikrobiyal aktivite gösterdiği, morfolin içeren bileşiklerin ise *Candida* türlerine karşı herhangi bir antifungal etki göstermediği ortaya konulmuştur.

Pirolidin sübstitüe fosfazenlere ilişkin yapılan başka bir biyolojik aktivite çalışmasında ise, N/O⁻ spirosiklikfosfazenlerin mono- ve bis-ferroseniltetrapirolidinofosfazenlerden daha iyi etki gösterdiği ifade edilmiştir (Işıklan ve diğerleri, 2010). Pirolidin içeren bileşiklerin antimikrobiyal etkisinin DNA ile fosfazen arasındaki hidrojen bağı ve/veya van der Waals etkileşiminden kaynaklanabileceği ve pirolidino, piperidino gibi P atomuna bağlanan yan grupların ve fosfazen halkasının konformasyonunun bunu etkiliyor olabileceği ileri sürülmüştür (Asmafiliz ve diğerleri, 2019). Asmafiliz ve diğerlerinin (2016) bir çalışmasında oktapirolidino- grubu içeren bir trimerik fosfazenin *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *E. faecalis* bakterileri ile *C. tropicalis* mayasına karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği, aynı zamanda L929 fibroblast ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Fosfazen türevleri ile yapılan başka bir sitotoksikite çalışmasında, WST-1 testi sonucunda da kısmen pirolidino ile sübstitüe spiro-bino-spiro tetramerik fosfazen bileşiği ile tamamen sübstitüe tetra-yapıdaki fosfazen bileşiğinin, 6,25 µg/mL'den daha düşük konsantrasyonda MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile L929 fare fibroblast hücrelerine sitotoksik aktivite gösterdiği, bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin referans olarak kullanılan sisplatinden daha düşük olduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenle bu bileşiklerin gelecekte antikanser ilacı araştırmalarında kullanılabileceği önerilmiştir (Berberoğlu ve diğerleri, 2016). Bu tez çalışmasında sitotoksik aktiviteleri çalışılan pirolidin sübstitüe bileşiklerden 3a ve 4a'nın ikisinin de MCF-7 meme kanseri ve L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olmadığı görülmüştür. Bunun yanında spiro halkasına sahip pirolidin sübstitüe 4a bileşiğinin 100-12,5 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarının her iki hücre hattında da proliferasyona sebep olduğu, özellikle 25 µg/mL konsantrasyonunun sağlıklı L929 fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu kontrol grubuna göre yaklaşık 2 katına çıkarmış olması dikkat çekmektedir. 4a bileşiği ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri ve L929 fare fibroblast hücre hatlarında yapılan Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile 96 saat sonrasındaki hücre indeksi sonuçları da bu bileşiğin proliferasyonu artırıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Fosfazenlerle yapılan benzer çalışmalarda pirolidin sübsitüe trimerik ve tetramerik fosfazenlerin *Candida* türleri üzerinde yüksek antifungal etki gösterdiği ve DLD-1 gibi bazı kanser hücre hatlarında düşük konsantrasyonlarda dahi önemli derecede sitotoksik aktivite gösterdiği ortaya konulmuş olmasına rağmen, bu çalışmada ele alınan pirolidin sübstitüe bileşiklerinde antifungal aktivite ve sitotoksik etkiye ilişkin olumlu sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle fosfazenlerin biyolojik aktivitelerinin ihtiva ettiği yan

grupların yanında, molekül geometrik yapısı gibi diğer etmenlere de bağlı olduğu düşünülmektedir.

Bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri ile plazmit DNA etkileşimi sonuçları karşılaştırıldığında, tam süstitüe spiro- siklotetrafosfazen bileşiklerinden spiro-4 ve piperidin süstitüe 4b'nin diğer bileşiklere göre daha iyi DNA kesme aktivitesi gösterdiği, aynı zamanda bu bileşiklerin 11 farklı bakteri suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca piperidin süstitüe 4b bileşiğinin yüksek konsantrasyonlarda plazmit DNA'nın A/A ve G/G bölgelerine bağlanarak restriksiyon enzimi kesimini engellediği ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar ışığında piperidin süstitüe fosfazenlerin DNA ile etkileşim hususunda biyolojik aktiviteyi artırdığı yorumu yapılabilir. Benzer şekilde Akbaş ve diğerleri (2013), çalıştıkları aminosiklotrifosfazenlerin antimikrobiyal etkisinin P atomuna bağlanan yan gruplarına bağlı olduğu yorumlanmış, tetrapiperidino grupların varlığında bileşiklerin antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir (Akbaş ve diğerleri, 2013).

Mutlu ve diğerlerinin (2015) yapmış olduğu bir çalışmada 2,6-sas-siklotetrafosfazen (3) ile morfolin ve DASD ile süstitüe tris- siklotetrafosfazen (4f) bileşiğinin L929 fibroblast hücre hattına ve A549 akciğer kanseri hücre hattına sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada 4f olarak isimlendirilen tris- siklotetrafosfazen bileşiğinin 12,5 µg/mL konsantrasyonda A549 akciğer kanseri hücre hattına karşı güçlü sitotoksik etki gösterdiği ifade edilmiştir. Aynı zamanda bu bileşiklerin kanser hücre hatlarında apoptoz ve nekrozu da uyarma yeteneğinde olabileceği gösterilmiştir (Mutlu ve diğerleri, 2015). Bu tez çalışmasında ele alınan ve morfolin süstitüe 2,4-ansa siklofosfazen 3c bileşiğinin 200-100 µg/mL konsantrasyonlarının L929 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisi olduğu ancak referans olarak kullanılan doxorubisin ile kıyaslandığında bu etkinin çok güçlü olmadığı görülmüştür. Çalışılan bir diğer morfolin süstitüe siklotetrafosfazen 4c bileşiğinin proliferasyona etkisi Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile araştırılmış ve 96 saat sonunda 200 µg/mL konsantrasyonunun L929 fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu görülmüştür. Ancak 4c bileşiğinin WST-1 testi sonuçlarına göre 24 saat sonrasında L929 fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde proliferasyona sebep olduğu ortaya konulmuştur. Bu iki proliferasyon testinin arasındaki sonuç farklılığı, proliferasyon testlerinin uygulama süresindeki değişikliklerden kaynaklı olabilmekle birlikte, bir maddenin DNA'ya etki şeklinin uygulama süresiyle değişebileceği

yorumunu getirmektedir. Bunun dışında 4c bileşiğinin kullanılan mikroorganizmaların hiçbirine inhibisyon zonu oluşturmadığı ve antimikrobiyal aktivite göstermediği görülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD) süstitüe iki fosfazen bileşiğinin WST-1 testi sonuçlarına göre, 3d bileşiği MCF-7 meme kanseri hücreleri ile L929 fibroblast hücrelerinde herhangi bir sitotoksisite göstermezken, proliferasyonu artırıcı yönde etki yaptığı görülmüştür. Benzer şekilde Gerçek Zamanlı Hücre Analizi sonucunda 3d bileşiğinin 200 µg/mL konsantrasyonunun 96 saat sonrasında yapılan ölçümlerde meme kanseri ve sağlıklı hücre hatlarında proliferasyona sebep olduğu ortaya konulmuştur. Çalışılan diğer DASD grubu süstitüe spiro halkasına sahip 4d bileşiğinin ise 50-200 µg/mL konsantrasyonları ile muamele edilen L929 fare fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkiye sebep olurken, MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik aktivitesi olmadığı tespit edilmiştir. DASD süstitüe bileşiklerin antimikrobiyal çalışma sonuçlarına bakıldığında ise, ansa halkasına sahip 3d bileşiği tüm bakteri türlerine antimikrobiyal aktivite gösterirken, yine DASD grubu taşıyan, spiro halkası içeren 4d'nin hiçbir mikroorganizmaya karşı etki göstermemesi dikkat çekmiştir. Bu sonuca dayanarak morfolin grubu taşıyan siklotetrafosfazen bileşikleri için ansa-spiro durumunun farklı etkileşimlere sebep olduğu yorumlanmıştır. Bu nedenle bileşiklerin içerdiği grupların yanında molekül yapısının da biyolojik aktivitesinde etkili olduğu görülmüştür. Bileşiklerin süstitüe gruplarının yanında moleküler yapısının da önemli olduğu daha önce benzer çalışmalarda ifade edilmiştir. Başterzi ve diğerleri (2015)'nin yapmış olduğu bir çalışmada da spiro-ansa-spiro (sas) siklotrifosfazen 7, 8 bileşikleri ile analoğu olan fosfazenin *E. coli* ATCC 35218 bakterisi üzerinde göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite karşılaştırıldığında, sas 7'nin 8 üyeli halkasının, 9 ve 7 üyeli ansa halkasına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur.

Pirolidin ikameli ferrosenil, N/O⁻, 4-florobenzil taşıyan siklotrifosfazen bileşiklerinin agar difüzyon yöntemi ile yapılan *in vitro* çalışmalarda *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (Başterzi ve diğerleri, 2015). İnci Tanrikulu ve diğerleri (2019)'nin 4-floro/4-nitrobenzil süstitüe dispirosiklotrifosfazenler ile yaptığı DNA etkileşimi çalışmalarında bileşiklerin etkili düzeyde plazmit DNA ile etkileşime girdiği ve DNA'nın iki zincirinin de kırıldığı gösterilmiştir. Okumuş ve diğerleri (2015)'nin 4-nitrobenzil spiro siklotrifosfazen ile 4-

florobenzil spiro siklotrifosfazenlere ilişkin yaptığı bir çalışmada da nitro grubu bulunduran fosfazenlerin, redoks aktif merkezi olmasından dolayı DNA ile etkileşime girebildiği sunulmuştur. Aynı zamanda 4-nitrobenzil grubu içeren spiro siklotrifosfazenlerin MİK değerlerinin, 4-florobenzil grubu içeren fosfazen bileşiklerine göre daha düşük olduğu, daha düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal aktivite gösterebildiği belirtilmiştir. Bununla birlikte 4-nitrobenzil içeren siklotrifosfazenlerin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivite çalışmalarında ikili boyama sonucunda fosfazen bileşiklerinin konsantrasyona bağlı olarak her iki hücre hattında da nekrotik etkisinin arttığı belirtilmiştir (Okumuş ve diğerleri, 2015). Bu tez çalışmasında kullanılan, 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit süstitüe olan 3g ve 4g fosfazen bileşiklerinin 4 adet F atomu bulundurması ve F atomlarının etrafında bağ yapmamış 6 elektronun bulunması sebebiyle dipol-dipol etkileşimine girme ve DNA'nın P grubuna tutulma ihtimali yüksektir. Bu etkileşimin 4g bileşiğinin *B. subtilis* ATCC 6633 üzerinde gösterdiği antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olabileceği yorumlanmıştır. 4g bileşiğine benzer şekilde 3g bileşiği de 4 F atomu içermektedir. Ancak 3g bileşiği ansa konumunda olduğundan esnekliği daha azdır, bu nedenle 4g bileşiğinin N/O spiro halkasının bu bileşiğin DNA ile daha kolay etkileşime girmesine neden olmuş olabileceği yorumlanmıştır. 4g bileşiği *Bacillus* cinsine ait *B. cereus* suşunun çoğalmasını inhibe etmezken, *B. subtilis* suşunun çoğalmasını inhibe etmesi ise, iki bakteri türü arasındaki bazı fizyolojik farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Örneğin *B. cereus*'un *B. subtilis*'ten farklı olarak, gıda zehirlenmesine de yol açan enterotoksin ve emetik toksin oluşturuyor olması (Erem, Küçükçetin ve Certel, 2013) ve ürettiği β -laktamaz ile penisilin, ampisilin veya sefalosporinlere karşı duyarlı olmadığı bilinmektedir (Tumbull, 1996). 3e, 4e ve 4f'nin de taşımış olduğu F atomu etkisiyle DNA ile etkileşime girme potansiyeli yüksektir. Ancak daha fazla F atomu taşıyan 3g ve 4g bileşiklerinden 4g daha yüksek antimikrobiyal etki gösterirken, 3g'nin hiç bir bakteri ve maya üzerinde etki göstermemiş olması dikkat çekmektedir. Bu nedenle bir fosfazen bileşikinde F atomu sayısının fazla olmasının ve spiro halkanın bulunmasının, antimikrobiyal aktiviteyi sağladığı, bileşiklerin mikroorganizma DNA'sı ile etkileşime girmesine neden olduğu yorumlanmıştır.

Orta ya da yüksek derecede antimikrobiyal aktivite göstermiş olan tüm bileşiklerin bu aktivitesinin, bakterinin genom DNA'sından ziyade hücre zarıyla yapmış olduğu dipol-dipol etkileşiminden, Van der Waals bağlarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bunun dışında, yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 3d, 3h ve 4h bileşiklerinin Van der Walls bağlarının yanında karbokasyon oluşumu ile de antimikrobiyal aktiviteyi sağladığı öngörülmektedir. 3d, 3h ve 4h bileşiklerinin bulundurduğu gruplardaki oksijen atomu varlığının da antimikrobiyal aktivite ile ilişkilendirilebileceği yorumlanmaktadır. Bu çalışmada ele alınan fosfazen bileşikleri genel olarak büyük yapıları olduğu için DNA ile etkileşiminin oluğa bağlanma şeklinde değil, karbokasyon ve hidrojen bağı oluşumu ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunun yanında bazı aminosiklotetrafosfazenlerin hidrojen bağıyla DNA ile etkileşime girdiği, DNA'ya karbokasyona dönüşerek bağlanabildiği gösterilmiştir. Bu nedenle kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayabileceği düşünülmektedir (Elmas ve diğerleri, 2017).

