

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FOSFONYUM GRUPLARI İÇEREN ROMP POLİMERLERİNİN
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİBAKTERİYEL
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

NAİME CEREN SÜER

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

**DANIŞMAN
PROF. DR. TARIK EREN**

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FOSFONYUM GRUPLARI İÇEREN ROMP POLİMERLERİNİN
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİBAKTERİYEL
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

N. Ceren SÜER tarafından hazırlanan tez çalışması 20.08.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Tarık EREN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Volkan SÖZER
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Tarık EREN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Volkan SÖZER
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Atilla GÜNGÖR
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ
Acıbadem Üniversitesi

Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2015-01-02-YL12 ve TUBİTAK 113S355 numaralı projeleri tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans bitirme çalışmamda da yüksek lisans tezimde de bana karşı güvenini gösteren ve projede çalışmama izin vererek bilimsel hayata karşı büyük bir adım atmamı sağlayan eş danışmanım Doç. Dr. Volkan SÖZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması süresince bilgisini ve emeğini benden esirgemeyen, her geçen gün yeni bir şeyler öğrenmemize teşvik eden, sadece tez konusunda kalmayıp her türlü yardımını öğrencilerine gösteren danışmanım Prof. Dr. Tarık EREN'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Okumam için büyük emek gösteren kıymetlim olan annem Güler SÜER'e, bana destek olan ve daima olacaklarını bildiğim ailem, babam Osman SÜER'e ve abim Cem SÜER'e teşekkür ederim.

Yaptıkları çalışmalarıyla tezimde yardımcı olan Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ'e, Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ'e, Öğr. Gör. Nihan ÜNÜBOL'a ve Öğr. Gör. Sinem ÖKTEM OKULLU'ya teşekkür ederim.

Daha küçük çocukken tanıştığım ve o günden beri arkadaşlarım olan Elçin BAŞARAN ve Filiz YILMAZ'a, ortaokulda kazandığım dostum Sezen GEZGİN'e, lisede hayatıma katılan Özgen ALGÜL'e, üniversitede yoldaşım olan Sultan Merve ŞEN'e, mektup arkadaşım Emel BARAN AZİMLİ'ye, hayatımda önemli yerleri olan Elif ÇAL, Ecem IŞIKSEL ve Tuğçe TUNCA'ya, bu tezimde benimle birlikte yorulan ve sayamadığım kaç gece boyunca sabahlayan Ceren DEMİR ve Tayfun ACAR'a, lisans öğrencileri Bahar SÜRMEHİNDİ, Şebnem SALIN ve Özlem ÇELİKASLAN'a her daim yanımda oldukları için teşekkür ediyorum.

Ağustos, 2015

N. Ceren SÜER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xvi
ÖZET	xvii
ABSTRACT.....	xix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	9
1.3 Hipotez	10
BÖLÜM 2	
BAKTERİLER	11
2.1 Bakterilerin Tarihçesi.....	11
2.2 Bakterilerin Sınıflandırılması	14
2.2.1 Fiziksel Şekillerine Göre Sınıflandırılması	14
2.2.1.1 Çomaksı Bakteriler (Bacillus).....	14
2.2.1.2 Yuvarlak Olanlar (Coccus)	15
2.2.1.3 Spiral Olanlar (Spirillum)	15
2.2.2 Beslenme Şekillerine Göre Bakteriler	16
2.2.2.1 Ototrof Bakteriler.....	16
2.2.2.2 Heterotrof Bakteriler	16
2.2.3 Gram Boyadan Etkilenmelerine Göre Bakteriler	17
2.2.4 Oksijene Duydukları İhtiyaca Göre Bakteriler.....	19
2.2.4.1 Aerob Bakteriler	19
2.2.4.2 Anaerob Bakteriler	19

2.2.4.3	Fakültatif Bakteriler.....	20
2.2.4.4	Mikroaerofil Bakteriler.....	20
2.3	Bakterilerin Hücresel Yapıları ve Özellikleri.....	20
2.3.1	Hücre Duvarı	21
2.3.1.1	Gram Pozitif Hücre Duvarı	22
2.3.1.2	Gram Negatif Hücre Duvarı.....	22
2.3.2	Kapsül.....	23
2.3.3	Kirpik (Flagella = Kamçı).....	23
2.3.4	Fimbria (Piluslar).....	24
2.3.5	Sitoplazmik Zar (Hücre Membranı).....	24
2.3.5.1	Fosfolipitler	25
2.3.6	Sitoplazma	26
2.3.7	Çekirdek (Nucleus, Kromozom, DNA).....	26
2.3.8	Mezozom	27
2.3.9	Plazmidler	27
2.3.10	Ribozomlar.....	27
2.4	Bakterilerde Direnç.....	27
2.4.1	Doğal Direnç	29
2.4.2	Kazanılmış Direnç.....	29
2.4.2.1	Mutasyona Bağlı Kazanılmış Direnç	30
2.4.2.2	Direnç Geninin Alınmasına Bağlı Kazanılmış Direnç ((Plazmid veya Transpozon Aracılığıyla).....	30
BÖLÜM 3		
POLİMERLER.....		32
3.1	Polimerlerin Sınıflandırılması	32
3.2	Polimerlerin Sentezi	33
3.2.1	Basamaklı Polimerizasyon	34
3.2.1.1	Kondensasyon Tepkimeleri	34
3.2.2	Katılma Polimerizasyonu	36
3.2.2.1	Radikal Katılma Polimerizasyonu	36
3.2.2.2	İyonik Polimerizasyon	38
3.3	Kontrollü Polimerizasyon	39
3.3.1	ROMP (Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu).....	40
3.3.2	Olefin Metatez Polimerizasyonu	44
3.3.2.1	Asiklik Dien Metatez Polimerizasyonu	45
3.3.2.2	Katalistler	45
BÖLÜM 4		
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİK GÖSTEREN DOĞAL VE SENTETİK POLİMERLER		47
4.1	Antimikrobiyal Peptitler	47
4.1.1	Melittin	48
4.1.2	Sekropin	48
4.1.3	Nisin	49
4.1.4	Magainin	49

4.1.5	Defensinler.....	50
4.1.6	Histatinler	52
4.1.7	Katolisidinler	52
4.1.8	Granülizinler	52
4.2	Sentetik Antimikrobiyal Polimerler	53
4.2.1	Fosfonyum Esaslı Antimikrobiyal Polimerler	65

BÖLÜM 5

DENEYSEL ÇALIŞMA VE BULGULAR.....	71
5.1 Materyal ve Yöntem	71
5.1.1 Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler	71
5.1.2 Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Gereçler.....	71
5.2 Monomerlerin Sentezi.....	72
5.2.1 Furan Maleik Anhidrit Diels Alder Ürününün (4,10-Dioxa-tricyclo [5.2.1.0 ^{2,6}] dec-8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 1)	72
5.2.2 Bromookzanorbornen (4-(3-bromopropyl)-10-oxa-4- azatricyclo[5.2.1.0 ^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 2).....	72
5.2.3 Trifenil Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Phe).....	73
5.2.4 Tris(4-metoksifenil) Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Metoksi_Phe)	73
5.2.5 Trimetil Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Metil)	73
5.2.6 Trietil Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Etil).....	74
5.2.7 Tripropil Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Propil).....	74
5.2.8 Tri(t-bütil) Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_t-Bütil)	74
5.3 Grubbs 3. Jenerasyon Katalistinin Sentezi.....	74
5.4 Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Monomerlerinin ROMP ile Polimerizasyonları	75
5.4.1 Trifenil Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Phe_3K)	75
5.4.2 Tris(4-metoksifenil) Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Metoksi_Phe_3K)	75
5.4.3 Trimetil Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Metil_3K).....	76
5.4.4 Trietil Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Etil_3K)	76
5.4.5 Tripropil Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Propil_3K)	76
5.4.6 Tri(t-bütil) Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_t-Bütil_3K)	77
5.5 Polimerlerin Sıvı ve Katı Fazdaki Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi	77
5.5.1 MIC Değerlerinin Belirlenmesi.....	77
5.5.2 Katı Yüzeyde Antibakteriyel Etkinlik	78

5.6	Sitotoksosite Çalışmaları.....	78
5.6.1	Hemolitik Konsantrasyon (HC ₅₀) Tayini	78
5.7	Polimerlerin Cam Yüzeylere Kaplanması.....	79
5.8	Katyonik Yük Yoğunluğu Tayini.....	80
5.8.1	Sodyum Floresein Metodu	80
5.8.2	Zeta Potansiyel Metodu.....	80
5.9	Biyofiziksel Çalışmalar	81
5.9.1	Bakteri ve Polimer Etkileşmesinin Zeta Potansiyel ile Ölçülmesi	81
5.9.2	Floresan Mikroskopu ile Bakteri Polimer Etkileşmesinin Görüntülenmesi	81
 BÖLÜM 6		
DENEYSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....		82
6.1	Monomerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu	83
6.1.1	Fosforyum Esaslı Monomerlerin Sentezi	85
6.1.2	Polimer Sentezi	100
6.2	Antimikrobiyal Etkinlik.....	110
6.2.1	Polimerlerin Sıvı Fazdaki Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi	110
6.2.2	Polimerlerin Katı Yüzeyde Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi	112
6.3	Sitotoksosite Çalışmaları.....	114
6.3.1	Hemolitik Konsantrasyon.....	114
6.4	Katyonik Yük Yoğunluğu Tayini.....	117
6.5	Temas Açısı Ölçümü.....	119
6.6	SEM Analizi	120
6.7	Polimerlerin Bakteriler ile Etkileşmesinin Biyofiziksel Teknikler ile İncelenmesi.....	121
6.7.1	Bakteri ve Polimer Etkileşmesinin Zeta Potansiyel ile Ölçülmesi	123
6.7.2	Floresan Mikroskopu ile Bakteri Polimer Etkileşmesinin Görüntülenmesi	124
 BÖLÜM 7		
SONUÇ VE ÖNERİLER		126
KAYNAKLAR.....		128
ÖZGEÇMİŞ.....		137

SİMGE LİSTESİ

Å	Angström
CFU	Koloni oluşturan birim (colony forming units)
cm	Santimetre
Da	Dalton
g	Gram
kcal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
McF	Mcfarland
mg	Miligram
MHz	MegaHertz
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mV	Milivolt
n	Mol
nm	Nanometre
ppm	Parts per million
rpm	Rounds per minute
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µm ²	Mikrometrekare
µM	Mikromolar
°C	Derece santigrat

KISALTMA LİSTESİ

Ac ₂ O	Asetikanhidrit
AFM	Atomik kuvvet mikroskopisi (Atomik force microscopy)
AROMP	Sıralı halka açılma metatez polimerizasyonu
ATR	Attenuated Total Reflectance
ATRP	Atom transfer radikal polimerizasyonu
CDC	Hastalık önleme ve kontrol merkezleri (Centers for Disease Prevention and Control)
CDCl ₃	Döterokloroform
CH	Kolesterol
CL	Kardiyolipin
DCM	Diklorometan
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DP	Polimerizasyon derecesi
EDC	1-etil-3-(3-dimetillaminopropil)karbodiimid
EDS	Enerji dağılımlı x-ray spektroskopisi (Energy Dispersive x-ray Spectroscopy))
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy)
GPC	Moleküler eleme kromatografisi (Gel permeation chromatography)
hBD	İnsan beta defensini
HC	Hemolitik konsantrasyon
HCl	Hidroklorik asit
HD	İnsan defensini
HNP	İnsan nötrofil defensini
HRBC	Taze kırmızı kan hücreleri
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
H ₂ SO ₄	Sülfürikasit
LBTP	Lineer polietilenimin trifenilfosfonyumbromür
IPEI	Lineer polietilenimin
LPS	Lipopolisakkarit
M _A	Molekül ağırlığı

M_n	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
M_p	En yüksek pik molekül ağırlığı
M_w	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
M_z	z-ortalama molekül ağırlığı
MeOH	Metanol
MIC	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO_3	Sodyumbikarbonat
Na_2SO_4	Sodyumsülfat
N_2	Azot gazı
NMP	Nitroksit aracılıklı polimerizasyon
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PBu_3	Tribütilfosfin
PC	Fosfatidilkolin
PDI	Poli dispersite indeks
PE	Fosfatidiletanolamin
PEG	Polietilenglikol
PG	Fosfatidil gliserol
PPH_3	Trifenilfosfin
PPO	Polifenilenoksit
PS	Fosfatidilserin
RAFT	Tersinir eklenme-parçalanma zincir transferi
RBC	Kırmızı kan hücreleri
ROMP	Halka açılma metatez polimerizasyonu
SEC	Moleküler eleme kromatografisi (Size Exclusion Chromatography)
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy)
SENIC	Nozokomiyal Enfeksiyon Kontrol ve Önleme Etkisinin İncelemesi (The Study of the Efficacy of Nosocomial Infection Control and Prevention)
SM	Sfingomiyelin
TEA	Trietilenamin
TEDA	Trietilendiamin
THF	Tetrahidrofuran
TMS	Tetrametilsilan
UV-Vis	Ultraviolet görünür bölge
WHO	The World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1	Yüksek gelirli ülkelerde 1995-2010 yılları arasında görülen sağlık kuruluşu kaynaklı enfeksiyon yüzdeleri [9] 5
Şekil 1.2	Düşük ve orta gelirli ülkelerde 1995-2010 yılları arasında görülen sağlık kuruluşu kaynaklı enfeksiyon yüzdeleri [9] 5
Şekil 1.3	Mikroorganizmaların damar içi kateterlere giriş yerleri [18] 9
Şekil 2.1	Çomaksı bakteri çeşitleri [28] 14
Şekil 2.2	Yuvarlak bakteri SEM görüntüsü [29] 15
Şekil 2.3	Spiral bakteriye örnek Campylobacter Jejuni görüntüsü [30] 15
Şekil 2.4	Çeşitli hastalıklara neden olan patojen bakterilerin elektron mikroskop görüntüleri [33] 17
Şekil 2.5	Gram boyama yönteminin mekanizması ve çubuk, virgül, yuvarlak şekillerdeki Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler [35] 19
Şekil 2.6	Tipik bir bakteri hücresi [37] 20
Şekil 2.7	Gram pozitif hücre duvarı kimyasal yapı ve fonksiyonu [41] 22
Şekil 2.8	Gram negatif hücre duvarı kimyasal yapı ve fonksiyonu [41] 23
Şekil 2.9	Bakterilerdeki kirpik yapıları [42] 24
Şekil 2.10	Fosfolipitlerin şematik gösterimi [43] 25
Şekil 2.11	Hücre membranında bulunan lipidlerin yapısal gösterimi [20] 25
Şekil 2.12	Bakteri hücrelerindeki tipik antibiyotik hedef alanları (A), Antibiyotik direnç mekanizması (B) [46] 29
Şekil 2.13	Direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direncin şematik gösterimi [47] 31
Şekil 3.1	Polimerizasyonun şematik gösterimi [49] 32
Şekil 3.2	Homopolimere örnek olan stirenden polistiren eldesi [51] 33
Şekil 3.3	Kopolimer çeşitleri [52] 33
Şekil 3.4	Diol ve dikarboksilik asit tepkimesi ile poliester oluşumu 34
Şekil 3.5	Diamin ve dikarboksilik asit tepkimesi ile poliamid oluşumu 35
Şekil 3.6	-OH ve -COOH gruplu bifonksiyonel molekül 35
Şekil 3.7	-NH ₂ ve -COOH gruplu bifonksiyonel molekül 35
Şekil 3.8	Diol ve dikarboksilik asit esterleri arasındaki tepkime sonucu poliester eldesi 35
Şekil 3.9	Diamin ve dikarboksilik asit klorür tepkimesi ile poliamid oluşumu 36
Şekil 3.10	Benzoil peroksitin parçalanma reaksiyonu 36
Şekil 3.11	Radikal katılma polimerizasyonu çoğalma basamağı gösterimi 37

Şekil 3.12	Radikalik katılma polimerizasyonu birleşme ile sonlanma basamağının gösterimi	37
Şekil 3.13	Radikalik katılma polimerizasyonu orantısız sonlanma basamağının gösterimi	37
Şekil 3.14	Anyonik polimerizasyonda monomerin başlatıcı ile reaksiyonu	38
Şekil 3.15	Kasyonik polimerizasyonu başlama basamağının gösterimi.....	39
Şekil 3.16	Kasyonik polimerizasyonu ilerleme basamağının gösterimi.....	39
Şekil 3.17	Halka açılma metatez polimerizasyonuna (ROMP) genel bir örnek [56].....	40
Şekil 3.18	Siklopentenin halka açılma metatez polimerizasyon adımları. M, molibden veya Tungusten gibi bir geçiş metalini gösterir [20]	41
Şekil 3.19	Tipik bir ROMP reaksiyonunun mekanizması [20]	42
Şekil 3.20	ROMP reaksiyonlarda ikincil metatez (moleküller arası zincir transfer ve molekül içi zincir transfer) reaksiyonların örnekleri [20]	43
Şekil 3.21	Olefin metatez polimerizasyonunun şematik gösterimi	44
Şekil 3.22	Asiklik dien metatez reaksiyonu	45
Şekil 3.23	Asiklik dien metatez polimerizasyonu	45
Şekil 3.24	Olefin metatez polimerizasyonunda kullanılan çeşitli Rutenyum esaslı katalistler [69]	46
Şekil 3.25	Çeşitli Molibden esaslı Schrock katalistleri [70]	46
Şekil 4.1	Melittinin üç boyutlu yapısı [74]	48
Şekil 4.2	Sekropinin üç boyutlu yapısı [75].....	49
Şekil 4.3	Nisinin şematik gösterimi [77]	49
Şekil 4.4	Magainin 3 boyutlu yapısı [78].....	50
Şekil 4.5	Literatürdeki bazı kasyonik antibakteriyel polimerlerin genel yapısı [44]	54
Şekil 4.6	Piridin grubu içeren ROMP polimerlerinin sentezi [89].....	55
Şekil 4.7	Poli(2) filminin Ag ⁺ iyonu ile etkileşmesi ve yüzey uygulamasının şematik gösterimi [89].....	56
Şekil 4.8	Norbornen esaslı antimikrobiyal polimerlerin sentezi [90]	56
Şekil 4.9	Amfifilik monomer ve polimerler elde etme amaçlı “Yapı kiti” yaklaşımı. Hidrofilik kısım (mavi), hidrofobik kısım (yeşil) ve polimerleşebilir kısım (sarı) gösterilmiştir [91].....	58
Şekil 4.10	Moleküler kit kapsamında sentezlenen monomer ve polimerlerin yapısı [91]	58
Şekil 4.11	Floresan özellikli sonlandırıcı ajanların sentezi [98]	60
Şekil 4.12	Amino silan ile sonlandırılmış polimerlerin sentezi [98]	60
Şekil 4.13	Polisiklookten ve polisiklobüten esaslı farklı boşluk mesafelerine sahip yan zincirler içeren polimerler [100]	61
Şekil 4.14	Polisiklookten ve polisiklobüten esaslı amfifilik polimerlerin yapıları [100]	62
Şekil 4.15	Sentezlenen amfifilik polimerlerin MIC ve HC ₅₀ değerleri [100]	63
Şekil 4.16	Fosfonyum ve kuaterner amonyum tuzu içeren biyositlerin canlı hücre sayımları [106].....	66
Şekil 4.17	Glisidil metakrilat ve 2-hidroksietilmetakrilat esaslı kuaterner fosfonyum tuzlarının polimerizasyonunun şematik gösterimi [107]	66

Şekil 4.18	Kuartinize PPO ile polimerlerinin büyüme inhibisyonları [108]	67
Şekil 4.19	(4-penten-1-il)trifenilfosfonyum bromür içeren tripolimerin sentetik gösterimi [109]	68
Şekil 4.20	(4-penten-1-il)trifenilfosfonyum bromür içeren tripolimerin AFM görüntüsü [109]	68
Şekil 4.21	Bütiltrifenilfosfonyumbromür içeren polietileniminin sentetik gösterimi [110]	69
Şekil 4.22	LBTP kopolimerlerinin disk difüzyon ve MIC sonuçları	70
Şekil 6.1	Çalışmada sentezlenen homopolimerlerin yapısal gösterimi	82
Şekil 6.2	Çalışma kapsamında sentezlenen monomerlerin sentetik şeması	83
Şekil 6.3	Furan maleik anhidritin (Ürün 1) ^1H NMR spektrumu	84
Şekil 6.4	Furan maleik anhidritin (Ürün 1) ^{13}C NMR spektrumu	84
Şekil 6.5	Bromookzanorbornen'in (Ürün 2) ^1H NMR spektrumu	85
Şekil 6.6	P_Phe monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları	87
Şekil 6.7	P_Phe monomerinin ^{13}C NMR Spektrumu	88
Şekil 6.8	P_Metoksi_Phe monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları	89
Şekil 6.9	P_Metoksi_Phe monomerinin ^{13}C NMR Spektrumu	90
Şekil 6.10	P_Metil monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları	91
Şekil 6.11	P_Metil monomerinin ^{13}C NMR Spektrumu	92
Şekil 6.12	P_Etil monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları	93
Şekil 6.13	P_Etil monomerinin ^{13}C NMR Spektrumu	94
Şekil 6.14	P_Propil monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları	95
Şekil 6.15	P_Propil monomerinin ^{13}C NMR Spektrumu	96
Şekil 6.16	P_t-Bütil monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları	97
Şekil 6.17	P_t-Bütil monomerinin ^{13}C NMR Spektrumu	98
Şekil 6.18	Proje kapsamında sentezlenen Ürün 2 ve P_Phe monomerlerinin FTIR spektrumları ($^*\text{P}^+$ -Phe bandı)	99
Şekil 6.19	Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin sentetik şeması	100
Şekil 6.20	P_Phe_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu	103
Şekil 6.21	P_Metoksi_Phe_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu	104
Şekil 6.22	P_Metil_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu	105
Şekil 6.23	P_Etil_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu	106
Şekil 6.24	P_Propil_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu	107
Şekil 6.25	P_t-Bütil_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu	108
Şekil 6.26	Mikrodilüsyon ve makrodilüsyonun şekilsel gösterimi	111
Şekil 6.27	Antibakteriyel aktivitesini incelemek için kullanılan airborne testing ve disk difüzyon yönteminin gösterimi	114
Şekil 6.28	Çalışmada kullanılan polimerlerin yüzeydeki % antibakteriyel etkinlikleri	114
Şekil 6.29	P_Phe_3K ve P_Phe_10K'nın % hemolitik aktivitesinin grafiksel gösterimi	116
Şekil 6.30	P_Metoksi_Phe_3K ve P_Metoksi_Phe_10K'nın % hemolitik aktivitesinin grafiksel gösterimi	116
Şekil 6.31	P_t-Bütil_10K'nın % hemolitik aktivitesinin grafiksel gösterimi	116
Şekil 6.32	P_Etil_3K'nın % hemolitik aktivitesinin grafiksel gösterimi	117

Şekil 6.33	P_Phe_3K polimerinin SEM görüntüleri ((A)=500 nm, B= 2 µm, (C)=10 µm, (D)= fosfor mapping)).....	121
Şekil 6.34	Kilim (carpet) modeli mekanizmasının şematik gösterimi [120]	123
Şekil 6.35	Floresan mikroskop görüntüleri ((A)=polimer kaplanmamış kontrol cam, (B)=P_Phe_3K kaplı cam)	125

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 Hastane enfeksiyonu nedeni olan mikroorganizmaların dağılımı[8]	7
Çizelge 1.2 En sık rastlanan hastane enfeksiyonlarına göre mikroorganizmaların dağılımı [8].....	7
Çizelge 2.1 Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin arasındaki farklar [39].....	21
Çizelge 2.2 Farklı hücrelerde bulunan lipidlerin dağılımı * [44]	26
Çizelge 4.1 α ve β - defensinlerin insan hücrelerinde bulundukları yerler [79]	51
Çizelge 4.2 Polimerlerin MIC ₉₀ ve HC ₅₀ değerleri [91].....	59
Çizelge 4.3 Piridin bazlı polinorbornen tuzlarının antibakteriyel ve hemolitik değerleri [92].....	61
Çizelge 4.4 Trifenilfosfin ve tribütilfosfin tuzlu kopolimerlerin disk difüzyon sonuçları [107].....	67
Çizelge 4.5 Kuartirize PPO ile polimerlerinin MIC değerleri [108].....	68
Çizelge 4.6 LBTP aşısı kopolimerlerinin zeta potansiyel ölçümü ve ¹ H NMR ile bulunan % substütie oranları [110]	70
Çizelge 6.1 Projede sentezlenen polimerlerin teorik ve GPC ile molekül ağırlıkları tayini.....	110
Çizelge 6.2 Bu çalışmada kullanılan polimerlerin MIC ^a değerleri.....	112
Çizelge 6.3 Polimerlerin HC ₅₀ çalışmasında ölçülen absorpsiyon değerleri	115
Çizelge 6.4 Çalışmada kullanılan polimerlerin kırmızı kan hücrelerine karşı % hemolitik aktiviteleri	115
Çizelge 6.5 Polimerlerin zeta potansiyel sonuçları.....	118
Çizelge 6.6 Polimerlerin Sodyum Floresein metodu ile içerdikleri katyonik yük yoğunlukları.....	119
Çizelge 6.7 Polimerlerin temas açıları ölçüm sonuçları.....	120
Çizelge 6.8 Polimerlerin bakteri ile birlikte zeta potansiyel ölçüm sonuçları	124

**FOSFONYUM GRUPLARI İÇEREN ROMP HOMOPOLİMERLERİNİN
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİBAKTERİYEL
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Naime Ceren SÜER

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tarık EREN

Eş Danışman: Doç. Dr. Volkan SÖZER

Bakteri enfeksiyonu global bir problemdir. Özellikle son yıllarda bakterilerin kullanılan ilaçlara karşı direnç kazanması, enfeksiyon hastalıklarının yayılmasına ve sonucunda ölüm oranlarının artmasına sebep olmaktadır. Yeni nesil antibiyotiklerin geliştirilmesi ve özellikle implant malzemelerin (kateter gibi) yüzeyinin antimikrobiyal hale getirilmesi bakterilere karşı yapılan savaşta önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu kapsamda yapılan çalışmalar iki ana gruba oluşturmaktadır. Bunlardan ilki doğal peptit türevlerinin sentezini, ikincisi ise peptit türevlerinin sentetik taklitlerini kapsamaktadır. Bu çalışma kapsamında kontrollü polimerizasyon yöntemlerinden ROMP (halka açılma metatez polimerizasyonu) kullanılarak fosfonyum tuzu esaslı homopolimerler sentezlenmiştir. Fosfonyum tuzuna farklı alkil ve aromatik grupları bağlanarak (fenil, metoksifenil, metil, etil, propil, tert-bütill) hidrofobik özelliğin antimikrobiyal etkinliğe etkisi incelenmiştir. Polimerlerin antimikrobiyal testleri E. coli, S. aureus ve C. albicans'a karşı yapılmıştır. Sitotoksikite çalışmaları kapsamında hemolitik konsantrasyon (HC₅₀) değerleri hesaplanmıştır. Polimerlerin sıvı fazdaki etkinliklerinin yanısıra katı yüzeydeki (cam) etkinlikleri de çalışılmıştır. Polimer ile kaplı cam yüzeylerde katyonik yük yoğunluğu ve temas açısı ölçümleri yapılarak yüzeylerin hidrofobik/hidrofilik özelliklerinin antimikrobiyal etkinlik üzerine etkisi incelenmiştir.

Floresan mikroskobu ile amfifilik yapıdaki polimerlerin bakteri hücre zarını parçaladığı ve bakterilerin ölümüne sebep olduğu görülmüştür. Zeta potansiyel çalışması yapılarak yapı-aktivite ilişkisi ayrıca incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: ROMP, fosfonyum tuzu, antimikrobiyal etkinlik, hemolitik konsantrasyon, polimerlerin biyolojik uygulamaları, yapı-aktivite ilişkisi

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHONIUM-CONTAINING ROMP BASED POLYMERS AND INVESTIGATION OF THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Naime Ceren SÜER

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Tarık EREN

Co-Adviser: Assoc. Prof. Dr. Volkan SÖZER

Bacteria infection is a global problem. Especially in recent years, growing resistance against to antibiotic, result in spread of infection diseases and increasing in mortality. The surface modification of implant materials (such as catheters) and developing new generation antibiotics play an important role during the fight against to bacteria. However, there are two main strategy present. First one is synthesis of host defense peptides, the second one is the synthetic mimic of host defense peptides. In this thesis, one of the controlled polymerization techniques ROMP (ring opening metathesis polymerization) is used for phosphonium based homopolymers. The effect of hydrophobicity on the antimicrobial activity was investigated by using different alkyl and aromatic groups (phenyl, methoxyphenyl, methyl, ethyl, propyl, tert-butyl) bearing at phosphonium salts. Antimicrobial activity of the polymers was investigated against to *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*. Cytotoxicity of the polymers was evaluated by hemolytic concentration (HC_{50}). In this study, solution phase activity of the polymers have been analyzed and surface activity (on glass) was also investigated by cationic polymer coated glass surface as well. Charge density, contact angle studies were applied on the polymer coated glass surface to speculate the hydrophobic/hydrophilic

properties against to antimicrobial activity. Fluorescence microscopy is used to analyze interaction between the amphiphilic polymer and bacteria cell membrane and result in death of bacteria. Structure-activity relationship was also investigated by zeta potential studies.

Keywords: ROMP, phosphonium salts, antimicrobial effect, hemolytic concentration, biological application of polymers, structure-activity relationship

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Enfeksiyon, hastalık yapıcı herhangi bir yolla insana geçme özelliğindeki mikropların veya parazitlerin vücuda girmesiyle ortaya çıkan hastalık tablosudur. Bu hastalıklar, bir bireyden diğerine veya bir türden diğerine geçebilmelerinden dolayı, genellikle bulaşıcı hastalık olarak tanımlanırlar. Hastalığı yapan organizmalar, virüsler, bakteriler, mantarlar olabilir. Bütün bulaşıcı hastalıklar bir veya birkaç yolla insana geçebilme özelliğindedir. İnsandan insana, hayvandan insana olduğu gibi, topraktan insana bulaşma da meydana gelebilir. Bulaşma şekillerinden başlıcaları şunlardır:

- Aksırırken, öksürürken, konuşurken ağızdan çıkan damlacıkların başkası tarafından teneffüs edilmesiyle (verem, boğmaca ve çeşitli solunum yolu hastalıkları);
- Doğrudan deri temasıyla,
- Hastanın kullandığı çamaşır, yatak eşyası ve yiyecek eşyaları gibi malzemeler vasıtasıyla,
- Hayvanların insandan insana veya hayvanlardan insana hastalık taşımasıyla (Bunun en canlı örneği anofel cinsi sivrisineklerin taşıdığı sıtmadır. Yine aynı şekilde güvercinler "psitta-koz" hastalığını taşırlar.),
- Hastalandırıcı mikroplarla kirlenmiş yiyecekler ve içeceklerin alınmasıyla (Suyla bulaşan hastalıkların başlıcaları tifo, dizanteri, kolera, paratifo olarak sayılabilir. Yiyeceklerle de besin zehirlenmeleri ve gastroenteritler meydana gelebilir.),

- Hastalıklı bir anneden hamilelik sırasında veya doğum esnasında bebeğe hastalık bulaşmasıyla [1].

Toplumda en fazla görülen hastalıklar enfeksiyona bağlı gelişir. Bunun da büyük bir bölümünü üst solunum yolu enfeksiyonları oluşturur, en sık görülen bulgu ateştir. Enfeksiyon hastalıkları tedavi edilebilen hastalıklardır. Enfeksiyon hastalıkları uzmanlığı "Ateşli Hastalıklar" veya "İntaniye" olarak da adlandırılır. Bazı enfeksiyon hastalıkları:

- Menenjit
- Üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları
- Tifo
- Bruselloz
- Besin zehirlenmesi
- Grip
- İshal
- İdrar yolu enfeksiyonları
- Şark çıbanı
- Hepatit A-B-C
- Kızamık

Bu hastalıkların büyük bir bölümüyle aşı veya etkili tedavi ile başa çıkmak mümkündür. İnsanlık tarihi boyunca mücadelenin en fazla olduğu hastalık enfeksiyon hastalıkları olmuştur. Enfeksiyon hastalıkları mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Herhangi bir bakteriye karşı etkili yeni bir antibiyotik tedavisi bulunmakta, ancak bir süre sonra bu antibiyotiklere karşı direnç gelişmektedir. İnsanlarla mikroorganizmalar arasındaki bu savaş son yüz yıl içerisinde bütün hızıyla devam etmektedir [2].

Enfeksiyon hastalıkları yüzyıllardır insanoğlunun en önemli sorunlarından biri olmuştur. Salgınlar kimi zaman çağların açılıp kapanmasına sebep olmuş, kimi zaman ise savaşlarda üstünlük sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Örneğin veba, şarbon gibi hastalıkların önemli etkisi görülmüştür. Daha önceden de çiçek hastalığı virüsü ile hiç karşılaşmamış topluluklara bu hastalığın bulaştırıldığı battaniyeleri dağıtarak tüm

askerlerin hastalandırılması vakaları olmuştur. Günümüzde de biyolojik savaş silahı olarak gündemi son derece meşgul eden şarbon ve benzeri mikroorganizmalar vardır. Yani enfeksiyon hastalıkları zaman içerisinde şekil değiştirmiş olsa da insanlığın gündeminde sürekli olarak kalmıştır [3].

Enfeksiyon hastalıklarının kilometre taşları hastalıkları felsefeden ayıran, milattan 460 yıl önce doğan İstanköy'lü Hipokrat, mikroskobu bulan Leeuwenhoek, sterilizasyonu fark eden Lister, immunolojinin ilk aşısını yapan Jenner, Pasteur ve antibiyotiklerin babası Fleming'dır [3].

Eski Mısırlılar leprayı, trahomu, dizanteriyi, üç bin yıl önce Filistinliler vebayı ve bunun farelerle olan ilişkisini biliyorlardı. Enfeksiyon hastalıklarına ait belirti ve bulgular ortaya konup klinik tablolar pek çokları tarafından tanımlansa da hastalıkların nedenlerini anlamaya yönelik gelişmeler için aradan bin yılların geçmesi gerekmiştir [3].

İslam alemini ve dünyayı etkileyen tıp önderi İbni Sina, tıp araştırmaları yaparken bazı hastalıkların bulaşmasında göze görünmeyen birtakım yaratıkların etkisi olduğunu, yani mikropların varlığını sezmiş ve bu bilinmeyen mahluklardan eserlerinde sık sık bahsetmiştir. Mikroskobun henüz bilinmediği bir devirde böyle bir yargıya varmak çok ilginçtir [3].

Modern çağda enfeksiyon hastalıkları, bağlantılı olarak halk sağlığı, immünoloji, mikrobiyoloji birlikte değerlendirilmelidir. Bakterilerle oluşan hastalıklara karşı onlarca gruptan antibiyotiğe sahibiz ancak savaşılan şeyin başka bir canlı varlık olması nedeniyle bazı sorunlar mevcuttur ki bunların başında antibiyotiklere direnç gelmektedir. Her yeni bulunan antibiyotiğe bir süre sonra bu bakteriler tarafından direnç geliştirilmekte ve tedavide zorluklar ortaya çıkmaktadır. Bu direnç antibiyotiklerin lüzumsuz ve kötü kullanımları ile de artmaktadır [3].

Mısır mumyalarında bile rastlanan bir hastalık olan tüberküloz (verem) binlerce yıl içinde pek çok şekilde tedavi edilmeye çalışılsa da başarılı olunamamış ve en çok hastanın öldüğü hastalıklardan biri olarak tarihe geçmiştir. Bugün dünyada hala ilk pandemisi süren tüberküloza karşı kazanılan ilk zafer R. Koch tarafından hastalık etkeni olan bakterinin gösterilmesidir (Nobel ödülü- 1905) [3].