Karbokasyon oluşumu ya da hidrojen bağıyla etkileşim yapılması dışında DNA'ya oluktan bağlanan fosfazen bileşiklerinin de bulunduğu bilinmektedir. Antimikrobiyal aktivite gösteren ve plazmit DNA'nın süperhalkasal yapısında değişiklik meydana getirdiği bilinen ve çalışmada 6, 7 ve 9 olarak isimlendirilen cis- ve trans- dispiroferrosenilfosfazen bileşiklerinin moleküler yerleştirme analizi sonucunda fosfazen bileşiğinin DNA'ya ana oluktan bağlandığı gösterilmiştir (Tümer ve diğerleri, 2018). DNA ile etkileşime giren maddelerde genellikle oluğa bağlanma durumu interkalasyona tercih edilir. Çünkü oluğa bağlanma daha az toksisiteye sahiptir. Örneğin antiparasitik ilaçlar ele alındığında, bu ilaçların oluktan bağlanma mekanizması sebebiyle genellikle mutajenik etki göstermediği ifade edilmektedir (Wilson ve diğerleri, 2005). Bileşiğin DNA'ya bağlanmasına, bileşiklerin en yüksek dolu moleküler orbitali (HOMO) ve en düşük boş moleküler orbitali (LUMO) enerji boşluğunun küçük olmasının etki ettiği ifade edilmektedir. Bu nedenle küçük HOMO/LUMO enerji boşluğu, bileşik ve DNA'nın moleküller arası yük transferi ve bağlanma özellikleri üzerinde etkisi olduğu ve bunun da bileşiğin biyolojik aktivitesini belirleyebildiği yorumu yapılmıştır (Tümer ve diğerleri, 2018). Bu tez çalışmasında kullanılan siklotetrafosfazenlerin HOMO ve LUMO seviyeleri 1 mM dönüşümlü voltametri verileri ile tespit edilmiş olup, HOMO ve LUMO enerji seviye farklılığı fazla olan bileşiklerin plazmit DNA etkileşiminin daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Bu enerji farklılığının fosfazen bileşiklerinin ferrosenil gruba sahip olmasından kaynakladığı yorumlanabilir ve mono-ferrosenil fosfazen türevlerinin bis-ferroseniltetrafosfazenlere oranla daha yüksek biyolojik aktivite gösterdiği söylenebilir. Bunun yanında tetraamino-bis-ferrosenil-siklotetrafosfazenlerin DNA etkileşimi ve restriksiyon kesim çalışmaları sonucu ile bileşiklerin ΔE_p değerleri ve HOMO/LUMO enerji farklılığı ile ilişki olduğu

gösterilmiştir. Bu seviye farklılığı yanında, yapılan diğer elektrokimyasal deneyler de bileşiklerin elektrokimyasal açıdan kararlı olduğunu göstermektedir (Binici ve diğerleri, 2019; Elmas ve diğerleri, 2017). Bu tez çalışmasında da bileşiklerle muamele edilen plazmit DNA ile yapılan *Bam*HI ve *Hind*III enzim kesimi çalışmasında, bileşiğin plazmit DNA'ya A/A ve G/G bölgelerinden bağlanarak kesilmesine engel olan 4b ve 4e bileşiklerinin, HOMO/LUMO enerji farklılıklarının yanında ikisinin de mono-ferrosenil-spiro-siklotetrafosfazen olmasının bu etkiye sebep olabileceği düşünülmüştür. Piperidin sübtitüe siklotetrafosfazen bileşiği 4b, aynı zamanda bu çalışmada kullanılan tüm bakteri türleri üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Bu çalışmada kullanılan mono-ferrosenil-2-*cis*-4-dikloro-ansa- ve mono-ferrosenil-spiro-siklotetrafosfazen bileşiklerinin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan WST-1 testi sonucunda, piperidin sübtitüe siklotetrafosfazen bileşiği 4b'nin 200 µg/mL konsantrasyonunun sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. 2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandioksit sübtitüe fosfazen bileşiği 4g'nin ise 200 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi olduğu, diğer 14 bileşiğin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde toksik etkisi olmadığı görülmüştür. Bunun yanında düşük konsantrasyonda (25 µg/mL) 3b, 3c, 4b ve 4e bileşiklerinin MCF-7 hücreleri üzerine proliferatif etki göstermiş olması dikkat çekmektedir. L929 fibroblast hücrelerine yapılan WST-1 sonucunda da 4b, 4g, 3e ve 4e bileşiklerinin çalışılan tüm konsantrasyonlarının sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Ancak 3d, 3g, 3h, 4, 4a, 4c ve 4h bileşiklerinin tüm konsantrasyonlarda L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiden ziyade yüksek proliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bileşiklerin antiproliferatif etkilerinin araştırılması için Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile hücre indeksi-zaman grafikleri ortaya konulmuş ve sadece 4 ve 4c bileşiklerinin çalışılan en yüksek konsantrasyonda (200 µg/mL) 96 saat sonunda L929 fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde proliferasyonun kısmi düşüşüne sebep olduğu görülmüştür.

Çalışılan bileşiklerden 3, 3a, 3b, 3c, 3d, 4, 4a, 4b, 4c ve 4d'nin *M. tuberculosis* H37RV suşuna karşı antitüberküloz aktivitesi 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda araştırılmıştır. 4b ve 4d herhangi bir antitüberküloz aktivite göstermezken, MİK değerlerine göre en iyi aktivite ansa halkasına sahip pirolidin sübtitüe 3b ve morfolin sübtitüe 3c bileşiklerinde gözlemlenmiştir (Binici ve diğerleri, 2019). Fosfazen bileşiklerinin antitüberküloz aktivitelerine ilişkin yapılan başka bir çalışmada da

pirolidin ve DASD ile sübstitüe monoferrosenil-spitosiklotetrafosfazenlerin antitüberküloz aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (Okumuş ve diğerleri, 2016). Bileşiklerin antitüberküloz ve antimikrobiyal aktiviteleri karşılaştırıldığında, tüm bakteri türlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren 3d, 4 ve 4b bileşiklerinin *M. tuberculosis* H37RV bakterisine karşı antitüberküloz aktivite göstermediği, böylece çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere antimikrobiyal aktivite özelliği gösteren bileşiklerin, diğer bakteriler üzerinde de inhibe edici etki gösteremeyeceği görülmüş, antimikrobiyal ve antitüberküloz aktivitesi arasında doğrudan bir ilişki kurulamayacağı değerlendirilmiştir.

Yeni antibiyotik ilaçların keşfinde doğal ürünler kadar kimyasal bileşenler de kullanılmaktadır. Bir antimikrobiyal ajan olarak kimyasal bileşik (kombinatoryal) ve doğal ürünlerin molekül özellikleri Feher ve Schmidt (2003) tarafından karşılaştırılmış, bileşiklerin kiral merkezler, döneabilen bağlar, doymamışlık, atom tipi, aromatik halka bulundurma ve karmaşık halka sistemlerine sahip olma, zincir yapıları göz önünde bulundurulduğunda kombinatoryal bileşiklerin doğal ürün ve türevlerinden çok farklılık göstermediği belirtilmiştir. Bunun dışında kombinatoryal bileşiklerin sentezinin daha verimli olduğu bilindiğinden, doğal ürünlerin belirli özellikleri taklit edilerek daha çeşitli ve biyolojik yönden daha istenilen düzeyde kombinatoryal bileşiklerin elde edilebileceği bilinmektedir. Bu açıdan bu çalışmada elde edilen verilerin, gelecekte sentezlenecek fosfazen bileşiklerinin modellemesinde etkili olacağı düşünülmektedir.

Fosfazenlere yönelik yıllardır yapılan araştırmalar sonunda polifosfazenlerin ve halkalı yapıdaki siklotrifosfazenlerin biyolojik aktiviteleri ayrıntılı olarak araştırılmış, farklı gruplarla sübstitüe fosfazen bileşiklerin antimikrobiyal, antitümör, antitüberküloz ajan olarak kullanılma potansiyellerine ilişkin çok sayıda tespit yapılmıştır. Ancak bu tez çalışmasında ele alınan ve farklı yan gruplar içeren N/O donör atomlu siklotetrafosfazen bileşikleri ilk defa sentezlenerek biyolojik aktiviteleri ortaya konulmuştur. Bu bileşiklerden, antimikrobiyal etki, plazmit DNA etkileşimi ve sitotoksik aktivite gösteren bileşiklerin etki mekanizmaları araştırıldığında, pirolidin, morfolin ve DASD sübstitüe bileşiklerin düzlemsel yapıda olmaması ve çok büyük boyutlu olması göz önünde bulundurularak, biyolojik etkilerini hücre içine girmeden, DNA oluk bağlanması ya da interkalasyon yapması pek olası görülmemektedir. Bileşikler bu etkileşimi çoğunlukla, üzerinde çalışılan biyolojik yapıyla H bağı oluşturarak gerçekleştirmektedir.

6. ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlara göre yapılabilecek ek çalışmalara ve bileşiklerin kullanılabileceği alanlara ilişkin öneriler aşağıda sunulmuştur:

1. Çalışılan bileşiklerden mono-ferrosenil-2-cis-4-dikloro-ansa- ve *N*-mono-ferrosenil-propanoksi-siklotetrafosfazen bileşiklerinin; pirolidin, piperidin, morfolin ve DASD tepkimesiyle ortaya çıkan fosfazen bileşikleri (3a, 4a, 3b, 4b, 3c, 4c, 3d ve 4d) kısmen de olsa suda çözünmektedir. Çalışılan tüm bileşikler genelde polar ve apolar çözücülerde çözünür. Ancak biyolojik aktivite gösteren bileşiklerin ilaç taşıma sistemi oluşturma gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmesi için suda çözünürlüğü önem arz etmektedir. Bu nedenle bu bileşikler gerektiğinde tuz formuna getirilerek suda çözünür yapıya kavuşması sağlanabilir. Özellikle tıbbi uygulamalarda bileşiklerin suda çözünür olması ve toksik olmayan bileşiklere ayrışması biyoçözünür özellikleri açısından önemlidir.
2. Antimikrobiyal aktivite çalışma sonucunda 11 adet farklı bakteri suşuna karşı antibakteriyal etki gösteren 3d, 3h ve 4h bileşiklerinin MİK ve MBK değerleri tespit edilmiş ve bu bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda dahi bakterileri inhibe edebildiği ortaya konulmuştur. Bu bilgiler ışığında bu bileşiklerin bakteriler üzerinde hangi mekanizmalar ile (bakteri hücre duvarının parçalanması, genetik materyaline etki etmesi vb.) etkili olduğu ileri moleküler tekniklerle araştırılabilir ve yeni bir antimikrobiyal ajan olarak değerlendirme potansiyeli aydınlatılabilir. Bileşiklerin antimikrobiyal ajan potansiyeli, yapılacak *in vivo* çalışmalarla ve diğer klinik öncesi/klinik çalışmalar ile desteklenmelidir (Bkz: Çizelge 2.3. Yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi sürecindeki fazlar).
3. Sitotoksik aktivite sonuçlarına göre siklotetrafosfazen bileşiklerinin apoptotik/nekrotik etkisini değerlendirmek için yapılan ikili boyama test sonuçlarını daha geniş kapsamda değerlendirebilmek adına ek çalışmalar yapılabilir. Bileşikler ile muamele edilen hücrelerin ölüm mekanizmalarının aydınlatılması, bileşiklerin antikanser ajan potansiyelinin değerlendirilmesi için gereklidir. Bu nedenle hücrelerdeki apoptoz uyarılmasını gösteren Poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) ve kaspaz-9 proteinleri izole edilerek Western Blotlama çalışması yapılabilir.
4. DNA ile etkileşime girdiği belirlenen bileşiklerin, DNA'ya bağlanma mekanizmaları, interkalasyon ya da oluğa bağlanma durumlarının aydınlatılabilmesi için araştırmalar

yapılabilir. Bunun için DNA uzunluğundaki değişiklikleri tespit edebilecek diğer yöntemler (örneğin viskozite ölçümleri) kullanılabilir. Ayrıca moleküler bağlanma analizi ile çalışılan siklotetrafosfazenler bileşikleri arasında DNA ile oluğa bağlanarak etkileşme durumu olup olmadığı aydınlatılabilir.

5. DNA ile etkileşime giren bileşiklerden 4b ve 4e'nin DNA'ya A/A ve G/G bölgelerinden bağlandığı *Bam*HI ve *Hind*III enzim kesimlerini engellemiş olmasıyla ortaya konulmuştur. Ancak DNA kırma kapasitesi en yüksek bulunan bileşik 4g'nin bu enzimler tarafından kesilmemiş olması sebebiyle DNA'ya bağlandığı bölgeye ilişkin bir veri elde edilememiştir. Bu sebeple farklı kesim bölgelerine sahip restriksiyon enzimleri kullanılarak, bileşiklerin DNA ile etkileştiği nükleotidlerin belirlenmesi sağlanabilir.
6. Çalışmada kullanılan 16 adet siklotetrafosfazen bileşiğinin sitotoksik aktivitesinin tayini için yapılan WST-1 testi sonucunda, bileşiklerin referans olarak kullanılan antikanser ilaç doxorubisine kıyasla etkili düzeyde sitotoksik aktivite göstermediği, Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile de gözlemlenebilir derecede antiproliferatif etkiye sahip olmadığı ortaya konulmuştur. Aynı yan grupları içeren ve sitotoksik, antiproliferatif etki çalışmalarında farklı kanser hücre hatlarına etkili olduğu tespit edilen bileşiklerle, bu çalışmada yer alan bileşiklerin arasındaki kimyasal farklılıklar ayrıntılı olarak araştırılıp, biyolojik aktiviteyi tetikleyen mekanizmalar (DNA'ya bağlanma, hücre bütünlüğüne zarar verme vb.) açıklanabilir.
7. DNA etkileşimi ve restriksiyon kesimi için yapılan deneylerin sonuçları ile bileşiklerin ΔE_p değerleri ve HOMO/LUMO enerji farklılığı karşılaştırıldığında birbiriyle ilişki olduğu tespit edilmiştir. HOMO/LUMO enerji seviyesi farklılığı, bu çalışmada ele alınan siklotetrafosfazenlerin elektrokimyasal deney sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, bu bileşiklerin elektrokimyasal açıdan oldukça kararlı olduğu değerlendirilmektedir. Bu sebeple N/O donör atomlu siklotetrafosfazen bileşiklerinin elektronikte, elektron-transfer araçlarında kullanım için elverişli olabileceği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Acton, Q. A. (2013). *Klebsiella pneumoniae: New Insights for the Healthcare Professional* (First Edition). USA: ScholarlyEditions, 37.
- Afrikan, E. G., St Julian, G. and Bulla, L. A. (1973). Scanning Electron Microscopy of Bacterial Colonies. *Applied Microbiology*, 26(6), 934-937.
- Ahmed, A., Rushworth, J. V., Hirst, N. A. and Millner, P. A. (2014). Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 631–646.
- Akbaş, H., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Süzen, Y., Koç, L. Y., Açık, L. and Çelik, Z. B. (2013). Phosphorus–nitrogen compounds part 27. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing secondary amino and pendant (4-fluorobenzyl)spiro groups. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 294–307.
- Akbaş, H., Karadağ, A., Aydın, A., Destegül, A. and Kılıç, Z. (2017). Synthesis, structural and thermal properties of the hexapyrrolidinocyclotriphosphazenes-based protic molten salts: Antiproliferative effects against HT29, HeLa, and C6 cancer cell lines. *Journal of Molecular Liquids*, 230, 482–495.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983–3988.
- Alakomi, H.-L. and Saarela, M. (2009). *Salmonella* importance and current status of detection and surveillance methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1(3), 142–152.
- Alexopoulou, A., Papadopoulos, N., Eliopoulos, D. G., Alexaki, A., Tsiriga, A., Toutouza, M. and Pectasides, D. (2013). Increasing frequency of gram-positive cocci and gram-negative multidrug-resistant bacteria in spontaneous bacterial peritonitis. *Liver International*, 33(7), 975–981.
- Alidağı, H. A. (2016). *Fosfazen Merkezli Fluoren Ve Piren Dendrimerlerinin Sentezi Ve Özelliklerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 4.
- Alkan, R. (2012). Probiyotik Maya: *Saccharomyces boulardii*. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 5(4), 13-16.
- Allcock, H. R. and Kugel, R. L. (1965). Synthesis of High Polymeric Alkoxy- and Aryloxyphosphonitriles. *Journal of the American Chemical Society*, 87(18), 4216–4217.
- Allcock, H. R. (1972a). *Phosphorus-Nitrogen Compounds* (First Edition), USA: Academic Press, 3-5.
- Allcock, H. R. (1972b). Recent advances in phosphazene (phosphonitrilic) chemistry. *Chemical Reviews*, 72, 315-356.

- Allcock, H. R., Fuller, T. J., Mack, D. P., Matsumura, K. and Smeltz, K. M. (1977). Synthesis of poly(amino acid alkyl ester)phosphazenes). *Macromolecules*, 10, 824-830.
- Allcock, H. R., Desorcie, J. L. and Riding, G. H. (1987). The organometallic chemistry of phosphazenes. *Polyhedron*, 6(2), 119–157.
- Allcock, H. R. and Kim, C. (1991). Photochromic polyphosphazenes with spiropyran units. *Macromolecules*, 24, 2846-2851.
- Allcock, H. R., Lampe, F. W. and Mark, J. E. (2003). *Contemporary Polymer Chemistry* (Third Edition), USA: Pearson Education, 244.
- Allcock, H. R. (2006a). Recent developments in polyphosphazene materials science. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 10(5-6), 231-240.
- Allcock, H. R. and Wood, R. M. (2006b). Design and Synthesis of ion-conductive polyphosphazenes for fuel cell applications: Review. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 44(16), 2358-2368.
- Allcock, H. R. (2012). Polyphosphazene elastomers, gels, and other soft materials. *Soft Matter*, 8(29), 7521.
- Allcock, H. R. and Morozowich, N. L. (2012). Bioerodible polyphosphazenes and their medical potential. *Polymer Chemistry*, 3(3), 578–590.
- Allen, C. W. (1991). Regio- and stereochemical control in substitution reactions of cyclophosphazenes. *Chemical Reviews*, 91(2), 119-135.
- Altınbarın, Z. (2018). *Polianilin-Asit Sübstitüe Fosfazen İletken Kompozitlerinin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 22.
- Alvarez-Olmos, M. I. and Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic Agents and Infectious Diseases: A Modern Perspective on a Traditional Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1567–1576.
- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, 133, 4–19.
- Andrianov, A. K., Decolibus, D. P., Marin, A., Webb, A., Griffin, Y. and Webby, R. J. (2011). PCPP-Formulated H5N1 Influenza Vaccine Displays Improved Stability and Dose-Sparing Effect in Lethal Challenge Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(4), 1436–1443.
- Andrianov, A. K. (2018). Self-Assembling Ionic Polyphosphazenes and Their Biomedical Applications. In A. K. Andrianov, H. R. Allcock (Eds). *Polyphosphazenes in Biomedicine, Engineering, and Pioneering Synthesis, Chapter 2*, USA: ACS Symposium Series, 27–49.
- Aqil, F., Zahin, M., Ahmad, I. Owais, M., Khan, M. S. A., Bansal, S. S., Farooq, S. (2010). Antifungal activity of medicinal plant extracts and phytocompounds: a review. In I.

- Ahmad, M. Owais, M. Shahid, F. Aqil (Eds). Combating Fungal Infections: Problems and Remedy, Germany: Springer-Verlag, 472.
- Arai, H. (2011). Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 2(103), 1-13.
- Arias, C. A. and Murray, B. E. (2015). *Enterococcus* species, *Streptococcus gallolyticus* group, and *Leuconostoc* species. In J. E. Bennett, R. Dolin, M. J. Blaser. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Eighth Edition). USA: Elsevier Health Sciences, 2329-2330.
- Arjmand, F., Parveen, S., Afzal, M., Toupet, L. and Ben Hadda, T. (2012). Molecular drug design, synthesis and crystal structure determination of CuII–SnIV heterobimetallic core: DNA binding and cleavage studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 141–150.
- Ark, M. (2017). *Hücre Kültürü ve Temel Moleküler Biyoloji Protokolleri*. Ankara: Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, 109-121.
- Aslantürk, Ö. S. (2010). *Aydın Yöresi'nde Kullanılan Bazı Tıbbi Bitkilerin Antioksidant Ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 36-45.
- Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Öztürk, A., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Kısa, Ö., Albay, A., Üstündağ, Z. and Solak, A. O. (2009). Phosphorus–Nitrogen Compounds. 18. Syntheses, Stereogenic Properties, Structural and Electrochemical Investigations, Biological Activities, and DNA Interactions of New Spirocyclic Mono- and Bisferrocenylphosphazene Derivatives. *Inorganic Chemistry*, 48(21), 10102–10116.
- Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Civan, M., Avcı, O., Gönder, L. Y., Açık, L., Aydın, B., Türk, M. and Hökelek, T. (2016). Phosphorus–nitrogen compounds. Part 36. Syntheses, Langmuir–Blodgett thin films and biological activities of spiro-bino-spiro trimeric phosphazenes. *New Journal of Chemistry*, 40(11), 9609-9626.
- Asmafiliz, N., Berberoğlu, İ., Özgür, M., Kılıç, Z., Kayalak, H., Açık, L., Türk, M. and Hökelek, T. (2019). Phosphorus-nitrogen compounds: Part 46. The reactions of $N_3P_3Cl_6$ with bidentate and monodentate ligands: The syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of (N/N)spirocyclotriphosphazenes with 4-chlorobenzyl pendant arm. *Inorganica Chimica Acta*, 495, 1-15.
- Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., Weller, M., Armstrong, F. (2010). *Shriver & Atkins' Inorganic Chemistry* (Fifth Edition), Great Britain: Oxford University Press, 393-394.
- Avendaño, C. and Menendez, J. C. (2015). *Medicinal chemistry of anticancer drugs* (Second Edition). Netherlands: Elsevier, 6, 8, 13, 23-391.
- Ay, G. (2014). *Candida infeksiyonlarına duyarlı hastalardan soyutlanan Candida'ların ve virulans faktörlerinin belirlenmesi, antifungal duyarlılıklarının araştırılması*, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 4-7, 11-14.

- Aydın, B., (2018). *Ferrosenil siklotetrafosfazen türevlerinin antimikrobiyal, antitüberküloz, antioksidan, sitotoksik aktiviteleri ve DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 95.
- Baek, H., Cho, Y., Lee, C. and Shon, Y. (2000). Synthesis and Antitumor Activity of Cyclotriphosphazene-(diamine) Platinum(II) Conjugates. *Anti Cancer Drugs*, 11, 715-725.
- Balamuralidhara, V., Pramodkumar, T. M., Srujana, N., Venkatesh, M. P., Vishal Gupta, N., Krishna, K. L. and Gangadharappa, H. V. (2011). pH Sensitive Drug Delivery Systems: A Review, *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(1), 24-48.
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Barile, F., A. (2008). *Principles of Toxicology Testing*, Florida: Taylor & Francis Group, 175 – 202.
- Bartrop, J. A., Owen, T. C., Cory, A. H., and Cory, J. G. (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1(11), 611–614.
- Başar, F., (2006). *Taşıyıcı Enzimlerdeki Genetik Polimorfizmlerin İlaç Yanıtına Etkileri*, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Ankara, 12.
- Başterzi, N. S., Bilge Koçak, S., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Çelik, Ö., Türk, M., Koç, Y. L., Açıık, L. and Aydın, B. (2015). Syntheses, structural characterization and biological activities of spiro-ansa-spiro-cyclotriphosphazenes. *New Journal of Chemistry*, 39(11), 8825–8839.
- Bax, R., Gabbay, F., Phillips, I., and the Witley Park Study Group. (2000). Antibiotic clinical trials-the Witley Park Symposium. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(6), 289-339.
- Becker, N. G. (1989). *Analysis of Infectious Disease Data*. Florida: CRC Press, 1.
- Becker, K. (2018). Characteristics and Detection of *Staphylococcus aureus*. In A. Fetsch (Editor). *Staphylococcus aureus*. London: Academic Press, 14-24.
- Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnürch, H.-G., Gusterson, B. A. and Bender, H. G. (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine*, 75(6), 429–439.
- Bedir, B. (2016). *Ekstraintestinal Enfeksiyonlardan İzole Edilen Ve Virulans Faktörleri Tanımlanan E. Coli Suşlarının Filogenetik İlişkilerinin Tespitinde RAPD Yönteminin Önemi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 6, 23.

- Beganovic, M., Luther, M. K., Rice, L. B., Arias, C. A., Rybak, M. J. and LaPlante, K. L. (2018). A Review of Combination Antimicrobial Therapy for *Enterococcus faecalis* Bloodstream Infections and Infective Endocarditis. *Clinical Infectious Diseases*, 67(2), 303–309.
- Belloc, F., Dumain, P., Boisseau, M. R., Jalloustre, C., Reiffers, J., Bernard, P. and Lacombe, F. (1994). A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry*, 17(1), 59–65.
- Bendel, C. M. (2016). Candidiasis. In C. B. Wilson, V. Nizet, Y. A. Maldonado, J. S. Remington, J. O. Klein (Eds). *Remington and Klein's Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant* (Eighth Edition). United States of America: Elsevier Saunders, 1060-1061.
- Berberoğlu, İ., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Türk, M., Soltanzade, H. and 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.
- Berdan, F. (2016). *Erişkin Yoğun Bakım Ünitelerinde Candida albicans ve non-albicans Candida Nozokomiyal Kan Dolaşımı Enfeksiyonları: Risk Faktörleri Ve Mortalitenin Kıyaslanması*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 5-15.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., and Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 127–152.
- Bilge Koçak, S., Koçoğlu, S., Okumuş, A., Kılıç, Z., Öztürk, A., Hökelek, T., Öner, Y. and Açık, L. (2013). Syntheses, spectroscopic properties, crystal structures, biological activities, and DNA interactions of heterocyclic amine substituted spiro-ansa-spiro and spiro-bino-spiro-phosphazenes. *Inorganica Chimica Acta*, 406, 160–170.
- Binici, A., Okumuş, A., Elmas, G., Kılıç, Z., Ramazanoğlu, N., Açık, L., Şimşek, H., Çağdaş Tunalı, B., Türk, M., Güzel, R. and Hökelek, T. (2019). Phosphorus-Nitrogen Compounds. Part 42. The comparative syntheses of 2-cis-4-ansa(N/O) and spiro(N/O) cyclotetraphosphazene derivatives: spectroscopic and crystallographic characterizations, antituberculosis and cytotoxic activity studies. *New Journal of Chemistry*, 43(18), 6856-6873.
- Black, J. G. (2012). *Microbiology: principles and explorations* (Eight Edition). New Jersey: John Wiley & Sons, 377-378.
- Bose, R. J. C., Kim, M., Chang, J. H., Paulmurugan, R., Moon, J. J., Koh, W.-G., Lee, S.-Y. and Park, H. (2019). Biodegradable polymers for modern vaccine development. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 77, 12–24.