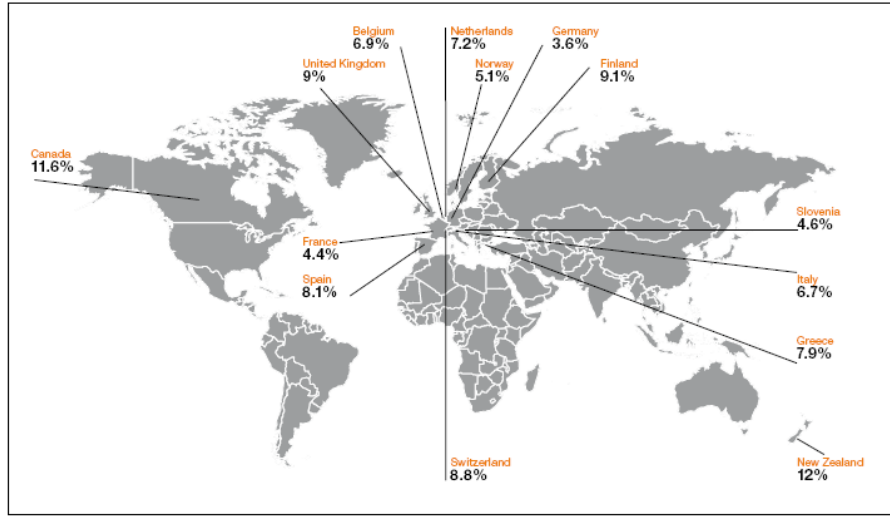
Bunu izleyen başarı ise Calmette ve Guerin adlı iki araştırmacı tarafından 20 yıl boyunca bakterinin 229 pasajı yapılarak zayıflatılmış bir suş elde ederek oluşturulan aşı-BCG aşısıdır [3].

Üçüncü başarı ise bu hastalığa karşı ilk ilaç olan streptomisin'in 1952'de Waksman tarafından bulunmasıdır (Nobel ödülü- 1952). 1952 yılı bu buluş nedeniyle "annulus mirabilis- harikalar yılı" olarak adlandırılmıştır. Tüm bu başarılar hastalığı ortadan kaldırmak için yeterli olmamıştır. Bu tarihleri izleyerek çok güçlü ilaçlar bulunmuştur. Ama bakteriler de bu ilaçlara karşı direnç geliştirerek hastalık tablosunda yeni bir şekle neden olmuştur ki "Çok İlaça Dirençli Tüberküloz" olarak adlandırılan bu klinik tablo bugün hem hasta hem de toplum sağlığı açısından en korkulan hastalıklardan biridir [3].

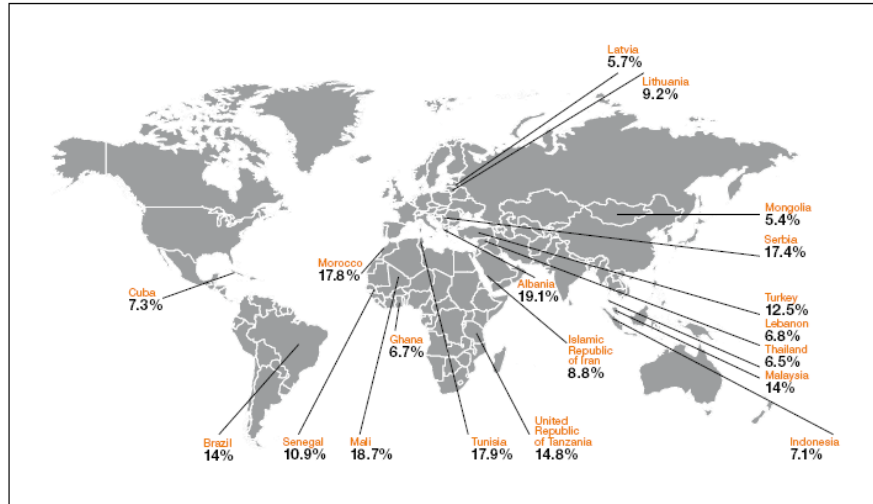
Pek çok hastalığa karşı elimizde aşılar vardır ve çok başarılı uygulamalarla bazı hastalıklar dünyadan tamamen yok edilmiş ya da edilmektedir. Çiçek yok edilmiş, çocuk felci için çalışmalar sürmekte ve bir sonraki hedef de kızamıktır. Ancak hastalıkların sayısı ile karşılaştırıldığında bu başarılar cılız kalmaktadır. Halk sağlığını korumaya yönelik hastalıkları oluşmadan önce yok etmeye yönelik çalışmalar sürerken bulaşıcı hastalıklara karşı elimizdeki tek silah olan antibiyotiklerin çok iyi ve doğru kullanımı da giderek daha fazla önem taşımaktadır. Hijyen şartlarındaki ve kişisel hijyene yönelik eğilimlerdeki iyileşmeler de bulaşıcı hastalıklardan korunmada son derece önemlidir [3].

Enfeksiyon hastalıklarının uğraştığı önemli hastalık grubundan biri de hastane enfeksiyonlarıdır. Hastane enfeksiyonları tıptaki gelişmelerle birlikte gündemimize giren ve tüm dünyayı ilgilendiren önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır [4], [5]. Maliyeti ve mortalitesi yüksek, ancak önlenabilir enfeksiyonlar olan hastane enfeksiyonları son yıllarda giderek önem kazanmıştır [6], [7]. Hastane enfeksiyonları sağlık hizmetleri kalitesinde kritik bir faktör olarak kabul edilmekte ve sağlık hizmetlerinden alınan sonuçların olumsuz etkilenmesinde önemli rol oynamaktadır [8]. Hastane enfeksiyon oranları ülkeler, bölgeler veya hastaneler arasında bile farklılık göstermektedir. Şekil 1.1 ve Şekil 1.2'de; yüksek, orta ve düşük gelirli ülkelerde 1995-2010 yılları arasındaki görülen sağlık kuruluşu kaynaklı enfeksiyon yaygınlık yüzdeleri

gösterilmektedir. Araştırma, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılmıştır. Ülkemizde bu oranın %12,5 civarı olduğu görülmektedir [9].



Şekil 1.1 Yüksek gelirli ülkelerde 1995-2010 yılları arasında görülen sağlık kuruluşu kaynaklı enfeksiyon yüzdeleri [9]



Şekil 1.2 Düşük ve orta gelirli ülkelerde 1995-2010 yılları arasında görülen sağlık kuruluşu kaynaklı enfeksiyon yüzdeleri [9]

Birçok hastanede enfeksiyon kontrol komiteleri kurularak enfeksiyon oranları izlenmekte ve analiz edilmektedir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her hastanenin kendine özgü enfeksiyon oranları ve yüksek riskli servisleri saptanmakta, enfeksiyon kontrol önlemleri ve sağlık personelinin eğitim programları hastanenin özelliği ve gereksinimine göre yeniden düzenlenmektedir. Hastane enfeksiyonlarının kontrolünde süreyansın önemi “The Study of the Efficacy of Nosocomial Infection Control and Prevention” (SENIC) tarafından yapılan çalışmalarda açıkça gösterilmiştir. SENIC

projesinin sonuçları etkili önlemler alındığı takdirde, hastane enfeksiyonlarının üçte birinin önlenebileceğini göstermiştir. Bu çalışmada enfeksiyon kontrol ve sürveyans programı olan hastanelerde 5 yıllık sürede hastane enfeksiyonlarının %32 oranında azalırken, olmayan hastanelerde %18 oranında artış gösterdiği bildirilmiştir [10]. Hastane enfeksiyonu kontrol programında başarıya ulaşmak için ön koşul, hastane enfeksiyonları sürveyansı uygulanmasıdır. Hastane enfeksiyonu hızlarını minimum düzeyde tutmak, salgınları önlemek ve kontrol edebilmek için hastanelerin sürveyans uygulaması zorunludur [11], [12].

Hastane enfeksiyonu hasta hastaneye başvurduğunda inkübasyon döneminde olmayan; daha sonra gelişen ve taburcu olduğunda ortaya çıkabilen enfeksiyonlardır. Genellikle hastaneye yattıktan 48–72 saat sonra ve taburcu olduktan sonra ilk 10 gün içinde görülür. Hastane enfeksiyonları hastane ortamında bulunan antibiyotiklere çok dirençli mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar yaşanmakta bazen de başarısız olunmaktadır. Sonuç olarak hastanede yatış süresinde, ölümlerde ve tedavi maliyetinde artışa neden olmaktadır.

Ülkemizde, hastane enfeksiyon etkenleri içinde, Gram-negatif bakteriler ön sırada yer almaktadır. Bunların başlıcaları *P.aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* dir. Bunu Gram pozitif olan *S. aureus* takip etmektedir [13], [14].

Modern sağlık hizmetlerinde birçok çeşit invazif cihazlar, hasta tedavisi ve hastaları kurtarmak için çeşitli yöntemler kullanılır. Enfeksiyonlar, kateter ve vantilatörler gibi tıbbi işlemlerde kullanılan çeşitli cihazlar ile ilişkili olabilir. Bu sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyonlar için şunlar örnek verilebilir:

- Kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonu,
- Kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu,
- Vantilatörle ilişkili pnömoni
- Cerrahi alan enfeksiyonu [15].

Hastane enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalar arasında *A. baumannii* %23.2 oranı ile ilk sırada yer almakta, bunu %20.5 ile *Klebsiella spp*, %19.6 ile *E. coli*, %11.6 ile *Pseudomonas spp*. izlemektedir (Çizelge 1.1). Enfeksiyon tanılarına göre izole edilen

bakterilerin dağılımı incelendiğinde; ilk sırada pnömonide; *A. baumannii*, *Klebsiella* spp. ve *Pseudomonas* spp., idrar yolu enfeksiyonlarında; *E. coli* ve *E. faecium*, kan dolaşımı enfeksiyonlarında; *Pseudomonas* spp., *S. aureus*, *Klebsiella* spp. ve *E. coli*, cerrahi alan enfeksiyonlarında ise *Klebsiella* spp., *E. coli* ve *S. aureus* yer almaktadır (Çizelge 1.2) [8].

Çizelge 1.1 Hastane enfeksiyonu nedeni olan mikroorganizmaların dağılımı[8]

Mikroorganizma	Sayı (n=109)	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	26	23.8
<i>Escherichia coli</i>	22	20.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18	16.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	11.9
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	11.0
<i>Enterococcus faecium</i>	10	9.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	5.5
<i>Candida albicans</i>	2	1.8

Çizelge 1.2 En sık rastlanan hastane enfeksiyonlarına göre mikroorganizmaların dağılımı [8]

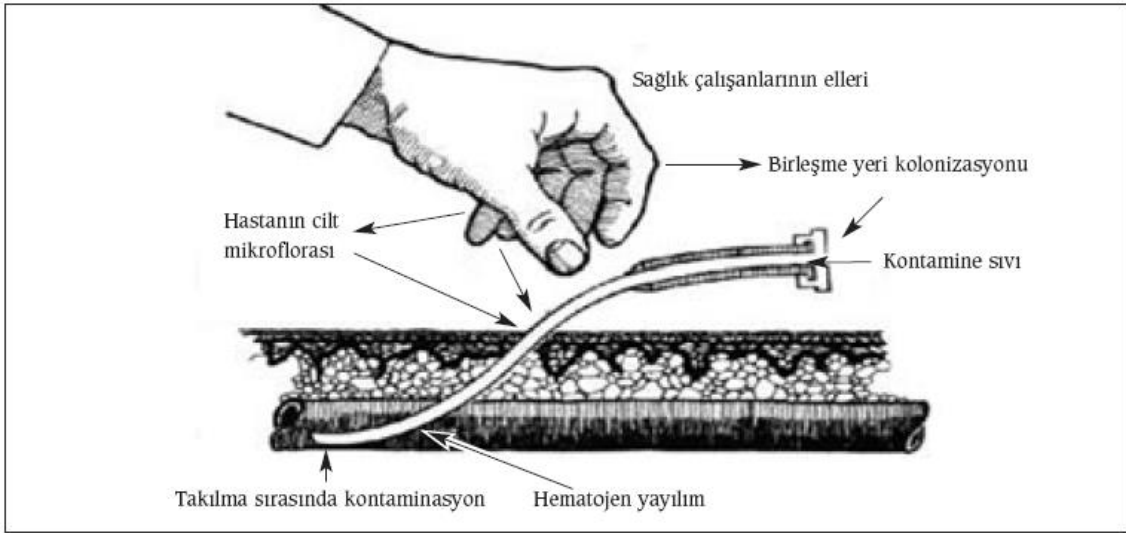
Mikroorganizma	Pnömoni	Üriner Sistem İnfeksiyonu	Cerrahi Alan İnfeksiyonu	Kan Dolaşımı İnfeksiyonu
	N=51 (%)	N=22 (%)	N=21 (%)	N=15 (%)
<i>A. baumannii</i>	23 (42.5)	1 (5)	2 (9.5)	
<i>P. aeruginosa</i>	8 (14.8)		2 (9.5)	3 (20)
<i>K. pneumoniae</i>	12 (22.2)	2 (9)	2 (9.5)	2 (13.3)
<i>E. coli</i>	4 (7.4)	11 (50)	5 (23.8)	2 (13.3)
<i>S. aureus</i>	4 (7.4)		5 (23.8)	3 (20)
<i>S. epidermidis</i>			3 (9.5)	3 (20.2)
<i>E. faecium</i>		8 (36.3)	2 (9.5)	
<i>C. albicans</i>				2 (13.3)

Hastane enfeksiyonları tüm dünyada hastaneye yatan hastalarda görülen en sık komplikasyonlardır. Amerikan Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Prevention and Control, CDC) sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık 1,7 milyon sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon ve bu enfeksiyonlara bağlı doksan dokuz bin ölüm geliştiğini bildirmiştir. Bu enfeksiyonların % 32'sinin idrar yolları enfeksiyonları, % 22'sinin cerrahi alan enfeksiyonu, % 15'inin pnömoni (akciğer enfeksiyonları), % 14'ünün kan dolaşımı enfeksiyonları olduğu kabul edilmektedir. Yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatan hastalarda enfeksiyon ve enfeksiyon komplikasyonları gelişme riski daha yüksektir. Günümüzde enfeksiyon kontrolü hasta güvenliğinin bir parçası olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle hastanelerde enfeksiyon kontrol programları kalite iyileştirme programlarının içinde mütalaa edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1970'li yıllarda kurulan ulusal hastane enfeksiyonları sürveyans sistemi (National

Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS)) bu alanda birçok gelişmeye katkı sağlamıştır. Bu sistem kurulduğu tarihten itibaren ülke genelinde üç yüzden fazla hastaneden topladığı verileri sürekli olarak analiz ederek sürveyans programlarının standartlarını oluşturmuştur. Bu sistem içinde oluşturulan enfeksiyon kontrol programları sayesinde kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu, kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonu, Cerrahi Alan Enfeksiyonu gibi başlıklarda % 30- 40'a varan azalmalar sağlanmıştır. Benzer ulusal sürveyans sistemleri gelişmiş ve gelişmekte olan başka ülkelerde de kurulmuş ve hastane enfeksiyonlarında ciddi azalmalar sağlamışlardır [16].

Damar içine yerleştirilen kateter adı verilen tüpler, son yıllarda tıbbın vazgeçilmezlerinden biri haline gelmiştir. Kateterler; sıvı tedavileri, hemodiyaliz, damar yolu açma, parenteral besleme, çeşitli ilaçların infüzyonu vb. pek çok işlem için gereklidir. Bu sıklıkla kullanılan kateterlerin en büyük handikapı enfeksiyon sorunlarına yol açmalarıdır. A.B.D'de yapılan bir araştırmada yılda ortalama yüz elli milyon kateter yapıldığı ve bunların ortalama sekiz yüz bin kadarının kateter kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonuna sebep olduğu ortaya konmuştur [17].

Kataterle ilgili enfeksiyonların önlenmesinde el yıkama ve aseptik tekniklere uyulması başta gelen kuraldır; bununla birlikte, katater uygulama yerinin seçimi, katater tipi, uygulanan sıvılar, profilaktik antibiyotik kullanımı gibi faktörler kataterle ilgili enfeksiyonların oluşumunu pozitif ve negatif yönde etkiler [18]. Kateter giriş yeri ve kateter birleşme yeri, kateter enfeksiyonlarının en sık kaynağını oluşturmaktadır [19]. Mikroorganizmaların, damar içi kateterlere giriş yerleri Şekil 1.3'te gösterilmektedir.



Şekil 1.3 Mikroorganizmaların damar içi kateterlere giriş yerleri[18]

Enfeksiyon kapmayı önlemede birinci etken çevre şartlarının sterilize edilmesidir. Örneğin, hastane ortamında hemşirenin giydiği tekstil malzemesi, yatak örtüsü, yer kaplaması, duvar boyası, bakterilerin yaşayabileceği yüzeyler olup kişiden kişiye bulaşarak enfeksiyona sebep olmaktadır. Ayrıca uzun süre kateter kullanmak zorunda kalan hastalarda yara bölgesinin çevreye maruz kalmasından dolayı kateter enfeksiyonuna yakalanma riski yüksektir. Bu sebeple son zamanlarda kateterlerin yüzeyleri ilaç ile doldurulmakta veya antibakteriyel kaplama yapılarak bakteri kolonilerinin oluşmasının engellenmesine çalışılmaktadır. Bu kapsamda özellikle virüs ve bakterilere karşı etkin mücadelede birçok antibakteriyel malzemeler geliştirilmekte ve kullanılmaktadır [20].

1.2 Tezin Amacı

Günümüzde bakterilere karşı etkin ve antimikrobiyal özellik gösteren başlıca iki çalışma konusu bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ilki doğal peptit ve doğal peptit türevlerinin sentezidir. Bu kapsamda özellikle magainin, melittin gibi doğal peptitler, yeni nesil antibiyotikler olarak çalışmaları hızlanılarak devam etmektedir. İkinci çalışma konusu ise sentetik katyonik polimerlerdir. Doğal antimikrobiyal peptitler incelendiğinde hidrofobik ve hidrofilik (+ yük) gruplarının olduğu görülmektedir. Hidrofobik / hidrofilik grupların belli bir düzen ve oranda olması peptite düşük toksisite ve yüksek aktivite özelliği kazandırmaktadır. Sentetik polimerlerin tasarlanmasında da benzer yaklaşım

uygulanmaktadır ve (+) yük / hidrofobik gruplara sahip polimer yapıları proje kapsamında doğal peptit türevlerini taklit etmek için fosfonyum (+) gruplarını ve çeşitli hidrofobik grupları içeren belli molekül ağırlığında (3.000 g/mol ve 10.000 g/mol) polimerler sentezlenmiştir. Polimerlerin hem sıvı hem de katı fazda antimikrobiyal etkinlikleri incelenmiş ve sitotoksite çalışmaları da yapılmıştır. Yapı-aktivite ilişkisini incelemek için zeta potansiyel çalışması ve floresan mikroskopu ile polimerlerin antibakteriyel etkinliğini görüntüleme yapılmıştır.

1.3 Hipotez

Kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç kazanması ve enfeksiyonların giderek geniş bir spektruma yayılmasını durdurmak için yeni nesil sentetik antibiyotikler geliştirilmektedir. Daha ucuza elde edilmesi ve düşük miktarda maksimum tesir etmesi ilk amaçlar arasındadır. Özellikle hastane enfeksiyonları, yatan hastanın yatış süresini uzattığı için ektradan maliyete neden olmaktadır. Antibakteriyel polimerler, duvar boyalarında kullanılarak hasta odası içindeki bakterileri öldürerek enfeksiyonun oluşmasını engellerler. Özellikle implant malzeme uygulamalarında polimerlerin toksik özelliğinde olmaması ya da çok düşük olması gerekmektedir. Bu unsurlar ışığında proje kapsamında, hidrofobik / hidrofilik oranı ile yapı-aktivite ilişkisi incelenerek toksisiteye ve antibakteriyel etkinliğe etki eden faktörler yapısal değerlendirilecektir.

BÖLÜM 2

BAKTERİLER

Bakteriler, prokaryot hücre yapısına sahip, gözle görülemeyen, ancak mikroskopla saptanabilen yararlı ve zararlı işlevleri olan tek hücreli canlılardır. Zararları bir insanı ya da hayvanı öldürebilecek boyutlara varabilen bu canlıların günümüzde değerlendirilmekte olan birtakım yararlı işlevleri de vardır [21].

2.1 Bakterilerin Tarihçesi

Bakteriler, ilk defa Antony Van Leeuwenhoek tarafından basit ışık mikroskopunda su damlacığı içinde gözlenmiştir. Işık mikroskopuyla gözlemlenebilen bakterilerin büyüklükleri mikrometre (μm) ile ölçülür ve bu bakteriler 2-10 μm boyunda 1-2 μm genişliğinde olabilir [22]. Antony Van Leeuwenhock onlara “animalcules” (hayvancık) adını takmış, gözlemlerini Kraliyet Derneği’ne (Royal Society’ye) yazılmış bir dizi mektupla yayımlamıştır. Bacterium adı çok daha sonra, 1838’de Christian Gottfried Ehrenberg tarafından kullanıma sokulmuştur. Latince kullanımıyla Bacteria, bakteri sözcüğünün çoğulu, bacterium ise tekilidir. 19. yüzyılda bakterilerin, çoğu hastalığın nedeni olduğu bilinmesine rağmen, antibakteriyel bir tedavi bulunmuyordu. 1910 yılında Paul Ehrlich Treponema pallidum’u (frengiye neden olan spiroket) seçici olarak boyamaya yarayan boyaları değiştirecek bu patojeni seçici olarak öldüren bileşikler elde etti. Böylece de ilk antibiyotiği geliştirmiş oldu. Ehrlich, bağışıklık üzerine yaptığı çalışmasından dolayı 1908 Nobel ödülünü kazanmıştır. Arkelerin bakterilerden farklı bir evrimsel soya ait olduklarının 1977’de Carl Woese tarafından anlaşılması ile birlikte bakterilerin araştırılması süreci hızlı ivme kazanmıştır [23].

Bugüne kadar mikrobiyolojinin gelişmesine katkıları olan bazı önemli bilim adamlarından kısaca bahsederek;

Hippocrates (Yunanistan, MÖ 460 - MÖ 377) : İlaç tarihinde en önemli figürlerden biri olarak kabul edilir. Hastalıkların, tanrıların lanetinden değil; yaşama, yeme tarzı ve çevre şartlarına bağlı olduğunu söylemiştir.

Marcus Terentius Varro (Roma, MÖ 116 - MÖ 27) : Çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük bazı hayvancıkların, hastalık sebebi olabileceği fikrini ortaya atmıştır.

Jacobo Forli and Alexandro Benedetti (İtalya, 14-15. yüzyıl) : Havada süzülen bazı partiküllerin, nefes yoluyla içeri girdiği takdirde hastalık yapabileceklerini ortaya atmışlardır.

Antonie van Leeuwenhoek (Hollanda, 1632-1723) : Mikrobiyolojinin babası olarak bilinir. Bakteriler ilk defa 1676'da Antonie van Leeuwenhoek tarafından, kendi tasarımı olan tek mercekli bir mikroskopla gözlemlenmiştir. Onlara "animalcules" (hayvancık) adını takmıştır.

Christian Gottfried Ehrenberg (Almanya, 1795-1876) : Bizleri 1838'de "Bacterium" adıyla tanıştıran önemli bilim insanlarından.

Louis Pasteur (Fransa, 1822-1895) : Çok önemli buluşları bulunan bilim adamıdır. 1885'te kuduz için ilk aşığı geliştirmiştir. 1859'da fermantasyon olayının, mikroorganizmaların üremesiyle gerçekleştiğini söylemiştir. O ve Robert Koch, hastalıkların nedeninin mikroplar olduğu fikrini öne sürmüşlerdir.

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

Carl Woese (Amerika, 1928-2012) : Evrimleşmede arkaebakterilerin, normal bakterilerden farklı yol izlemesi konusu üzerine yaptığı çalışmalarıyla tanınır [24].

Joseph Lister (İngiltere, 1827-1912) : Antiseptik tekniğini (istenmeyen mikroorganizmalardan korunma) cerrahiye girmesini sağlamıştır. Bu bilim adamı o zaman kadar doktorların ameliyat sonrası iltihaplanmalardan dolayı çektikleri sıkıntıları antiseptik maddeye batırılmış sargılar kullanarak hafifletmiştir.

Hans Christian Joachim Gram (Danimarka, 1853-1938) : Kendi ismi ile anılan boyama metodu ile bakterileri boyamış ve bunları “Gram Pozitif ve Gram Negatif” diye ikiye ayırmıştır. Bu yöntem halen bakterilerin tanımlanmasında kullanılmaktadır.

Paul Ehrlich (Almanya, 1854-1915) : İmmunolojide önemli bir isimdir. Kemoterapi terimini bulmuştur. Frengiyi tedavi etmek için ilk antibiyotik olan Salvarsan'ı geliştirmiştir. 1908’de immünoloji araştırmalarından dolayı Nobel Ödülü kazanmıştır. Bakteri tespit etmede boyaları kullanmıştır.

Dmitri İosifovich Ivanovsky (Rusya, 1864-1920) : Bakterilerin geçemediği filtrelerden geçen ve tütün mozaik hastalığına sebep olan küçük canlıları bulmuştur. Böylece virüsleri bakterilerden ayırmıştır.

Félix d'Herelle (Fransa, 1873- 1949) : 1915-1917 yıllarında bakterileri enfekte eden ve özel filtrelerden geçebilen virüsleri yani, bakteriyofajları bulmuştur [25].

Bakteriler dünyasını incelerken onlara iki değişik açıdan bakmak yararlı olur; hastalık yapan bakteriler ve yararlı bakteriler. Hastalık yapan bakterilerin oluşturduğu zararlı olaylara verem, tifo, kolera, frengi, belsoğukluğu, tetanos, boğmaca, malta humması, şarbon, veba, botulizm, difteri hastalıkları ve çeşitli organlardaki iltihaplar örnek gösterilebilir. Bir başka zararları da yiyeceklerin bozulmasına neden olmalarıdır. Bakterilerin yararlı işlevlerinden mayalanma (fermantasyon) ile günlük yaşamda gereksinime duyulan birçok ürün (yoğurt, peynir, sirke) elde edilebilir. Bakteriler kemosentezle doğada işe yaramaz hale gelen birçok maddenin yeniden biyolojik yaşama girecek biçimde yararlı duruma gelmesini sağlarlar. Örneğin, amonyak halinde insan ve hayvan vücudundan atılan azot, bazı bakteriler tarafından önce nitrit ve sonra nitrate çevrilerek yine bitkilerin yararlanabileceği biçime dönüştürülür. Aynı işlem kükürt için de geçerlidir. Ayrıca bakteriler insan, hayvan ve bitki cesetlerinin dokularının kokuşmayla parçalanmasını sağlayarak onlardaki organik maddelerin toprağa karışmasını sağlarlar. Nadasa bırakılan ya da baklagil ekilen topraklarda, havanın azotunu toprağa bağlayarak, toprağın azot açısından zenginleşmesini sağlayanlar yine bakterilerdir. Bu gibi olayların doğadaki ham besin maddesi dengesini sağlamakta büyük katkıları vardır. İnsan bağırsağında ortak yaşayan bakteriler, insanların gereksinmesi olan vitaminleri sentezleyerek kana karıştırırlar. Ayrıca geviş

getiren hayvanların sindirim sisteminde yer alanları da otlardaki selülozun parçalanmasını kolaylaştırırlar [21].

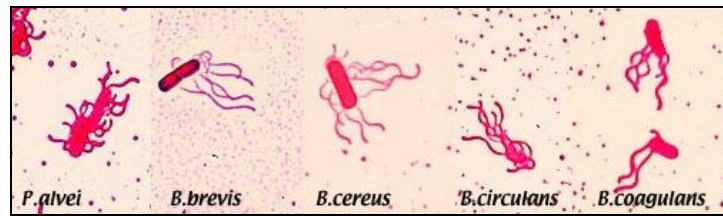
2.2 Bakterilerin Sınıflandırılması

2.2.1 Fiziksel Şekillerine Göre Sınıflandırılması

Çok ilkel bir mikroskop kullanarak, çalışmış olan Anthony Van Leeuwenhoek'dan beri bakteriler, görünüm bakımından yuvarlak şekilliler, çomakçıklar ve sarmal şeklindekiler olmak üzere üç esas grupta incelenmiştir. Işık mikroskoplarının gelişmesi, karanlık alan, ultraviyole, faz mikroskopisi ve elektron mikroskoplarının ortaya çıkması bile görünüm bakımından yapılmış olan bu gruplama önemini kaybetmemiştir. Bakteriler fiziksel şekillerine göre üç bölüme ayrılırlar [26].

2.2.1.1 Çomaksı Bakteriler (Bacillus)

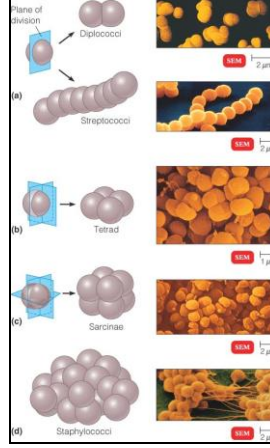
Sert veya esnek çeperli, düzenli veya düzensiz çomakçık veya silindir şeklinde olan bakterilere basil denir. Kokobasil, fuziform, difteroid ve streptobasil olmak üzere 4 çeşidi vardır. Kokobasil düzenli ve silindir şeklinde ya da hafif eğri görünüşte boyu enine yakın ve sanki koklara benzer biçimde, fuziform çomağın iki kenarı dışbükey ve uçları sivriye yakın şekilde, difteroid bir veya iki uçları bazen de uç ve ortaları şişmiş görünümündedir. Streptobasil ise birbirleriyle uç uca degecek şekilde çomakçıklardan ibaret zincir yapan basillerdir[26]. Bacillus cinsi bakterilerin genel özellikleri; Gram pozitif, sporlu ve aerob olmalarıdır. Tifo, tüberküloz etkeni ve yoğurt bakterileri bu tür bakteriler için örnektir [27]. Şekil 2.1'de bazı çomaksı bakteri örnekleri görülmektedir.



Şekil 2.1 Çomaksı bakteri çeşitleri [28]

2.2.1.2 Yuvarlak Olanlar (Coccus)

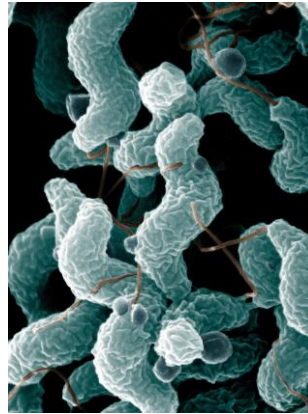
Küre şeklindeki bakterilerdir. Diplokoklar, stafilokoklar, streptokoklar ve sarcina olmak üzere dört çeşidi vardır. Diplokoklar çiftler halinde bulunur. Stafilokoklar üzüm salkımı şeklinde kümelenmiş halde bulunur. Streptokoklar zincir şeklindedir. Sarcina ise dörderli kümelenerek kübik kutu şekli oluştururlar. Zatürre ve bel soğukluğu bakterileri bunlara örnektir [26]. Şekil 2.2’de yuvarlak bakterilerin SEM görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 2.2 Yuvarlak bakteri SEM görüntüsü [29]

2.2.1.3 Spiral Olanlar (Spirillum)

Spiroket ve spiril olmak üzere iki çeşidi vardır. Spiroket esnek yapılı, uzun, eksenleri etrafında dalgalı ve spiral bükülmüş, spiril ise sert yapılı eğilip bükülemeyen spiral biçimlidir. Kıvrık vücutlu olanların bir alt grubu da Vibrio’lardır. Bunlar virgüle benzeyen adeta çomakçık şeklindedirler [26]. Şekil 2.3’te spiral bakteri çeşidi olan Campylobacter Jejuni görüntüsü gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Spiral bakteriye örnek Campylobacter Jejuni görüntüsü [30]

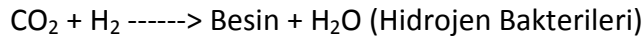
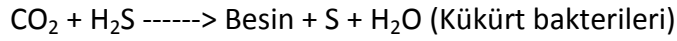
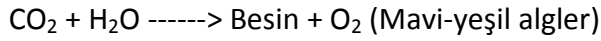
2.2.2 Beslenme Şekillerine Göre Bakteriler

Bazı bakteriler ototrof olup; yaşamaları için gerekli olan organik molekülleri, inorganik moleküllerden sentezleyebilen bakterilerdir. Çoğunluğu ise heterotrof olup; yaşamaları için gerekli olan organik molekülleri dışarıdan alan bakterilerdir [31].

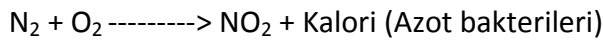
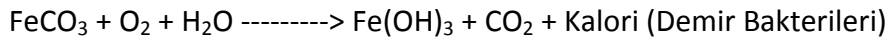
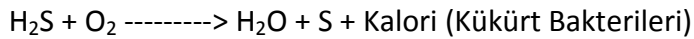
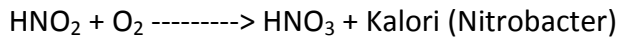
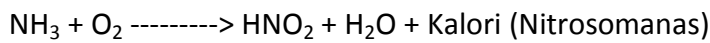
2.2.2.1 Ototrof Bakteriler

Ototrof bakteriler fotosentetik ve kemosentetik olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

Fotosentetik bakteriler; sitoplazmalarında serbest klorofil taşırlar. Fotosentezlerinde elektron kaynağı olarak H_2O yerine H_2S ve H_2 kullanırlar [32].



Kemosentetik bakteriler ise madde devrinde çok önemlidirler. Bazı inorganik maddeleri oksitleyerek onları zararsız hale getirirler. Oluşan maddeler ise bitkilerce mineral tuzlar olarak kullanılır. Bu oksitleme sonucunda açığa kimyasal enerji çıkar. Bu enerjiyle de CO_2 indirgemesi yaparak besinlerini sentezlerler. Işık ve klorofil gerekli değildir. Oksijen kullanılır. Kemosentetik bakteriler en çok azotlu, kükürtlü, demirli maddeleri oksitlerler.



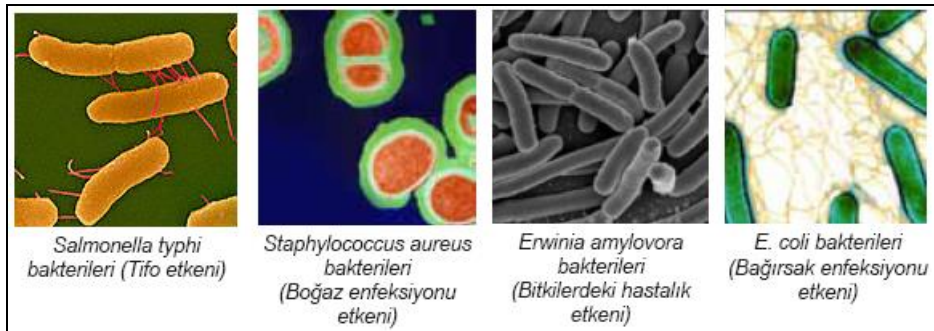
2.2.2.2 Heterotrof Bakteriler

Heterotrof bakteriler ise saprofit ve parazit olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

Saprofit bakteriler; bakterilerin çoğunluğunu oluşturur. Besinlerini bulundukları ortamlardan hazır sıvılar olarak alırlar. Nemli, ıslak ve çürükler üzerinde yaşarlar. En çok

aminoasit, glikoz ve vitamin gibi besinleri ortamdan alırlar. Bu tür bakteriler dış ortama salgıladıkları enzimlerle bitki ve hayvan ölümlerini daha basit organik maddelere parçalayarak onların çürümesini sağlarlar. Böylece hem toprağın humusunu artırır, hem de kendilerine besin sağlarlar. Çürütme sonucu çeşitli kokular meydana gelir. Bu yüzden bu olaya kokuşma denir. Bazı saprofit bakteriler, sütün yoğurt ve peynir olarak mayalanmasını sağlarlar. Saprofitler, dünyada madde devrinin tamamlanmasında önemli rol oynadıklarından hayat için mutlaka gereklidir [32].