- Brandt, K. and Jedlinski, Z. (1985). New monospirocyclic tetrakis (aziridinyl) cyclotriphosphazene derivatives as potential antitumor drugs. *Die Makromolekulare Chemie*, 9: 169–174.
- Brandt, K., Kruszynski, R., Bartczak, T. J. and Porwolik-Czomperlik, I. (2001). AIDS-related lymphoma screen results and molecular structure determination of a new crown ether bearing aziridinylcyclophosphazene, potentially capable of ion-regulated DNA cleavage action. *Inorganica Chimica Acta*, 322, 138–144.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394-424.
- Breza, M. (2000). The electronic Structure of planar phosphazene rings. *Polyhedron*, 19, 389-397.
- Brinkmann, V. (2005). A Novel Data-Mining Approach Systematically Links Genes to Traits. *PLoS Biology* 3(5), e166.
- Brown, E. D. and Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 529, 336-343.
- Bryskier, A. (2005). *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals*. Washington: ASM Press, 1, 39, 105.
- Burnett, Y. and Ritchie, D. (2019). Antibacterials. In A. Spec, G. V. Escota, C. Chrisler, B. Davies (Eds). *Comprehensive Review of Infectious Diseases*, USA: Elsevier, 132-133.
- Caminade, A.-M., Hey-Hawkins, E. and Manners, I. (2016). Smart Inorganic Polymers. *Chemical Society Reviews*, 45(19), 5144-5146.
- Carter, R., Wycisk, R., Yoo, H., and Pintauro, P. N. (2002). Blended Polyphosphazene/Polyacrylonitrile Membranes for Direct Methanol Fuel Cells. *Electrochemical and Solid-State Letters*, 5(9), A195-A197.
- Caymaz, B. (2019). *İmidazo(1,2-A)Piridin Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu Ve DNA Etkileşimlerinin Çalışılması*, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 35-40.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 7, 15, 20, 21, 51, 52.
- Chabner, B. A. and Roberts, T. G, Jr. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5, 65-72.
- Cho, S. Y. and Allcock H. R. (2007). Novel highly fluorinated perfluorocyclobutane-based phosphazene polymers for photonic applications. *Chemistry of Materials*, 19(25), 6338-6344.

- Chun, C., Lim, H. J., Hong, K.-Y., Park, K.-H. and Song, S.-C. (2009). The use of injectable, thermosensitive poly(organophosphazene)-RGD conjugates for the enhancement of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biomaterials*, 30(31), 6295–6308.
- Ciapetti, G., Granchi, D., Cenni, E., Savarino, L., Cavedagna, D. and Pizzoferrato, A. (2000). Cytotoxic effect of bone cements in HL-60 cells: Distinction between apoptosis and necrosis. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(2), 338–345.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2019). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Sixteenth Informational Supplement* (29th Edition), Pennsylvania, 1-29.
- Conconi, M. T., Lora, S., Baiguera, S., Boscolo, E., Folin, M., Scienza, R., Rebuffat, P., Pamigotto, P. P. and Nussdorfer, G. G. (2004). *In vitro* culture of rat neuromicrovascular endothelial cells on polymeric scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 71A(4), 669–674.
- Conconi, M. T., Lora, S., Menti, A. M., Carampin, P. and Pamigotto, P. P. (2006). *In vitro* Evaluation of Poly[bis(ethyl alanato)phosphazene] as a scaffold for bone tissue engineering, *Tissue Engineering*, 12(4), 811-819.
- Costelloe, C., Metcalfe, C., Lovering, A., Mant, D. and Hay, A. D. (2010). Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 340, c2096–c2096.
- Coşkun, G. ve Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20, 145-158.
- Curtiss, R., MacLeod, D. L., Lockman, H. A., Galan, J. E., Kelly, S. M. and Mahairas, G. G. (2012). Colonization and Invasion of the Intestinal Tract by Salmonella. In F. Cabello, C. Hormaeche, P. Mastroeni, L. Bonina (Eds). *Biology of Salmonella*, USA: Springer Science + Business Media, 192.
- Çeken Toptancı, B., Kızıl, G. ve Kızıl, M. (2016). DNA Damage Mechanisms Of Anti-Cancer Drugs. *Middle East Journal of Science*, 2(1), 33 - 49
- Çetindere, S., Tümay, S. O., Kılıç, A., Durmuş, M. and Yeşilot, S. (2016). Hexa-BODIPY Linked-Triazole Based on a Cyclotriphosphazene Core as a Highly Selective and Sensitive Fluorescent Sensor for Fe²⁺ Ions. *Journal of Fluorescence*, 26(4), 1173–1181.
- Çil, E., Arslan, M., Aslan, F. and Ozturk, A. I. (2003). The Synthesis and Characterization of Aryloxy-Linear Phosphazenes. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 178(5), 1037-1046.
- Çil, E., Tanyıldızı, M. A., Ozen, F., Boybay, M., Arslan, M. And Görgülü, A. O. (2012). Retraction: Synthesis, Characterization, and Biological-Pharmacological Evaluation of New Phosphazenes Bearing Dioxybiphenyl and Schiff Base Groups. *Archiv Der Pharmazie*, 345(6), 476–485.

- Çoşut, B., Yeşilot, S., Durmuş, M. and Kılıç A. (2013). Synthesis and fluorescence properties of hexameric and octameric subphthalocyanines based cyclic phosphazenes. *Dyes and Pigments*, 98(3), 442-449.
- Darzynkiewicz, Z., Li, X. and Gong, J. (2009). Assay of Cell Viability: Discrimination of Cells Dying by Apoptosis. In Z. Darzynkiewicz, J. P. Robinson, M. Roederer (Eds). *Essential Cytometry Methods*. London: Academic Press, 459.
- Darbre, P. D. and Harvey, P. W. (2014). Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *Journal of Applied Toxicology*, 34, 925–938.
- Davies, D. B., Clayton, T. A., Eaton, R. E., Shaw, R. A., Egan, A., Hursthouse, M. B., Sykara, G. D., Porwollik-Czomperlik, I., Siwy, M. and Brandt, K. (2000). Chiral Configurations of Cyclophosphazenes. *Journal of the American Chemical Society*, 122(50), 12447-12457.
- Davies J. and Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74, 417-433.
- De Boer Sietske, A., and Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 1–4.
- De Jaeger, R. and Gleria, M. (1998). Poly(Organophosphazene)s and related compounds: Synthesis, properties and applications, Poly(organophosphazene)s and related compounds: Synthesis, properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 23, 179-276.
- De Nollin, S. and Borgers, M. (1975). Scanning Electron Microscopy of *Candida albicans* After In Vitro Treatment with Miconazole. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 7(5), 704-711.
- Dembek, A. A., Kim, C., Allcock, H. R., Devine, L. R. S., Steier, W. H. and Spangler C. W. (1990). A second-order nonlinear optical poly(organophosphazene). *Chemistry of Materials*, 2, 97-99.
- Deng, M., Nair, L. S., Nukavarapu, S. P., Kumbar, S. G., Jiang, T., Krogman, N. R., Singh, A., Allcock, H. R. and Laurencin, C. T. (2008). Miscibility and *in vitro* osteocompatibility of biodegradable blends of poly[(ethyl alanato) (p-phenyl phenoxy) phosphazene] and poly(lactic acid-glycolic acid). *Biomaterials*, 29, 337-349.
- Deng, M., Kumbar, S. G., Wan, Y., Toti, U. S., Allcock, H. R. and Laurencin, C. T. (2010). Polyphosphazene polymers for tissue engineering: an analysis of material synthesis, characterization and applications. *Soft Matter*, 6(14), 3119-3132.
- D'Eredita, R., Marsh, R. R., Lora, S. and Kazahaya, K. (2002). A new absorbable pressure-equalizing tube. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 127(1), 67-72.

- Doğan, S., Balcı, C. M. and Beşli, S. (2018). Dibenzylamine substituted cyclotetraphosphazenes: Synthesis, characterization and their stereogenic properties. *Inorganica Chimica Acta*, 482, 144-153.
- Donnenberg, M. S. (2015). *Enterobacteriaceae*. In J. E. Bennett, R. Dolin, M. J. Blaser. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Eighth Edition). USA: Elsevier Health Sciences, 2514-2516.
- Dunning, D. (2002). Surgical wound infection and the use of antimicrobials. In D. H. Slatter (Editor). *Textbook of Small Animal Surgery, Volume 1* (Third Edition). USA: Saunders, 116-117.
- El-Arabi, T. F., & Griffiths, M. W. (2013). Chapter: 29 *Bacillus cereus*. In J. G. Morris, Jr., M. E. Potter (Eds). *Foodborne Infections and Intoxications*, London: Academic Press, 401.
- Elmas, G., Okumus, A., Kilic, Z., Hokelek, T., Acik, L., Dal, H., Ramazanoglu, N. and Koc, L. Y. (2012). Phosphorus-Nitrogen Compounds. Part 24. Syntheses, Crystal Structures, Spectroscopic and Stereogenic Properties, Biological Activities, and DNA Interactions of Novel Spiro-ansa-spiro- and Ansa-spiro-ansa-cyclotetraphosphazenes. *Inorganic Chemistry*, 51(23), 12841-12856.
- Elmas, G., Okumuş, A., Cemaloğlu, R., Kılıç, Z., Çelik, S. P., Açık, L., Çağdaş Tunalı, B., Türk, M., Çerçi, N. A., Güzel, R. and 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.
- Elmas, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Çam, M., Açık, L. and Hökelek, T. (2018). Phosphorus-nitrogen compounds. Part 40. The syntheses of (4-fluorobenzyl) pendant armed cyclotetraphosphazene derivatives: Spectroscopic, crystallographic and stereogenic properties, DNA interactions and antimicrobial activities. *Inorganica Chimica Acta*, 476, 110-122.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Eng, N. F., Garlapati, S., Gerdts, V., Potter, A., Babiuk, L. A. and Mutwiri, G. K. (2010). The Potential of Polyphosphazenes for Delivery of Vaccine Antigens and Immunotherapeutic Agents. *Current Drug Delivery*, 7, 13-20.
- Erdemir, F. Uysal, G., Akman, A. ve Çırlak, A. (2011). Yeni ve Yeniden Tanımlanan Enfeksiyonlar ve Enfeksiyon Kontrolü II 21. Yüzyılda Yeniden Tanımlanan Enfeksiyonlar ve Enfeksiyon Kontrolü. *Ege Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi*, 27(1), 61-75.
- Erem, F., Küçükçetin, A. and Certel, M. (2013). *Bacillus* Türlerinin Probiyotik Olarak Değerlendirilmesi, *GIDA*, 38(4), 247-254.
- Ergönül, Ö. (2016). Enfeksiyon Hastalıkları Epidemiyolojisi. *Okmeydanı Tıp Dergisi*, 32(Ek sayı),1-7.

- Erkurt, M. A., Kuku, İ., Kaya, E. ve Aydoğdu, İ. (2009). Kanser Kemoterapisi ve Böbrek. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(1), 63-68.
- Farquhar, C., Marjoribanks, J., Lethaby, A. and Azhar, M. (2016). High-dose chemotherapy and autologous bone marrow or stem cell transplantation versus conventional chemotherapy for women with early poor prognosis breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1-81.
- Febler, A. T., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y. and Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance properties of *Staphylococcus aureus*. In A. Fetsch (Editor). *Staphylococcus aureus*. London: Academic Press, 57-58
- Feher, M. and Schmidt, J. M. (2003). Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 43(1), 218–227.
- Fei, S.-T., Wood, R. M., Lee, D. K., Stone, D. A., Chang, H.-L. and Allcock, H. R. (2008). Inorganic–organic hybrid polymers with pendent sulfonated cyclic phosphazene side groups as potential proton conductive materials for direct methanol fuel cells. *Journal of Membrane Science*, 320(1-2), 206–214.
- Fei, S.-T., and Allcock, H. R. (2010). Methoxyethoxyethoxyphosphazenes as ionic conductive fire retardant additives for lithium battery systems. *Journal of Power Sources*, 195(7), 2082–2088.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893–2917.
- Fields, F. R., Lee, S. W. and McConnell, M. J. (2017). Using bacterial genomes and essential genes for the development of new antibiotics, *Biochemical Pharmacology*, 134, 74–86.
- Finkelstein, R. (2012). Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*. In A. U. Khan, R. Zarrilli (Eds). *Multidrug Resistance: A Global Concern*. United Arab Emirates: Bentham Science Publishers, 37.
- Fischetti, V. A. and Ryan, P. (2008). The Genus *Streptococcus*. In E. Goldman, L. H. Green (Eds). *Practical Handbook of Microbiology* (Second Edition). United States of America: CRC Press, 303-304.
- Fricker, M. and Tolkovsky, A. M. (2011). Necrosis, Apoptosis, and Autophagy: Mechanisms of Neuronal and Glial Cell Death. In M. Aschner, C. Suñol, A. Bal-Price (Eds). *Cell Culture Techniques* (First Edition). London: Humana Press, 307-312.
- Galanski, M., Jakupiec, M. A. and Keppler, B. K. (2005). Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches, *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2075-2094.
- Gandhi, M., Baum, P., Hare, C. B. and Caughey, A. B. (2004). *Microbiology and Immunology* (First Edition). Massachusetts: Blackwell Publishing, 35-36.

- Gasink, L. B., Edelstein, P. H., Lautenbach, E., Synnestvedt, M. and Fishman, N. O. (2009). Risk Factors and Clinical Impact of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 30(12), 1180–1185.
- Gavasane, A. J. and Pawar, H. A. (2014). Synthetic biodegradable polymers used in controlled drug delivery system: an overview. *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics*, 3(2), 1-7.
- Gilad, J., Borer, A., Riesenber, K., Peled, N., Shnaider, A., & Schlaeffer, F. (1998). Enterococcus hirae septicemia in a patient with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 17(8), 576–577.
- Giltrap, A. (2018). *Total Synthesis of Natural Products with Antimicrobial Activity*. Singapore: Springer, 5.
- Giuliano, M., Barza, M., Jacobus, N. V. and Gorbach, S. L. (1987). Effect of broad-spectrum parenteral antibiotics on composition of intestinal microflora of humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(2), 202–206.
- Gleria, M. and De Jaeger, R. (2004). *Phosphazenes: A Worldwide Insight*, New York: Nova Science Publishers, 1-22.
- Goedemoed, J. H. (1990). *Polyphosphazene drug delivery systems for antitumour treatment*. Amsterdam: University Press, 189-203.
- Goins, D. E. and Li, H. M. (1992). Phosphazene antioxidants. United States Patent 5,105,001.
- Golstein, P. and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37–43.
- Gordy, T. A., Ung, N. S., Fritz, U. and Denk, R. (2011). Bioprosthetic heart valve with polyphosphazene. United States Patent US 7,922,764 B2.
- Görgülü, A. O., Koran, K., Özen, F., Tekin, S., and Sandal, S. (2015). Synthesis, structural characterization and anti-carcinogenic activity of new cyclotriphosphazenes containing dioxybiphenyl and chalcone groups. *Journal of Molecular Structure*, 1087, 1–10.
- Granum, P. E. (2005). *Bacillus cereus*. In P. M. Fratamico, A. K. Bhunia, J. L. Smith (Eds). *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Great Britain: Caister Academic Press, 409, 415.
- Granum, P. E. (2017). *Bacillus Cellular and Molecular Biology* (Third Edition). Great Britain: Caister Academic Press, v.
- Greish, Y. E., Bender, J. D., Lakshmi, S., Brown, P. W., Allcock, H. R. And Laurencin C. T. (2005). Low temperature formation of hydroxyapatite-poly(alkyl oxybenzoate)phosphazene composites for biomedical applications. *Biomaterial*, 26, 1-9.

- Gunatillake, P. A. and Adhikari, R.(2003). Biodegradable Synthetic Polymers For Tissue Engineering. *European Cells and Materials*, 5, 1-16.
- Gül Şeker, M., Akbal, T., Atilla, D., Avşar, N. and İbişoğlu, H. (2018). Synthesis and antimicrobial effects of cyclotriphosphazenes containing monocarbonyl curcumin analogs. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22(4), 536-546.
- Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 73-78.
- Gümüş, F., Eren, G., Açık, L., Çelebi, A., Öztürk, F., Yılmaz, S., Sakan, R., Gür, S., Özkul, A., Elmalı, A. and Elerman, Y. (2009). Synthesis, cytotoxicity, and DNA interactions of new cisplatin analogues containing substituted benzimidazole ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 1345-1357.
- Gümüşderelioğlu, M. and Gür, A. (2002). Synthesis, characterization, *in vitro* degradation and cytotoxicity of poly[bis(ethyl 4-aminobutyro)phosphazene]. *Reactive and Functional Polymers*, 52(2), 71–80.
- Gür, D. (2016). Antibiyotik Duyarlılık Testleri, EUCAST: Uygulama, Yorum ve Uzman Kurallar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 46 Ek Sayı, 12-19.
- Hackl, C. M., Schoenhacker-Alte, B., Klose, M. H. M., Henke, H., Legina, M. S., Jakupiec, M. A., Berger, W., Keppler, B.K., Brüggemann, O., Teasdale, I., Heffeter, P. and Kandioller, W. (2017). Synthesis and *in vivo* anticancer evaluation of poly(organo)phosphazene-based metallodrug conjugates. *Dalton Transactions*, 46(36), 12114–12124.
- Hajfathalian, M., Bouché, M. and Cormode, D. P. (2018). Polyphosphazene-Based Nanoparticles as Contrast Agents. *ACS Symposium Series*, 77–100.
- Hancock, R. E. W. and Speert, D. P. (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*, 3(4), 247–255.
- Hare, J. I., Lammers, T., Ashford, M. B., Puri, S., Storm G. and Barry, S. T. (2017). Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 108, 25-38.
- Harwood, C. R. (1989). Introduction to the Biotechnology of *Bacillus*. In C. R. Harwood (Editor). *Bacillus* (First Edition). New York: Springer Science+Business Media, 1-3.
- Henderson, I. C. (2015). *Breast Cancer Fundamentals of Evidence-Based Disease Management*. New York: Oxford University Press, 4.
- Henke, H., Kryeziu, K., Banfić, J., Theiner, S., Körner, W., Brüggemann, O., Berger, W., Keppler, B. K., Heffeter, P. and Teasdale, I. (2016). Macromolecular Pt(IV) Prodrugs from Poly(organo)phosphazenes. *Macromolecular Bioscience*, 16(8), 1239–1249.

- Heyde, M., Moens, M., Van Vaeck, L., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., and Schacht, E. H. (2007). Synthesis and Characterization of Novel Poly[(organo)phosphazenes] with Cell-Adhesive Side Groups. *Biomacromolecules*, 8(5), 1436–1445.
- Hmed, A., A., Sofy, A., R., Sharaf1 A. M. A. and El-DougDoug, K. A. (2017). Effectiveness of Chitosan as Naturally-Derived Antimicrobial to Fulfill the Needs of Today's Consumers Looking for Food without Hazards of Chemical Preservatives. *Journal of Microbiology Research*, 7(3), 55-67.
- Holohan, C., Van Schaeeybroeck, S., Longley, D. B. and Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714–726.
- Hostetler, D. E. (2013). Urogenital system. In D. S. McVey, M. Kennedy, M. M. Chengappa (Eds). *Veterinary Microbiology* (Third Edition). United States of America: John Wiley & Sons, 595.
- Hu, D-L., Wang, L., Fang, R., Okamura, M. and Ono, H. K. (2018). *Staphylococcus aureus*: Enterotoxins. In A. Fetsch (Editor). *Staphylococcus aureus*. London: Academic Press, 39.
- Hughes, D. and Karlen, A. (2014). Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119, 162–169.
- Hunter, R. C. and Beveridge, T. J. (2005). High-Resolution Visualization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilms by Freeze-Substitution Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology*, 187(22), 7619–7630.
- Hurley, L. H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 188–200.
- Igney, F. H. and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277–288.
- Işıklan, M., Asmafiliz, N., Özalp, E. E., İlter, E. E., Kılıç, Z., Çoşut, B., Yeşilot, S., Kılıç, A., Öztürk, A., Hökelek, T., Koç Bilir, L. Y., Açıık, L. And Akyüz, E. (2010). Phosphorus–Nitrogen Compounds. 21. Syntheses, Structural Investigations, Biological Activities, and DNA Interactions of New N/O Spirocyclic Phosphazene Derivatives. The NMR Behaviors of Chiral Phosphazenes with Stereogenic Centers upon the Addition of Chiral Solvating Agents. *Inorganic Chemistry*, 49(15), 7057–7071.
- Işıklan, M., Sayın, L., Sonkaya, Ö., Hökelek, T., Türk, M. and Oğuztüzün, S. (2016). Synthesis, structural characterization, and cytotoxic activity of new spirocyclic octachlorocyclotetraphosphazenes. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 191(9), 1216–1222.
- İbişoğlu, H., Çiftçi, G. Y., Kiliç, A., Tanriverdi, E., Ün, İ., Dal, H. and Hökelek, T. (2009). Formation of novel spiro, spiroansa and dispiroansa derivatives of cyclotetraphosphazene from the reactions of polyfunctional amines with octachlorocyclotetraphosphazetetraene. *Journal of Chemical Sciences*, 121(2), 125–135.

- İlter, E. E., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Açık, L., Yavuz, M., Bali, E. B., Solak, A. O., Büyükkaya, F., Dal, H. and Hökelek, T. (2010). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 19. Syntheses, structural and electrochemical investigations, biological activities, and DNA interactions of new spirocyclic monoferrocenylcyclotriphosphazenes. *Polyhedron*, 29(15), 2933-2944.
- İnci Tanrikulu, G., Yakut Özgür, M., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Aydın, B. and Açık, 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, 179-189.
- İnternet: *Bacillus subtilis*, URL-1: <https://fineartamerica.com/featured/bacillus-subtilis-bacteria-sem-steve-gschmeissner.html> (Son Erişim tarihi: 29.11.2019).
- İnternet: *Enterococcus faecalis*, URL-2: <https://fineartamerica.com/featured/9-enterococcus-faecalis-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html> (Son Erişim Tarihi: 04.12.2019).
- İnternet: *Enterococcus hirae*, URL-3: <https://fineartamerica.com/featured/enterococci-sem-eye-of-science.html> (Son Erişim Tarihi: 29.11.2019).
- İnternet: *Staphylococcus aureus*, URL-4: <https://www.entandaudiologynews.com/features/ent-features/post/staphylococcus-aureus-as-a-cause-of-refractory-chronic-rhinosinusitis> (Son Erişim Tarihi: 29.11.2019)
- İnternet: *Klebsiella pneumoniae*, URL-5: <https://fineartamerica.com/featured/sem-of-klebsiella-pneumoniae-bacteria-dr-tony-brainscience-photo-library.html> (Son Erişim Tarihi: 04.12.2019).
- İnternet: *Proteus vulgaris*, URL-6: <https://pixels.com/featured/3-proteus-vulgaris-bacteria-sem-thomas-deerinck-ncmir.html> (Son Erişim Tarihi: 29.11.2019).
- İnternet: *Pseudomonas aeruginosa*, URL-7: <https://fineartamerica.com/featured/5-pseudomonas-aeruginosa-bacteria-sem-steve-gschmeissner.html> (Son Erişim Tarihi: 03.12.2020).
- İnternet: Gerçek Zamanlı Hücre Analizi, URL-8: <https://www.aceabio.com/about/real-time-cell-analysis/> (Son Erişim Tarihi: 26.10.2019).
- İzmirli, M. (2013). Epigenetik Mekanizmalar ve Kansere Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*, 20(1), 48-51.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90.
- Jenkins, T. C., Price, C. S., Sabel, A. L., Mehler, P. S. and Burman, W. J. (2008). Impact of Routine Infectious Diseases Service Consultation on the Evaluation, Management, and Outcomes of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 46(7), 1000–1008.

- Johnson, J. R. (2002). Evolution of Pathogenic *Escherichia coli*. In M. Donnenberg (Editor). *E. coli: Genomics, Evolution and Pathogenesis*. USA: Academic Press, 57.
- Johnson, J. R. and Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*.” *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(3), 155–162.
- Johnstone, T. C., Park, G. A. Y., and Lippard S. J. (2014). Understanding and Improving Platinum Anticancer Drugs – Phenanthriplatin, *Anticancer Research*, 34, 471-476.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L. and Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990–993.
- Jorgensen, J. H. and Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1749–1755.
- Kaláb, M. Yang, A. and Chabot, D. (2008). Conventional Scanning Electron Microscopy of Bacteria. *Royal Microscopical Society*, 10, 42-61.
- Kallen, A. J. and Srinivasan, A. (2010). Current Epidemiology of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli in the United States. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(S1), S51–S54.
- Kapoor, G., Saigal, S. and Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300-305.
- Karageorgieiu, V. and Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474–5491.
- Kavruk, U. (2007). *Hastane Kaynaklı Gram Negatif Non Fermentatif Bakterilerde Antibiyotik Direnci, Antibiyotik Direnç Mekanizmaları Ve Antibiyotik Direnç Gelişimine Neden Olan Risk Faktörlerinin Belirlenmesi*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, İstanbul, 3-4.
- Kayış, U. (2019). Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi*, 5(1), 1-12.
- Keller, M. A. and Saba, C. S. (1996). Oxidative Stability and Degradation Mechanism of a Cyclotriphosphazene Lubricant. *Analytical Chemistry*, 68(19), 3489–3492.
- Kelly, J. M., Tossi, A. B., McConnell, D. J. and OhUigin, C. (1985). A study of the interactions of some polypyridylruthenium(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Research*, 13(17), 6017–6034.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.