Parazit bakteriler ise; besinlerini cansız ortamdan değil de üzerinde yaşadıkları canlılardan temin ederler. Çünkü sindirim enzimleri yoktur. Bunların bazıları konak canlıya fazla zarar vermeden yaşayabilirler. Sadece onun besinlerine ortak olurlar. Kalın bağırsağımızdaki *Escherichia coli* bunun en iyi örneğidir. Bazı parazit bakteriler ise konak canlının ölümüne bile sebep olabilen hastalıklara yol açarlar. Bunlara patojen bakteriler denir. Patojenler ya toksin çıkararak ya da konak canlının enzim ve besinlerini kullanarak zarar verirler. Toksinler ya dışarı atılır (ekzotoksin), ya da bakterinin içinde kalır (endotoksin). İçinde kalan toksinler, bakteriler ölünce zararlı hale geçerler. Canlıların patojen bakterilere ve toksinlerine karşı oluşturdukları savunmaya bağışıklık denir. Parazit bakterilerinin üremeleri oldukça hızlıdır [32]. Şekil 2.4'te çeşitli hastalıklara neden olan patojen bakterilerin elektron mikroskopta kaydedilmiş görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Çeşitli hastalıklara neden olan patojen bakterilerin elektron mikroskop görüntüleri [33]

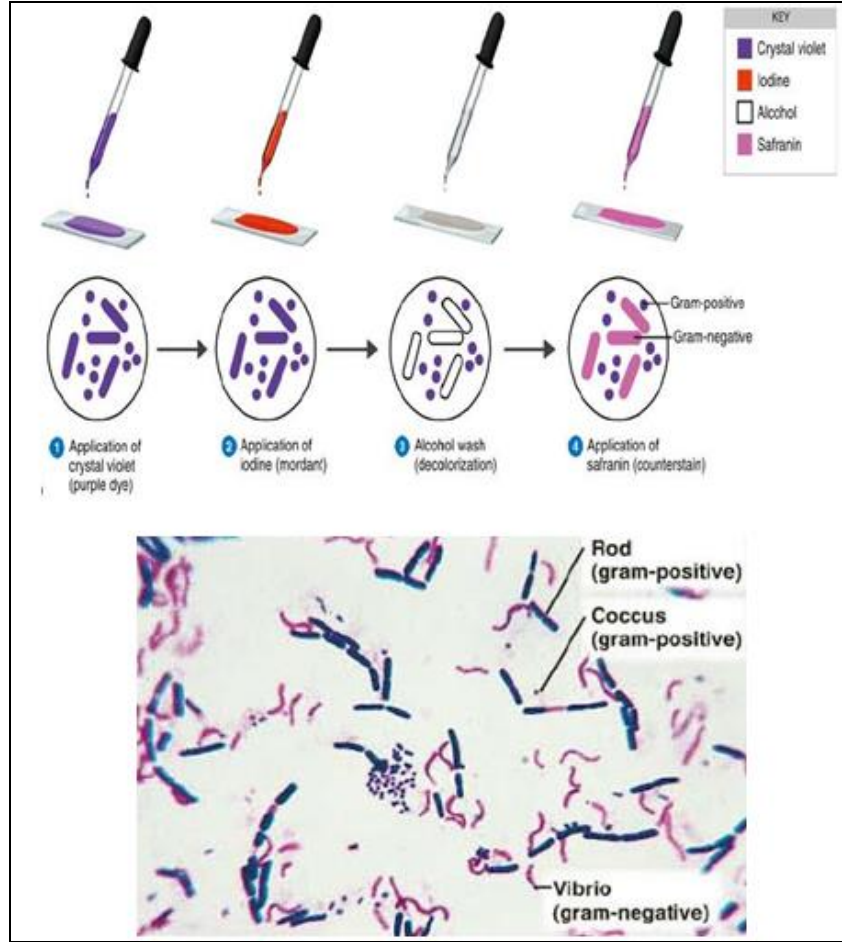
2.2.3 Gram Boyadan Etkilenmelerine Göre Bakteriler

Gram boyama; bakterileri, hücre duvarlarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre iki büyük gruba ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, bir bakteri örneğinin

kimliğinin belirlenmesinde ilk aşama olan Gram-pozitif/Gram-negatif ayrımının yapılmasında kullanılır. Bu metodu bulan kişi, Danimarkalı bilim adamı Hans Christian Gram'dır [32].

Gram-pozitif bakterilerin kristal viyole/iyot kompleksini tutma özelliğine sahip peptidoglikan yapıda hücre duvarları vardır. Hücre duvarlarının ağı ve kat kat peptidoglikandan oluşan yapısı boya parçacıklarını tutar [32].

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı ise sadece ince bir peptidoglikan katmanından oluşur ve boyaları tutamaz. Ardından alkolle yıkama, Gram-pozitif hücre duvarının su kaybedip büzüşmesine neden olur, bu yüzden boya tanecikleri moleküllerin arasına sıkışır. Gram-negatif bakterilerdeki ince olan peptidoglikan katman boya parçalarını tutamaz; alkol dış zardaki lipidleri çözünce boya dağılır, hücrenin rengi açılır. Renk açılmasının ardından birinciden farklı ikinci bir boya olan safranin ya da fuksin uygulanır, bu boya rengi açılmış hücreleri boyayarak onların görünmelerini sağlar. Gram pozitifler birinci boyayla mora boyandıkları için ikinci boya onların rengini etkilemez, ama Gram negatif olanlar pembe-kırmızı olurlar. Genellikle, Gram-negatif bakteriler hastalık yapıcı kuvvetleri açısından daha tehlikelidirler. Gram-negatiflerin dış zarlarının üstünde, antikorların bağlanmasını engelleyen sümüksü bir tabakaları vardır. Gram-pozitiflerin ise hücre duvarlarını koruyan dış zarları yoktur ve vücudun ürettiği lizozim enzimi çıplak peptidoglikan katmanlarına zarar vererek bakteriyi imha eder. Gram-pozitifler bu özellikleri yüzünden penisilin gibi beta-laktam antibiyotiklere daha duyarlıdır [34]. Gram boyama yönteminin mekanizması ve çubuk, virgül, yuvarlak şekillerdeki Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5 Gram boyama yönteminin mekanizması ve çubuk, virgül, yuvarlak şekillerdeki Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler [35]

2.2.4 Oksijene Duydukları İhtiyaca Göre Bakteriler

2.2.4.1 Aerob Bakteriler

Yaşamları için oksijenin zorunlu olan bakterilere denir. Bu tür bakteriler, hücresel faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için mutlaka oksijene ihtiyaç duyarlar [36].

2.2.4.2 Anaerob Bakteriler

Yaşamları için oksijene kesinlikle ihtiyaç duymayan bakterilere denir. Bu tür bakteriler hücresel faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için oksijene ihtiyaç duymazlar, hatta oksijen bu bakterilere toksik etki özelliği gösterir [36].

2.2.4.3 Fakültatif Bakteriler

Yaşamlarını hem oksijensiz ortamda hem de oksijenin bulunduğu ortamlarda sürdürebilen bakterilere denir. Bu tür bakteriler, hücresel faaliyetlerini, ortamda oksijen bulursa da bulunmasa da devam ettirirler. Oksijenin bulunmadığı ortamlara göre oksijen bulunduğu ortamlarda hücresel faaliyetleri daha iyi olan bakterilere aerop fakültatif bakteriler ve oksijenin bulunmadığı ortamlarda oksijenin bulunduğu ortamlara göre hücresel faaliyetleri daha iyi olan bakterilere anaerop fakültatif bakteriler adı verilmektedir [36].

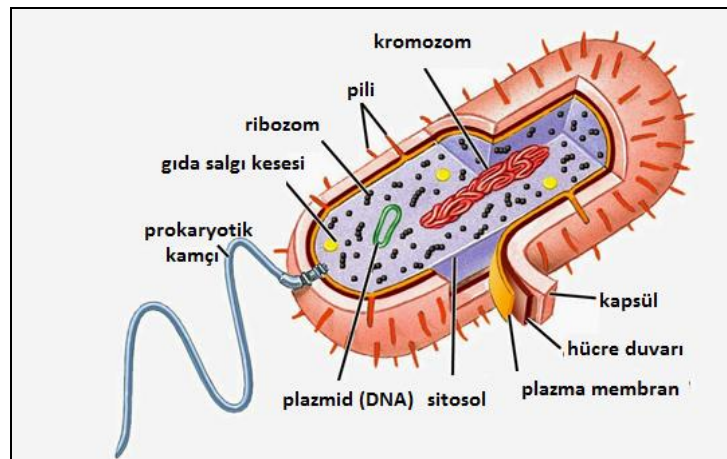
2.2.4.4 Mikroaerofil Bakteriler

Çok az oksijen bulunması halinde yaşamlarını sürdüren bakterilere mikroaerofil bakteriler adı verilir [36].

2.3 Bakterilerin Hücresel Yapıları ve Özellikleri

Bakterilerin hücre yapılarının incelenmesini kolaylaştırmak için iki temel kısma ayırmada yarar vardır. Bunlar;

- Dış yapı (hücre duvarı, kapsül, flagella, fimbria),
- İç yapı (sitoplasmik membran, mesosom, nukleus, ribozom, sitoplasmik granüller, sporlar vb.) [36]. Şekil 2.6'da tipik bir bakteri hücresi görülmektedir.



Şekil 2.6 Tipik bir bakteri hücresi [37]

2.3.1 Hücre Duvarı

Bakterilerin etrafını tam ve kesintisiz olarak saran hücre duvarı, sitoplazmik zarın dışında lokalize olmuştur. Sert, aynı zamanda elastik bir yapı karakterine sahip olan hücre duvarı, bu özelliği sayesinde bakterilere orijinal şekillerini verir ve esneklik kazandırır. Hücre duvarına sertliği mürein tabakası (peptidoglikan) verir.

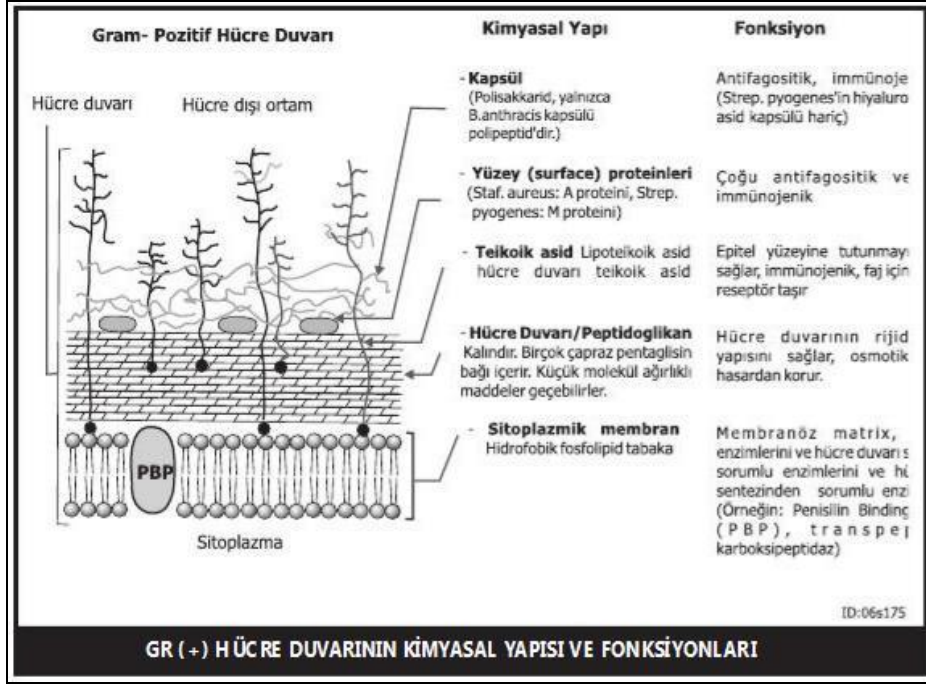
Bakterilerin yaşamı için önemi olan geçirgenliğin veya ozmozun sağlanmasında ve devam ettirilmesinde hücre duvarının özel bir fonksiyonu vardır. Bakteriler bu özellikleri nedeniyle dış ortamlardaki su, organik ve inorganik maddeleri içeri alabilir ve aynı zamanda hücre içinde oluşan çeşitli metabolitleri (toksik maddeler, enzimler, metabolizma artıklarını vs.) dışarı verebilirler. Bu durum hücre duvarının selektif bir süzgeç (elek) gibi görev yapmasından kaynaklanmaktadır (selektif permeabilite). Hücre duvarının yapısı ve fonksiyonları Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde farklıdır [38]. Çizelge 2.1’de Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin arasındaki farklar gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin arasındaki farklar [39]

	GRAM POZİTİF	GRAM NEGATİF
Peptidoglikan Katmanı	kalın (çok katmanlı)	ince (tek katmanlı)
Hücre Duvarı Kalınlığı	20-80 nm	10 nm
Duvardaki Katman Sayısı	1	2
Peptidoglikan İçeriği	>50%	10-20%
Hücre Duvarındaki Teikoik Asit Varlığı	var	yok
Lipit ve Lipoprotein İçeriği	düşük (aside dayanıklı bakteriler peptidoglikan bağlantılı lipitleri olması)	yüksek (dış zar varlığı)
Protein İçeriği Oranı	0%	9%
Lipopolisakkarit (LPS) İçeriği	neredeyse hiç	yüksek
Periplazmik Boşluk	yok	var
Dış Zar	yok	var
Kamçılı Yapı	temel vücutta 2 halka	temel vücutta 4 halka
Toksin Üretimi	ekzotoksin	ekzotoksin ve endotoksin
Fiziksel Bozulma Direnci	yüksek	düşük
Lizozim ile Hücre Duvarı Parçalanması	yüksek	düşük (dış membranı bozma ön işlemi gerektirir)
Sülfoamid ve Penisiline Duyarlılık	yüksek	düşük
Streptomisini Kloroamfenikol ve Tetrasiklin Duyarlılığı	düşük	yüksek
Temel Boya (Basic Dyes) İnhibisyonu	yüksek	düşük
Anyonik Deterjanlara Duyarlılık	yüksek	düşük
Sodyum Azid Direnci	yüksek	düşük
Kurumaya Direnci	yüksek	düşük

2.3.1.1 Gram Pozitif Hücre Duvarı

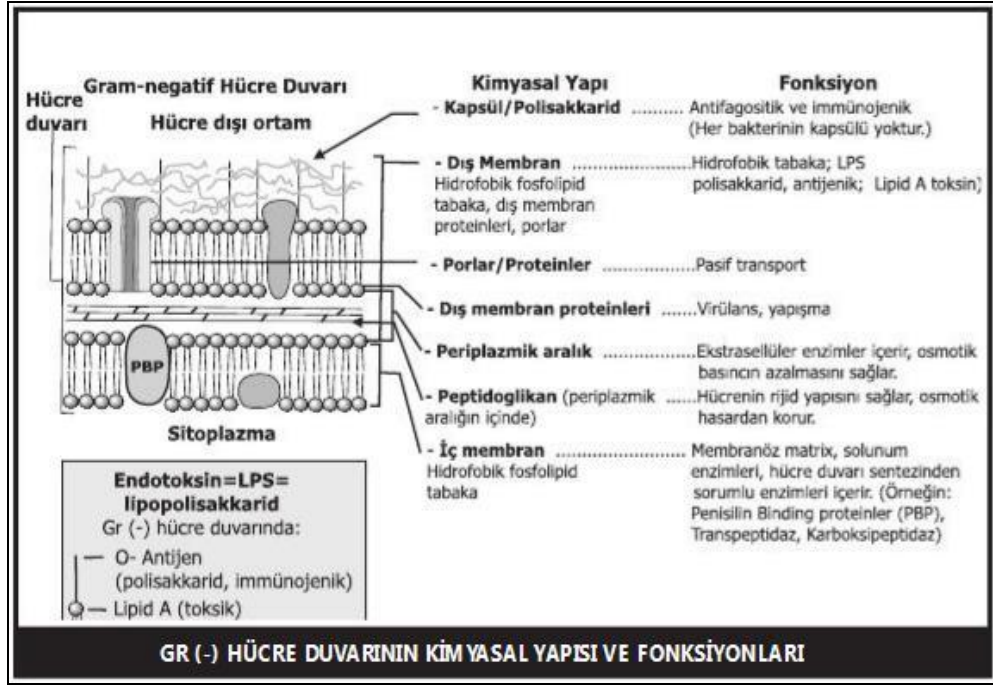
Gram pozitif bakterilerde kalın ve çok katmanlı peptidoglikan tabakası bulunur (%80-85). Bu tabaka, teikoik asit, lipoteikoik asit ve kompleks yapıdaki polisakkaritleri de içerir. Protein yapıda olan teikoik asit ve lipoteikoik asit antijeniktir ve önemli virulans faktörlerinden biridir [40]. Şekil 2.7’de Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.7 Gram pozitif hücre duvarı kimyasal yapı ve fonksiyonu [41]

2.3.1.2 Gram Negatif Hücre Duvarı

Gram pozitif bakteri duvarına göre daha kompleks bir yapıdadır. Peptidoglikan tabaka (%5-10) ve dış zar olmak üzere başlıca iki tabakadan oluşur. Teikoik asit ve lipoteikoik asit içermez. Gram pozitif bakterilerden farklı olarak periplazmik aralık bulunur [40]. Şekil 2.8’de Gram negatif bakterilerinin sahip olduğu hücre duvarının şematik gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.8 Gram negatif hücre duvarı kimyasal yapı ve fonksiyonu [41]

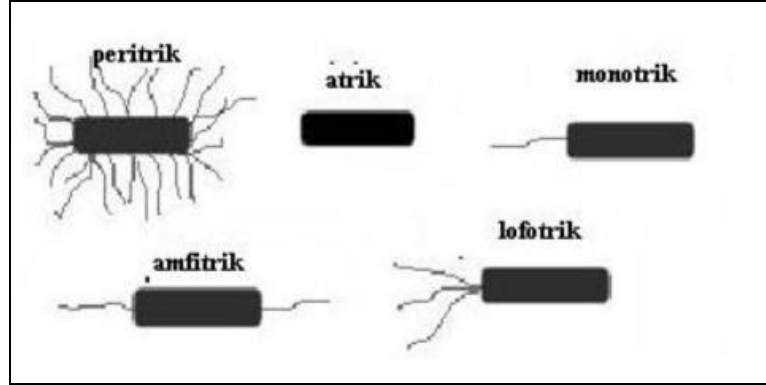
2.3.2 Kapsül

Bazı yuvarlak ve çomak biçimli mikroorganizmaların hücre duvarından ayrı olarak ekstraselüler (hücre dışı) yapıda bir tabaka bulunur ki buna kapsül adı verilir. Kapsül, genellikle polisakkarid yapıdadır. Nadiren protein veya hem polisakkarid hem protein yapısında olanlara da rastlanılmaktadır. Kapsül; mikroorganizmaları, çevrenin fiziksel, kimyasal ve mekanik etkilerinden koruyarak dayanıklılığını artırır [38].

2.3.3 Kirpik (Flagella = Kamçı)

Kirpikler protein yapısında, ince, uzun, dalgalı, esnekliği fazla, sitoplazmadan köken alan, sarmal yapıdaki uzantılar olup mikroorganizmalar için hareket organelidir. Kirpik, her mikroorganizma türünde bulunmaz. Bakterilere sıvı ortamda yer değiştirme (aktif hareket) olanağı sağlar. Kirpikli mikroorganizmaların mikroskop altında hareketleri gözlensin veya gözlenmesin, hareketli kabul edilir. Mikroorganizmalar arasında kirpiklerin konumu oldukça değişik olup sadece türler arasında sabit bir karakter gösterebilir. Bakteriler kirpik olup olmasına ve kirpiklerin konumuna göre atrik (kirpiksiz), monotrik (tek kirpikli) ve politrik (çok kirpikli) olmak üzere başlıca 3 gruba ayrılır. Çok kirpiklilik durumu da kendi içinde amfitrik (kirpiklerin karşılıklı olması),

lofotrik (kirpiklerin demet hâlinde bir veya iki uçta bulunması) ve peritrik (kirpiklerin her tarafta bulunması) olarak isimlendirilmektedir [42]. Şekil 2.9'da bakterilerdeki kirpik yapıları gösterilmektedir.



Şekil 2.9 Bakterilerdeki kirpik yapıları [42]

2.3.4 Fimbria (Piluslar)

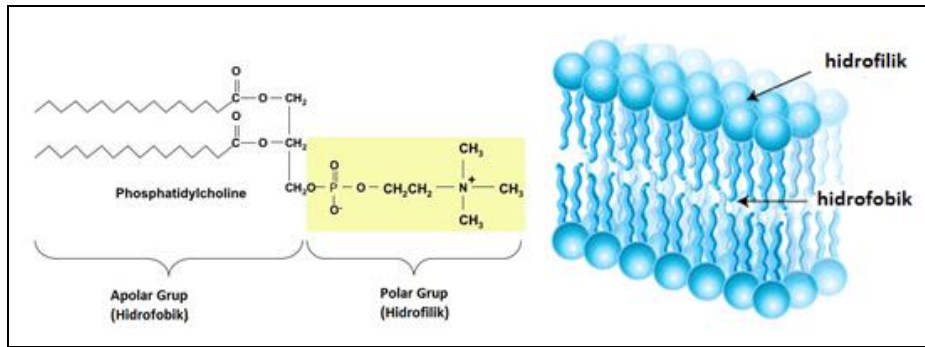
Bakterinin her yönünden çıkan ve kirpikten daha kısa ve ince olan, düz, bazılarının ortası boş ve çok sayıda oluşumlara rastlanılmaktadır ki bunlara fimbria (pilus) adı verilmektedir. Bakterilerde basit ve seks pilusu olmak üzere iki çeşittir. Basit piluslar bakterinin hücre yüzeylerine yapışmasını, tutunmasını sağlar. Seks pilusları ise bakteriler arası genetik madde aktarımından sorumludur [42].

2.3.5 Sitoplazmik Zar (Hücre Membranı)

Hücre duvarı olan peptidoglikan katmanının hemen iç yüzünde sitoplazmik zar yer alır ve fosfolipit çift katmanından oluşur. Zarın dış tabakası polar fosfat gruplarından, iç tabakası ise polar olmayan lipid zincirlerinden oluşmuştur. Sitoplazmik zarın başlıca fonksiyonları; seçici geçirgenlik ve madde alışverişi, elektron transferi ve oksidatif fosforilasyon, çeşitli enzimlerin ve proteinlerin hücre dışına salgılanması ve hücre duvarı sentezidir. Hücre membranının ana bileşenleri fosfolipitler, kolesterol ve glikolipitlerdir [42].

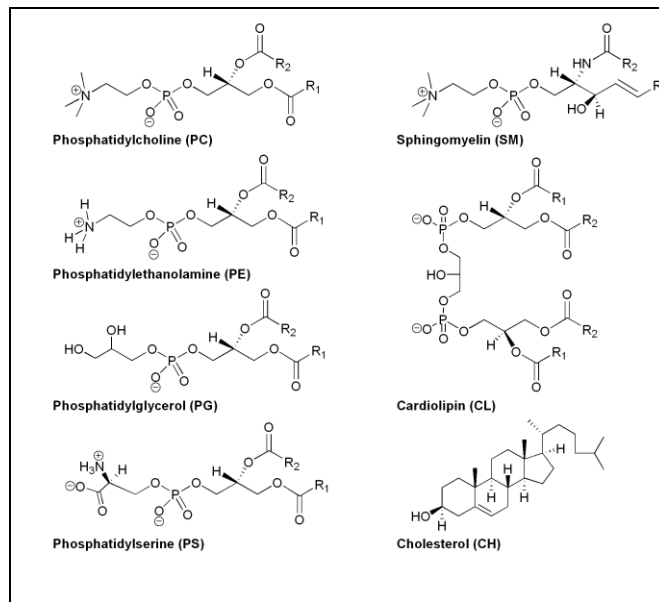
2.3.5.1 Fosfolipitler

Hücre membranının en önemli bileşeni olan fosfolipitler; bir veya iki yağ asidi grubu, negatif yüklü bir fosfat grubu, bir alkol grubu ve de bunları birbirine bağlayan bir omurgadan oluşur. Fosfat grubunu içeren polar başları hidrofilik (suyu seven), apolar kuyrukları ise hidrofobik (suyu sevmeyen) özelliklidir. Bu yüzden sulu ortamda fosfolipitler, hidrofobik kuyruklarını yan yana ve uç uca yerleştirerek, sadece hidrofilik başların suyla temas ettiği bir çift tabaka oluştururlar. Oluşan bu çift tabaka esnek, bir sıvı kristal gibi akışkan ve kısmen geçirgendir [42]. Şekil 2.10'da fosfolipitlerin şematik olarak gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.10 Fosfolipitlerin şematik gösterimi [43]

Fosfolipidler; nötral, asidik ve bazık olmak üzere üç ana kategoriye ayrılır. Baş kısım denilen fosfatın bulunduğu bölge fosfolipidin yükünü etkiler. Şekil 2.11'de hücrelerdeki lipidler ve baş gruplarından dolayı lipidlerin yükleri görülmektedir [42].



Şekil 2.11 Hücre membranında bulunan lipidlerin yapısal gösterimi [20]

Çizelge 2.2’de kırmızı kan hücrelerinin (RBC) ve bazı Gram pozitif, Gram negatif bakterilerinin hücre membranında bulunan lipidlerin türüne göre dağılımı gösterilmiştir. Burada da anlaşılaçağı gibi kan hücrelerinde (RBC) fosfatidil gliserol (PG) olmaması hücre çeperini nötral yapar. Bununla birlikte bakterilerde PG bulunması (-) yüklü çeper olmasına sebep olur ve böylece katyonik maddelerle etkileşime girebilir.

Çizelge 2.2 Farklı hücrelerde bulunan lipidlerin dağılımı * [44]

Hücre Türü	PC	PE	PG	PS	SM	CL	CH
<i>E. coli</i> (Gram-negatif)	-	%80	%20	-	-	%5	-
<i>S. typhimurium</i> (Gram-negatif)	-	%60	%33	-	-	%7	-
<i>P. cepacia</i> (Gram-negatif)	-	%82	%18	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> (Gram-pozitif)	-	%12	%70	-	-	%4	-
<i>S. aureus</i> (Gram-pozitif)	-	-	%57	-	-	%43	-
Kırmızı kan hücreleri-RBC (dış kısım)	%33	%9	-	-	%18	-	%25
Kırmızı kan hücreleri-RBC (iç kısım)	%10	%25	-	%10	%5	-	-

* PC: Fosfatidilkolin; PE: Fosfatidiletanolamin; PG: Fosfatidilgliserol; PS: Fosfatidilserin; SM: Sfingomiyelin; CL: Kardiyolipin; CH: Kolesterol

2.3.6 Sitoplazma

Sitoplazma fiziksel olarak berrak, hafif yapışkan bir sıvıdır. Hücrede meydana gelen kimyasal reaksiyonların oluştuğı, hücrenin yapı maddelerinin sentezlendiğı yerdir. Sitoplazma içinde çeşitli iyonlar, aminoasit, protein, pürin, glikoz, riboz, vitamin, koenzim, disakkaritler vs. bulunur. Ayrıca mezozom, ribozom çekirdek, sitoplazmik granüller (volutin, lipid, polisakkarid, pigment, endosporlar vs.) vardır [42].

2.3.7 Çekirdek (Nucleus, Kromozom, DNA)

Bakterinin orta kısmında, yumak hâlinde bir tek kromozomdan meydana gelmiş bir çekirdek bulunur. Bu kromozomun yapısı, DNA molekülünden oluşur. Kromozomun etrafında bir çekirdek zarı yoktur. Kromozom yumağı bir ucu ile hücre zarında bulunan mezozoma bağlıdır. Çekirdek kalıtsal (genetik) özellikleri taşır [42].

2.3.8 Mezozom

Sitoplazma zarı kıvrılıp içeri doğru girinti yaparak mezozom denen özel yapıları oluşturur. Septal ve lateral olmak üzere iki çeşittir. Bakteri kromozomu hücre bölünmesi sırasında septal mezozoma bağlanır. Lateral mezozomların ise, kendilerine yapışmış olan plazmidlerin replikasyonda ve spor oluşturmada görevli olduğu sanılmaktadır [42].

2.3.9 Plazmidler

Bakteri kromozomundan bağımsız olarak çoğalabilen, çembersel, ekstrakromozomal DNA molekülüdür. Bakterinin DNA'sından farklı olarak hücre canlılığı için gerekli olmayan fakat antibiyotiklere karşı direnç ve toksin üretimi gibi çeşitli fonksiyonları kodlayan genleri taşırlar [42].

2.3.10 Ribozomlar

Bakteriyel ribozomlar, ökaryotlarda olduğu gibi protein yapım bölgesi ise de bunların büyüklük ve kimyasal bileşimi ökaryotik ribozomlardan farklıdır [42].

2.4 Bakterilerde Direnç

Antibiyotik direnci dünya çapında bir sorundur. Antibiyotik direncinin yeni biçimleri, uluslararası sınırları aşabilir ve de olağanüstü bir hızla kıtalar arası yayılabilir. Dünya Sağlık Liderleri, antibiyotik dirençli mikroorganizmaları, “kabus bakteri” adıyla “yıkıcı tehdit” olarak her ülkedeki insanlara bakteri direncinin ne demek olduğunu açıklamaktadır [45].

Birleşik Devletler’de, en az iki milyon insan, bir veya birden fazla enfeksiyon tedavileri için dizayn edilmiş antibiyotikleri kullanarak ciddi bir şekilde bakterilere direnç kazandırmaktadırlar. Her yıl en az yirmi üç bin insan sadece bu antibiyotik dirençli enfeksiyonlar nedeniyle ölmektedir. Buna ek olarak her yıl yaklaşık iki yüz elli bin insan *Clostridium difficile* (C. difficile) enfeksiyonu nedeniyle hastaneye yatmaktadır. Birleşik Devletler’de en az on bin insan C. Difficile enfeksiyonundan dolayı ölmektedir. Birleşik Devletler’de, antibiyotik dirençli enfeksiyonlar, sağlık sisteminde maliyet olarak aşırı

yüke sebep olmaktadır. Çoğu durumda bu enfeksiyonlar, uzun süreli ve/veya fazla maliyetli tedavileri, hastanede kalışı uzatma ve ek doktor viziteleri gerektirmektedir. Bu durumlardan dolayı antibiyotik ile kolayca tedavi edilebilir enfeksiyonlardan daha büyük bir sorun ve ölüm oranı ortaya çıktığı görülmektedir. Bu sorunun devlete maliyeti her yıl yaklaşık olarak yirmi milyar \$ - otuz beş milyar \$ arası değişmektedir (2008 yılı verileri) [45].

Antibiyotik kullanımı tüm dünyada antibiyotik direncine yol açan en önemli faktördür. Antibiyotikler, insan hekimliğinde kullanılan en sık reçete ilaçlar arasında yer almaktadır. Ancak, reçete edilen tüm antibiyotiklerin yaklaşık % 50'si gereksiz veya öngörülen optimum etkili değildir. Antibiyotikler ayrıca yaygın olarak gıda üreten hayvanların hastalanmalarını önlemede, tedavisinde ve büyümesini geliştirmede de kullanılmaktadır. Büyümeyi geliştirmek için antibiyotik kullanımı gerekli değildir ve de pratik aşamalı olmalıdır. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yapılan en son rehberde bu hedefe doğru bir yol tarif etmektedir. İnsanlarda kullanılan ile gıda hayvanlarında kullanılan dozaj miktarını doğrudan karşılaştırmak zordur. Fakat gıda üretiminde antibiyotiğin daha fazla kullanıldığına dair kanıtlar mevcuttur [45].

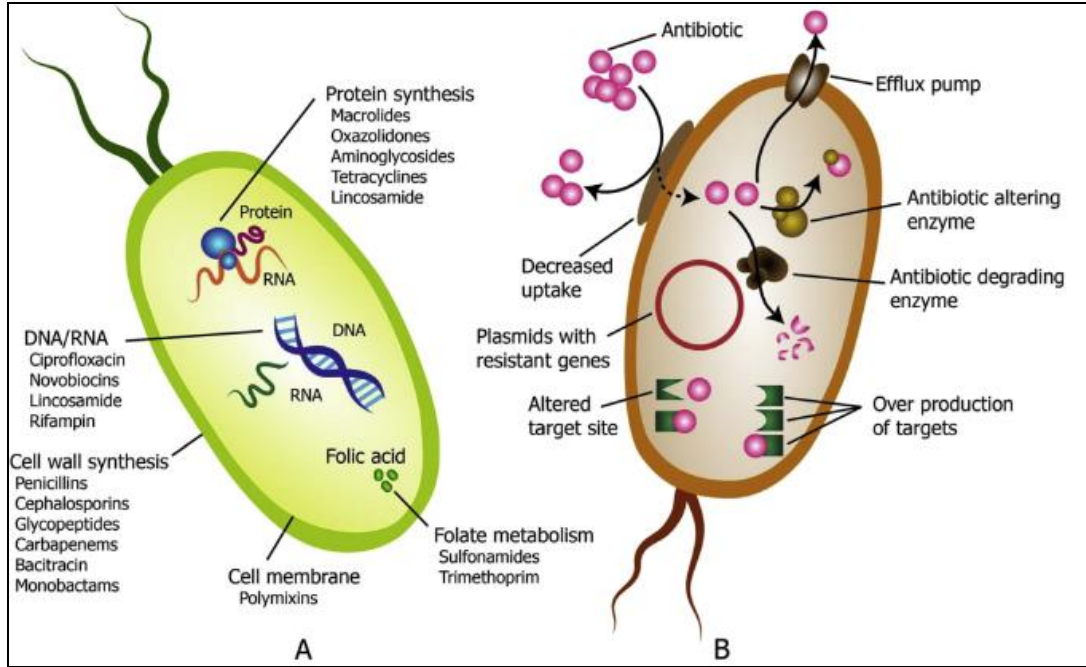
Antibiyotik direnci büyümesindeki bir diğer faktör bu bakterilerin insandan insana yayılması ya da insan kaynaklı olmayan çevresel faktörlerdir (tüketilen yiyeceğin bu bakteriyi içermesi).

Bu ölümcül enfeksiyonlarla mücadelede yardımcı olacak dört temel eylem mevcuttur:

- Enfeksiyonların ve direnç yayılımının önlenmesi
- Dirençli bakterileri takip etme
- Bugünün antibiyotik kullanımının geliştirilmesi
- Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini teşvik etmek ve dirençli bakteriler için yeni tanı testleri geliştirmesi [45].

Klinik olarak günümüzde kullanılan antibiyotiklerin çoğu, 1940'lardan 1960'lara kadar olan sürede, antibiyotik keşfinin altın döneminde bulunmuştur. Örneğin; hücre duvarı, 60S ribozomlar, hücre membranları, genetik materyal ve biyosentetik yollar gibi insan hücrelerinden önemli ölçüde farklı veya insan hücrelerinde bulunmayan patojenlerin moleküler hedefleri, antimikrobiyal ajanları tasarlamak için kullanılır (Şekil 2.12. (A)).