- Keogh, R. J. (2010). New technology for investigating trophoblast function. *Placenta*, 31(4), 347–350.
- Khalid, Z., Ali, S. and Akram, M. (2018). Review on polyphosphazenes-based materials for bone and skeleton tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(11), 693-701.
- Khan, R. U., Wang, L., Yu, H., Zain-ul-Abdin, Akram, M., Wu, J., Haroon, M., Ullah, R. S., Deng, Z. and Xia, Z. (2018). Poly(Organo)Phosphazenes: recent Progress in the Synthesis and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. *Russian Chemical Reviews*, 87(2), 109–150.
- Kırmusaoğlu, S., Gareayaghi, N. and Kocazeybek, B. S. (2019). Introductory Chapter: The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance. In S. Kırmusaoğlu. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. London: IntechOpen, 2.
- Kich, D. M., Bitencourt, S., Caye, B., Faleiro, D., Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Mergener, M., Majolo, F., Boligon, A. A., Santos, R. C., Pedrosa, R., de Souza, C. F. and Goettert, M. I. (2016). Lymphocyte genotoxicity and protective effect of *Calyptanthus tricona* (Myrtaceae) against H₂O₂-induced cell death in MCF-7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 424(1-2), 35-43.
- Kim, K. M., Lee, S. B., Lee, S. H., Lee, Y. K., and Kim, K. N. (2005). Comparison of Validity between WST-1 and MTT Test in Bioceramic Materials. *Key Engineering Materials*, 284-286, 585–588.
- Klein, R., Welna, D. T., Weikel, A., Allcock, H. R. and Runt, J. (2007). Counterion effects on ion mobility ion concentration of doped polyphosphazenes and polyphosphazene ionomers. *Macromolecules*, 40, 3990-3995.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. ve Spencer, C. A. (2011). *Genetik kavramlar* (çev. C. Öner, S. Sümer, R. Öner, A. Ögüş ve L. Açık). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2006'da yayımlandı). 464-465.
- Koc, E. M., Can, H., Alacacioglu A., Kucukzeybek, Y., Turan, S., Bilgin, B., Ozkan, H. G., Harvey, G. and Karaca, C. (2018). Prevalence of malnutrition / malnutrition risk in cancer patients: experience of an oncology outpatient clinic in Turkey. *Family Practice and Palliative Care*, 3(1), 39-44.
- Koch, A. L. (1995). *Bacterial Growth and Form* (First Edition). USA: Chapman & Hall, 200.
- Koppara, T., Sakakura, K., Pacheco, E., Cheng, Q., Zhao, X., Acampado, E., Finn, A. V., Barakat, M., Maillard, L., Ren, J., Deshpande, M., Kolodgie, F. D., Joner, M. and Virmani, R. (2016). Preclinical evaluation of a novel polyphosphazene surface modified stent. *International Journal of Cardiology*, 222, 217–225.
- Koran, K., Ozkaya, A., Özen, F., Çil, E. and Arslan, M. (2013). Synthesis, characterization, and biological evaluation of new oxime-phosphazenes. *Research on Chemical Intermediates*, 39(3), 1109-1124.

- Koran, K., Özen, F., Biryani, F., Demirelli, K. and Görgülü, A. O. (2016). Eu⁺³ -doped chalcone substituted cyclotriphosphazenes: Synthesis, characterizations, thermal and dielectrical properties. *Inorganica Chimica Acta*, 450, 162–169.
- Koran, K., Tekin, Ç., Biryani, F., Tekin, S., Sandal, S., and Görgülü, A. O. (2017a). Synthesis, structural and thermal characterizations, dielectric properties and *in vitro* cytotoxic activities of new 2,2,4,4-tetra(4'-oxy-substituted-chalcone)-6,6-diphenylcyclotriphosphazene derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 26(5), 962-974.
- Koran, K., Tekin, Ç., Çalışkan, E., Tekin, S., Sandal, S., and Görgülü, A. O. (2017b). Synthesis, structural and thermal characterizations and *in vitro* cytotoxic activities of new cyclotriphosphazene derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 192(9), 1002–1011.
- Köksal, İ. (2010). Antibiyotik Duyarlılık Testleri: Laboratuvardan Kliniğe (İn-Vitro Parametrelerin Kliniğe Yansımaları). *ANKEM Dergisi*, 24(Ek 2), 159-161.
- Kumar, C. V., Turner, R. S. and Asuncion, E. H. (1993). Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 74(2-3), 231–238.
- Kumar, S., Singh, R. K., Murthy, R. S. R. and Bhardwaj, T. R. (2015). Synthesis and Evaluation of Substituted Poly(organophosphazenes) as a Novel Nanocarrier System for Combined Antimalarial Therapy of Primaquine and Dihydroartemisinin. *Pharmaceutical Research*, 32(8), 2736-2752.
- Kumaraswamy, S., Vijjulatha, M., Muthiah, C., Kumara Swamy, K. C. and Engelhardt, U. (1999). Synthesis, reactivity and structures of spirocyclic products derived from octachlorocyclotetraphosphazene: comparison with spirocyclic cyclotriphosphazenes and linear phosphazenes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 6, 891-900.
- Kushwaha, K., Babu, D. and Juneja, V. K. (2014). *Proteus*. In C. A. Batt, M-L. Tortorello (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology Volume 1* (Second Edition). United States of America: Academic Press, 238-242.
- Labarre, J.-F. (1982). Up-to-date improvements in inorganic ring systems as anticancer agents. *Inorganic Ring Systems*, 102, 1–87.
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G. A., Booth, C. J., Mehal, W. Z., Inayat I. and Flavell, R. A. (2006). Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis. *Science*, 311(5762), 847–851.
- Langone, F., Lora, S., Veronese, F. M., Caliceti, P., Parnigotto, P. P., Valenti, F. and Palma, G. (1995). Peripheral nerve repair using a poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials*, 16(5), 347–353.
- Laurencin, C. A., Norman, M. E., Elgendy, H. M., El-Amin, S. F., Allcock, H. R., Pucher S. R. and Ambrosio A. A. (1993). Use of polyphosphazenes for skeletal tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 963-973.

- Lederberg, J. (2000). Infectious History. *Science*, 288(5464), 287–293.
- Lee, S. M., Chun, C. J., Heo, J. Y. and Song, S.-C. (2009). Injectable and thermosensitive poly(organophosphazene) hydrogels for a 5-fluorouracil delivery. *Journal of Applied Polymer Science*, 113(6), 3831–3839.
- Li, H. J. and Crothers, D. M. (1969). Relaxation studies of proflavine–DNA complex—Kinetics of an intercalation reaction. *Journal of Molecular Biology*, 39(3), 461–477.
- Li, N., Ma, Y., Yang, C., Guo, L. and Yang, X. (2005). Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biophysical Chemistry*, 116(3), 199–205.
- Link, W. (2019). *Principles of Cancer Treatment and Anticancer Drug Development*. Switzerland: Springer, 88.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H. ve Matsudaira, P. (2011). Moleküler Hücre Biyolojisi (çev. H. Geçkil, M. Özmen, Ö. Yeşilada). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2008’de yayımlandı). 936-939, 1095, 1107-1148.
- Love, R. M. (2001). *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal*, 34(5), 399–405.
- Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M. and Ussery, D. W. (2010). Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial Ecology*, 60(4), 708-720.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. and Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of microorganisms* (Thirteenth Edition). London: Pearson, 84-756.
- Magiri, R., Mutwiri, G. and Wilson, H. L. (2018). Recent advances in experimental polyphosphazene adjuvants and their mechanisms of action. *Cell and Tissue Research*, 374(3), 465–471.
- Magiri, R., Lai, K., Huang, Y., Mutwiri, G. and Wilson, H. L. (2019). Innate immune response profiles in pigs injected with vaccine adjuvants polydi(sodium carboxylatoethylphenoxy)phosphazene (PCEP) and Emulsigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 209, 7–16.
- Malorny, B., Löfström, C., Hoofar, J., Schelin, J. and Rådström, P. (2009). Salmonella. In L. Dongyou (Editor). *Molecular Detection of Foodborne Pathogens* (First Edition). USA: CRC Press, 447-458.
- Marrollo, R. (2016). Microbiology of *Bacillus cereus*. In V. Savini (Editor). *The Diverse Faces of Bacillus Cereus*. United Kingdom: Academic Press, 6-8.
- Meyers, J. A., Sanchez, D., Elwell, L. P. and Falkow, S. (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal Of Bacteriology*, 1529-1537.

- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J. and Jaffrès, P.-A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *British Journal of Pharmacology*, 157, 166–178.
- Mølbak, K., Baggesen, D. L., Aarestrup, F. M., Ebbesen, J. M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A. M. and Wegener, H. C. (1999). An Outbreak of Multidrug-Resistant, Quinolone-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104. *New England Journal of Medicine*, 341(19), 1420–1425.
- Molinari, G., Guzmán, C. A., Pesce, A. and Schito, G. C. (1993). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by subinhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 31(5), 681–688.
- Molinari, G. (2014). Impact of microbial natural products on antibacterial drug discovery. In C. O. Gualerzi, L. Brandi, A. Fabbretti, C. L. Pon (Eds). *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*, New Jersey: John Wiley & Sons (E-book).
- Monson, L. S. (2011). Staphylococci. In C. R. Mahon, D. C. Lehman, G. Manuselis (Eds). *Textbook of diagnostic microbiology* (Fourth Edition). USA: WB Saunders Company, 316-329.
- Moran, G., Coleman D. and Sullivan, D. (2011). An introduction to the medically important *Candida* species. R. A. Calderone and C. J. Clancy. *Candida and Candidiasis* (Second Edition) (E-book). United States of America: American Society for Microbiology Press.
- Morozowich, N. L., Nichol, J. L., Mondschein, R. J. and Allcock, H. R. (2012a). Design and examination of an antioxidant-containing polyphosphazene scaffold for tissue engineering. *Polymer Chemistry*, 3(3), 778.
- Morozowich, N. L., Nichol, J. L. and Allcock, H. R. (2012b). Investigation of Apatite Mineralization on Antioxidant Polyphosphazenes for Bone Tissue Engineering. *Chemistry of Materials*, 24(17), 3500–3509.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
- Moxley, R. (2013). *Enterobacteriaceae: Escherichia*. In D. S. McVey, M. Kennedy, M. M. Chengappa (Eds). *Veterinary Microbiology* (Third Edition). United States of America: John Wiley & Sons, 74, 75, 78.
- Mutlu, G., Elmas, G., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Türk, M., Açık, L., Aydın, B. and Dal, H. (2015). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 31. Syntheses, structural and stereogenic properties, *in vitro* cytotoxic and antimicrobial activities, and DNA interactions of bicyclotetraphosphazenes containing bulky side group. *Inorganica Chimica Acta*, 436, 69–81.
- Nader, B. S. and Inbasekaran, M. N. (1993). Antioxidant-containing cyclophosphazene compositions, antioxidants for use therein, and method therefor, United States Patent 5,219,477.

- Nee, P. W. (2013). *The Key Facts on Cancer Types: Everything You Need to Know About*. USA: MedicalCenter.com, 1.
- Neidle, S. (1979). 3 The Molecular Basis for the Action of Some DNA-Binding Drugs. *Progress in Medicinal Chemistry*, 16, 151–221.
- Nelson, S. M., Ferguson, L. R. and Denny, W. A. (2007). Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623(1-2), 24–40.
- Nicoli-Aldini, N., Fini, M., Rocca M., Martini, L., Giardino, R., Caliceti, P., Veronese, F. M., Lora, S. and Maltarello, M. C. (1997). Peripheral nerve reconstruction with bioabsorbable polyphosphazene conduits. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 12(1), 3-13.
- Nicotera, P. and Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*, 23, 2757–2765.
- Nukavarapu, S. P., Kumbar, S. G., Brown, J. L., Krogman, N. R., Weikel, A. L., Hindenlang, M. D., Nair, L. S., Allcock, H. R. And Laurencin, C. T. (2008). Polyphosphazene/Nano-Hydroxyapatite Composite Microsphere Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 9(7), 1818–1825.
- Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L. and Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, 85(5), 2265–2289.
- Okumuş, A., Akbaş, H., Koç, L. Y., Aydın, B., Kılıç, Z., Açık, L., Türk, M., Hökelek, T., Dal, H. (2015, 22-25 Nisan). *Amin Substitue Mono(4-Nitrobenzil) Siklotrifosfazenlerin Sentezi, Karakterizasyonları, İn Vitro Sitotoksik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri ve DNA ile Etkileşimleri*. V. Ulusal Anorganik Kimya Kongresinde sunuldu, Mersin.
- Okumuş, A., Elmas, G, Cemaloğlu, R., Aydın, B., Binici, A., Şimşek, H., Açık, L., Türk, L., Güzel, R., Kılıç Z. and Hökelek T. (2016). Phosphorus–nitrogen compounds. Part 35. Syntheses, spectroscopic and electrochemical properties, and antituberculosis, antimicrobial and cytotoxic activities of mono-ferrocenylspirocyclotetraphosphazenes. *New Journal of Chemistry*, 40(6), 5588-5603.
- de Sousa Oliveira, K., de Lima, L. A., Cobacho, N. B., Dias, S. C. and Franco, O. L. (2016). Mechanisms of antibacterial resistance: shedding some light on these obscure process. In K. Kon, M. Rai (Eds). *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*, London: Academic Press, 24-29.
- Olshavsky, M. A. and Allcock, H. R. (1995). Polyphosphazenes that exhibit high refractive indices: synthesis, characterization and optical effects. *Macromolecules*, 1995, 28, 6188-6197.
- Opal, S. M. and Pop-Vicas, A. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In J. E. Bennett, R. Dolin, M. J. Blaser. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Eighth Edition). USA: Elsevier Health Sciences, 235-236.

- Ozay, H. and Ozay O. (2014). Synthesis and characterization of drug microspheres containing phosphazene for biomedical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 450, 99–105.
- Önercan, C. (2019). *Development of ultrasound triggered drug delivery systems for cancer treatment*, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 7-8.
- Örüm, S. M. and Demircioğlu, Y. S. (2018). Crosslinked Polyphosphazene Nanospheres with Anticancer Quercetin: Synthesis, Spectroscopic, Thermal Properties, and Controlled Drug Release. *Macromolecular Research*, 26(8), 671–679.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. and Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.
- Özmen, V. (2013). Türkiye’de meme kanseri. *Türkiye Klinikleri General Surgery - Special Topics*, 6(2), 1-6.
- Öztürk, E., Okumuş, A., Kılıç, Z., Kılıç, A., Kayalak, H., Açık, L., Çerçi, N. A., Türk, M. and Hökelek, T. (2019). 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 cytotoxic activities. *Inorganica Chimica Acta*, 486, 172-184.
- Öztürk, M. (2006, 13-14 Aralık). Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. Meme Kanseri Sempozyumu’nda sunuldu, İstanbul.
- Palchaudhuri, R. and Hergenrother, P. J. (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 497–503.
- Palmer, M., Chan, A., Dieckmann, T. and Honek, J. (2012). *Biochemical Pharmacology*. New Jersey: John Wiley & Sons, 304-306, 314, 329-331.
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J. V. P., Bera, S., Deviram, G. V. N. S., Kumar, A., Panchpuri, M. and Prasuna, R. G. (2015). Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, 9(1), 50–55.
- Parija, S. C. (2009). *Textbook of Microbiology and Immunology*. Haryana, India: Elsevier, 274-276.
- Park, C. J., Nah, W. H., Lee, J. E., Oh, Y. S. and Gye, M. C. (2012). Butyl paraben-induced changes in DNA methylation in rat epididymal spermatozoa. *Andrologia*, 44, 187-193.
- Parrish, A. B., Freel, C. D. and Kornbluth, S. (2013). Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6), 1-24.