Direnç mekanizmaları, effluks pompaları, fosforilasyon, asetilasyon ve hidroliz gibi kimyasal modifikasyonları, en küçük antimikrobiyal moleküllerine karşı hedef değiştirme ve yeniden programlama biyosentezini içerirler (Şekil 2.12. (B)) [46].



Şekil 2.12 Bakteri hücrelerindeki tipik antibiyotik hedef alanları (A), Antibiyotik direnç mekanizması (B) [46]

Antibiyotik direnci, doğal direnç ve kazanılmış direnç olmak üzere iki çeşit olarak sınıflandırılabilir.

2.4.1 Doğal Direnç

Temelinde mikroorganizmaların metabolik olarak inaktif fazda bulunması veya ilacın etki mekanizmasına uygun hedef yapıların bulunmaması vardır. Bu duruma örnek olarak *M. tuberculosis*'in kalsifiye odaklarda metabolizması yavaşlamış olarak uzun süre canlı kalabilmesi ve bunun sonucunda antitüberküloz ilaçlara dirençli olması verilebilir. Bir diğer örnek hücre duvarı olmayan Mycoplasmaların beta-laktam antibiyotiklere olan direncidir [46].

2.4.2 Kazanılmış Direnç

Kazanılmış direnç mutasyona bağlı ve direnç geninin alınmasına bağlı olarak ikiye ayrılır.

2.4.2.1 Mutasyona Bağlı Kazanılmış Direnç

Bu şekilde rezistansa yol açan mutasyon olayı genellikle bakterinin kemoterapötik ilaç ile temasına bağlı değildir ve arada bir neden sonuç ilişkisi bulunmaz. Mutasyon bakteride genellikle spontan olarak oluşmaktadır. İlaçla temasta olan ve olmayan iki bakteri popülasyonunda mutasyon sıklığının genellikle aynı olduğunu gösteren gözlemler vardır. Kromozomal mutasyonla oluşan kazanılmış direnç bir aşamada veya çok aşamada oluşabilir [46].

2.4.2.2 Direnç Geninin Alınmasına Bağlı Kazanılmış Direnç ((Plazmid veya Transpozon Aracılığıyla)

Plazmidler, ekstrakromozomal genetik elemanlardır. Sirküler yapıda çift zincirli DNA molekülleridir. Plazmidlerin molekül ağırlığı 1-200 milyon dalton arasında değişir. Direnç genleri taşıyan plazmidlere rezistans plazmidleri (R plazmidleri) adı verilir [46] .

Transpozonlar, rezistansın taşınmasında rol oynayan diğer bir özel DNA parçasıdır. Hem kromozomal DNA üzerine, hem de plazmidler üzerine sokulabilen (rekombine olan) daha ufak ve hareketli DNA parçacıklarıdır [46].

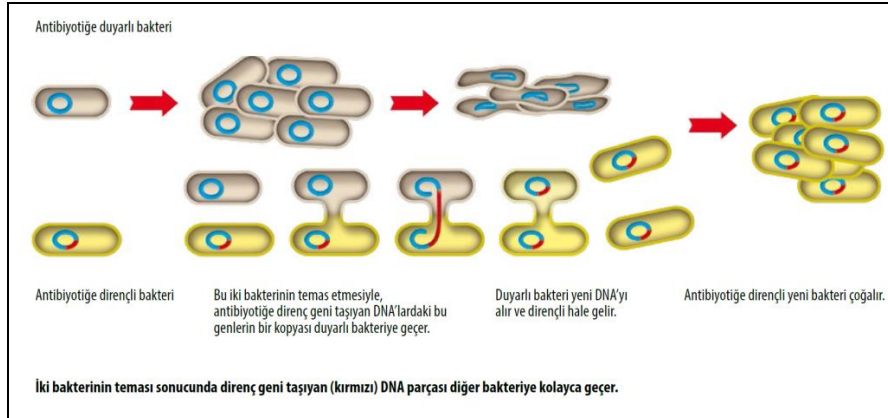
Plazmidlerin başka hücreden veya ortamdan hücreye transferinde rol oynayan mekanizmalar aşağıda sıralanmıştır.

Transdüksiyonda; bakteriyofajlar (bakteri virüsleri) rezistans plazmidinin taşıyıcılığını yaparlar. Bakteri içine giren bakteriyofaj onun R plazmidini, kendisinin viral protein kılıfı içine alır ve bölünerek plazmidin kopyasını içeren çok sayıda yavru bakteriyofaj oluşturur. Sonuçta bakteri hücresi patlar ve ortama R plazmidi içeren yüzlerce yeni bakteriyofaj saçılır. Bunlarda aynı veya farklı türden diğer bakterileri infekte ederler ve onları rezistan duruma getirirler [46].

Konjugasyonda; rezistan bakteri, duyarlı bakteriyle sitoplazma köprüsü oluşturur ve R plazmidlerinden biri duyarlı hücreye geçer ve onu rezistan yapar [46].

Transformasyonda; bakterinin lizisi sonucu ortama dökülmüş R plazmidleri veya DNA kırıntıları duyarlı bakteri tarafından alınır, bakteri rezistan duruma geçer [46].

Şekil 2.13, direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direnci şematik olarak göstermektedir.

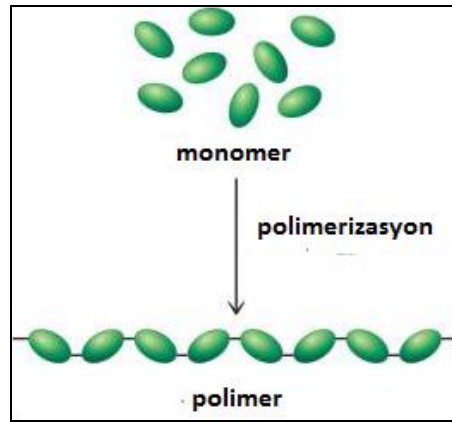


Şekil 2.13 Direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direncin şematik gösterimi [47]

BÖLÜM 3

POLİMERLER

Polimer, çok sayıda küçük molekülün kovalent bağlarla birbirlerine bağlanarak meydana getirdiği makromoleküldür. Şekil 3.1’de gösterildiği gibi monomer adı verilen küçük moleküller uygun koşullarda polimerizasyon tepkimesi sonucu birbirleriyle kimyasal bağ yaparlar ve polimer moleküllerine dönüşürler [48].

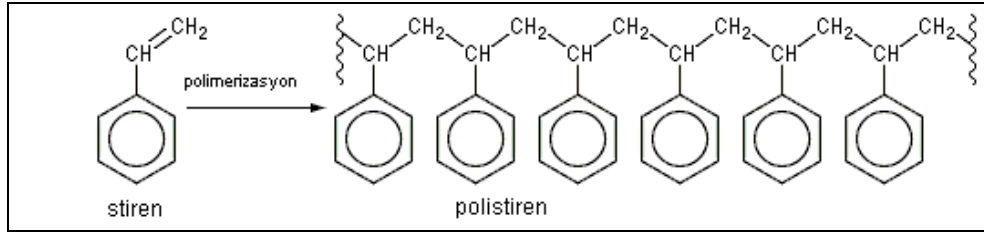


Şekil 3.1 Polimerizasyonun şematik gösterimi [49]

3.1 Polimerlerin Sınıflandırılması

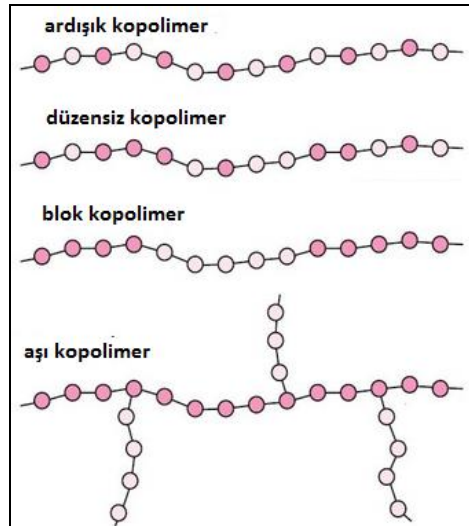
Polimerleri diğer klasik kimyasal maddelerden ayıran en önemli özelliği moleküllerinin büyüklüğüdür. Bu nedenle polimer kelimesi bütün yüksek molekül ağırlıklı maddeleri kapsar. Polimerlerin üstün özelliklerine makromoleküler yapılarının katkısı büyüktür. Örneğin; gerekli mekaniksel özellikler belli bir zincir büyüklüğü üzerinde kazanılır. Polimer zincirlerinin şekilleri polimer özelliklerini etkilemektedir [50].

Polimer tek bir monomer biriminin tekrarlanmasından oluşuyorsa buna “homopolimer” denir. Şekil 3.2’de bir homopolimer örneği olan polistiren gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Homopolimere örnek olan stirenden polistiren eldesi [51]

Polimer molekülü iki farklı monomerin birleşmesinden oluşuyorsa buna “kopolimer” denir. Şekil 3.3, kopolimer çeşitlerini göstermektedir.



Şekil 3.3 Kopolimer çeşitleri [52]

3.2 Polimerlerin Sentezi

Polimerler, değişik kimyasal tepkimelerden yararlanılarak sentezlenebilir. Bu tepkimeler, genel işleyiş mekanizmaları bakımından;

i.Basamaklı polimerizasyon

ii.Katılma polimerizasyonu

adları verilen iki temel polimerizasyon yöntemi altında toplanırlar. Polimerleşmeye yatkın kimyasal maddeler, bu iki mekanizmadan birini izleyerek polimer zincirlerine katılırlar. Polimerizasyon mekanizmasının, özellikle polimerizasyonun zamanla

davranışının bilinmesi (polimerizasyon kinetiği), aranan karakteristikleri taşıyan ve istenilen türde polimer üretimi açısından önemlidir [50].

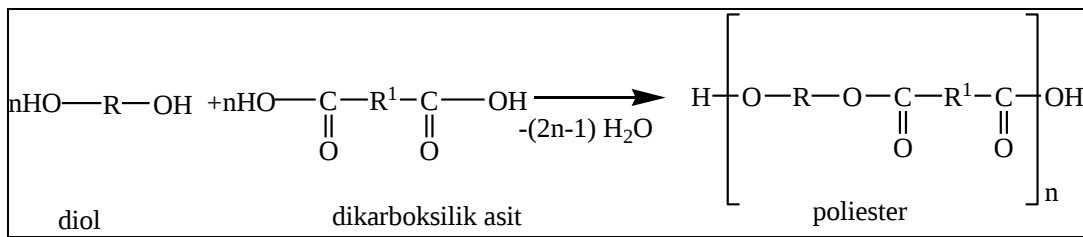
3.2.1 Basamaklı Polimerizasyon

Basamaklı polimerizasyon fonksiyonel gruplar taşıyan moleküller arasında adım adım ilerler. Önce iki monomer tepkimeye girerek bir dimer oluşturur. Dimer, başka bir monomerle birleşerek trimer veya kendisi gibi bir dimerle birleşerek tetramere dönüşür ve benzer tepkimelere girerek zincir büyümesi gerçekleşir. Polimerizasyon ortamında bulunan her büyüklükteki molekül birbiriyle tepkimeye girebilir ve polimerin mol kütlesi yavaş yavaş, uzun bir zaman aralığında artar [48].

3.2.1.1 Kondensasyon Tepkimeleri

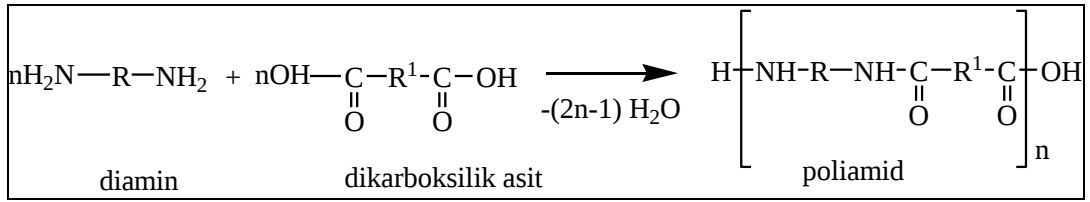
Kondensasyon tepkimeleri $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$ türü fonksiyonel gruplar taşıyan moleküller arasında gözlenir. Tepkimeye katılan moleküller, aralarından küçük bir molekül ayrılarak birleşirler, ayrılan küçük molekül çoğu kez sudur. Kondensasyon tepkimeleri ile polimer elde edilebilmesi için en az iki noktadan kondenzasyona girebilecek kimyasal maddeler gereklidir. kondensasyon tepkimelerinin bu noktadan ard arda ilerlemesiyle (polikondensasyon) polimer zincirleri oluşur [50].

Şekil 3.4'te görüldüğü gibi poliestерler, diol ve dikarboksilik asit arasındaki kondensasyon tepkimelerinden sentezlenebilirler [48].



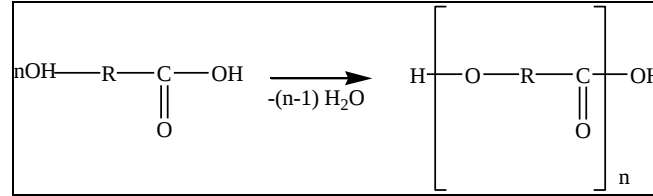
Şekil 3.4 Diol ve dikarboksilik asit tepkimesi ile poliestер oluşumu

Poliesterlere benzer olarak Şekil 3.5'te poliamidlerin, diamin ve dikarboksilik asitler arasındaki kondensasyon tepkimelerinden sentezlendiği görülmektedir.



Şekil 3.5 Diamin ve dikarboksilik asit tepkimesi ile poliamid oluşumu

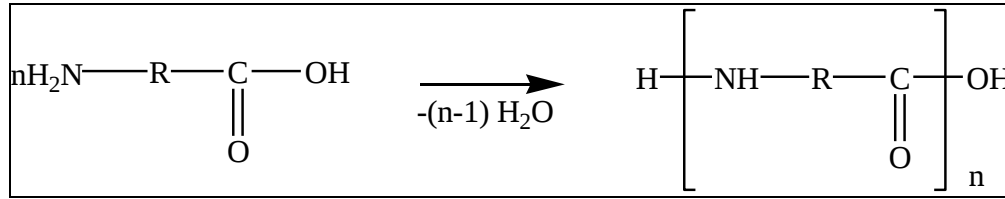
-OH ve -COOH gruplarını birlikte taşıyan bifonksiyonel moleküller (Şekil 3.6),



Şekil 3.6 -OH ve -COOH gruplu bifonksiyonel molekül

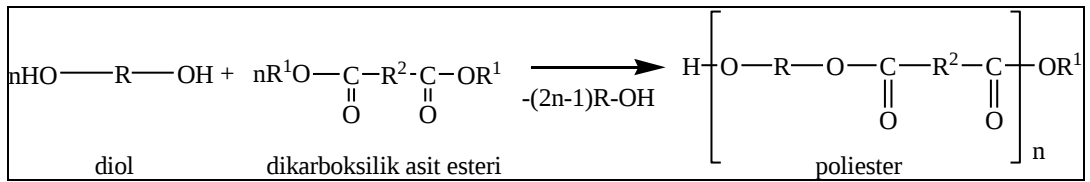
tepkimesinde olduğu gibi poliester verecek şekilde veya Şekil 3.7’de gösterildiği gibi

-NH₂ ve -COOH gruplarını birlikte taşıyan bifonksiyonel moleküller



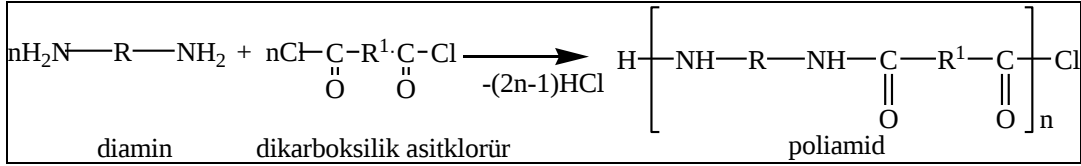
Şekil 3.7 -NH₂ ve -COOH gruplu bifonksiyonel molekül

tepkimesiyle poliamid oluşturmak üzere kondenzasyon tepkimesine girebilirler. Şekil 3.8’de belirtildiği gibi dikarboksilik asit esterleri ve dioller arasındaki tepkimeler de kondenzasyon üzerinden ilerler, tepkimede ayrılan küçük molekül alkoldür [48].



Şekil 3.8 Diol ve dikarboksilik asit esterleri arasındaki tepkime sonucu poliester eldesi

Kondenzasyon tepkimelerine bir başka örnek, diaminler ile dikarboksilik asitklorürler arasında HCl ayrılması şeklinde ilerleyen poliamid sentezidir (Şekil 3.9).



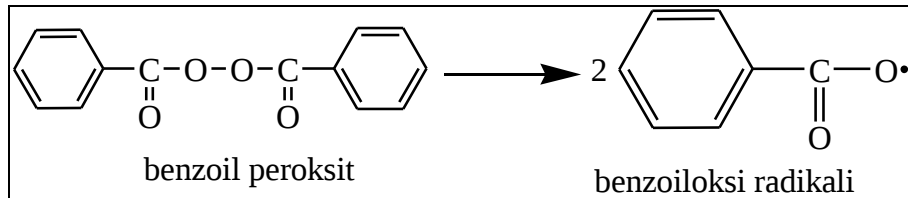
Şekil 3.9 Diamin ve dikarboksilik asitklorür tepkimesi ile poliamid oluşumu

3.2.2 Katılma Polimerizasyonu

3.2.2.1 Radikalik Katılma Polimerizasyonu

Ticari polimerlerin içerisinde polistiren, polietilen, polipropilen, poli(vinil klorür) gibi katılma polimerizasyonu ile üretilen polimerlerin önemli bir payı bulunmaktadır. Bu tür katılma polimerleri genellikle bir vinil monomerinin katılma polimerizasyonu ile üretilir. Polimerizasyon radikaller üzerinden başlar ve zincir büyümesi yine radikaller üzerinden ilerlemektedir. Katılma polimerizasyonuna yönelik ilk bilgiler 1920'lerde Staudinger tarafından verilmiş, 1937'de Flory radikalik polimerizasyonunun küçük moleküllü maddelerin verdiği zincir tepkimelerine benzer şekilde; başlama, büyüme ve sonlanma adımları üzerinden ilerlediği ileri sürülmüştür [48].

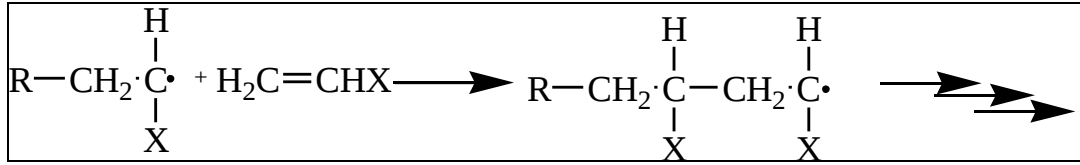
Radikalik katılma polimerizasyonunun başlama basamağında; monomer molekülleri kimyasal veya fiziksel yolla aktive edilerek radikal haline dönüştürülür ve bu basamak başlangıç aktivitesinin oluşturulduğu bir basamak gibi düşünülebilir. Başlama basamağın gerçekleştirilmesi için izlenen en yaygın yöntem sisteme dışarıdan başlatıcıların ilave edilmesidir. Bu amaçla anorganik veya organik peroksitler ve diazo bileşikler veya redoks başlatıcıları kullanılır. Başlatıcılara örnek olarak benzoil peroksit verilebilir. Bu organik peroksit 60°C-90°C sıcaklık aralığında Şekil 3.10'daki reaksiyona göre kolaylıkla parçalanarak radikal oluşur [48].



Şekil 3.10 Benzoil peroksitin parçalanma reaksiyonu

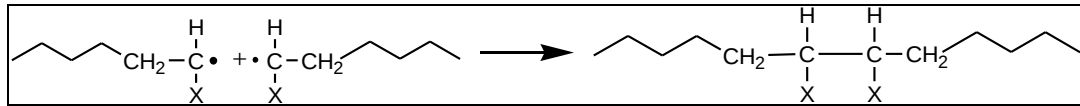
Çoğalma basamağında, başlama basamağında oluşan zincir radikali monomer moleküllerinin katılması ile büyür. Çoğalma reaksiyonunda yüzlerce, bazen binlerce

monomer birimi zincire katılabilir [48]. Şekil 3.11’de radikalik katılma polimerizasyonunun çoğalma basamağı şematik olarak gösterilmektedir.



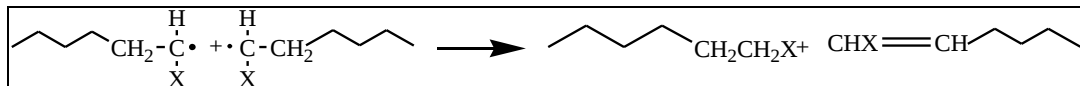
Şekil 3.11 Radikalik katılma polimerizasyonu çoğalma basamağı gösterimi

Çoğalmakta olan polimer zinciri sonlanma basamağında durur. Burada aktif uçlar pasifleşerek yapıyı kararlı hale getirirler ve böylece polimerleşme tamamlanır [50]. Sonlanma; “birleşme ile sonlanma”, “orantısız sonlanma” ve “zincir transferi” şeklinde olmaktadır. Şekil 3.12’de radikalik katılma polimerizasyonunun birleşme ile sonlanma basamağının gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 3.12 Radikalik katılma polimerizasyonu birleşme ile sonlanma basamağının gösterimi

Orantısız sonlanmada hidrojen transferi ile iki polimer molekülü oluşur. Şekil 3.13’de görüldüğü gibi moleküllerden birinde doymuş, ötekinde ise doymamış son gruplar vardır [50].



Şekil 3.13 Radikalik katılma polimerizasyonu orantısız sonlanma basamağının gösterimi

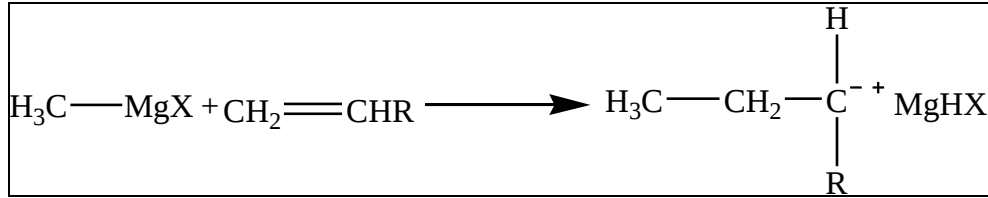
Birçok polimerizasyon reaksiyonunda elde edilen zincir uzunluklarının, birleşme ile ya da orantısız sonlanmadan beklenen değerlerden daha küçük olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, büyümekte olan bir zincir radikalinin aktifliğinin sistemde bulunan başka bir moleküle aktarılması ile zincir transferlerinin olmasıdır. Radikalın aktarıldığı molekül; monomer, başlatıcı, çözücü, polimer veya sistemde bulunan başka maddelerin molekülleri olabilir [48].

Polimerizasyon ortamına bazı maddelerin katılması ile polimerleşme yavaşlatılabilir veya durdurulabilir. Bu nedenle polimer üretimine başlamadan önce inhibitörlerin ortamdan uzaklaştırılması gerekir [48].

3.2.2.2 İyonik Polimerizasyon

İyonik polimerizasyonda, çift bağın etrafındaki sübstitüe grupların etkisi ile yüklü bir yapı oluşur. Zincir polimerizasyonu radikalik, anyonik veya katyonik olarak gerçekleşebilir. Serbest radikal polimerizasyonunun seçiciliği yoktur. Ancak iyonik polimerizasyon seçimlidir [53].

Metil metakrilat, stiren, akrilonitril ve vinilklorür gibi kuvvetli elektronegatif gruplar içeren monomerler anyonik polimerleşme gösterebilirler. Başlatıcı seçimi, monomerdeki sübstitüe grupların elektron çekme derecesine bağlı olarak yapılır. Monomer kuvvetli elektron çekici sübstitüentlere sahipse, RMgX gibi zayıf bir başlatıcı kullanılır [53]. Şekil 3.14'te anyonik polimerizasyonda monomerin başlatıcı ile reaksiyonu gösterilmektedir.

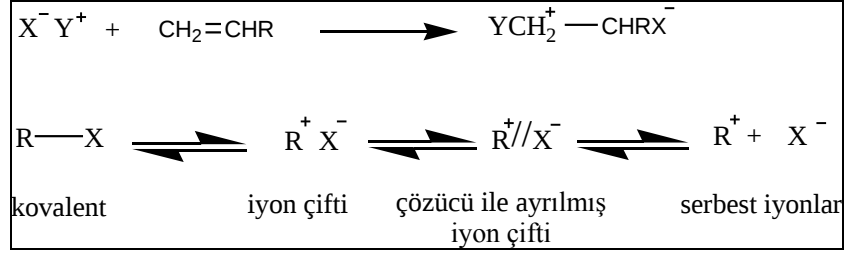


Şekil 3.14 Anyonik polimerizasyonda monomerin başlatıcı ile reaksiyonu

Anyonik polimerizasyon protik ortamda gerçekleştirilmelidir. Eğer aprotik ortamda gerçekleştirilirse, ortamdaki monomerler tükendiği halde polimerizasyon sonlanmaz; hatta ortama monomer eklenirse polimerizasyon devam eder. Bu durumda “yaşayan polimerler” olarak adlandırılan polimerler elde edilir. Yaşayan polimerlerin en büyük avantajı, elde edilen polimer zincirlerinin yapılarındaki tekrarlanan ünite sayıları, molekül ağırlıkları ve uzunluklarının birbirine eşit olmasıdır. Bu nedenle de molekül ağırlık dağılımları 1'e yakın veya eşittir [53].

Katyonik polimerizasyonda kullanılan başlatıcılar üç çeşittir. Klasik mineral asitleri olarak HCl, H₂SO₄, HClO₄, Cl₃CCOOH, H₃PO₄, Lewis asitleri ve Friedel Craft katalizörleri olarak BF₃, PF₅, SnCl₄, TiCl₂, AlCl₃, R₃Al kullanılır. Lewis asitleri birçok durumda Lewis bazları veya proton verici bileşikler ile katalizörler ile birlikte kullanılır. Kararlı karbenyum tuzları olarak ise (C₇H₇)⁺PF₆⁻, (C₆H₅)₃C⁺SnCl₆⁻ kullanılır. Polimerizasyon mekanizması başlama, ilerleme ve sonlanma olmak üzere üç basamak şeklindedir [54].

Şekil 3.15 ve 3.16, katyonik polimerizasyonunun başlama ve ilerleme basamaklarını göstermektedir.



Şekil 3.15 Katyonik polimerizasyonu başlama basamağının gösterimi



Şekil 3.16 Katyonik polimerizasyonu ilerleme basamağının gösterimi

Sonlanma aşamasında, katyonik zincir transfer reaksiyonları katyonik polimerizasyonda önemli yer tutar. Zincir transferi monomere, karşı iyon, çözücüye ve polimere yapılabilir [54].

3.3 Kontrollü Polimerizasyon

1956 yılında Swarcz, zincir transferi ya da sonlandırma olmadan ilerleyen polimerizasyon olarak “yaşayan polimerizasyon”u tanımladı [55], [56]. Yaşayan polimerizasyon olarak da bilinen kontrollü polimerizasyon mekanizmasında, transfer ve sonlanma gibi istenmeyen yan reaksiyonlar olmadığı için, tüm polimerler eş zamanlı olarak polimerleşir. Bu koşullar altında, yaşayan polimerizasyonla oluşan polimerik materyaller genellikle çok dar moleküler ağırlık dağılımına sahiptir. Böylece monodisperse yakın, dar bir molekül ağırlığı elde edilir. Bu dağılımlar genellikle aşağıda verilen denklemde, örneğin polidispersite indeksinin (PDI) belirlenmesiyle hesaplanır:

$$PDI = M_w/M_n = 1/1+DP \quad (3.1)$$

M_w ; ağırlıkça ortalama molekül ağırlığını,

M_n ; sayıca ortalama molekül ağırlığını,

DP ; polimerizasyon derecesini, başka bir deyişle polimer zinciri başına monomer birimlerinin ortalama sayısını belirtir.

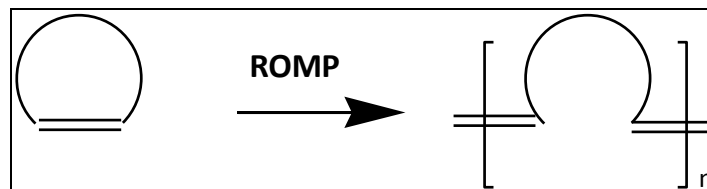
Yaşayan polimerizasyon genellikle, polimerin molekül ağırlığı değişiminin zamanın ve/veya monomer dönüşümünün bir fonksiyonu olarak analiziyle, kondenzasyon ve kinetik olarak kontrollü (serbest radikal) polimerizasyondan ayırt edilebilir. Kinetik kontrollü polimerizasyonlar nispeten daha erken aşamalarda yüksek molekül ağırlıklı polimerler sağlarken, kondenzasyon polimerizasyonu genellikle sadece çok yüksek dönüşümlü yüksek moleküler ağırlıklı polimerler sağlarlar. Bunun tersi olarak, yaşayan polimerizasyonda, molekül ağırlığı monomerin dönüşümüyle direkt olarak doğru orantılıdır çünkü bütün zincir sonlanmaları büyümeyle aynı orandadır [57].

Kontrollü polimerizasyon, bütün monomerler tükeninceye kadar devam eder. Bu yüzden molekül ağırlığı polimer dönüşümü ile doğru orantılıdır. Böylece istenilen molekül ağırlığı elde edilebilir. Kontrollü polimerizasyon tekniklerinden atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP), tersinir eklenme-parçalanma zincir transferi (RAFT), nitroksit aracılıklı polimerizasyon (NMP), anyonik polimerizasyon gibi metotlar bulunmaktadır. Bir sonraki bölümde çalışmalarımızda da uyguladığımız bir diğer kontrollü polimerizasyon yöntemi olan halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) hakkında bilgi verilecektir.

3.3.1 ROMP (Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu)

Metatez polimerizasyonuna yönelik ilk çalışmalar 1950'lerde başlamakla birlikte, bu yöntemin ticari amaçlı üretimde uygulanması ancak 1970'lerin sonlarında siklopentenin halka-açılma metatez polimerizasyonu ile gerçekleşmiştir [58].

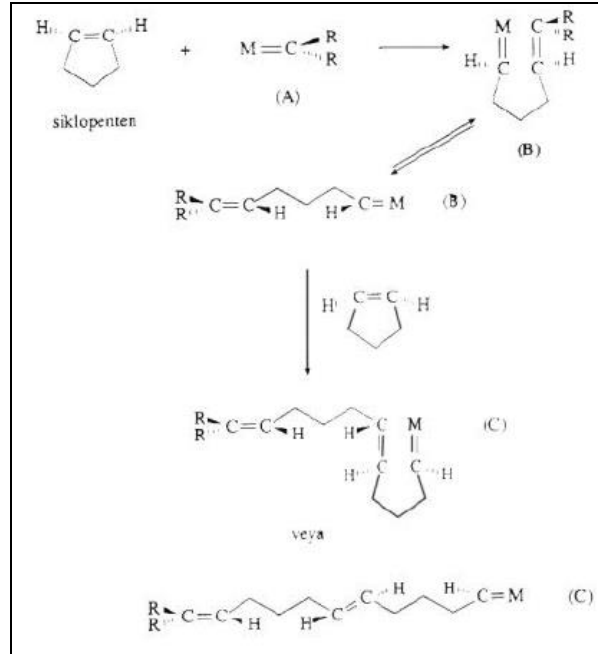
Halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP), siklik olefin karışımının polimerik materyallere dönüştürüldüğü bir zincir polimerizasyon işlemidir. Şekil 3.17'de halka açılma metatez polimerizasyonuna genel bir örnek verilmiştir [58], [59], [60].



Şekil 3.17 Halka açılma metatez polimerizasyonuna (ROMP) genel bir örnek [56]

Siklopentenin polimerizasyon adımları toplu olarak Şekil 3.18'de verilmiştir. Polimerizasyonu başlatmak için karbon çift bağlanmış tungusten veya molibden gibi bir

metal atomu kullanılır (A). Katalizör ve siklopenten etkileşerek bir ucunda karbon-karbon çift bağı, diğer ucunda karbon-metal çift bağı bulunan bileşik oluşur (B). İleri adımlarda karbon-metal çift bağı diğer monomer molekülleriyle aynı şekilde tepkimeye girerek zinciri büyütür (C).



Şekil 3.18 Siklopentenin halka açılma metatez polimerizasyon adımları. M, molibden veya Tungusten gibi bir geçiş metalini gösterir [20]

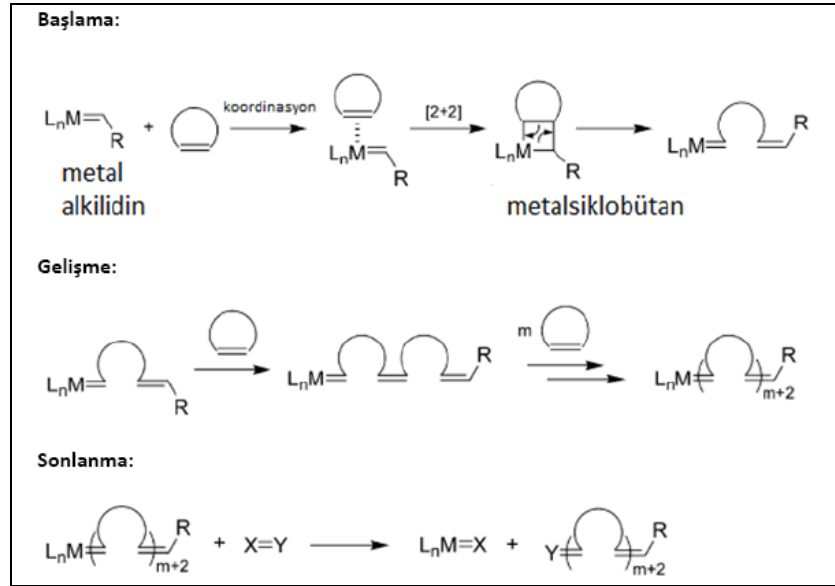
Norbornen, siklopentene benzer şekilde halka-açılma metatez polimerizasyonu ile polinorbornene dönüşür. Endo-disiklopentadienin polimerizasyonu, ana zinciriyle birlikte yan grubunda da çift bağı bulunan poli(endo-disiklopentadien) polimer verir.

ROMP'un mekanizması, eşsiz bir metal aracılı karbon-karbon çifte bağ değişim işlemi olan olefin metatezine dayanır. Bunun sonucu olarak; bir monomerle ilgili herhangi bir doymamışlık polimere dönüştürüldüğünde de korunmuş olur. Bu ROMP'u tipik olefin eklemeli polimerizasyonlardan ayıran en önemli özelliktir (Örneğin; etilen-polietilen).

ROMP için genel mekanizma Şekil 3.19'da gösterilen Chauvin 'in ilk önerisine dayanır [61]. Başlama, siklik olefinlere geçiş metali alkiliden kompleksinin koordinasyonu ile başlar. Daha sonra büyüyen polimer zincirinin başlangıcını etkili bir şekilde meydana getiren dört üyeli ara metalsiklobütan [2+2] siklo yapısı meydana gelir. Bu ara madde yeni metal alkiliden meydana getirmek için siklorevizyon reaksiyonuna uğrar. Ortaya çıkan kompleks boyutu büyümesine rağmen (monomerlerin birleşmesinden dolayı),

başlatıcının siklik olefinlere karşı aktifliği aynıdır. Bu yüzden benzer işlemler gelişme aşamasında polimerizasyon bitene kadar tekrar eder, yani, tüm monomerler tükenir, reaksiyon dengeye ulaşır ya da reaksiyon sonlandırılır.

Yaşayan ROMP reaksiyonları yaygın olarak, özel reaktiflerin dışarıdan eklenmesiyle sonlandırılır. Bu reaktifin fonksiyonu; büyüyen zincirin sonundaki geçiş metalini kaldırmak, metalin yerine bilinen bir fonksiyonel grubun geçmesini sağlamaktır [62].



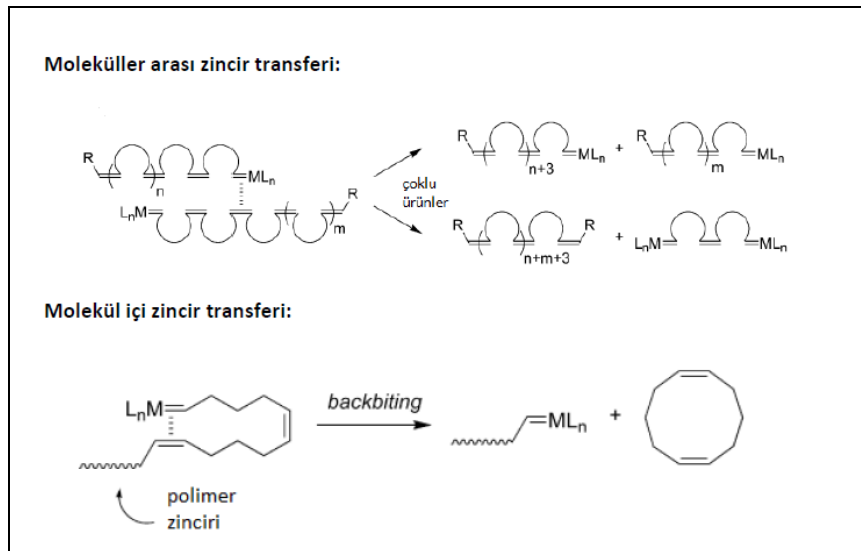
Şekil 3.19 Tipik bir ROMP reaksiyonunun mekanizması [20]

Metal-aracılı ROMP reaksiyonlarıyla ilgili üç önemli özellik vardır. İlk olarak, büyüyen polimer zincirlerindeki yayılan metal merkezleri, ya metalosiklobütan ya da metal alkilidin formunda yer alır. Bu fark, reaksiyon koşullarından ziyade geçiş metallerine ve onlarla ilişkili ligantlara bağlıdır. İkinci olarak, çoğu olefin metatez reaksiyonları gibi, ROMP reaksiyonları da genellikle geri dönüşümlüdür. Bu yüzden, Şekil 3.22’de resmedilen temel mekanizmada gösterildiği gibi ters yönlü de devam edebilir [62].

Üçüncü olarak, çoğu ROMP reaksiyonları geri dönüşümlü olmasına rağmen, reaksiyonlar denge kontrollüdür ve denge pozisyonları (monomer-polimer) polimerizasyonun termodinamiği göz önüne alınarak tahmin edilebilir. Reaksiyon, diğer halka açılma polimerizasyonları gibi, siklik olefinlerin halka gerginliğine bağlı olarak monomerden polimere dönüşür [62].

ROMP’da kullanılan çoğu yaygın monomerler, önemli ölçüde gerginlik derecesine sahip (>5 kcal/mol) siklik olefinlerdir. Örnek olarak; siklobüten, siklopenten, cis-siklookten ve

norbornen verilebilir [62]. Siklohekzen önemli bir istisnadır. Düşük halka gerginliği ile bu siklik olefin, ROMP kullanılarak polimerize etmek için, çok az entalpik itici güce sahiptir. Siklik olefinlere iyi bir örnek olarak norbornenler verilebilir. Norbornen bileşiklerinin popüler olmasının sebebi, Diels-Alder reaksiyonları ile kolaylıkla elde edilebilme özellikleridir. Benzer şekilde, sıcaklık ve konsantrasyon ROMP'da yürütülen reaksiyonun sonuçları üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Genellikle, başarılı ROMP reaksiyonları için en uygun koşullar, mümkün olan en düşük sıcaklıkta en yüksek monomer konsantrasyonunu kullanmaktır. Şekil 3.20'de gösterilen genel ROMP mekanizmasına ek olarak (ve depolimerizasyon mekanizmasıyla ilgili), yukarıda belirtilen denge, moleküller arası zincir transferi ve molekül içi zincir transfer reaksiyonlarını ("backbiting" diye de adlandırılır) içeren diğer metatez yollar ile de kurulabilir. Bu ikincil metatez reaksiyonlarının örnekleri Şekil 3.23'te gösterilmiştir [63].



Şekil 3.20 ROMP reaksiyonlarda ikincil metatez (moleküller arası zincir transfer ve molekül içi zincir transfer) reaksiyonların örnekleri [20]

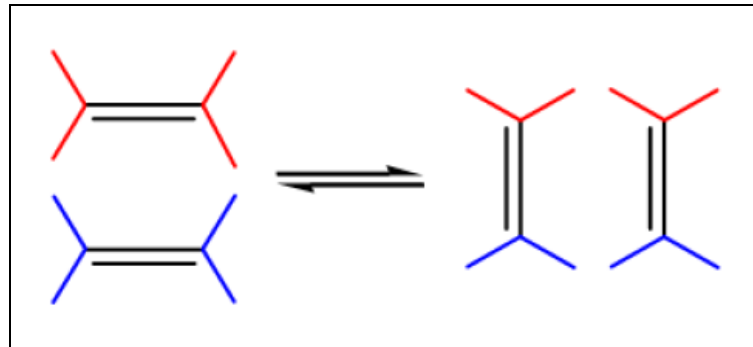
Moleküller arası zincir transferi reaksiyonunda, terminalinde aktif metal alkiliden içeren bir polimer zinciri, aynı reaksiyon kabında bulunan farklı bir polimer zincirinin omurgası boyunca uzanan herhangi bir olefinle reaksiyon verebilir. Toplam polimer zinciri sayısı aynı kalsa da, polimerlerin molekül ağırlığı buna göre alçalacak veya yükselecektir. Bir "molekül içi zincir transfer-backbiting" reaksiyonunda, polimer zincirinin aktif terminal ucu, siklik türler ve azalmış molekül ağırlıklı polimer zincirini serbest bırakmak için kendisiyle reaksiyon verir. Toplu olarak, bu zincir transfer

reaksiyonları, sistemin moleküler ağırlık dağılımını (ya da polidispersitesini) etkili bir şekilde genişletir [64].

ROMP gibi denge kontrollü polimerizasyonların diğer çıkarımı da, siklik oligomer oluşturmaya eğilimleridir. Jacobson-Stockmayer halka-zincir denge teorisine göre; siklik oligomer oluşumu her zaman yüksek moleküler ağırlıklı polimerin oluşumuna eşlik eder [56], [63], [64], [65]. Mevcut siklik türlerin toplam miktarı çözücü, polimer yapısının cis/trans oranı, monomerin halka gerginliği, reaksiyon zamanı ve konsantrasyon gibi faktörlere bağlıdır. Siklik türlerin oluşumunda yukarıda belirtilen kritik değerlere bağlılıkları ile yüksek sıcaklık ve düşük konsantrasyon tercih edilir.

3.3.2 Olefin Metatez Polimerizasyonu

Olefin monomerlerinden elde edilen polimerlerin ana zincirleri üzerinde çift bağ bulunmaz. Olefin metatez polimerizasyonu, çift bağ içeren bir monomerden çıkarak yine çift bağ içeren polimer sentezine olanak sağlar. Yan grupları farklı olan olefin Şekil 3.21’de gösterildiği gibi tepkimeye girerek yan gruplarını değiştirebilirler [48].

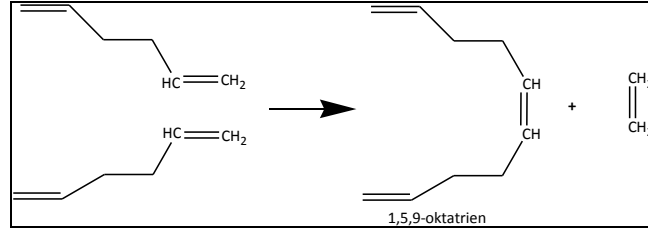


Şekil 3.21 Olefin metatez polimerizasyonunun şematik gösterimi

Olefin metatez polimerizasyonu (veya kısaca metatez polimerizasyonu), asiklik dien metatez polimerizasyonu (basit olefin metatez polimerizasyonu) ve halka-açılma metatez polimerizasyonu şeklinde iki grup altında incelenir. Polimerizasyon genelde katalizör olarak WCl₆, WOCl₄, MoO₃ gibi geçiş metal bileşikleri ve EtAlCl₂, AlR₃, Sn₄ türü katalizörler kullanılır. Katalizör sistemi homojen ya da heterojen olabilir [48].

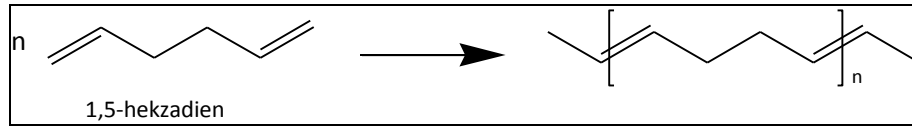
3.3.2.1 Asiklik Dien Metatez Polimerizasyonu

Asiklik dien metatez polimerizasyonuna iyi bir örnek 1,5-hekzadienin polimerizasyonudur. Şekil 3.22’de görüldüğü gibi iki tane 1,5-hekzadien molekülü birbirine bağlanarak 1,5,9-oktatrien oluşturur. 1,5,9-oktatrienin uçlarındaki çift bağlar korunur ve ayrıca molekül içerisinde de bir çift bağ bulunur [59].



Şekil 3.22 Asiklik dien metatez reaksiyonu

1,5,9-oktatrien daha sonra uçlarındaki çift bağlar üzerinden ileri tepkimeye girerek daha büyük bir moleküle dönüşür. Benzer adımlarla yinelenen metatez tepkimeleri sonucu Şekil 3.23’te yapısı verilen ve ana zinciri üzerinde çift bağlar bulunan bir polimer elde edilir.



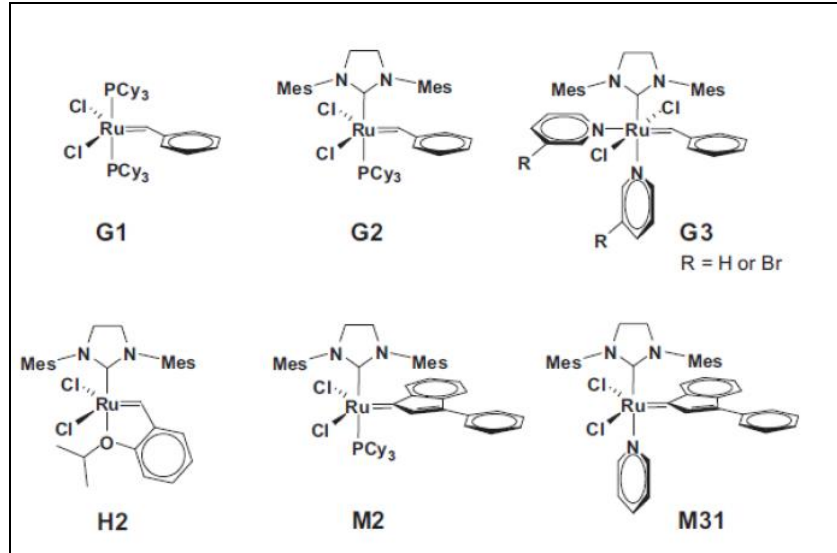
Şekil 3.23 Asiklik dien metatez polimerizasyonu

3.3.2.2 Katalistler

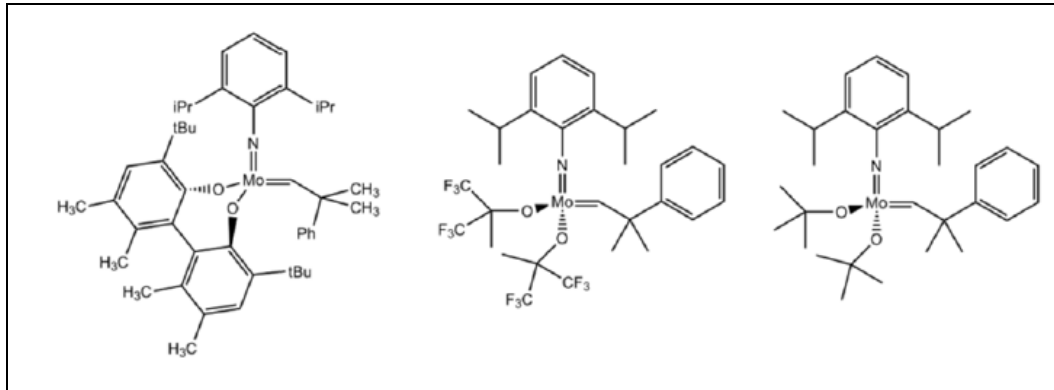
ROMP’daki gelişmeler; olefin metatezi için uygun fonksiyonel grup toleranslı, iyi tanımlanmış katalistlerin geliştirilmesine kendisini adayan çok sayıdaki araştırmacının büyük çabasına atfedilebilir. İlk katalist sistemleri genellikle hava ve neme karşı aşırı hassas, karakterize etmesi zor, sistematik olarak çalışması ve en iyi şekilde kullanımı neredeyse imkansız olan heterojen karışımlardı. Olefin metatezinin tam potansiyeline ulaşması için, iyi tanımlanmış yapıdaki katalistlerin gerekli olduğu hemen anlaşılmıştır [56]. Diğer olefin metatezi katalistlerine kıyasla, Grubbs’ katalistleri, alkendeki diğer fonksiyonel grupları tolere ettiğinden, havaya karşı dayanıklı olduğundan ve geniş yelpazedeki solventlerle uyumlu olduğundan özellikle önemlidir [66], [67]. Bu katalistlere, onları ilk sentezleyen kimyager olan Robert H. Grubbs’ın ismi verilmiştir.

Şekil 3.24'te çeşitli Grubbs' katalistleri de dahil olmak üzere Rutenyum esaslı katalizörler gösterilmektedir.

Şekil 3.25'te ise, Chauvin, Grubbs ve Schrock'un, halka açılma polimerizasyonu için geliştirdikleri çeşitli "Schrock katalistleri" gösterilmektedir. Yves Chauvin, Robert H. Grubbs, ve Richard R. Schrock bugüne kadar yüksek etkili ve seçici olan bir çok katalist buluşlarından dolayı 2005 yılında Nobel Ödülü almaya layık görülmüşlerdir [68].



Şekil 3.24 Olefin metatez polimerizasyonunda kullanılan çeşitli Rutenyum esaslı katalistler [69]



Şekil 3.25 Çeşitli Molibden esaslı Schrock katalistleri [70]

ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİK GÖSTEREN DOĞAL VE SENTETİK POLİMERLER

Antimikrobiyal maddeler, bakteri ve / veya mantar gelişimini engellemekte ve / veya sınırlandırmaktadır. Antimikrobiyal maddelerin birçoğu hem bakteri, hem de mantara karşı güçlü aktivite göstermektedirler. Ancak bütün mikroorganizmalara karşı aynı derecede etkin maddelerin sayısı oldukça azdır. Bakterilerin üremesini ve gelişmesini engelleyen maddelere antibakteriyel maddeler denilmektedir. Bakterilere zarar veren maddelere bakterisidal (bakterisit), sadece çoğalmalarını engelleyen maddelere ise bakteriyostatik adı verilmektedir. İstenilen antibakteriyel etkiyi elde etmek için, antibakteriyel maddeler, gereksinime ve uygulamaya bağlı olarak tek tek veya kombine edilerek kullanılabilirler. Mantar üremesini ve gelişmesini önleyen antimikrobiyal maddelere fungisid, mantar üremesini sınırlandıran maddelere ise fungistatik maddeler adı verilmektedir. Bu maddeler arasında çeşitli izotiyozolin bileşikleri ve imidazol türevleri, arsenik bileşikleri ve kalay esaslı ürünler sayılabilmektedir [71].

4.1 Antimikrobiyal Peptitler

Antimikrobiyal peptitler, (host defense peptides) doğal immun sistemin bir parçası olup tüm canlılarda bulunmaktadır. Genellikle 12 ve 50 aminoasit dizisi arasındaki kısa proteinlerdir. Bu peptitler iki ya da daha çok pozitif yüklü arginin, lizin kalıntıları veya asidik ortamlarda, histidin, ve büyük çoğunlukla (genellikle %50) hidrofobik kalıntıları içerir. Geleneksel antibiyotiklerin tersine bu peptitler bakteriyostatik (bakteri

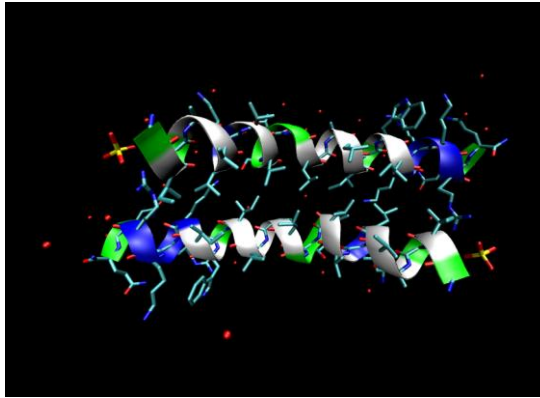
üremesini durduran) yerine bakteriyosidal (bakteri öldürücü) olarak rol almaktadırlar [72].

4.1.1 Melittin

Melittin, balırsı venomundan izole edilen, 26 aminoasit uzunluğunda helezonal yapıda bir katyonik peptittir. Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Melittinin aminoasit dizilimi;

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂

şeklindedir ve Şekil 4.1’de Melittin peptidinin üç boyutlu yapısı görülmektedir [73].



Şekil 4.1 Melittinin üç boyutlu yapısı [74]

4.1.2 Sekropin

Sekropinler, küçük peptitler olup yaklaşık 33 aminoasitten oluşurlar. Etki mekanizmaları bakterilerin hücre zarını eritmesi şeklindedir. Sekropinler aynı zamanda bakterilerde prolin yükselişini engeller ve zayıf hücre zarı oluşmasına sebep olurlar [73]. Sekropinin aminoasit dizilimi;

-Sekropin A: Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Asn-Ile-Arg-Asp-Gly-Ile-Ile-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Val-Ala-Val-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-Ala-Lys-NH₂

-Sekropin B: Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-Gly-Ile-Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-Lys-Ala-Leu-NH₂

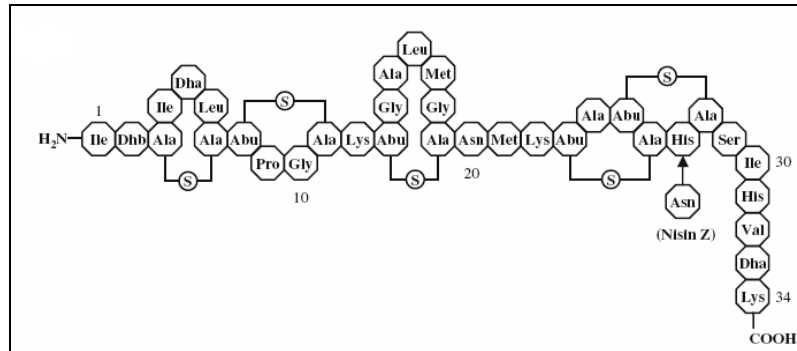
olmak üzere iki çeşittir.



Şekil 4.2 Sekropinin üç boyutlu yapısı [75]

4.1.3 Nisin

Nisin, *Lactococcus lactis* bakterisinden üretilen gıda katkı maddesi olarak kullanılan bir polisiklik antibakteriyel peptittir. Yaygın olmayan lantionin (Lan), metillantionin (MeLan), didehidroalanin (Dha) ve didehidroaminobütirik asit (Dhb) aminoasitleri dahil 34 tane aminoasit içerir [76]. Molekül formülü $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ve molekül ağırlığı 3354,07 g/mol'dür. Nisinin yapısındaki 27. aminoasit histidin ise Nisin A, aspartik asit ise Nisin Z olarak adlandırılır [77].



Şekil 4.3 Nisinin şematik gösterimi [77]

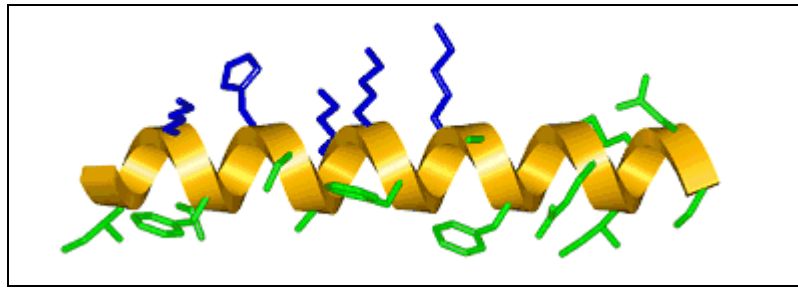
4.1.4 Magainin

Magainin ilk olarak Dr. Michael Zasloff tarafından 1987 yılında *Xenopus laevis* adlı yaralı bir Güney Afrika kara kurbağasının derisinden izole edilmesiyle keşfedilmiştir. Tesir mekanizmalarının antibiyotiklerden farklı olması ve bakterilerin onlara karşı direnç kazanamamalarından dolayı magaininler önemli antimikrobiyal katyonik peptitlerdir. Magaininler bakteri zarında delikler açar ve zarı delinen bakteri parçalanıp ölür [20]. Magainin aminoasit dizilimi;

Magainin 1: Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Lys-Ser

Magainin 2: Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser

şeklindedir. Magainin 3 boyutlu yapısı Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Yeşil renkli kısım hidrofobik ve mavi renkli kısım hidrofilik aminoasit gruplarını göstermektedir. Peptit yapısındaki hidrofobik ve hidrofilik oranı ve dizilimi, magainine yüksek aktiflik ve düşük toksik özelliği kazandırmaktadır.



Şekil 4.4 Magainin 3 boyutlu yapısı [78]

4.1.5 Defensinler

Defensinler, 30-40 aminoasitten oluşan, arjininden zengin, β -tabakalı katlantı gösteren, moleküler ağırlıkları 3,5- 6 kDa arasında olan ve altı sistein rezidüsünün oluşturduğu üç disülfid köprüsü içeren memelilerdeki en önemli katyonik antimikrobiyal peptit gruplarıdır. Bilinen tüm insan defensin genleri 8. kromozomda telomer bölgesine yakın p22-23.1 bölgesinde bulunmaktadır. Sistein rezidülerine ve disülfid bağlarının yerleşimine göre alfa (α), beta (β) ve teta (θ) defensinler olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. Teta defensinler insanlarda tanımlanmamıştır. Defensinler de diğer katyonik ve amfifilik özelliklerinden dolayı diğer antimikrobiyal peptitler gibi mikroorganizmaların membranlarındaki negatif yüklü moleküllere etki ederler. Bunlar Gram negatif bakterilerde lipopolisakkaritler (LPS), Gram pozitiflerde polisakkaritler ve lipoteikoik asit (LTA) ve her iki tip bakterinin iç membranında bulunan fosfolipitlerdir. Defensinler bakterisidal etkilerini μ M düzeyde gösterirler. Bu etkileri ortamda fizyolojik konsantrasyondaki tuz (150 mM NaCl) varlığında azalmaktadır. Bu nedenle defensinlerin in vivo antimikrobiyal etkileri iyon yoğunluğunun düşük olduğu fagosit

vakuolleri ile deri ve mukozal epitel yüzeylerinde gerçekleşmektedir. Bazı mikroorganizmalar, bakteriyel lipopolisakkarit veya lipoteikoik asit modifikasyonu, dış membran proteaz sentezi ve defensinlerin ekspresyonlarının baskılanması gibi defensinlerin etkisini yok edecek mekanizmalar geliştirmişlerdir [79]. Çizelge 4.1’de defensinlerin insan hücrelerindeki bulundukları yerleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 α ve β - defensinlerin insan hücrelerinde bulundukları yerler [79]

Bulundukları Yerler		
α-defensinler		
HNP 1-3	Nötrofiller	Kornea
	B hücreleri	Timus
	Doğal öldürücü hücreler	Verniks
	Dalak	Amnion sıvısı
HNP 4	Nötrofiller	
HD-5	Paneth hücreleri	Plasenta
	Dişi ürogenital sistem epitel	Fetal membran
HD-6	Paneth hücreleri	Dişi ürogenital sistem epitel
β-defensinler		
hBD-1	Nötrofil ve diğer lökositler	Tükürük bezleri
	Dişi genital sistem	Plazma
	Deri	Plasenta
	İdrar	Timus
	Anne sütü	Hemofiltrat
	İnce barsak	Böbrek
	Akciğer	Testis
	Pankreas	Vajina
	Prostat	Meme bezleri
	Nötrofil ve diğer lökositler	Ürogenital sistem
hBD-2	Böbrek	Plazma
	Pankreas	Mide
	İdrar	Deri
	Timus	Akciğer
	Kemik iliği	Karaciğer
hBD-3	Barsak	
	Deri	İdrar
	Uterus	Tonsiller
	Akciğer	Böbrek
	Nötrofil ve diğer lökositler	Barsak
hBD-4,5,6	Kalp	Plazma
	Timus	İskelet kası
	Epididim	Mide antrumu
	Akciğer	Plazma
	Nötrofiller	Uterus
	İdrar	Tiroid
	Böbrek epitel	

HNP: İnsan nötrofil defensini; HD: İnsan defensini; hBD: İnsan beta defensini

4.1.6 Histatinler

Histatinler, histidin bakımından zengin 32-38 aminoasitten oluşan insan tükürüğünde bulunan antimikrobiyal peptitlerdir. Salyadan gelip diş yüzeyini örten koruyucu bir örtü gibi doğal bir savunma bariyeridirler. 1 μm^2 diş sert doku yüzeyine 10^4 tane histatin molekülü asidik amino terminal ucundan yapışabilir. Histatin tabakası, diş yüzeyinde biyofilm yaparak nonimmün savunma bariyeri oluşturur ve böylece bakterilerin yüzeye adezyonunu engellemiş olur. Gram negatif bakteri dış duvarında bulunan Lipit A'yı bloke eden bir özelliği de vardır. Ayrıca mast hücrelerinin ve diğer immün hücrelerin uyarı eşiğini düşürür. Böylece konak immün sistemini daha kolay alarm durumuna geçecek şekilde muhafaza eder [80].

4.1.7 Katelisidinler

Katelisidinler, antibakteriyel proteinlerin yeni bir grubunu oluşturmaktadır. Son yıllarda insanların ve hayvanların epitel dokuları ile miyeloid hücrelerden tanımlanmışlardır. Katelisidinler, konak savunmasının başlangıç safhasında önemli rol oynar. Katelisidin üretimi enfeksiyöz değişim ve epitelyal yaralanmayı takiben oluşabilir. *Shigella dysenteriae* gibi belli bazı bakteriyel patojenlerin virulans mekanizmalarıyla katelisidin üretimi baskılanabilir. İnsan katelin molekülü, sistein proteinaz inhibitörü işlevini görür. Katelin molekülünün, *E.coli* ve MRSA patojenlerine karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir [81]

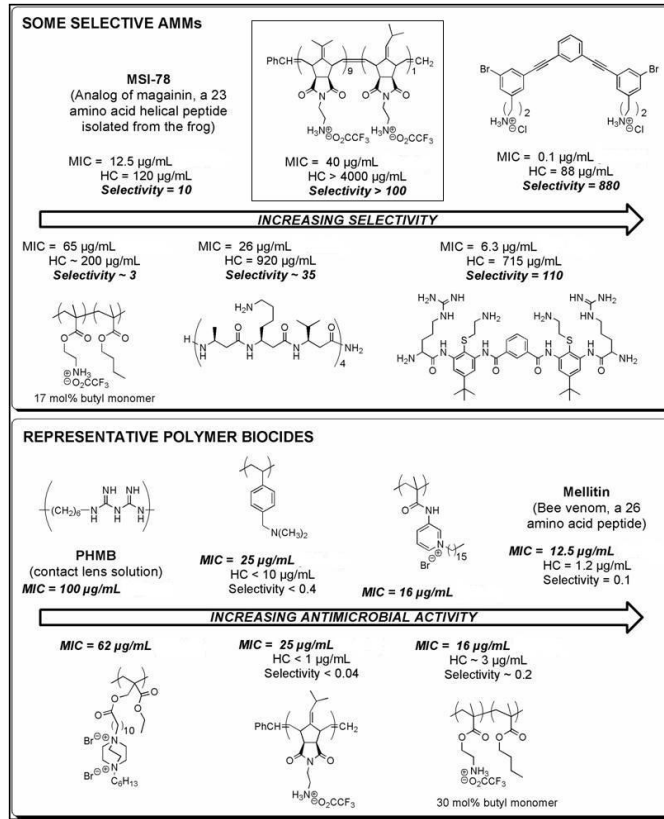
4.1.8 Granülizinler

Granülizinler, katelisidin ve defensin gibi diğer antimikrobiyal peptitlerden farklı bir yapıya sahiptirler. Granülizin, epitelyum tarafından üretilmezler. Fakat T hücreleri tarafından deriye getirilirler ve sadece insanda bulunurlar. Bu peptit, önce 15 kd öncü proteininde sentezlenir ve daha sonra aktif 9 kd katyonik peptit moleküllerine bağlanır. Bakteri, mikobakteri ve mantarlara karşı güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve çeşitli efektör tümör hücrelerine, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere, mantarlara ve parazitlere karşı etkilidir. Granül eksositozisi ile doğal öldürücü hücreler aracılığı ile salınır. Purifiye perforin ile kombinasyonunda, rekombinant granülizin, *Mycobacterium*

tuberculosis'in hücre içeriğini %90 oranında lize eder ve mikobakteriyel hücre yüzeyinde, tahribata sebebiyet verir [81].

4.2 Sentetik Antimikrobiyal Polimerler

Yapılan yeni antibiyotik çalışmaları, katyonik doğal peptitlerin benzerlerinin yapılması, daha aktif ve toksik özelliği düşük sentetik peptit ve türevlerinin sentezlenmesini hedeflenmektedir. Sentezlenen bu moleküllerin sadece antibiyotik olarak kullanımı öngörülmemektedir. Özellikle gıda ambalajlarında, yara bantlarında, sargı bezlerine, kateterlerde, tekstil melzemlerinde, duvar boyalarında uygulanabilecek çok çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır. Peptit türevlerinden ayrı yapılan çalışmalar da antibakteriyel katyonik polimerlerin sentezlenmesi ve uygulamaları ikinci grubun oluşturduğu araştırma grubunu temsil eder [82], [83], [84], [85], [86], [87]. Polimer yapılarının peptitlerden daha kolay bir şekilde sentezlenmesi, ucuz olması ve uzun süreli ortam şartlarına karşı kararlı olması avantaj olarak gözükmektedir. Bununla beraber aynı oranda etkinlik yani düşük konsantrasyon ile etkili bir şekilde zararlı mikroorganizmaları yok etmesi beklenir. Son yapılan kapsamlı yayında literatürde bulunan bazı antibakteriyel polimer ve oligomerlerin yapıları Şekil 4.5'te gösterilmektedir [44].

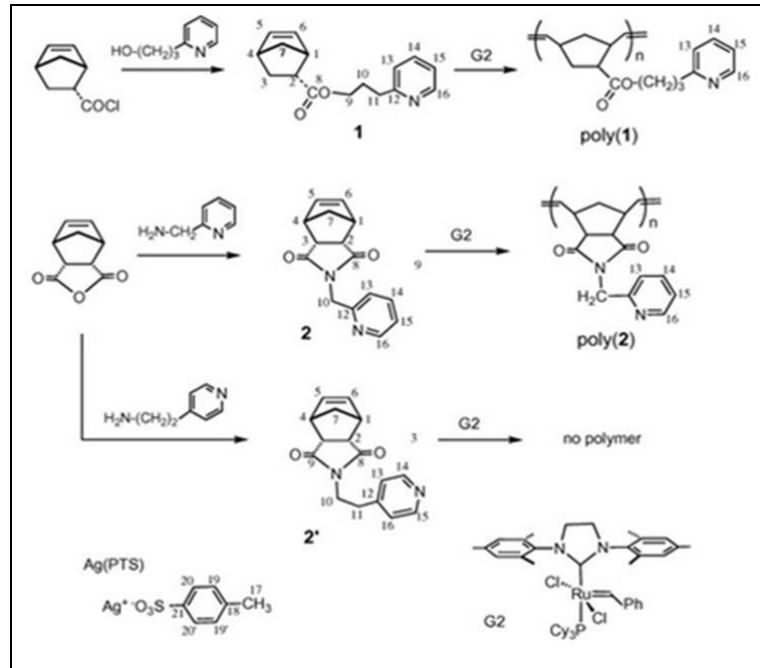


Şekil 4.5 Literatürdeki bazı katyonik antibakteriyel polimerlerin genel yapısı [44]

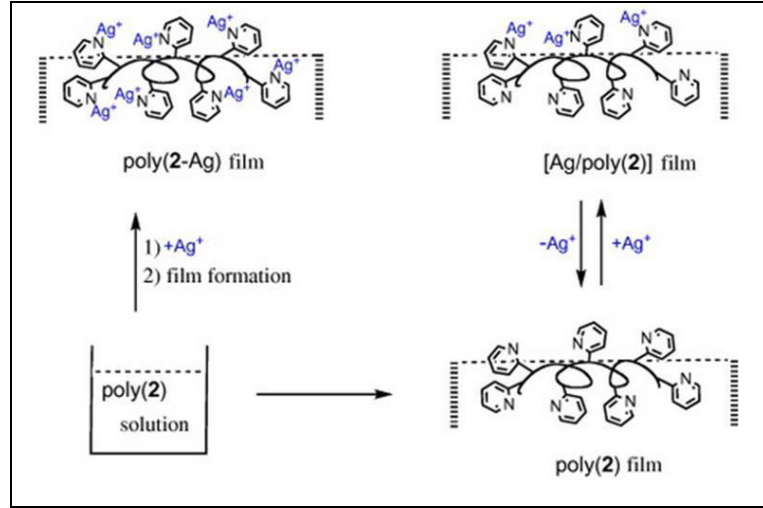
Şekil 4.5'te çerçeve içinde görünen Coughlin ve grubunun yaptıkları polinorbornen bazlı antibakteriyel polimer yüksek oranda seçicilik göstermiştir (> 100) [88]. Burada dikkat edilmesi gereken kısım kopolimerde kullanılan monomer yapıların homopolimerleri aynı özellikleri göstermemiştir. Monomerlerden biri (Poli2) çok aktif olmayan ve aynı zamanda düşük toksik özellik gösteren bir homopolimer oluşturmuştur. Bunun yanında diğer monomer (Poli3) hem çok aktif hemde toksik özellik göstermiştir. Çalışma sırasında seçiciliği artırmak için kopolimer sentezleri düşünülmüş ve 9:1 oranında sentezlenen kopolimer yüksek oranda seçicilik kazanmış ve aynı zamanda bakteriye karşı olan aktivitesini koruduğu görülmüştür. Dikkat edilmesi gereken kısım polimerin ana zincir yapısında hidrofobik özelliği arttıkça toksik ve antibakteriyel özelliğinin artmasıdır.