- Pektaş, S., Bilge Koçak, S., Başterzi, N. S., Kılıç, Z., Zeyrek, C. T., Coban, B., Yıldız, U. and Çelik, Ö. (2018). spiro -Cyclotriphosphazenes containing 4-hydroxyphenylethyl pendant arm: Syntheses, structural characterization and DNA interaction study. *Inorganica Chimica Acta*, 474, 51–65.
- Pellecuer, S., Allegrini, J. and Simeon de Buochberg, M. (1976) Huiles essentielles bactericides et fongicides. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon*, 9, 135-159.
- Perez, C., Pauli, M. and Bazerque, P. (1990). An antibiotic assay by the agar-well diffusion method. *Acta Biologiae et Medicine Experimentalis*, 15, 113-115.
- Perry, J. A., Westman, E. L. and Wright, G. D. (2014). The antibiotic resistome: what's new?. *Current Opinion in Microbiology*, 21, 45–50.
- Pham, V. T. H., Truong, V. K., Quinn, M. D. J., Notley, S. M., Guo, Y., Baulin, V. A., Al Kobaisi, M., Crawford, R. J. and Ivanova, E. P. (2015). Graphene Induces Formation of Pores That Kill Spherical and Rod-Shaped Bacteria. *ACS Nano*, 9(8), 8458–8467.
- Place, E. S., Evans, N. D. and Stevens, N. M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, 8, 457-470.
- Pontieri, E. (2016). *Bacillus Cereus* group diagnostics: chromogenic media and molecular tools. In V. Savini (Editor). *The Diverse Faces of Bacillus Cereus*. United Kingdom: Academic Press, 17.
- Poyart, C., Lambert, T., Morand, P., Abassade, P., Quesne, G., Baudouy, Y. and Trieu-Cuot, P. (2002). Native Valve Endocarditis Due to *Enterococcus hirae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7), 2689–2690.
- Prasad, R. (2017). Introduction. In R. Prasad (Editor). *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology* (Second Edition). Haryana, India: Springer International, 1-2.
- Prescott, J. F. (2013). Antimicrobial Chemotherapy. In D. S. McVey, M. Kennedy, M. M. Chengappa (Eds). *Veterinary Microbiology* (Third Edition). United States of America: John Wiley & Sons, 42.
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G. and Gabai, V. L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*, 283(1), 1–16.
- Radecka, I., Martin, C. and Hill, D. (2015). The Problem of Microbial Drug Resistance. In D. A. Phoenix, F. Harris, S. R. Dennison (Eds). *Novel Antimicrobial Agents and Strategies* (First Edition). United Kingdom: Wiley-VCH, 1-2.
- Rastogi, R. P., Richa and Sinha, R. P. (2009). Molecular Mechanisms And Pathogenicity. *EXCLI Journal*, 8, 155-181.
- Raman, N., Sobha, S., and Mitu, L. (2012). Synthesis, structure elucidation, DNA interaction, biological evaluation, and molecular docking of an isatin-derived tyramine bidentate Schiff base and its metal complexes. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*, 143(7), 1019–1030.

- Ramis, G., Martínez-Alarcón, L., Quereda, J. J., Mendonça, L., Majado, M. J., Gomez-Coelho, K., Mrowiec, A., Herrero-Medrano J. M., Abellana, J. M., Pallares, F. J., Ríos, A., Ramírez, P. and Muñoz, A. (2013). Optimization of cytotoxicity assay by real-time, impedance-based cell analysis. *Biomedical Microdevices*, 15(6), 985–995.
- Ravi, R. and Bedi, A. (2003). Death receptors in apoptosis. In S. Grimm (Editor). *Genetics of Apoptosis*. United Kingdom: BIOS Scientific Publishers, 1.
- Reich, E. and Goldberg, I. H. (1964). Actinomycin and nucleic acid function. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 3, 183–234.
- Reygaert, W. C. (2017). Antimicrobial Mechanisms of *Escherichia Coli*. In A. Samie (Editor). *Escherichia coli: Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. Croatia: InTech, 81-87.
- Rios, J. L., Recio, M. C. and Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(2-3), 127–149.
- Riss, T. L. and Moravec, R. A. (2004). Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2(1), 51–62.
- Roche Diagnostics GmbH (2008). Introduction of the RTCA SP instrument. *RTCA SP instrument operator's manual*, A. Acea Biosciences, 14-16.
- Rogers, K. (2011). *Bacteria and Viruses* (First Edition). New York: Britannica Educational Publishing, 3-9.
- Rollins, H. W., Harrup, M. K., Dufek, E. J., Jamison, D. K., Sazhin, S. V., Gering, K. L. and Daubaras, D. L. (2014). Fluorinated phosphazene co-solvents for improved thermal and safety performance in lithium-ion battery electrolytes. *Journal of Power Sources*, 263, 66–74.
- Rothmund, S. and Teasdale, I. (2016). Preparation of polyphosphazenes: a tutorial review. *Chemical Society Reviews*, 45(19), 5200–5215.
- Rozalski, A., Sidorczyk, Z. and Kotelko, K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 65- 89.
- Rzayev, Z. M. O., Türk, M. and Söylemez, E. A. (2012). Bioengineering functional copolymers. XXI. Synthesis of a novel end carboxyl-trithiocarbonate functionalized poly(maleic anhydride) and its interaction with cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(16), 5053–5061.
- Sabir, M. I., Xu, X. and Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, 44(21), 5713–5724.
- Sahl, J. W., Morris, C. R. and Rasko, D. A. (2013). Comparative genomics of pathogenic *Escherichia coli*. In M. S. Donnenberg (Editor). *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (Second Edition). London: Academic Press, 21-35.

- Sassus, J.-L., Graffeuil, M., Castera, P. and Labarre, J.-F. (1985). Covalent binding of non-effective diaziridinocyclotriphosphazenes to natural polyamines as tumor finders makes potential anticancer agents. *Inorganica Chimica Acta*, 108(1), 23–27.
- Schenk, R. and Romer G., (1924). Über die phosphornitrilchloride und ihre umsetzungen (I.). *Chemische Berichte* 57B(8), 1343-1355.
- Schulte, P. (2011). Occupational Cancer and the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) Carcinogen Policy. *NIOSH eNews*, 8(12).
- Sezgin, Z., Yüksel, N. ve Baykara, T. (2003). İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Polimerik Misellerin Hazirlanmasi Ve Karakterizasyonu. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 32(2), 125-142.
- Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M. and Chiarello, L. (2007). Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *American Journal of Infection Control*, 35(10), S165–S193.
- Silver, L. L. (2014). Antibacterial discovery: problems and possibilities. In C. O. Gualerzi, L. Brandi, A. Fabbretti, C. L. Pon (Eds). *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*, New Jersey: John Wiley & Sons (E-book).
- Singh, A., Krogman, N. R., Sethuraman, S., Nair, L. S., Sturgeon, J. L., Brown, P. W., Laurencin, C. T. and Allcock, H. R. (2006). Effect of side group chemistry on the properties of biodegradable L-alanine cosubstituted polyphosphazenes. *Biomacromolecules*, 7, 914-918.
- Singler, R. E., Deome, A. J., Dunn, D. A. and Bieber, M. J. (1986). Preparation and properties of phosphazene fire-resistant fluids. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 25(1), 46.
- Sirajuddin, M., Ali, S. and Badshah, A. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1–19.
- Siwy, M., Sęk, D., Kaczmarczyk, B., Jaroszewicz, I., Nasulewicz, A., Pelczyńska, M., Nevozhay, D. and Opolski, A. (2006). Synthesis and *in vitro* Antileukemic Activity of Some New 1,3-(Oxytetraethylenoxy)cyclotriphosphazene Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(2), 806–810.
- Siwy, M., Sęk, D., Kaczmarczyk B., Wietrzyk, J., Nasulewicz, A. and Opolski, A. (2007). Synthesis and *in vitro* Antiproliferative Activity of New 1,3-(Oxytetraethylenoxy)-cyclotriphosphazene Derivatives, *Anticancer Research*, 27, 1553-1558.
- Slater, T. F., Sawyer, B. and Sträuli, U. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 77, 383–393.
- Sohn, Y. S. and Jun, Y. J. (2009). Part 14 Poly- and Cyclophosphazenes as Drug Carriers for Anticancer Therapy. In A. K. Andrianov (Editor), *Polyphosphazenes for Biomedical Applications*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 249–255.

- Srivastav, M. J., Nair, R. and Natarajan, K. (2017). Iron acquisition in the pathobiology of *Candida albicans*. In R. Prasad (Editor). *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology* (Second Edition). Haryana, India: Springer International, 370.
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267(5203), 1445–1449.
- Stewart, G. C. (2013). *Streptococcus* and *Enterococcus*. In D. S. McVey, M. Kennedy, M. M. Chengappa (Eds). *Veterinary Microbiology* (Third Edition). United States of America: John Wiley & Sons, 200-201.
- Stone, P. W., Gupta, A., Loughrey, M., Della-Latta, P., Cimiotti, J., Larson, E., Rubenstein, D. and Saiman, L. (2003). Attributable Costs and Length of Stay of an Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 24(08), 601–606.
- Sun, J-S., François, J-C., Montenay-Garestier, T., Saison-Behmoaras, T., Roig, V., Thuong and N. T., Hélène (1989). C. Sequence-specific intercalating agents: intercalation at specific sequences on duplex DNA via major groove recognition by oligonucleotide-intercalator conjugates. (1989), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), 9198-9202.
- Sussman, M. (1997). *Escherichia coli: Mechanisms of Virulence* (First Edition). United Kingdom: Cambridge University Press, 1-10, 15, 24.
- Şenkuytu, E., Öztürk, E., Aydinoglu, F., Taniverdi Eçik, E. and Okutan, E. (2019). Cyclotriphosphazene Cored Naphtalimide-BODIPY Dendrimeric Systems: Synthesis, Photophysical and Antimicrobial Properties. *Inorganica Chimica Acta*, 119386.
- Taban, B. M., Dogan Halkman, H. B. and Halkman, A. K. (2014). Biology of the *Enterococcus* spp. In C. A. Batt, M-L. Tortorello (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology Volume 1* (Second Edition). United States of America: Academic Press, 655.
- Tanaka, H., Nakamura, S., Onda, K., Tazaki, T. and Hirano, T. (2009). Sofalcone, an anti-ulcer chalcone derivative, suppresses inflammatory crosstalk between macrophages and adipocytes and adipocyte differentiation: Implication of heme-oxygenase-1 induction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(4), 566–571.
- Tang, H. B., Dimango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B. H., Goldberg, J. B., and Prince, A. (1996). Contribution of Specific *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors to Pathogenesis of Pneumonia in a Neonatal Mouse Model of Infection. *Infection and Immunity*, 64(1), 37-43.
- Teasdale, I. and Brüggemann, O. (2013). Polyphosphazenes: Multifunctional, Biodegradable Vehicles for Drug and Gene Delivery. *Polymers*, 5(1), 161–187.

- Tekdemir, P. (2015). *Tetramerik Fosfazenle 4-Florobenzil Diaminlerin Reaksiyonlarının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 8-9.
- Terzioğlu, G., Keskin, A. Ü. ve Yanıkkaya Demirel, G. (2013). Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turkish Journal of Immunology*, 1(3), 74-89.
- Thabit, A. K., Crandon, J. L. and Nicolau, D. P. (2014). Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16(2), 159–177.
- Thuong, N. T. and Hélène, C. (1993). Sequence-Specific Recognition and Modification of Double-Helical DNA by Oligonucleotides. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(5), 666–690.
- Thurston, D. E. (2006). *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*. Florida: Taylor & Francis Group, 29-114.
- Tian, Z., Zhang, Y., Liu, X., Chen, C., Gultinan, M. J. and Allcock, H. R. (2013). Biodegradable polyphosphazenes containing antibiotics: synthesis, characterization, and hydrolytic release behavior. *Polymer Chemistry*, 4(6), 1826.
- Tibbitt, M. W., Dahlman, J. E. and Langer, R. (2016). Emerging frontiers in drug delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 138, 704–717.
- Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). *In vitro* Sitotoksosite Testleri, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- Topal, M., Uslu Şenel, G., Arslan Topal E. I. ve Öbek, E. (2017). Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31(3), 121-127.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. and Jemal, A. (2015a). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. and Jemal, A. (2015b). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 25(1), 16–27.
- Tumbull, P. (1996). Chapter 15: Bacillus. In S. Baron (Editor). *Medical Microbiology (4th edition)*, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Turan, A. (2009). *İlaç-DNA Etkileşimi Ve DNA Analizleri İçin Elektrokimyasal Sensörlerin Geliştirilmesi*. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 30.
- Turantaş, F. (1996). ATP Biyoluminesans Yöntemi ve Gıda Mikrobiyolojisindeki Uygulamaları. *Gıda*, 21(5), 331-335.
- Turkington, C. and Ashby, B. L. (2017). *The Encyclopedia of Infectious Diseases* (Third Edition). United States of America: Facts on File, xiv, 27.