Wakatsuki ve grubu, gümüş iyonlarıyla tekrar yüklenebilir olan ROMP esaslı antimikrobiyal film çalışmalarında, piridin yan grubu taşıyan iki norbornen türevi hazırlamışlardır: 5-norbornen-endo-2-karboksilik asit'in 3-(piridin-2-il)propil ester'ini (1) ve N-(piridin-2-ilmetil)-5-norbornen-endo-2,3-dikarboksiimid'ini (2). Bu bileşiklerin

her ikisinden de ikinci nesil Grubbs katalisti kullanarak, poli(1) ve poli(2) olmak üzere yüksek verimli ROMP polimerleri elde etmişlerdi (Şekil 4.6). Ag^+ iyonları bu polimer çözeltilerine eklendiğinde, polimer- Ag^+ kompozitleri olan poli(1-Ag) ve poli(2-Ag) kantitatif olarak oluşturulmuştur. Poli(2) ve poli(2-Ag) bileşiklerinin DMF çözeltilerinden film oluşturulmuştur ve ikinci film Gram-pozitif *Bacillus subtilis* ve Gram-negatif *Escherichia coli*'ye karşı güçlü antimikrobiyal özellikler göstermiştir. Alternatif olarak, poly(2) filmi, Ag^+ çözeltisine daldırıldığında, iyon yakalama kabiliyeti göstermiş ve böylece yüzey modifiye filmi $[\text{Ag}/\text{poly}(2)]$ 'yi oluşturmuştur (Şekil 4.7). $[\text{Ag}/\text{poly}(2)]$ de poli(2-Ag)'den oluşturulmuş filmlerle aynı antimikrobiyal etkinliği göstermiştir ki bu da bize film yüzeyinin çözeltideki Ag^+ iyonlarına karşı katı hal reaksiyonunun kantitatif olduğunu gösterir. Tekrar tekrar kullanımlardan sonra $[\text{Ag}/\text{poly}(2)]$ filmi biyosidal etkisini kaybettiğinde, film, gümüş iyonu çözeltisine batırılarak Ag^+ iyonları tekrar yüklenmiş ve orijinal aktivitenin tamamı geri kazandırılmıştır [89].

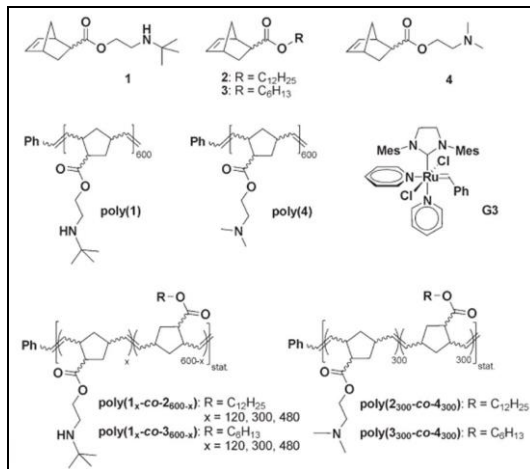


Şekil 4.6 Piridin grubu içeren ROMP polimerlerinin sentezi [89]



Şekil 4.7 Poli(2) filminin Ag^+ iyonu ile etkileşmesi ve yüzey uygulamasının şematik gösterimi [89]

Slugovc ve grubunun yaptığı çalışma, amino fonksiyon gruplu polinorbornenlerin, katı haldeki mikrobiosidal potansiyellerini araştırmak için yapılmıştır. Bir seri ikincil ve üçüncül amin grupları taşıyan norbornen tipte monomerler ve bunun yanında hekzil ve dodesil grupları hazırlanmıştır. Halka açılma metatez polimerizasyonu, amin taşıyan monomerlerin homopolimerlerini ve yüksek molekül ağırlıklı amin ve alkil substitüeli monomerlerin rastgele kopolimerlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan monomerler; iki amino fonksiyonel grubu içeren norbornen türevleri olan 1 ve 4, ve değişik uzunluklarda alkil grupları taşıyan norbornenler olan 2 ve 3 numaralı monomerler Şekil 4.8’de gösterilmiştir. 1 ve 4 numaralı monomerler kullanılarak poli(1) ve poli(4) homopolimerleri hazırlanmıştır. Polimerizasyonlar, Grubbs üçüncü jenerasyon katalist (G3) ile başlatılmıştır [90].



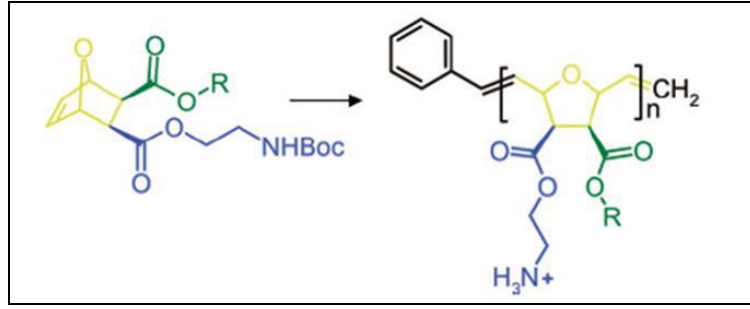
Şekil 4.8 Norbornen esaslı antimikrobiyal polimerlerin sentezi [90]

Polimerlerin bileşimi ve biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişki Gram-negatif (E.coli) ve Gram-pozitif (S.aureus) bakteriler için araştırılmıştır. JIS Z2801 antimikrobiyal testi, polimer filmlerinin antimikrobiyal aktivitelerini tayin etmek için kullanılmıştır. Yüksek amino grup içeriğine sahip homopolimerlerin, E.coli'yi öldürmede en iyi aktiviteyi gösterdiği gözlemlenmiştir. Alkil substitüeli monomer içeren kopolimerizasyon, polimer filmlerinin E.coli'ye karşı olan antimikrobiyal aktivitesini azaltmıştır. Bunun aksine, uzun alkil zincirleri (dodesil) içeren rastgele kopolimerlerin, homopolimerlere ya da onların kısa zincirlerine (heksil) kıyasla, S. aureus'a karşı daha fazla etkinlik göstermiştir. Ayrıca seçilmiş bir kopolimerin (poly(1300-co-2300)), iki fungi türüne karşı (A. niger ve C. albicans) antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. A. Niger'e karşı göze çarpan fungisidal özellikler keşfedilmesine karşın, C. Albicans türünün büyümesi neredeyse bundan hiç etkilenmemiştir. Bu polimerin sitotoksitesi değerlendirilmiş ve Balb/3T3-hücre testlerine göre polimer parçalarında toksisite gözlenmemiştir. Bu çalışma; amin ve hidrofobik gruplar arasındaki uygun dengenin sadece çözelti içinde değil, katı hal içinde de antimikrobiyal etki için önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, amin taşıyan polinorbornenlerin antimikrobiyal etkisini katı halde de devam ettirdiği ilk defa gösterilmiştir. Bunların dışında, polimer filmlerinin mikrobiosidal etkisi çok büyük ölçüde incelenen bakteri ya da fungiye bağlı olduğu görülmüştür [90].

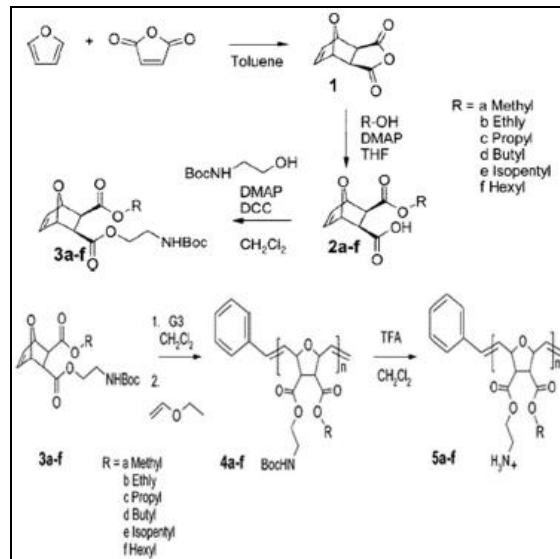
Tew ve grubu, "Moleküler Yapı Kiti" ismiyle adlandırdıkları yaklaşımla, daha önce görülmemiş seçicilikte ROMP esaslı antimikrobiyal polimerler hazırlamışlardır [91], [92].

Antimikrobiyal aktivitenin, hidrofilik ve hidrofobik monomerlerin rastgele kopolimerleri ile başarılabileceğini ortaya konulmuş ve yüzeysel amfifilik monomerleri, diğer bir deyişle, hidrofilik katyonik ve hidrofobik kısımları aynı polimerleşme ünitesinde bulunduran monomerleri kullanarak daha hassas bir bakteriyel aktivite elde edilmiştir [88], [93], [94], [95], [96], [97].

Moleküler yapı kitinin ana bileşenleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Hidrofilik (mavi) ve hidrofobik (yeşil) kısımlar, polimerleşebilir okzonorbornen gruba (sarı) bağlanmıştır ve bağımsız olarak çeşitlendirilebilirler. Bu çalışmalarında, hidrofilik grubu, yani, lizin benzeri birincil amin grubunu sabit tutarken, hidrofobik kısmı değiştirmişlerdir [91].



Şekil 4.9 Amfifilik monomer ve polimerler elde etme amaçlı “Yapı kiti” yaklaşımı. Hidrofilik kısım (mavi), hidrofobik kısım (yeşil) ve polimerleşebilir kısım (sarı) gösterilmiştir [91]



Şekil 4.10 Moleküler kit kapsamında sentezlenen monomer ve polimerlerin yapısı [91]

Moleküler yapı kiti yaklaşımı, çok sayıda ayarlanabilir aktivite ve seçicilikte, amfifilik yüzeyli sentetik antibakteriyal homopolimer ve kopolimerlerin sentezine olanak sağlar.

Yapılan çalışmalarda, 3K homopolimerleri *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı dikkat çekici bir anti-bakteriyal aktivite göstermişlerdir. Bazı 10K homopolimerleri hem memeli hücreleri hem de *S. aureus* üzerine *E. Coli*'yi seçerek, *E. coli* 'ye karşı çifte seçicilik göstermişlerdir (Çizelge 4.2) [91].

Çizelge 4.2 Polimerlerin MIC₉₀ ve HC₅₀ değerleri [91]

sample	MIC ₉₀ $\mu\text{g mL}^{-1}$		HC ₅₀ $\mu\text{g mL}^{-1}$	selectivity	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Methyl_3k	> 200	100	2000	< 10	20
Ethyl_3k	50	50	1400	28	28
Propyl_3k	6.25	15	50	8.3	3.3
Butyl_3k	15	25	<50	<3.3	<2.0
Isopentyl_3k	12.5	50	<50	<4.0	<1.0
Hexyl_3k	> 200	> 200	<50	<0.3	<0.3
Methyl_10k	> 200	> 200	50	< 10	< 10
Ethyl_10k	> 200	> 200	1250	<6.3	<6.3
Propyl_10k	3.75	200	<50	13	<0.25
Butyl_10k	20	> 200	<50	<2.5	<0.3
Isopentyl_8k	50	> 200	<50	<0.3	<0.3
Isopentyl_10k	50	200	<50	<0.3	<0.3
Hexyl_10k	100	> 200	n.d.	n.d.	n.d.

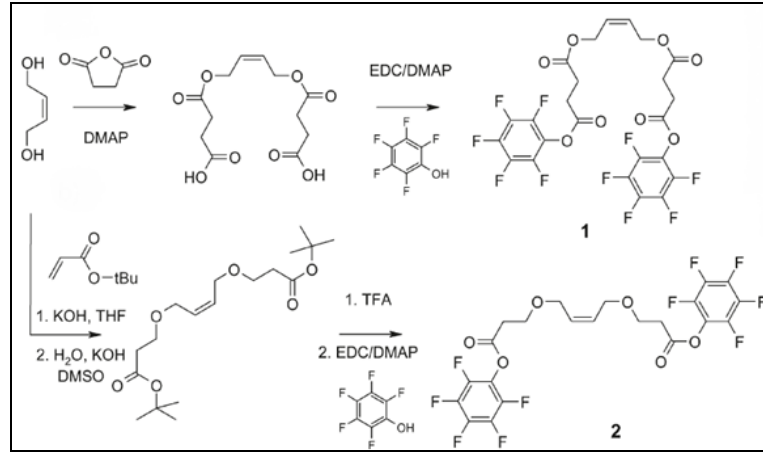
Bunun dışında molekül ağırlığının antibakteriyal aktiviteyi ayarlama bir parametre olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Optimum aktivitenin, *S. aureus*'a karşı 750-1.100 g/mol'de, *E. coli*'ye karşı ise 3.000 g/mol ve 10.000 g/mol'de olduğu bulunmuştur [91].

Tew ve grubu, inaktif/hemolitik olmayan monomer ile aktif/hemolitik monomer kopolimerizasyonu ile birlikte kan hücrelerine karşı *S. aureus* seçiciliğini 533 kat kadar arttırmayı başarmışlardır. Bu polimerler ayrıca, kan hücrelerine karşı 533 kat ve *E. coli*'ye karşı ise 53 kat daha fazla *S. aureus* seçiciliği göstererek, bir çift seçicilik özelliği ortaya koymuştur [91]. *S. aureus*'a karşı bu kadar yüksek bir seçicilikle daha önce karşılaşmamıştır. Bu gelişme özellikle, hastane hastaları için günümüzün en ciddi sağlık tehditlerinden biri olan antibiyotik rezistanlı "süperböcek"e yani, *S. aureus*'un Metisilin-rezistanlı formu olan MRSA'ya karşı umut verici bir gelişmedir.

ROMP antimikrobiyal polimerlerle ilgili olarak bir diğer çalışmada; Tew ve grubu, Grubbs'ın üçüncü nesil katalistini kullanarak halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) ile elde edilen yaşayan polimer zincirlerinin sonunu fonksiyonlu yapmak amacıyla kullanılabilecek iki yeni, alil esaslı sonlandırıcı ajan sunmaktadır. Bu çalışmanın amacı antimikrobiyal polimerlerin bakteri hücrelerini öldürme mekanizmalarını floresans mikroskopide incelenmesidir [98].

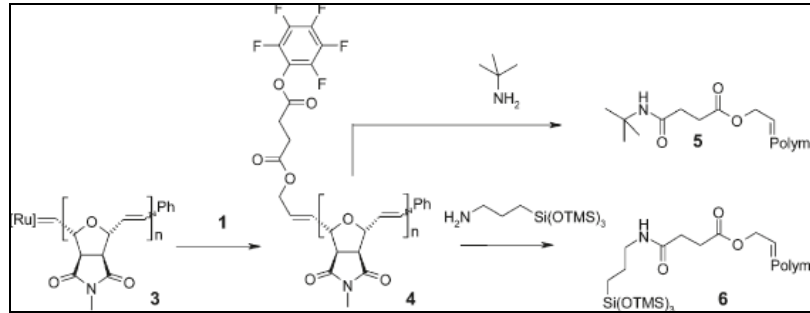
Şekil 4.11'de gösterildiği gibi ROMP polimerinin son grupları floresans özellik gösteren moleküller ile sonlandırılmıştır. Birinci sonlandırıcı ajan, 2-büten-1,4-diol ve süksinik anhidritten elde edilmiş, devamında da EDC bağlayıcı ajan olarak kullanılarak pentafluorofenol ile asit gruplarının esterifikasyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci sonlandırıcı ajan, 2-büten-1,4-diol'ün tert-bütil akrilata Michael katılmasıyla elde

edilmiştir, ardından, trifluoroasetik asit ile koruyucu grup çıkarılmış ve asit gruplarının pentafluorofenol ile esterifikasyonu yapılmıştır [98].



Şekil 4.11 Floresan özellikli sonlandırıcı ajanların sentezi [98]

Bu iki sonlandırıcı ajan da kolayca sentezlenebilir ve zincir sonunda stabil, depolanabilir aktif ester gruplu ROMP polimer ürünleri verebilir. Fonksiyonlu ROMP polimerleri özellikle biyomedikal alanda olmak üzere, gelişmiş polimerik materyaller için cazip birer inşa bloklardır. Antimikrobiyal olarak aktif polimerlerden olan boyayarak etiketleme ve amino silan grupları kullanarak yüzey bağlamada, kullanılan bu son gruplar gösterilmiştir (Şekil 4.12) [98].



Şekil 4.12 Amino silan ile sonlandırılmış polimerlerin sentezi [98]

Yapılan araştırmalarda, floresan boyası ve amin substitüeli yüzeyler gibi küçük moleküllerin, son fonksiyonelli polimer ile kolayca bağlandığı gösterilmiştir. Yüzey fonksiyonilize etme çalışmaları ve antimikrobiyal ve hücreye nüfuz edici peptidlerin boya etiketlemesi de dahil olmak üzere gelecek araştırmalarda bu metoddan yararlanılmıştır [98].

Piridin bazlı katyonik polimerlerin antibakteriyel etkileri bilinmektedir. Piridin bazlı antibakteriyel tuzlarının genel özelliği çevre şartlarında bozunmaması, yani ortamın

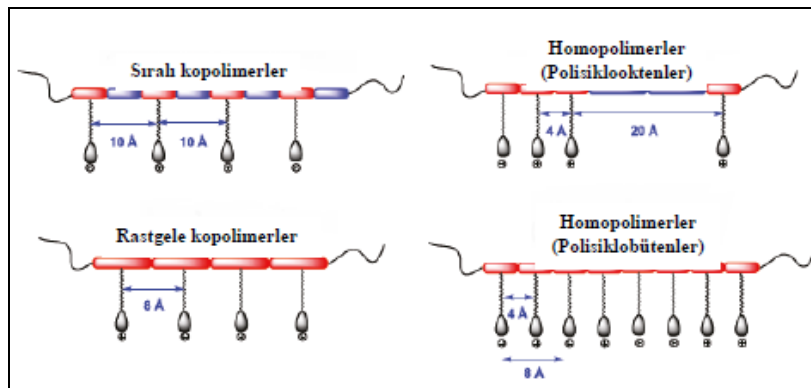
pH'ından etkilenmemesi, uzun süre yüzeylerde aktif özelliğini sürdürmesi ve bakterileri etkili bir şekilde öldürmesidir. Eren, literatürde ilk defa piridin tuzlarının ROMP tekniği ile polimerlerini sentezlemiş ve antibakteriyel etkilerinin yanı sıra hemolitik çalışmalar da yapmıştır . Çizelge 4.3'te polimerlerin MIC ve HC₅₀ değerleri görülmektedir [92].

Çizelge 4.3 Piridin bazlı polinorbornen tuzlarının antibakteriyel ve hemolitik değerleri [92]

Mn (kDa)	Polimer	R	MIC (mg/mL)		HC50 (mg/mL)	selectivity (HC50/MIC)	
			E. coli	B. subtilis		E. coli	B. subtilis
3	4a	etil	200	200	4030	~20	~20
10	4a	etil	200	200	>2000	>20	>20
3	4a'	etil	200	200	>2000	>10	>10
3	4b	bütil	200	200	2000	10	10
10	4b	bütil	200	200	1653	8	8
3	4c	hekzil	12,5	4	<50	<4	<12,5
10	4c	hekzil	12,5	4	202	16	50
3	4d	oktil	4	4	8	1,7	1,7
10	4d	oktil	6	4	<50	<8,3	<12,5
3	4e	desil	12,5	6	7	0,6	1,3
10	4e	desil	12,5	6	<50	<4	<8,3
3	4f	feniletil	12,5	12,5	240	19	19
10	4f	feniletil	12,5	12,5	108	8	8

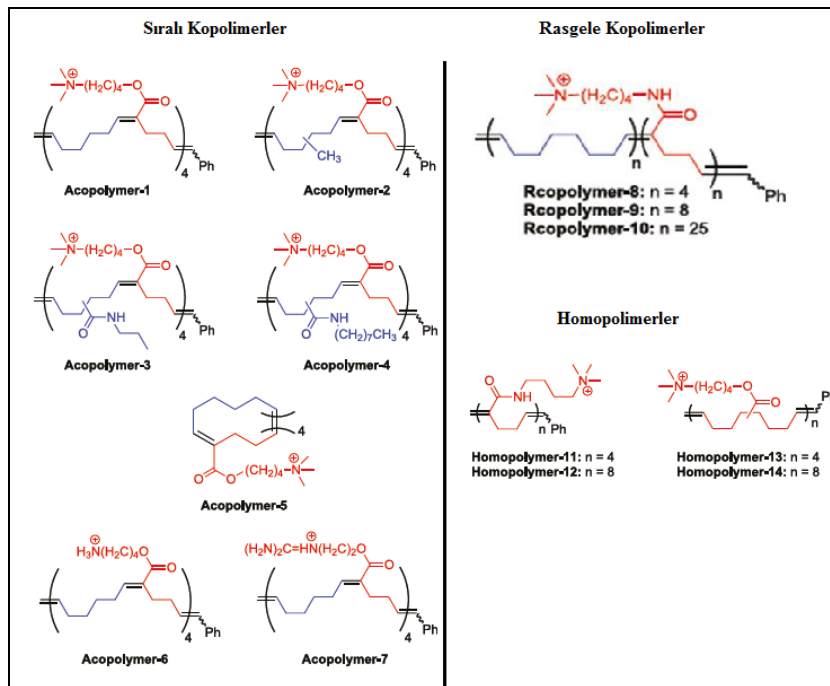
Bu çalışmada polimerlerin hidrofobik gruplarının zincir uzunluğu arttıkça antibakteriyel etkinliklerinin de arttığı; fakat aynı oranda toksikliğin de arttığı görülmektedir.

Sampson ve Parker'ın yaptıkları çalışmada, katyonik ve hidrofobik gruplarını omurgaları üzerinde dağılmış halde bulunduran dört seri polimerin, altı farklı bakteri türüne (hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif) karşı gösterdiği davranışları ve sitotoksiteleri (alyuvar hücrelerinin yıkımını) test etmişlerdir. Bu çalışmalarda sıralı halka açılma metatez polimerizasyonu ile (AROMP) elde ettikleri düzenli polimerlerin, doğrusal bir omurgaya sahip ve düzenli bir şekilde dizilmiş katyonik ve lipofilik kalıntılı hidrokarbon polimerleri sağlayabileceği farkedilmiştir [99], [100].



Şekil 4.13 Polisiklookten ve polisiklobüten esaslı farklı boşluk mesafelerine sahip yan zincirler içeren polimerler [100]

Polimerlerin hidrofilitikleri, siklobüten ve/veya sikloheksen monomerleri üzerindeki sübstitüentlerin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Bunun yanı sıra, yalnız bir fonksiyonel gruba sahip polimerler (homopolimerler) fonksiyonel grup dizilimi şartlarını kıyaslamak için ROMP ile elde edilebilir. Burada, katyonik yan zincirlerine, lipofilik yan zincirler ya da substitüe olmayan bölgeler içeren bir seri sıralı kopolimerin, rastgele polimerin ve homopolimerin antibakteriyel değerlendirmesi ve sentezleri rapor edilmiştir. Test edilen trialkilaminyum, amonyum ve guanidinyum substitüentli polimerler (sıralı kopolimerler, ayarlı Akopolimerler; rastgele kopolimerler, ayarlı Rkopolimerler; homopolimerler), ROMP ile sentezlenmiştir (Şekil 4.14) [100].

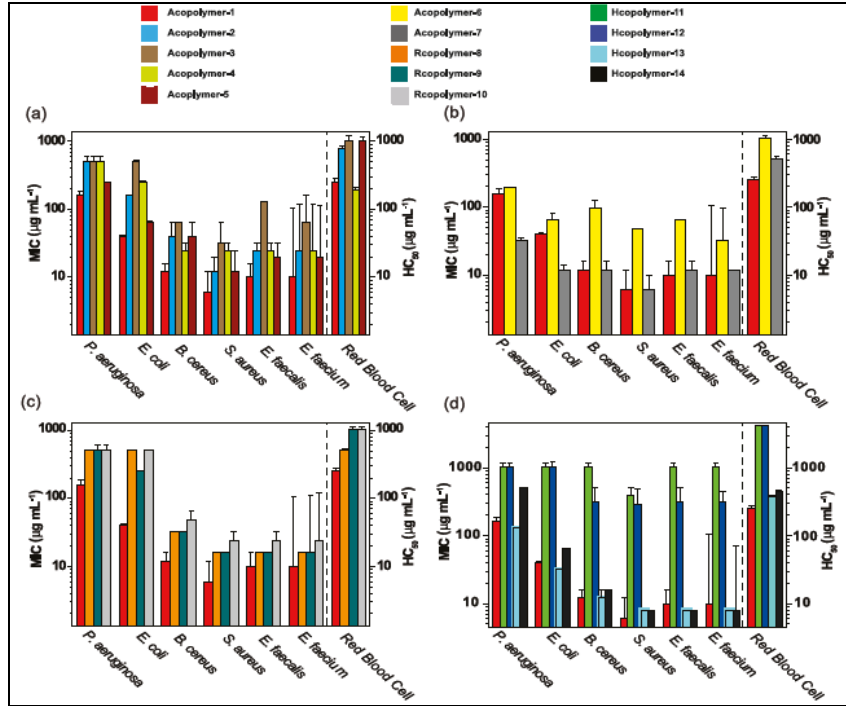


Şekil 4.14 Polisiklookten ve polisiklobüten esaslı amfifilik polimerlerin yapıları [100]

Bu çalışmada ön değerlendirme için, 4-8 ve bir tanesinde de sayısı 25'e varan katyonik grup içeren polimerler hazırlanmıştır. Hidrofobik ve hidrofilik yapıların miktarı ile aktivite anlaşılmaya çalışılmıştır. Etkili antibakteriyel peptidler ve sentetik taklitleri tipik olarak 2-9 katyonik yük içerir [101], [102]. Bununla birlikte, yük yoğunluğunu arttırmak hemolize neden olabilir [101]. Doğal peptidlerin bu özellikleri yapılan çalışmada incelenmiş ve etki mekanizmaları hakkında çalışmalar yapılmıştır.

Sentezlenen polimerler, diğer sentetik polimer taklitlerinde gözlendiği gibi, membranda depolarizasyona yol açmış, liziz ve ardından hücrel bileşenlerin sızmasına neden

olarak, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin altı türüne karşı iyi bir in vitro antibakteriyel aktivite göstermiştir [88]. Ayrıca, eritrosit lizisi sayılarak ölçülen sitotoksosite de düşük çıkmıştır. Benzer omurgaya, boyuta ve fonksiyona sahip fakat değişik aralıklı dizilen rastgele kopolimerlere kıyasla, omurgasında düzenli 8-10 Å'luk sıralamaya sahip antibakteriyel ajanlar daha etkili olmuştur [100].



Şekil 4.15 Sentezlenen amfifilik polimerlerin MIC ve HC₅₀ değerleri [100]

(a) Farklı hidrofobik boşluk mesafeleri bulunan sıralı kopolimerler: Akopolimerler -1,-2,-3,-4,-5; (b) Farklı katyon gruplara sahip sıralı kopolimerler: Akopolimerler -1,-2,-3,-4,-5,-6,-7; (c) Akopolimer-1 ve rastgele sıralı polimerler olan Rkopolimer -8,-9,-10'un karşılaştırılması; (d) Akopolimer-1 ve homopolimerler olan Homopolimerler -11,-12,-13,-14'ün karşılaştırılması

Şekil 4.15'i incelersek; Akopolimer-1'den Akopolimer-4'e hidrofobikliğin değiştirilmesi antibakteriyel aktiviteyi arttırmamıştır. Daha hidrofobik polimerler olan Akopolimer-2 ve Ako-polimer-4, Akopolimer-1'den daha düşük antibakteriyel aktiviteye göstermişlerdir. Bununla birlikte, hidrofobik özelliği arttırmanın diğer taklitlerde gözlemlendiği gibi eritrosit yıkımını arttırmadığı literatürde benzer gözleme göre tespit edilmiştir [88].

Dört polimer kendi içinde incelendiğinde (Akopolimerler -1, -5, -6 ve -7), Akopolimer-1 bakteriyi etkili öldürmede, en iyi mikro yapısal düzeyde hidrofobiklik içerir. Doğal bir peptid olan magainin ile kıyaslandığında, aynı mikrop türüne karşı olan etkisi magaininkinden yaklaşık 10 kat daha fazladır [99]. Akopolimer-5, Akopolimer-1'e kıyasla çok daha düşük antibakteriyel aktivite göstermiştir. Antibakteriyel aktiviteye, ilave katyonik grupların etkisini görmek için Akopolimer-6 ve Akopolimer-7 incelenmiştir. Akopolimerler-1 ve -7 altı bakteri türüne karşı da etkili olmuştur ve ikisinin de *S. aureus*, *E. faecalis* ve *E. faecium*'a karşı olan etkileri çok güçlüdür. Akopolimer-6, Akopolimerler-1 ve -7'den daha az etkili bulunmuştur. Bunun nedeni, Akopolimerler-1 ve -7'nin fizyolojik pH'da tamamen pozitif yüklenirken, nötral tampon çözeltisinde Akopolimer-6'daki primer amin gruplarının tam olarak protonlanmamasıdır. Bu yüzden, diğer antibakteriyel peptid taklitlerinde olduğu gibi, Akopolimerler-1 ve -7'de de pozitif yükler anyonik bakteriyel membrana tutunmayı sağlar [103]. Akopolimer-7'nin, Akopolimer-1'e göre antibakteriyel testlerde biraz daha iyi olmasına rağmen, ilave analog çalışması için sentezinin daha kolay olması nedeniyle guanidinyum yerine trimetil amonyum seçilmiştir.

Rastgele polimerlerin (Rkopolimerler -8, -9 ve -10) *E. coli*, *B. Cereus* ve *S. aureus*'a karşı olan antibakteriyel aktiviteleri, sıralı polimerler olan Akopolimerler-1 ve -7'den yaklaşık 2-6 kat daha düşük çıkmıştır (Şekil 4.15.(c)). Böylece, kuaterner amonyum gruplarının belirli boşluk mesafesinde olmasının, mikroplara karşı gösterilen aktivitede kritik öneme sahip olduğu görülmüştür. Benzer deneysel gözlem Carmeli ve grubu tarafından da tespit edilmiştir [104].

Homopolimerler-11, -12, -13 ve -14, aralardaki boşluk mesafesinin antibakteriyel aktiviteyle olan ilişkisini daha detaylı ve iyi bir şekilde keşfetmek için hazırlanmıştır. Bunlardan homopolimerler-11 ve -12 hiçbir antibakteriyel aktivite göstermemiştir (Şekil 4.15.(d)) ki bu da bize etkili bakteri öldürmek için yük yoğunluklarının çok fazla olduğunu düşündürür. Homopolimerler-13 ve -14 ise özdeş aktivite (Şekil 4.15.(d)) ve seçicilik göstermişlerdir yani, toplam katyonik yükü 4'ten 8'e çıkarmak ağırlık bazında etkiyi arttırmamıştır. Homopolimerler-13 ve -14'ün aktiviteleri ve seçicilikleri, Akopolimer-1 ile kıyaslanabilir düzeydedir [99].

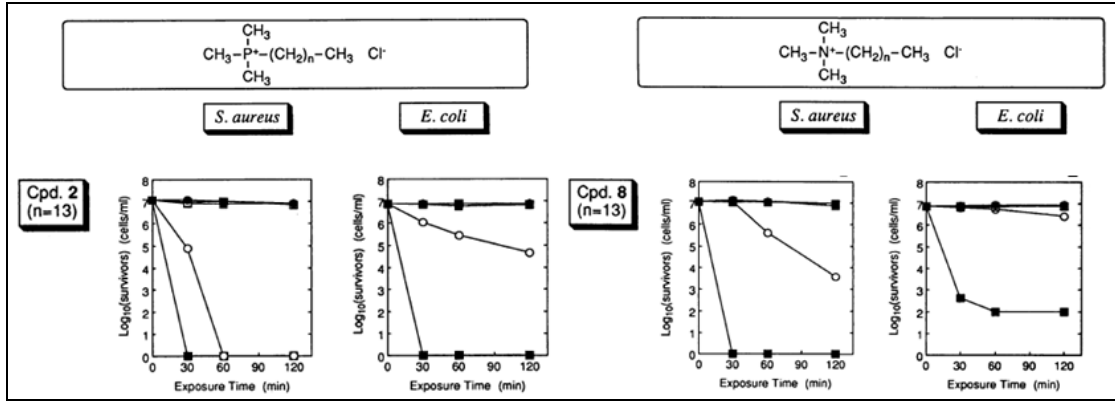
Bu çalışmayla birlikte, antibakteriyel aktivite için, omurga üzerinde yer alan yan zincirler arasındaki minimum mesafenin yaklaşık 8-10 Å olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Sıralı halka açılma metatez reaksiyonundan (AROMP) elde edilmiş bu polimerler, antibakteriyel polimerlerde düzenli aralıklarla dizilmenin ve düzgün dizilmiş iskelet temelli ek fonksiyonel materyallerin önemine kanıt niteliğindedir. Bunun yanı sıra, aradaki boşlukları arttırarak Homopolimer-11'den Homopolimer-12'yi elde ederken, boşlukların hidrofobik özellikte olması gerektiği, bu kısımların katyonik monomerler olması halinde antibakteriyel etkinin artmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmadaki AROMP ve ROMP polimerleri aynı antimikrobiyal peptidler ve onların taklitleri gibi [105], membrandan potasyumu serbest bırakarak ani depolarizasyona ve ardından hücre ölümüne yol açmıştır [99].

Burada çalışılan düzgün boşluk mesafesi, hidrofobiklik ve yüke ek olarak, bu ilave parametrelerin ileride daha da iyi ayarlanması bakteriyel membrana ya da tanımlanamayan hücresel reseptörlere tutunmayı geliştirebileceği düşünülmektedir [100].

4.2.1 Fosfonyum Esaslı Antimikrobiyal Polimerler

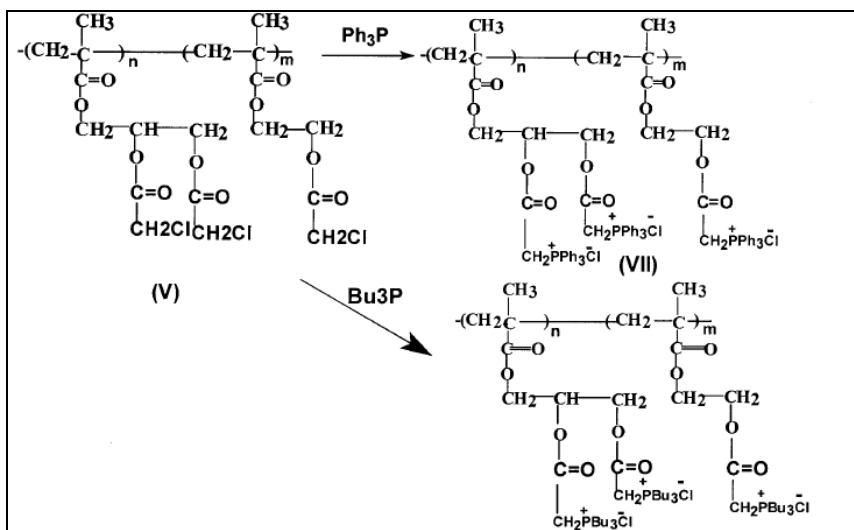
Literatüre baktığımızda fosfonyum tuzu içeren antimikrobiyal polimerlerin daha önce ROMP ile yapılmadığı görülmektedir. Endo ve arkadaşları geniş bir yelpazedeki bakterilere karşı etkinliği olan çeşitli fosfonyum tuzu içeren biyositler ile çalışmışlardır [46]. Antimikrobiyal aktivite canlı hücre sayımı metodu ile gerçekleştirilmiştir ve bakteri olarak 10^7 konsantrasyonuna sahip E.coli IFO 3806 ve S.aureus IFO 12732 kullanılmıştır. Kuaterner amonyum ve fosfonyum tuzlarını karşılaştırmak için tetradeciltrimetilfosfonyum klorür ve tetradeciltrimetilamonyum klorür kullanılmıştır. Bakterilere sırası ile (■)280 µM, (○)28 µM, (▲)2,8 µM ve (▣)0,28 µM biyosit çözeltileri konmuştur. Fosfonyum tuzu içerenden 280 µM eklendiğinde hem S.aureus hem de E.coli'yi 30 dakika sonra bütün hücrelerini öldürdüğü gözlenmiştir. Kuaterner amonyum içerene bakacak olursak aynı konsantrasyonda S.aureus'u fosfonyumlu gibi 30 dakikada hepsini öldürdüğü fakat E.coli hücrelerinin hepsini öldürmediği görülmüştür (Şekil 4.16). Konsantrasyonu seyreltip 28 µM'a getirdiğimizde fosfonyum tuzu içeren biyositin S.aureus hücrelerinin hepsini 60 dakikada öldürdüğü, kuaterner

amonyum içerenin ise hepsini öldüremediği gözlenmiştir. Bu çalışmada fosfonyum içeren biyositlerin, benzer şekilde kuaterner amonyum içerenlerden antimikrobiyal olarak daha etkin oldukları bulunmuştur [106].