- Tümer, Y., Koç, L. Y., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Soltanzade, H., Açık, L., Yola, M. L. and Solak, A. O. (2014). Phosphorus–nitrogen compounds: part 30. Syntheses and structural investigations, antimicrobial and cytotoxic activities and DNA interactions of vanillinato-substituted NN or NO spirocyclic monoferrocenyl cyclotriphosphazenes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20(1), 165–178.
- Tümer, Y., Asmafiliz, N., Zeyrek, C. T., Kılıç, Z., Açık, L., Çelik, S. P., Türk, M., Tunalı, B., Ç., Ünver, H. and Hökelek, T. (2018). Syntheses, spectroscopic and crystallographic characterizations of cis- and trans-dispirocyclic ferrocenylphosphazenes: molecular dockings, cytotoxic and antimicrobial activities. *New Journal of Chemistry*, 42(3), 1740–1756.
- Ulkar, G. (2018). *Bazi Yeni Dibenzo-Diaza-Crown Eterler İle Kripta Fosfazen Türevlerinin Sentezi, Yapılarının Spektroskopik Ve Termal Yöntemlerle İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 17-20.
- Uppuluri, P., Khan, A. and Edwards, J. E. (2017). Current trends in Candidiasis. In R. Prasad (Editor). *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology* (Second Edition). Haryana, India: Springer International, 15.
- Uslu, A. and Yeşilot, S. (2015). Chiral configurations in cyclophosphazene chemistry. *Coordination Chemistry Reviews*, 291, 28-67.
- Voskoboinik, I., Smyth, M. J. and Trapani, J. A. (2006). Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 6(12), 940–952.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. and Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 388–400.
- Wagner, A. J. and Vos, A. (1968). The crystal structure of compounds with (N-P)_n rings IV. The stable modification (T Form) of tetrameric phosphonitrilic chloride, N₄P₄Cl₈. *Acta Crystallographica*, B24, 707-713.
- Wang, L., Yang, Y.-X., Shi, X., Mignani, S., Caminade, A.-M. and Majoral, J.-P. (2018). Cyclotriphosphazene core-based dendrimers for biomedical applications: an update on recent advances. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(6), 884–895.
- Wang, X., Yasukawa, E. and Kasuya, S. (2001). Nonflammable Trimethyl Phosphate Solvent-Containing Electrolytes for Lithium-Ion Batteries: I. Fundamental Properties. *Journal of The Electrochemical Society*, 148(10), A1058-A1065.
- Wanger, A. (2007). Disk Diffusion Test and Gradient Methodologies. In R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C. Goodwin (Eds). *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, USA: CRC Press, 55, 56, 58.
- Wanunu, M. and Tor, Y. (2012). *Methods for Studying Nucleic Acid/Drug Interactions*, Florida: CRC Press, ix.

- Waring, M. J. (1981). DNA modification and cancer. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 159-192.
- Warshawsky, D. and Landolph, J. R. (2006). *Molecular Carcinogenesis And The Molecular Biology Of Human Cancer*. Florida: Taylor & Francis Group, 4, 5, 353.
- Wilhelm, M., Mukherjee, A., Bouvier, B., Zakrzewska, K., Hynes, J. T. and Lavery, R. (2012). Multistep Drug Intercalation: Molecular Dynamics and Free Energy Studies of the Binding of Daunomycin to DNA. *Journal of American Chemical Society*, 134(20), 8588-8596.
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941–2953.
- Wilson, W., Nguyen, B., Tanious, F., Mathis, A., Hall, J., Stephens, C. and Boykin, D. (2005). Dications That Target the DNA Minor Groove: Compound Design and Preparation, DNA Interactions, Cellular Distribution and Biological Activity. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(4), 389–408.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. and Woods, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (Sixth Edition). United States of America: Lippincott Williams & Wilkins, 319-320.
- Wolfe, N. D., Dunavan, C. P. and Diamond, J. (2007). Origins of major human infectious diseases. *Nature*, 447(7142), 279–283.
- Wong, E. and Giandomenico, C. M., (1999). Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chemical Reviews*, 99, 2451–2466.
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance, WHO Report, France, 1-65.
- Wöhler, F., Kopp, H., Erlenmeyer, E. and Volhard, J. (1874). Justus Liebig's Annalen der Chemie und Pharmacie. Neue Reihe. Band 95, C. F. Winter'sche Verlagshandlung, Leipzig und Heidelberg.
- Xia, L., Xia, Y. and Liu, Z. (2015) A novel fluorocyclophosphazene as bifunctional additive for safer lithium-ion batteries. *Journal of Power Sources*, 278, 190–196.
- Xu, L.-C., Li, Z., Tian, Z., Chen, C., Allcock, H. R., and Siedlecki, C. A. (2018). A new textured polyphosphazene biomaterial with improved blood coagulation and microbial infection responses. *Acta Biomaterialia*, 67, 87–98.
- Yang, Y., Xu, Z., Jiang, J., Gao, Y., Gu, W., Chen, L., Tang, X. and Li, Y. (2008a). Poly(imidazole/DMAEA)phosphazene/DNA self-assembled nanoparticles for gene delivery: Synthesis and *in vitro* transfection. *Journal of Controlled Release*, 127, 273–279.
- Yang, Y., Z. Xu, Chen, S., Gao, Y., Gu, W., Chen, L. Pei, Y. and Li, Y. (2008b). Histidylated cationic polyorganophosphazene/DNA self-assembled nanoparticles for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 353, 277-282.

- Yang, Y., Zhang, Z., Chen, L., Gu, W. and Li, Y. (2010). Galactosylated Poly(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)phosphazene/DNA Complex Nanoparticles: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation for Gene Delivery. *Biomacromolecules*, 11(4), 927–933.
- Yang, G., Wu, W.-H., Wang, Y.-H., Jiao, Y.-H., Lu, L.-Y., Qu, H.-Q. and Qin, X.-Y. (2019). Synthesis of a novel phosphazene-based flame retardant with active amine groups and its application in reducing the fire hazard of Epoxy Resin. *Journal of Hazardous Materials*, 366, 78-87.
- Yenilmez Çiftçi, G., Şenkuytu, E., İncir, S. E., Yüksel, F., Ölçer, Z., Yıldırım, T., Kılıç, A. and Uludağ, Y. (2016). First paraben substituted cyclotetraphosphazene compounds and DNA interaction analysis with a new automated biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 80, 331–338.
- Yenilmez Çiftçi, G., Şenkuytu, E., İncir, S. E., Eçik, E. T., Zorlu, Y., Ölçer, Z. and Uludağ, Y. (2017). Characterization of paraben substituted cyclotriphosphazenes, and a DNA interaction study with a real-time electrochemical profiling based biosensor. *Microchimica Acta*, 184(7), 2307–2315.
- Yıldırım, İ. H., Koçak, N. ve Cing Yıldırım, S. (2012). Programlı Hücre Ölümü; Literatür Bilgilerinin Türkçe Derlemesi. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 2(3), 58-66.
- Yıldırım, T., Bilgin, K., Çiftçi, G. Y., Eçik, E. T., Şenkuytu, E., Uludağ, Y., Tomak, L. and Kılıç, A. (2012). Synthesis, cytotoxicity and apoptosis of cyclotriphosphazene compounds as anti-cancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 213–220.
- Yıldırım, T., Şenkuytu, E., Ergene, E., Bilgin, K., Uludağ, Y. and Çiftçi, G. Y. (2018). Biological Activity of New Cyclophosphazene Derivatives Including Fluorenylidene-Bridged Cyclophosphazenes. *ChemistrySelect*, 3(34), 9933–9939.
- Yıldız, M., Yılmaz, S. and Dölger, B. (2007). Synthesis, spectral properties, and antimicrobial activity of 2-aryl-amino-2, 4, 4, 6, 6-pentachloro-1, 3, 5, 2λ5, 4λ5, 6λ5-triazatriphosphines and poly [bis (4-fluorophenylamino) phosphazene]. *Russian Journal of General Chemistry*, 7(12), 2117-2122.
- You, M., Li, W., Pan, Y., Fei, P., Wang, H., Zhang, W., Zhi, L. and Meng, J. (2019). Preparation and characterization of antibacterial polyamine-based cyclophosphazene nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 592(117371), 1-11.
- Youlden, D. R., Cramb, S. M., Dunn, N. A. M., Muller, J. M., Pyke, C. M., & Baade, P. D. (2012). The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiology*, 36(3), 237–248.
- Yousef, A. and Carlstrom, C. (2003). *Food Microbiology: A Laboratory Manual* (First Edition). New Jersey: John Wiley & Sons, 121.
- Yu, V. L., Hansen, D. S., Ko, W. C., Sagnimeni, A., Klugman, K. P., von Gottberg, A., Goossens, H., Wagener, M. M. and Benedi, V. J. (2007). Virulence Characteristics of

- Klebsiella* and Clinical Manifestations of *K. pneumoniae* Bloodstream Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 13(7), 986–993.
- Yüce, A. (2001). Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klimik*, 14(2), 41-46.
- Zeigler, D. R. and Perkins, J. B. (2008). The Genus *Bacillus*. In E. Goldman, L. H. Green (Eds). *Practical Handbook of Microbiology* (Second Edition). United States of America: CRC Press, 319-321.
- Zgoda, J. R. and Porter, J. R. (2001). A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. *Pharmaceutical Biology*, 39(3), 221–225.
- Zhang, Y., Liu, J., Huang, L., Wang, Z. and Wang, L. (2015). Design and performance of a sericin-alginate interpenetrating network hydrogel for cell and drug delivery. *Scientific Reports*, 5(1), 1-13.
- Zhu, X., Liang, Y., Zhang, D., Wang, L., Ye, Y. and Zhao, Y. (2011). Synthesis and Characterization of Side Group–Modified Cyclotetraphosphazene Derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 186(2), 281–286.
- Zijlstra, J. G., de Jong, S., van de Grampel, J. C., de Vries, E. G. E. and Mulder, N. H. (1986). Different Type of DNA Damage Caused by Three Aziridinyl Substituted Cyclophosphazenes in a Human Small Cell Lung Carcinoma Cell Line. *Cancer Research*, 46, 2726-2729.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : RAMAZANOĞLU, Nagehan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 19.01.1988, Fatsa
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 03122989527
 e-mail : nagehan.nr@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2012
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2009
Lise	Trabzon Yomra Fen Lisesi	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010 – ...	TÜBİTAK	Başuzman

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Binici, A., Okumuş, A., Elmas, G., Kılıç, Z., Ramazanoğlu, N., Açık, L., Şimşek, H., Çağdaş Tunalı, B., Türk, M., Güzel, R. and Hökelek, T. (2019). Phosphorus-Nitrogen Compounds. Part 42. The comparative syntheses of 2-cis-4-ansa(N/O) and spiro(N/O) cyclotetraphosphazene derivatives: spectroscopic and crystallographic characterizations, antituberculosis and cytotoxic activity studies. *New Journal of Chemistry*, 43(18), 6856-6873.

- Gozelle, M., Süloğlu, A. K., Selmanoğlu, G., Ramazanoğlu, N., Açıık, L., Gümüş, F. (2019). Studies on the synthesis, characterization, cytotoxic activities and plasmid DNA binding of platinum(II) complexes having 2-substituted benzimidazole ligands. *Polyhedron*, 161, 298–308.
- Asmafiliz, N., Civan, M., Özben, A., Kılıç, Z., Ramazanoğlu, N., Açıık, L., Hökelek, T. (2018). Phosphorus-nitrogen compounds. Part 39. Syntheses and Langmuir-Blodgett thin films and antimicrobial activities of N/N and N/O spirocyclotriphosphazenes with monoferrocenyl pendant arm. *Applied Organometallic Chemistry*, 32, 1-20.
- Okumuş, A., Elmas, G., Kılıç, Z., Ramazanoğlu, N., Açıık, L., Türk, M., Akca, G. (2017). The reactions of $N_3P_3Cl_6$ with monodentate and bidentate ligands: the syntheses and structural characterizations, *in vitro* antimicrobial activities, and DNA interactions of 4-fluorobenzyl(N/O)spirocyclotriphosphazenes. *Turkish Journal Of Chemistry*, 41, 525 – 547.
- Elmas, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Açıık, L., Dal, H., Ramazanoğlu, N., Koç, Y. L. (2012). Phosphorus–Nitrogen Compounds. Part 24. Syntheses, Crystal Structures, Spectroscopic and Stereogenic Properties, Biological Activities, and DNA Interactions of Novel Spiro-ansa-spiro- and Ansa-spiro-ansa-cyclotetraphosphazenes. *Inorganic Chemistry*, 51(23), 12841–12856.

Bildiri ve Posterler

- Açıık, L., Egemen, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Ramazanoğlu, N., Koç, L. Y. (2011). *Antimicrobial Activities and DNA Interactions of Spiro-ansa-spiro- and Ansa-spiro-ansacyclotetraphosphazenes*. Medicinal and aromatic plants in generating of new values in 21st century, (Poster Bildiri), Saraybosna.
- Yetkin, İ., Bayramcı N. S., Ramazanoğlu N., Kan, E., Kalkan, Ç., Açıık, L., (2010). Türk Toplumunda Tip 2 Diyabetli Hastalarda CAPN10 Geninde SNP19 Gen Mutasyonu, 46. Ulusal Diyabet Kongresi (Özet Bildiri) (Yayın No: 1277573), Antalya.
- Ramazanoğlu, N., Açıık, L., Aslan, S., Vural, M. (2010). *Antioxidant Activities of Endemic Helichrysum chionophilum*. Conference: 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, (Poster Bildiri), Antalya.

Hobiler

Doğa yürüyüşü, okumak, puzzle/maket yapmak.



GAZİ GELECEKTİR...