Şekil 4.16 Fosfonyum ve kuaterner amonyum tuzu içeren biyositlerin canlı hücre sayımları [106]

Glisidil metakrilat ve 2-hidroksietilmetakrilat esaslı kuaterner amonyum ve fosfonyum tuzlarının rastgele kopolimerleri serbest radikal polimerizasyonu ve postpolimerizasyon modifikasyonu ile Kenawy ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir. Kopolimer için trifenilfosfin ve tribütilfosfin kullanılmıştır (Şekil 4.17). Farklı bakterilere karşı disk difüzyon metodu uygulanmıştır ve her iki fosfor tuzu içiren kopolimerin de yayılım yaptığı görülmüştür. En fazla yayılım 50 ve 60 mm ile *P. aeruginosa*'ya karşı olduğu hesaplanmıştır. Bu verilere göre Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı tribütilfosfin içeren kopolimerin ise daha aktif olduğu bulunmuştur [107].

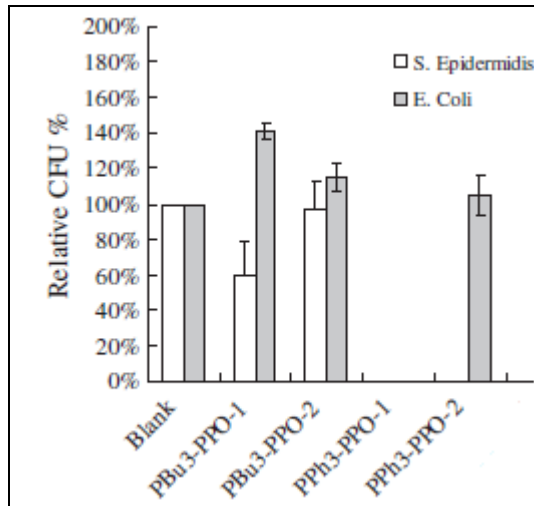


Şekil 4.17 Glisidil metakrilat ve 2-hidroksietilmetakrilat esaslı kuaterner fosfonyum tuzlarının polimerizasyonunun şematik gösterimi [107]

Çizelge 4.4 Trifenilfosfin ve tribütilfosfin tuzlu kopolimerlerin disk difüzyon sonuçları [107]

Bakteriler	Fosfonyum Grupları	
	PPH ₃	PBu ₃
E.coli	40	30
P.aeruginosa	50	60
Shigella sp.	30	30
Salmonella typhae	44	42
B.subtilis	30	40
B.cereus	12	20

Liang ve arkadaşları, poly(fenilenoksit) (PPO) omurgasından oluşan tersiyer amin ve fosforlu metil-bromlu PPO 'nun kuaternizasyon reaksiyonlarından yeni antimikrobiyal katyonik polimerler sınıfı hazırladı. Metil-bromürlü poli(2,6-dimetil-1,4-fenilenoksit (BPPO) bromlama oranı %46,4 (PPO-1) ve %24,8 (PPO-2) olmak üzere iki farklı şekilde elde edilmiştir ve trifenilfosfin ve tribütilfosfin ile tuzları oluşturularak polimerizasyon yapılmıştır. İlginç bir şekilde trifenilfosfin içeren polimerlerden PPH₃-PPO1'in (%45,5 trifenilfosfinli tuz içerir) hem E.coli hem de S.epidermidis'e karşı aktifliği gözlenirken tribütilfosfin içeren polimerlerin sadece S.epidermidis'e karşı aktif olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.18 ve Çizelge 4.5). Polimerlerin ayrıca Hs68 fibroblastlar ile uyumlu oldukları bulunmuştur. Bu farklılık, fenil kısımlarından gelen dengeli hidrofobisitenin karmaşık Gram negatif hücre yüzeyleri ile etkileşimi kolaylaştırmasına bağlanabilir [108].



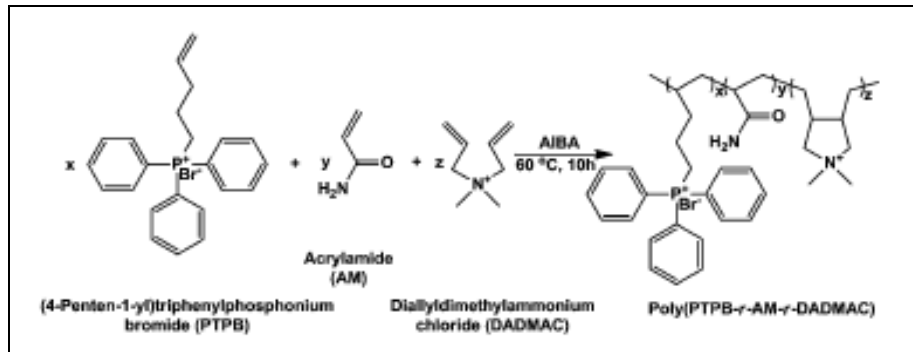
Şekil 4.18 Kuartinize PPO ile polimerlerinin büyüme inhibisyonları [108]

Çizelge 4.5 Kuartize PPO ile polimerlerinin MIC değerleri [108]

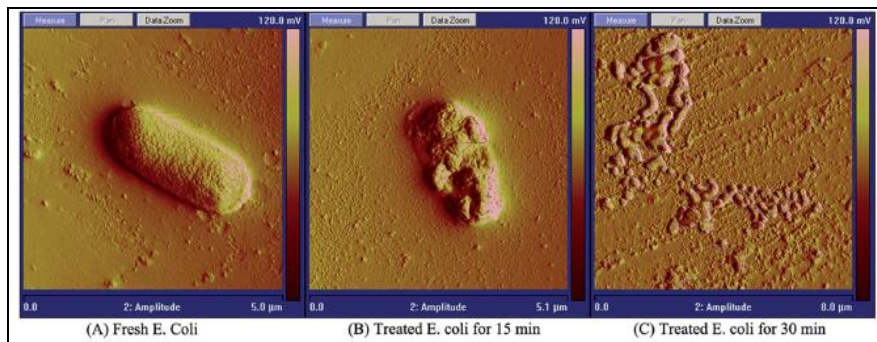
Polymer	Molar contents of salt (%)	MIC of <i>S. Epidermidis</i> (mg/mL)	MIC of <i>E. Coli</i> (mg/mL)
PPh ₃ -PPO-1	45.5	2.5	20
PPh ₃ -PPO-2	20.9	12.5	–
TEDA-PPO-1	39.2	2.5	–
TEDA-PPO-2	21.4	>15	–
TEA-PPO-1	35.8	10	–

* TEDA: trietildiamin; TEA: trietilenamin; PPO-1: bromlama oranı %46,4 olan metil-bromürlü poli(2,6-dimetil-1,4-fenilenoksit; PPO-2: bromlama oranı %24,8 olan metil-bromürlü poli(2,6-dimetil-1,4-fenilenoksit)

Amin, amonyum ve fosfonyum içeren katyonik poli akrilamid tripolimerler (PPAD) Zhao ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır. Bakterisidal ve virüsidal aktivite gösteren polimerler serbest radikal çözültisi polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Fosfonyum tuzu olarak olarak (4-penten-1-il)trifenilfosfonyum bromür kullanılmıştır. Bu polimerden 100 µg/mL E.coli üzerine eklenerek Şekil 4.20’de görülen AFM altında görüntüsü çekilmiştir. 15 dakika sonunda E.colinin hücre duvarının parçalanmaya başladığı; 30. Dakikada ise E.coli hücresinin tamamen yokolduğu görülmüştür [109].

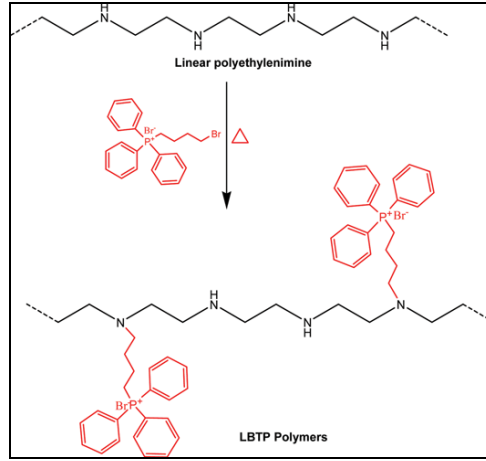


Şekil 4.19 (4-penten-1-il)trifenilfosfonyum bromür içeren tripolimerin sentetik gösterimi [109]



Şekil 4.20 (4-penten-1-il)trifenilfosfonyum bromür içeren tripolimerin AFM görüntüsü [109]

Bansal ve arkadaşları, amin-fosforyum (N-P) hibrit polimerlerinin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerine karşı antimikrobiyal etkinlikleri üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada lineer polietileniminin %10, %20, %30, %40 ve %50 oranında bütiltrifenilfosforyumbromür içeren son derece yüklü katyonik aşı kopolimerleri (LBTP) sentezlenmiştir. Lineer polietilenimini seçmelerinin en büyük sebebi ise toksik olmayan bir polimer olmasıdır. Şekil 4.21’de polimerin sentetik gösterimi görülmektedir [110].



Şekil 4.21 Bütiltrifenilfosforyumbromür içeren polietileniminin sentetik gösterimi [110]

Lineer polietileniminin (IPEI) zeta potansiyeli +25,9 mV olduğu ve kopolimerin içerdiği yüzde bütiltrifenilfosforyumbromür arttıkça teorik olarak beklenildiği gibi katyonik yüklerinin arttığı zeta potansiyel ölçülerek bulunmuştur. Ayrıca ^1H NMR ile bu bütiltrifenilfosforyumbromür yüzdelerinin teorik olarak istenilen yüzdelerden çok daha küçük değerde elde edildikleri bulunmuştur (Çizelge 4.6). Antibakteriyel etkinlik yöntemlerinden biri olan disk difüzyon metodu, Gram pozitif olan *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus* ve Gram negatif olan *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* ve *Salmonella enteric typhimurium*’a uygulanmıştır. Sentezlenen kopolimerlerinin hepsinin difüzyon yaptıkları ve test edilen bütün bakterilere karşı en fazla difüzyon yapanın LBTP-40 olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.6 LBTP aşı kopolimerlerinin zeta potansiyel ölçümü ve ¹H NMR ile bulunan % substütie oranları [110]

Sample ID	Zeta potential (mV)	Attempted substitution	Found substitution
LBTP-10	+29.3 ± 1.2	10%	5.48%
LBTP-20	+30.4 ± 1.1	20%	6.03%
LBTP-30	+31.4 ± 1.3	30%	6.86%
LBTP-40	+31.7 ± 2.0	40%	7.56%
LBTP-50	+34.4 ± 1.1	50%	10.3%
IPEI	+25.9 ± 1.0	—	—

MIC değerleri *Bacillus subtilis* ve *E. coli*'ye karşı test edilmiştir ve içerdiği yüzde bütiltrifenilfosfonyumbromür miktarı arttıkça antibakteriyel etkinliğinin de arttığı, maksimum etkinliği ilk LBTP-40'ta gösterdiği ve değerin sabit kalarak LBTP-50'nin de aynı değer olan *Bacillus subtilis*'e karşı 5 µg/mL, *E. coli*'ye karşı ise 15 µg/mL olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.22).

Polymer	Zone of inhibition (mm) ^a							MIC (µg/mL) ^b	
	Gram-positive bacteria			Gram-negative bacteria				BS	EC
	BS	BC	SA	EC	PA	KP	ST		
L-PEI	10.67 ± 0.58	11.67 ± 0.58	11.33 ± 0.58	12 ± 1.0	11.33 ± 0.58	10.67 ± 0.58	11.33 ± 0.58	40	40
LBTP-10	11.33 ± 1.52	12.67 ± 1.15	11.67 ± 0.58	12.67 ± 0.58	12.33 ± 0.58	12 ± 1.0	12 ± 0.58	40	50
LBTP-20	12.33 ± 2.30	12.67 ± 0.58	13.67 ± 0.58	12.33 ± 0.58	12.33 ± 0.58	12 ± 0.58	12 ± 0.58	20	40
LBTP-30	12.67 ± 2.88	13.33 ± 0.58	13.67 ± 2.30	12.67 ± 0.58	12.33 ± 0.58	11.67 ± 1.0	11.67 ± 0.58	10	30
LBTP-40	14 ± 1.73	13.67 ± 0.58	14.67 ± 2.30	13 ± 1.0	12.67 ± 1.0	12 ± 0.58	14.33 ± 1.15	5	15
LBTP-50	13.6 ± 1.15	13.33 ± 0.58	13.33 ± 0.58	13 ± 1.0	13 ± 0.58	11.67 ± 1.0	15 ± 0.58	5	15
Milli-Q water	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Şekil 4.22 LBTP kopolimerlerinin disk difüzyon ve MIC sonuçları

DENEYSEL ÇALIŞMA VE BULGULAR

5.1 Materyal ve Yöntem

5.1.1 Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tetrahidrofuran, diklorometan, etanol, metanol, petrolyum eter, etil asetat, dietil eter, kloroform, hekzan, dimetilsülfoksit, N,N-dimetilformamid, pentan, trifloroetanol, furan, etilvinileter Sigma-Aldrich'ten temin edildi. Sodyumsülfat, Grubbs katalist 2. Jenerasyon, 3-bromopiridin, maleik anhidrit, sodyum floresein, trifenilfosfin, tris(4-metoksifenil)fosfin, trimetilfosfin, trietilfosfin, tripropilfosfin, tritertbütillfosfin, 3-bromopropilamin hidrobromür Sigma-Aldrich'ten alındı.

5.1.2 Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Gereçler

Infrared spektrumları ATR cihazı ile “Perkin-Elmer, FT-IR” spektrofotometresinde, katyonik yük yoğunluğu analizi UV-Vis spektrofotometresinde Yıldız Teknik Üniversitesi Enstrümantel Analiz Laboratuvarı'nda alındı. Nükleer manyetik rezonans spektrumları (^1H NMR (500 MHz) ve ^{13}C NMR (75 MHz) spektrumları) Yıldız Teknik Üniversitesi NMR Laboratuvarında “Bruker-500 MHz NMR” cihazı ile, çözücü olarak d-DMSO, CDCl_3 ve standart olarak TMS kullanılarak alındı. Ayrıca ^{31}P NMR spektrumları Boğaziçi Üniversitesi İleri Teknolojiler Ar-Ge Merkez Laboratuvarları NMR Araştırma Laboratuvarında “The Varian Mercury-VX 400 MHz BB” cihazı ile alındı. Yüzey kaplama için Yıldız Teknik Üniversitesi Fizikokimya Laboratuvarında bulunan

“Spincoat G3-8 Spin Coating System” kullanıldı. Kaplanan yüzeylerdeki polimer görüntüleri ve bulundurduğu P (fosfor) miktarları analizi için Boğaziçi Üniversitesi R&D Merkezi Electron Mikroskopu ve Mikroanaliz Birimi’ndeki “The Philips XL30 ESEM-FEG/EDAX system” kullanıldı. Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde “Malvern Zetasizer nano zs (633 nm dalga boyu, 175° yayılma açısı-scattering angle, - 172,2 toluen sayım oranı -toluene count rate)” cihazı ile polimerlerin zeta potansiyelleri ve Viscotek GPCmax (CATSEC 300 kolon, 0,400 mL/dak akış hızı) ile ortalama molekül ağırlıkları (M_n) ölçüldü. Fransa Institut National des Sciences Appliquées de Rouen’da “GBX goniometer” ile temas açıları hesaplandı.

5.2 Monomerlerin Sentezi

5.2.1 Furan Maleik Anhidrit Diels Alder Ürününün (4,10-Dioxa-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 1)

63 g (642 mmol) maleik anhidrit, tetrahidrofuran içerisinde çözüldükten sonra 48 mL (660 mmol) furan ortama pipet ile eklendi. 5 dakika azot gazı altında karışım yapıldıktan sonra reaksiyon durduruldu ve oda sıcaklığında karanlıkta 4 gün beklendi. Dört günün sonunda flask içerisinde maleik anhidrit furan ürünü olan beyaz okzanorbornen kristalleri ortamda görüldü. Kristaller soğuk THF ile yıkanarak saflaştırıldı. Reaksiyon verimi %78 ve Diels-Alder ürünün hepsi ekzo-norbornen olarak elde edildi.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 6.6, 5.5, 3,2.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 172, 137, 82, 48.

5.2.2 Bromookzanorbornen (4-(3-bromopropyl)-10-oxa-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 2)

NaHCO_3 (5,44 gram, 65 mmol) 50 mL beher içinde suda çözüldü. Daha sonra çözelti üzerine 3-bromopropilamin hidrobromür (14,24 gram, 65 mmol) spatül ile yavaşça eklendi. Birkaç dakika karıştırıldıktan sonra Ürün 1 (10 gram, 60,24 mmol) spatül ile ilave edildi. Beyaz köpürme gözlemlendi. Reaksiyon oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karıştırıldı. Vakum altında 3x20 mL su ve 3x20 mL dietileter ile yıkandı ve beyaz renkli

ürünün kuruması için vakum etüvüne konuldu. İkinci aşamada, sodyum asetat (0,72 gram, 8,28 mmol) ve asetik anhidrit (16 mL) süspansiyonu 2 boyunlu balon içerisinde 90°C’de 10 dakika karıştırıldı. Bu karışımın üzerine vakum etüvünden alınan beyaz ürün (4 gram, 13,16 mmol) karışan solüsyona yavaşça eklendi ve 1 saat 90°C’de karıştırıldı. Reaksiyon sonlandırılırken, 250 mL’lik beherde bulunan 20 gram buzun içine döküldü ve 50 mL kloroform ile karıştırıldı. Kloroform fazı, 3x30 mL %5’lik NaHCO₃ ve 1x30 mL %10’luk NaCl ile ekstre edildikten sonra, Na₂SO₄ eklenerek kurutuldu, süzüldü ve çözücü vakum altında uçuruldu. Elde edilen vizkoz sıvı daha sonra kolon kromatografisi (Etilasetat-Hekzan 1:1 v/v) yapılarak saflaştırıldı ve beyaz katı madde elde edildi (Verim %40) [111].

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

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

5.2.3 Trifenil Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Phe)

Ürün 2 (0,5 gram, 1,748 mmol) ile trifenilfosfin (1,376 gram, 5,244 mmol) 11 mL etilasetat bulunan septum kapaklı bir flask içerisinde 50°C’de azot gazı altında bir hafta karıştırıldı. Bir hafta sonunda reaksiyon kabı oda sıcaklığına soğutulduktan sonra önce etil asetat, sonra THF ile santrifüj kullanılarak birkaç defa yıkama yapıldı ve azot altında kurutuldu (Verim %12).

5.2.4 Tris(4-metoksifenil) Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Metoksi_Phe)

0,2 g Ürün 2 ile 0,74 g tris(4-metoksifenil)fosfin, tek boyunlu septum kapaklı bir balon içerisinde bulunan 7 mL etil asetatta, 50°’de ve N₂ altında 1 hafta karıştırıldı. Reaksiyon kabındaki madde dietil eter ile çöktürlüdü ve dietil eter ile yıkandı (Verim %19).

5.2.5 Trimetil Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Metil)

1 g Ürün 2 ile 10,5 mL THF’de çözünmüş 1M trimetilfosfine 10 mL THF eklendi ve alüminyum folyoya sarılmış septum kapaklı tek boyunlu balonda 50°C’de, N₂ altında, 24

saat karıştırıldı. Reaksiyon oda sıcaklığına getirildikten sonra THF ile yıkama yapılarak reaksiyona girmemiş maddeler uzaklaştırıldı (Verim % 26).

5.2.6 Trietil Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Etil)

0,5 g Ürün 2 ile 5,25 mL THF'de çözünmüş 1M trietilfosfine 5 mL THF eklendi ve alüminyum folyoya sarılmış septum kapaklı tek boyunlu balonda 50°C'de, N₂ altında, 24 saat karıştırıldı. Reaksiyon oda sıcaklığına getirildikten sonra THF ile yıkama yapılarak reaksiyona girmemiş maddeler uzaklaştırıldı (Verim % 26).

5.2.7 Tripropil Fosforyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_Propil)

Ürün 2 (0,5 gram, 1,748 mmol), septum kapaklı vialde, 8 mL THF içinde çözüldü. N₂ altında şırınga ile %97'lik Tripropil Fosfin (1,119 mL, d=0,801 g/mL) eklendi ve 50°C'de, 24 saat karıştırıldı. Reaksiyon sırasında beyaz kristaller oluştuğu gözlemlendi, reaksiyon buz banyosunda kristallenme yapılarak saflaştırıldı. Çözücü karışımı THF-Dietileter (1:1 v/v) ile yıkama yapıldı ve N₂ altında kurutuldu (Verim %53).

5.2.8 Tri(t-bütil) Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (P_t-Bütil)

0,58 gr (2,03 mmol) Ürün 2 ile 1,47 mL tri tert-butilfosfin (6,09 mmol) tek boyunlu balon içerisinde 6 mL THF ilave edilerek N₂ altında, 60°C'de bir gün karıştırıldı. Dietil eter ile yıkama yapılarak saflaştırıldı (Verim %21).

5.3 Grubbs 3. Jenerasyon Katalistinin Sentezi

Grubbs 3. jenerasyon katalisti, Grubbs 2. jenerasyon katalistinden sentezlenmektedir. 0,2 g Grubbs 2. jenerasyon septum kapaklı vial içine konuldu ve üzerine 0,5 mL 3-bromopridin eklenerek N₂ altında 10 dakika süreyle karıştırıldı. Daha sonra pentan ile çöktürülüp yine pentan ile yıkandı. Azot ile kurutulup ışıktan etkilenmesi önlenmesi için alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi. (Grubbs 3. jenerasyon katalistinin molekül ağırlığı M_A: 884,48 g/mol).

5.4 Fosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Monomerlerinin ROMP ile Polimerizasyonları

Bütün polimerler 3.000 ve 10.000 g/mol olmak üzere iki farklı ortalama molekül ağırlığı hesaplanarak sentezlenmiştir. Sentez prosedürlerinde sadece 3.000 g/mol ağırlığındaki polimerlerin sentezi hakkında bilgi verilecektir. Teorik 10.000 g/mol ağırlığındaki homopolimerin sentezi monomer konsantrasyonunun Grubbs katalist konsantrasyonuna oranı ayarlanarak elde edilmektedir. Homopolimerizasyon için uygulanan hesaplama aşağıda verilmektedir.

$$DP = \frac{3000}{M} = n \quad (5.1)$$

$$n = \frac{[monomer]}{[kataliz]} \quad (5.2)$$

$$DP = \frac{10000}{M} = n \quad (5.3)$$

DP: polimerizasyon derecesi

M: monomerin molekül ağırlığı (g/mol)

5.4.1 Trifenil Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Phe_3K)

0,02 g monomer karıştırıcıya konularak 1 mL kuru diklorometanda çözüldü. Çözelti berrak olunca 0,5 mL kuru diklorometanda çözülmüş 0,0059 g Grubbs 3 tek bir seferde monomer çözeltisine eklendi ve hemen kapağı kapatılarak balondan şırınga ile N₂ verildi. Reaksiyon oda sıcaklığında 1 saat karıştıktan sonra katalisti etkinliğini sonlandırmak için 0,5 mL %30 etil vinil eter (diklorometan içinde) eklendi ve 30 dakika daha karıştırıldı. Süre sonunda reaksiyon kabına dietil eter eklenerek çöktürüldü. Dietil eter ile yıkama yapıldı ve azot gazı ile kurutuldu.

5.4.2 Tris(4-metoksifenil) Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Metoksi_Phe_3K)

0,04 g monomer karıştırıcıya konularak 1 mL kuru diklorometanda çözüldü. Çözelti berrak olunca 0,5 mL kuru diklorometanda çözülmüş 0,0118 g Grubbs 3 katalisti tek bir

seferde monomer çözeltisine eklendi ve kapağı kapatılarak balondan şırınga ile N₂ verildi. 1 saat sonra 0,5 mL %30 etil vinil eter (diklorometan içinde) eklendi. Reaksiyon 30 dakika sonra durdurulup dietil eter eklenerek çöktürüldü. Dietil eter ile yıkama yapıldı ve N₂ ile kurutuldu.

5.4.3 Trimetil Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Metil_3K)

0,03 g monomer karıştırıcıya konularak 1,5 mL trifloroetanolda çözöldü. Çözelti berrak olunca 0,5 mL kuru diklorometanda çözölmüş 0,0088 g Grubbs 3 katalisti tek bir seferde monomer çözeltisine eklendi ve kapağı kapatılarak balondan şırınga ile N₂ verildi. Reaksiyon bir gece boyunca karıştırıldıktan sonra 0,5 mL %30 etil vinil eter (diklorometan içinde) eklendi. Reaksiyon 30 dakika sonra durdurulup THF eklenerek çöktürüldü. THF ile yıkama yapıldı ve N₂ ile kurutuldu.

5.4.4 Trietil Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Etil_3K)

0,02 g monomer karıştırıcıya konularak 1 mL kuru DMF'de çözöldü. Çözelti berrak olunca 0,5 mL kuru diklorometanda çözölmüş 0,0059 g Grubbs 3 tek bir seferde monomer çözeltisine eklendi ve hemen kapağı kapatılarak balondan şırınga ile N₂ verildi. Reaksiyon oda sıcaklığında 1 gece boyunca karıştırıldıktan sonra 0,5 mL %30 etil vinil eter (diklorometan içinde) eklendi ve 30 dakika sonra durdurulup THF eklenerek çöktürüldü. THF ile yıkama yapıldı ve azot gazıyla kurutuldu.

5.4.5 Tripropil Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_Propil_3K)

0,1 g monomer karıştırıcıya konularak 2 mL kuru DMF'de çözöldü. Çözelti berrak olunca 0,5 mL kuru diklorometanda çözölmüş 0,0295 g Grubbs 3 tek bir seferde monomer çözeltisine eklendi ve hemen kapağı kapatılarak balondan şırınga ile N₂ verildi. 1 gece boyunca karıştırıldıktan sonra 0,5 mL %30 etil vinil eter (diklorometan içinde) eklendi. Reaksiyon 30 dakika karıştırıldıktan sonra THF eklenerek çöktürüldü. THF ile yıkama yapıp ve azot gazıyla kurutuldu.

5.4.6 Tri(t-bütil) Fosfonyum Tuzu İçeren Homopolimerin Sentezi (P_t-Bütil_3K)

0,07 g monomer karıştırıcıya konularak 2 mL kuru DCM'de çözüldü. Çözelti berrak olunca 0,5 mL kuru diklorometanda çözülmüş 0,0206 g Grubbs 3 tek bir seferde monomer çözeltisine eklendi ve hemen kapağı kapatılarak balondan şırınga ile N₂ verildi. 1 gece boyunca karıştırıldıktan sonra 0,5 mL %30 etil vinil eter (diklorometan içinde) eklendi. Reaksiyon 30 dakika karıştırıldıktan sonra dietileter eklenerek çöktürüldü. THF-Dietileter 1:1 ile yıkama yapıldı ve N₂ ile kurutuldu.

5.5 Polimerlerin Sıvı ve Katı Fazdaki Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi

5.5.1 MIC Değerlerinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal ajanların MIC değerlerinin tespit edilmesi için dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler antimikrobiyal duyarlılık testleri için referans yöntemlerdir. Dilüsyon testlerinde, antimikrobiyal ajanın dilüsyonlarını içeren mikropak kuyucuklarında ya da agar yüzeyinde üremenin gözle görülebilir olması temel alınır. Bir mikroorganizmanın gözle görülebilir olarak üremesinin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu "Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIC)" olarak belirlenir [112].

Her madde 1 mg/mL olacak şekilde çözücü madde de çözüldü. Besiyerinde, bir gece 37°C'de üremiş mikroorganizmalardan 0,5 McFarland (1×10^8 CFU/mL) süspansiyonlar hazırlandı ve bu süspansiyon 1:200 oranında seyreltildi (5×10^5 CFU/mL). 96 kuyucuklu platelere 0,1 mL sıvı besiyeri (LB broth) eklendi. Üzerlerine 0,01 mL mikroorganizma süspansiyonundan eklendi. 10 adet kuyucuğa sırasıyla ½ oranında MIC testi yapılan maddenin seri dilüsyonları yapıldı. Diğer tüplerden birine sadece besiyeri konuldu ve bu tüp negatif kontrol olarak belirlendi, kalan tüpe ise sadece mikroorganizma konuldu bu tüp ise pozitif kontrol olarak değerlendirildi. Plate vortekslendi ve 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün sonuçlar değerlendirildi. Üreme olmayan en son konsantrasyon minimal inhibitör konsantrasyonu olarak değerlendirildi.

5.5.2 Katı Yüzeyde Antibakteriyel Etkinlik

Escherichia coli (ATCC25922) 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi ve nutrient agar besi tabakları üzerinde muhafaza edildi. Bakteriyel çözelti konsantrasyonları standardizasyonu 590 nm'de (OD590) absorbans okundu [113]. Airborne testing ve disk difüzyon yöntemi, polimer kaplanmış yüzeylerin antibakteriyel aktivitesini incelemek için kullanıldı. Airborne testing için, *E. Coli*'nin doymuş bir süspansiyonu, 5 dakika boyunca 4000 rpm'de (oda sıcaklığı) santrifüjlendi. Hücreler, 10⁶ CFU/mL'lik bir konsantrasyon elde etmek için saf su içinde yeniden süspanse edildi. *E. coli* (10⁶ hücre/mL) süspansiyonu test yüzeyleri (cam yüzey) üzerine püskürtüldü. Püskürtme yüzeyleri kurutularak boş bir steril polistiren Petri kapları (VWR, 100 mm x 15 mm) içine yerleştirildi. Besin agarı (%1 bir besin suyu agar, otoklava, 37°C'ye soğutuldu) bakteri püskürtülmüş yüzeyler üzerine boşaltıldı ve katılaşmaya bırakıldı. Yüzeyler 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi ve daha sonra yüzeydeki koloniler sayıldı. Polimer kaplı olmayan bir cam yüzey, kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre ifade edilmiştir;

$$\text{Etkinlik Değeri} = \frac{\text{kontrol koloni sayısı} - \text{test yüzey üzerinde koloni sayısı}}{\text{kontrol koloni sayısı}} \times 100 \quad (5.4)$$

Disk difüzyon yönteminde, bakteri stok çözeltisi (10⁶ CFU/mL) 100 µL nutrient agar dökülmüş petri üzerine eklendi. Polimer kaplı cam yüzeyi besi ortamına temas edecek şekilde yerleştirildi ve 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Yetiştirilen bakteri kolonileri ve zone inhibisyonuna bakıldı.

5.6 Sitotoksite Çalışmaları

5.6.1 Hemolitik Konsantrasyon (HC₅₀) Tayini

Polimerlerin toksik özelliğini incelemek için hemolitik konsantrasyon değerlerine bakılır [92]. Literatürdeki prosedüre göre donörlerden alınmış taze kırmızı kan hücreleri (HRBC, 30 µL), 10 mL TRIS saline (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.2, 0,22 µm por çapına sahip polietersülfon membran ile süzölmüştür) eklendi ve TRIS salinle 3 kere 5

dk boyunca 1500 rpm'de santrifüj edildi. Polimer çözeltileri 8 mg/mL olacak şekilde TRIS salinde (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.2) hazırlandı. Polimerler tamamen çözüldükten sonra polimerlerin çözünürlüklerine göre pH 6.5 ve 7.0 arasına ayarlandı. Çözeltilerin pH'ı ayarlandıktan sonra, polimer çözeltileri polietersülfon membranlarından (0,45 µm por çapı) süzüldü. Yukarıda hazırlanan HRBC süspansiyonundan 100 µL alındı. Farklı konsantrasyonlarda taze hazırlanmış polimer çözeltileri, 200 µL son hacme ulaşacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolaklarda HRBC süspansiyonuna eklendi. Plaka 37 °C'de, 30 dk boyunca karıştırıldı. Ardından, 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve her kuyucuktaki süpernatant yeni plakaya alındı. Hemoliz, 414 nm'de serbest hemoglobinin abosarbansı ölçülerek incelendi. %100 hemoliz, güçlü bir yüzey aktif madde olan TRITON-X'den (Hacimce %20 DMSO içinde) 10 µL alınıp yukarıda hazırlanmış olan HRBC süspansiyonlarına eklenerek elde edildi.

Prosedüre göre %50 hemolize neden olan polimer konsantrasyonunun bir üst limiti HC₅₀ olarak adlandırılır, yalnız TRIS salin içeren polimersiz çözeltiden gelen absorbans %0 hemoliz olarak kabul edilir.

5.7 Polimerlerin Cam Yüzeylere Kaplanması

2,5 cm x 2,5 cm cam mikroskop lamelleri sentezlenen polimerler ile kaplanarak mikrobiyal testler, katyonik yük tayini, temas açısı testleri için kullanıldı. Cam yüzeyi 5 dakika boyunca Piranha çözeltisi (% 30 H₂O₂ / % 70 H₂SO₄) ile temizlendi. Daha sonra, lamalar distile su ve izopropanol içinde iyice çalkalandı, 40°'de vakum etüvünde kurutuldu [114]. Polimerlerin metanol içinde çözeltileri (1mg/mL) hazırlandı ve 30 saniye 2000 rpm'de (1000 devir/ s hızlanma) spin kaplama tekniği kullanılarak cam lamellerin yüzeyi kaplandı. Polimer kaplı yüzeyler 1 saat boyunca etüvde 70°C'de bekletildi.

5.8 Katyonik Yük Yoğunluğu Tayini

5.8.1 Sodyum Floresein Metodu

Tiller ve arkadaşları tarafından rapor edildiği gibi yüzeydeki katyonik yük yoğunluğu, floresan kompleksleşme ve UV-VIS spektroskopisine dayanan kolorimetrik yöntemle ölçüldü [115], [116].

Polimer ile kaplanmış ve kaplanmamış lameller (2,5 cm X 2,5 cm) destile suda hazırlanmış %1 floresein sodyum tuzunda 10 dk bekletildi. Floresan işaretleyiciler, negatif yükleri sebebiyle, katyonik bölgelere kuvvetlice bağlanır ve reaksiyona girmeyen moleküller destile suyla iyice yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Camlar, destile suda hazırlanmış %0,5'lik hekzadesiltrimetilamonyum klorür $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+\text{Cl}^-$ (CH_3)₃ çözeltisine (4 mL) alındı ve 30 dakika sonikasyon uygulanarak bağlanmış floresein moleküllerinin bu çözeltiye geçmesi sağlanmış oldu. Bu işlem sonrasında her birine 0,6 mL doymuş NaHCO_3 (pH = 8.3) eklendi. Çözeltilerin floresan şiddeti 450 nm'de ölçüldü ve floresein sodyum tuzu çözeltisi farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Katyonik yük tayininde spin kaplama metotları ile elde edilen yüzeylerde kantitatif analiz yapıldı.

5.8.2 Zeta Potansiyel Metodu

Suda çözünebilen polimerler (P_Metil_3K, P_Metil_10K, P_Etil_3K, P_Etil_10K), fosfat tamponu (pH 7.0) içinde konsantrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. Suda çözünmeyen polimerler (P_Phe_3K, P_Phe_10K, P_Metoksi_3K, P_Metoksi_10K) ise DMSO içinde konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde stok çözeltisi olarak hazırlandı. Stok çözeltiden 100 µL alınarak 900 µL fosfat tamponu üzerine eklenerek son konsantrasyonun 0,1 mg/mL olması sağlandı. Polimer çözeltileri, 45 µL por boyutlu filtrelerden süzülerek 0,8 mL hacimli zeta potansiyel ölçüm kuvvetlerine konuldu ve ölçüm alındı.

5.9 Biyofiziksel Çalışmalar

5.9.1 Bakteri ve Polimer Etkileşmesinin Zeta Potansiyel ile Ölçülmesi

Suda çözünen polimer (P_Etil_3K) için sadece 10^6 CFU/mL konsantrasyonundaki E.coli'nin, suda çözünmeyen polimerler (P_Phe_3K, P_Metoksi_3K) için 900 μ L E.coli üzerine 100 μ L DMSO ilave edilmiş çözeltilinin zeta potansiyeli ölçülerek blank elde edildi. Suda çözünen ve çözünmeyen polimerden 0,5 mg/mL konsantrasyonundan 100 μ L alındı ve üzerlerine 900 μ L'şer E.coli eklenerek zeta potansiyelleri ölçüldü.

5.9.2 Floresan Mikroskopu ile Bakteri Polimer Etkileşmesinin Görüntülenmesi

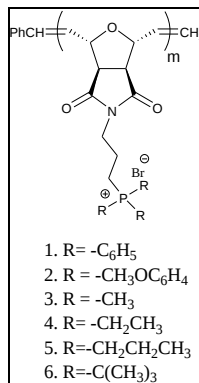
Taze hazırlanmış 1 Mcfarland S. aureus'tan 100 μ L bir eppendorf tüpe koyuldu. Üzerine, bakterilerin DNA'sı ile etkileştiğinde yeşil renk veren 0,01 mol Sybr Green'den 35 μ L eklendi. Karışım, vortekslendikten sonra 2 mg/mL konsantrasyonunda P_Phe_3K polimeri ile kaplanmış cam yüzeyin üzerine sürüldü. Cam yüzeyin kuruması için 15 dakika beklenildi ve floresan mikroskopu altında bakıldı.

BÖLÜM 6

DENEYSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ROMP, düşük ağırlık dağılımları (PDI) ve kontrollü bir molekül ağırlığı ile iyi tanımlanmış polimer hazırlamak için yaygın olarak kullanılan bir polimerizasyon yöntemidir. Özellikle, Tew ve arkadaşları güçlü antibakteriyel polimerlerin hazırlanması için ROMP'ü kullanarak farklı moleküller sentezlemişlerdir [96], [117]. Sentezlenen bu polimerler, polinorbornen türevleri primer amin trifloroasetik asit tuzları ve çeşitli alkil grupları içeriyordu. Yan zincirleri farklı kuaterner piridinyum tuzları ile amfifilik polinorbornen de Eren ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir [92]. Çeşitli alkil yan zincirleri ile bu polimerlerin antibakteriyel verimliliği büyüme inhibisyon deneyleri ile belirlenmiştir. Yan zincirde daha yüksek sayıda alkil karbon atomunun bulunmasıyla, bu polimerlerin toksisite ve etkinliğinin arttığı gösterilmiştir [92].

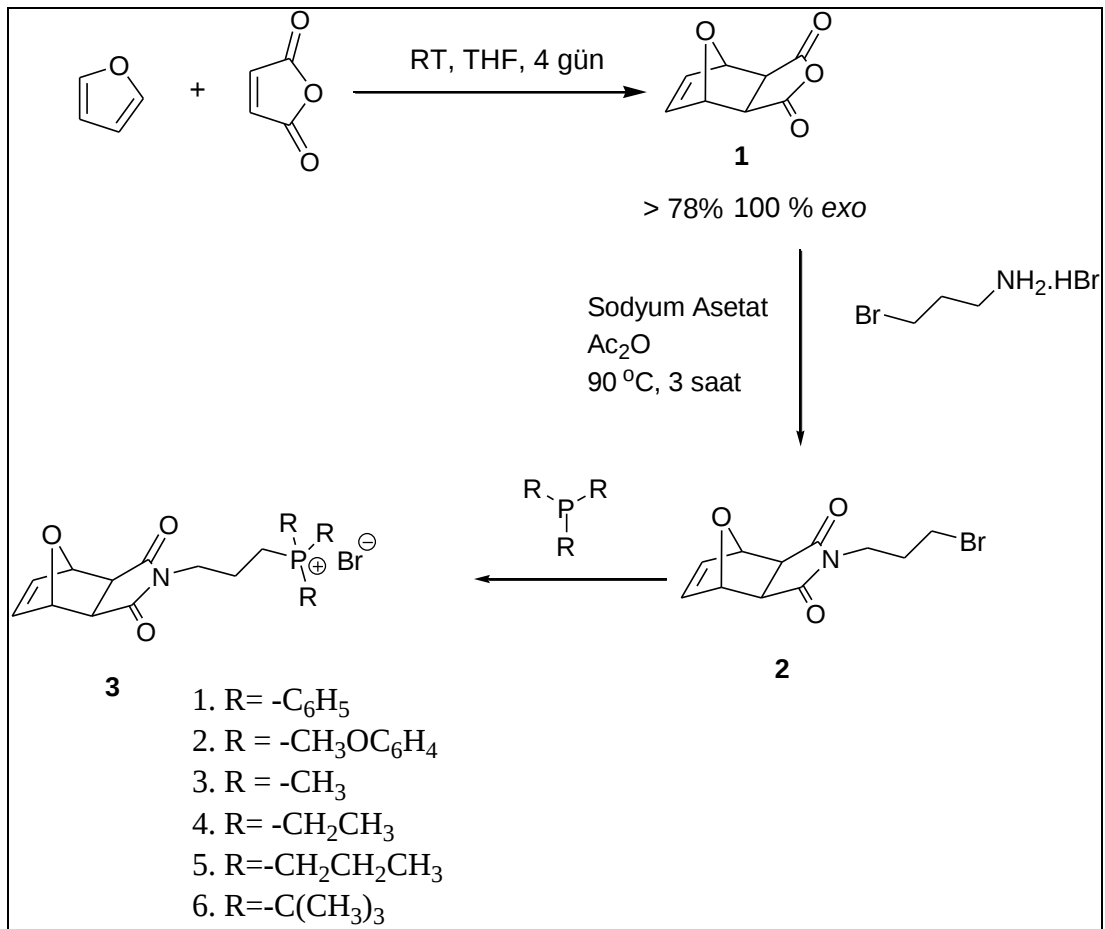
Çalışmamız kapsamında Şekil 6.1'de gösterilen yapıda fosfonyum grupları içeren polimerlerin antimikrobiyal etkinliklerinin yanısıra hemolitik konsantrasyon özellikleri de incelenmiştir.



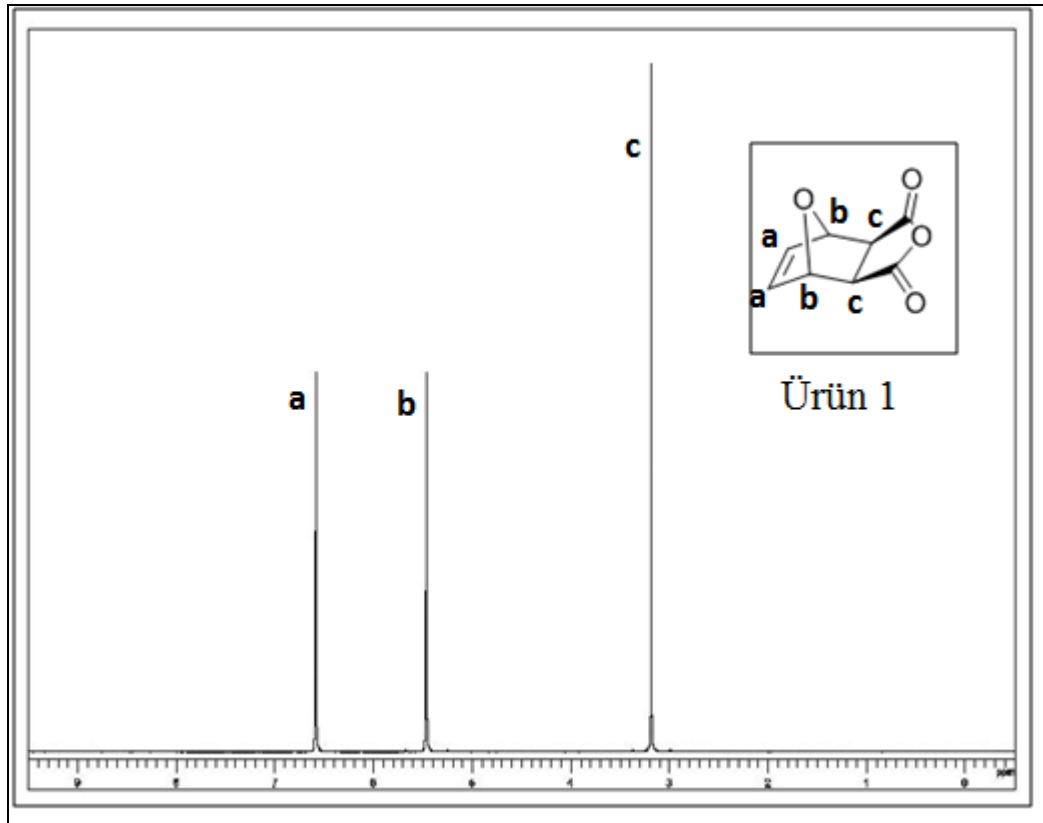
Şekil 6.1 Çalışmada sentezlenen homopolimerlerin yapısal gösterimi

6.1 Monomerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu

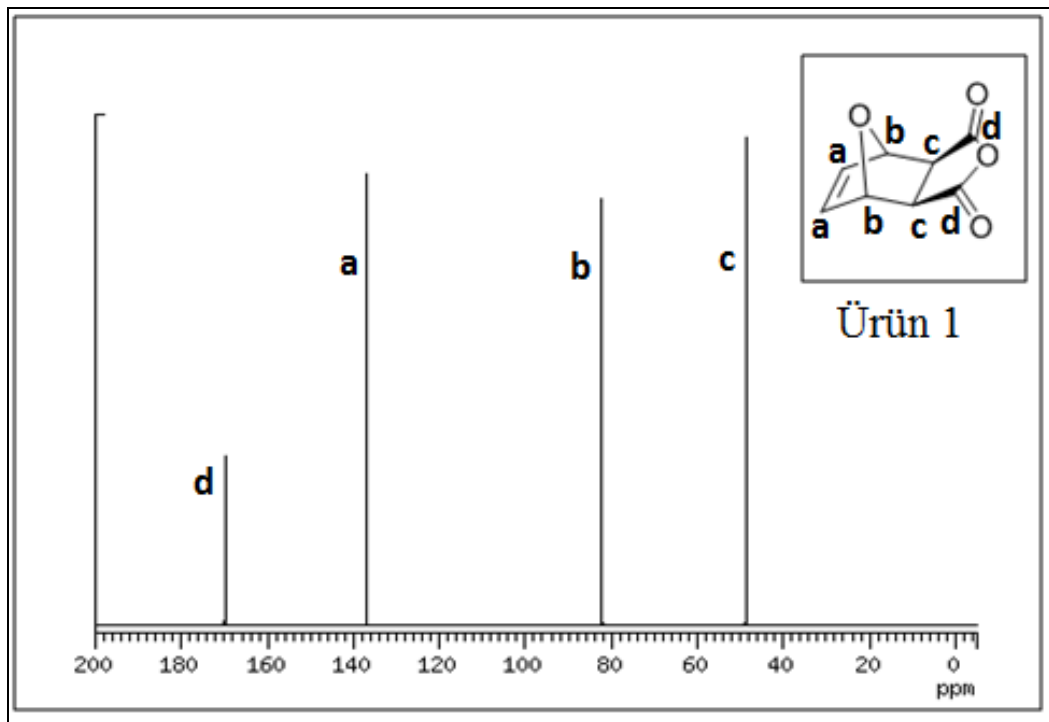
Çalışma kapsamında kullanılan monomerlerin sentezi Şekil 6.2’de gösterilmektedir. Sentez sırasında öncelikle furan ve maleik anhidritin Diels-Alder reaksiyonu sonucu 4,10-Dioxa-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}] dec-8-ene-3,5-dione (Ürün 1) oluşturulmuştur. Karakterizasyonu kapsamında ¹H ve ¹³C analizi yapılmış ve NMR analizi sonucu ürünün %100 ekzo yapıda olduğu görülmüştür. Okzanorbornen halkasındaki çift bağlı yapıda bulunan protonlar 6.5 ppm civarında gelmektedir (Şekil 6.3). ¹³C NMR analizinde okzanorbornen halkasındaki çift bağ karbon pikleri 137 ppm ve anhidrit karbonil grubu 172 ppm de görülmüştür (Şekil 6.4).



Şekil 6.2 Çalışma kapsamında sentezlenen monomerlerin sentetik şeması

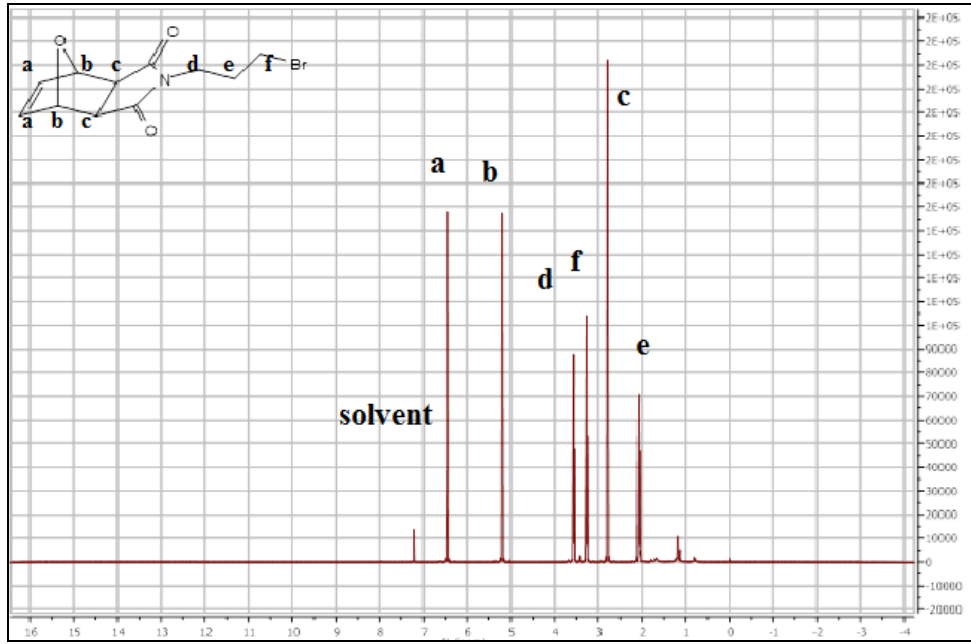


Şekil 6.3 Furan maleik anhidritin (Ürün 1) ^1H NMR spektrumu



Şekil 6.4 Furan maleik anhidritin (Ürün 1) ^{13}C NMR spektrumu

Ürün 2 sentezi imid mekanizmasının izlenmesi ile elde edilmiştir. Sentez kapsamında ürün 1, 3-bromo propilamin ile sodyum asetat katalisti ile elde edilmiştir. Saflaştırma işlemi etilasetat- hekzan (1:1) kolon kromatografisi kullanılarak yapılmış ve %40 verimde saf beyaz katı elde edilmiştir. Şekil 6.5, ürün 2'nin ^1H NMR spektrumunu göstermektedir. Okzanorbornen halkasındaki protonların 6.5, 5.2, ve 2.9 ppmde, $\text{CH}_2\text{-Br}$ protonu ise 3.2 ppmde olduğu görülmüştür.



Şekil 6.5 Bromookzanorbornen'in (Ürün 2) ^1H NMR spektrumu

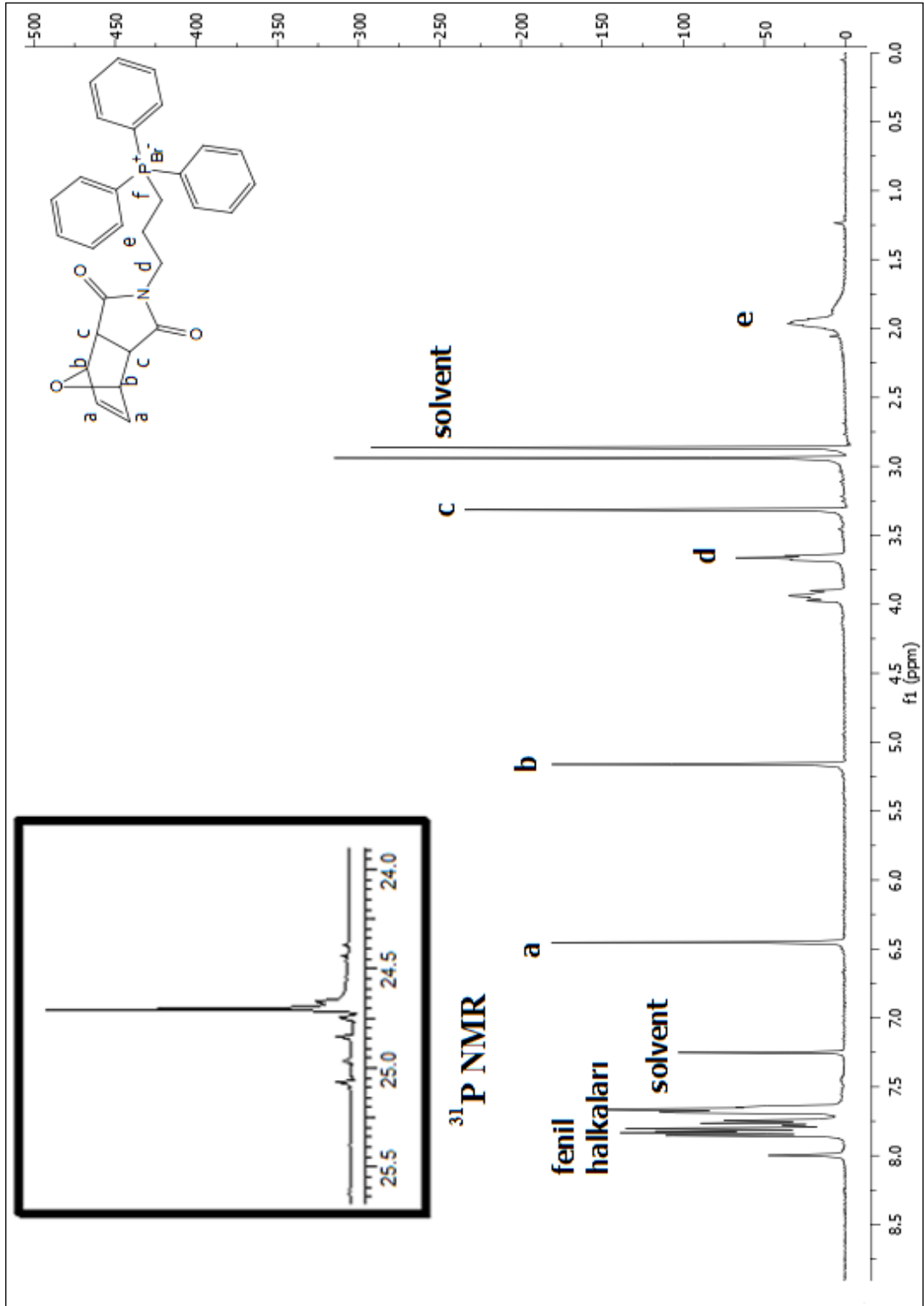
6.1.1 Fosfonyum Esaslı Monomerlerin Sentezi

Monomer sentezi, sodyum asetat katalistliğinde 3-bromopropil hidrobromür ile 4,10-diokza-trisiklo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion'un (Ürün 1) reaksiyonu sonucu 4-(3-bromopropil)-10-okza-4-azatrisiklo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (Ürün 2) elde edilerek bu ürünün fosfonyum içeren bileşiklerin reaksiyonu ile tuz oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Yapısal analiz, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve FTIR teknikleri ile yapılmıştır. Monomerlerin sentezinde çözücü olarak etil asetat ve THF çözücülerinin yanısıra oda sıcaklığı ve 60°C sıcaklıkta tuz oluşturma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Monomerlerden P_Phe ve P_Metoksi_Phe tuzlarının veriminin %10-20 aralığında değiştiği görülmüştür. Monomerler uygun çözücüde (fazla dietil eter) yıkanmış ve santrifüj yapıldıktan sonra vakum altında kurutulmuştur. Monomerlerin hidroskobik

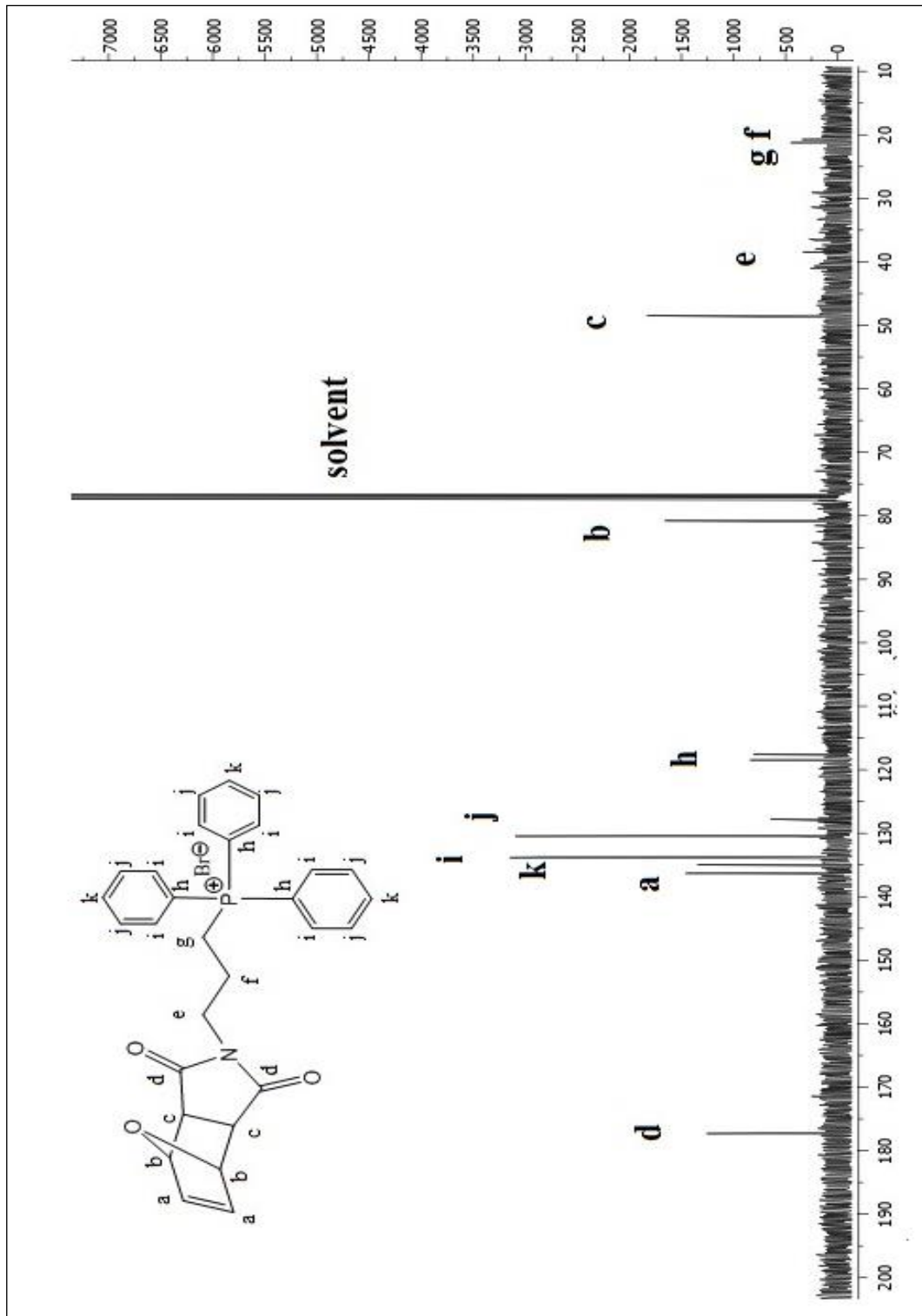
olduğu görülmüş, kurutma işlemi sonrası saklama kabı azot ile doldurulmuş ve desikatörde saklanmıştır. Monomerlerin sentezinde ayrıca fosfin oksit ($R_3-P=O$) oluşumu gözlenmiştir. Fosfin oksit, eser miktar oksijenin fosforu yükseltgemesiyle oluşur. Örneğin; trifenilfosfin ($P-Phe_3$) oksitlenmesi sonucu $O=P-Phe_3$ oluşmuştur. Ancak bu safsızlık polimerizasyon verimini etkilememektedir.

Proje kapsamında sentezlenen monomerlerin 1H ve ^{13}C NMR spektrumları Şekil 6.6-6.15'de gösterilmektedir. İlgili ^{31}P NMR spektrumları da 1H NMR spektrumlarına eklenerek verilmiştir. Örneğin trifenilfosfonyum esaslı monomer (P_Phe) NMR spektrumu incelendiğinde, fenil halkalarına ait sinyaller 7.5-8.0 ppm arasında görülmektedir. Fosfora bağlı karbondaki protonlar (CH_2-P^+) 3.5 ppmde görülmektedir (Şekil 6.6). ^{31}P NMR spektrumunda P^+-CH_2Br sinyalinin 24.7 ppmde olduğu görülmüştür. ^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde ise fenil halkası 120-135 ppmde, fosforun bağlı olduğu CH_2 spektrumu ise 20 ppmde görülmüştür (Şekil 6.7). Fenil halkası içeren P_Phe ve $P_Metoksi$ monomerlerinin fenil halkaları 1H NMR spektrumlarında 8-7 ppm arasında geldiği görülmektedir. Okzanorbornen halkasındaki çift bağlı yapıda bulunan protonların monomerlerde 6.5 ppm civarında geldiği 1H NMR'ında görülmektedir. Monomer sentezlerinde görülen fosfin oksit sinyalleri özellikle trifenilfosfin ve tris(4-metoksifenil)fosfin monomerlerinde görülmüştür. Örneğin trifenil fosfonyum esaslı monomer sentezinde ^{31}P NMR analizinde ($-P=O$) sinyali 29.7 ppmde, katyonik (P^+) sinyali 24.7 ppmde görülmüştür. Eser miktardaki (%5) safsızlık ROMP'ta reaksiyona girmediğinden polimerizasyon verimini etkilemediği görülmüştür.

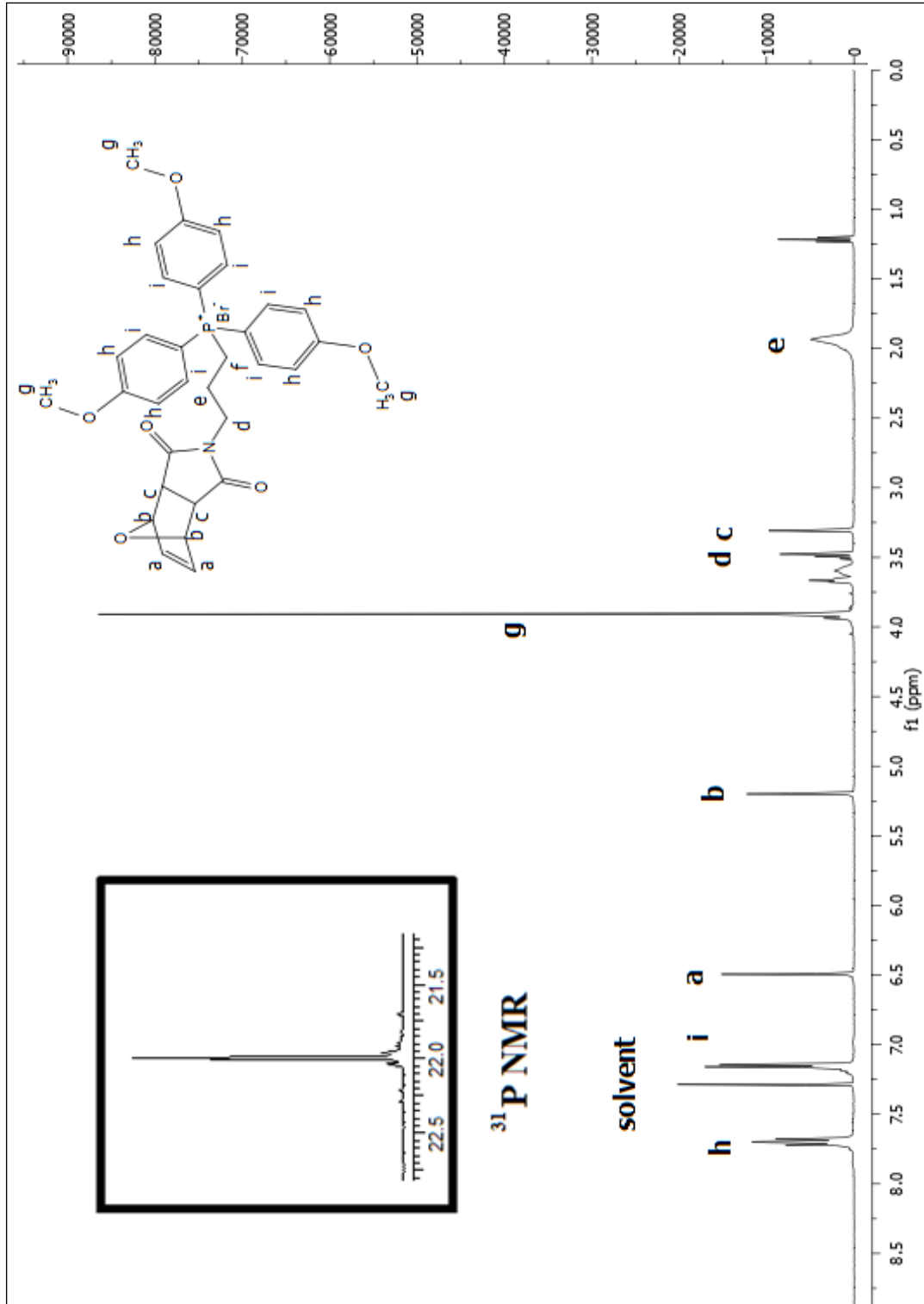
FTIR spektrumuna baktığımızda, 2925-3030 cm^{-1} 'de C-H aromatik bandının, 1600 ve 1510 cm^{-1} 'de fenil halkasının C=C bandının, 1460 cm^{-1} 'de C-C bandının ve 1120 cm^{-1} civarında ise P^+-Phe bandının geldiği görülmektedir (Şekil 6.18).



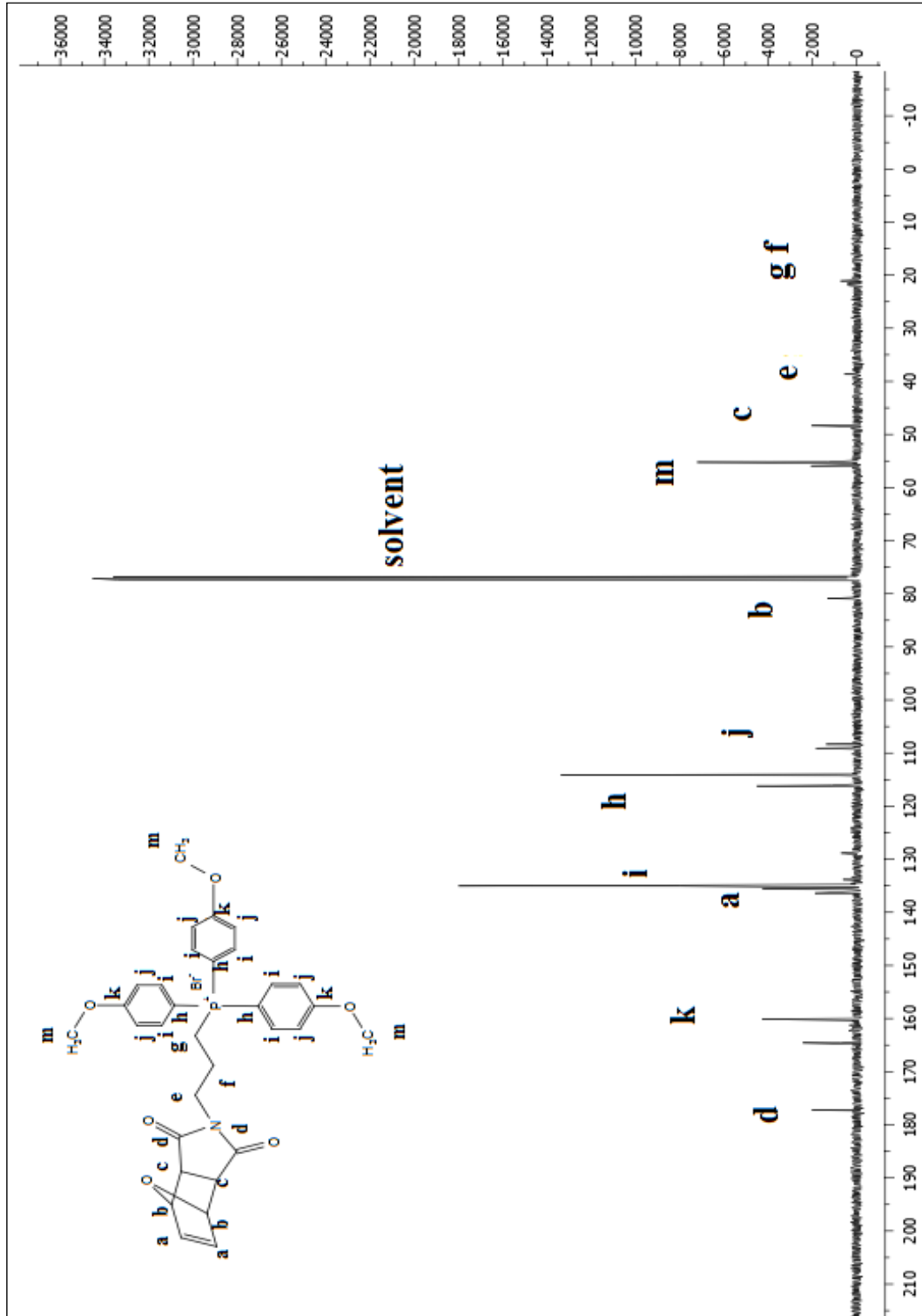
Şekil 6.6 P_Phe monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları

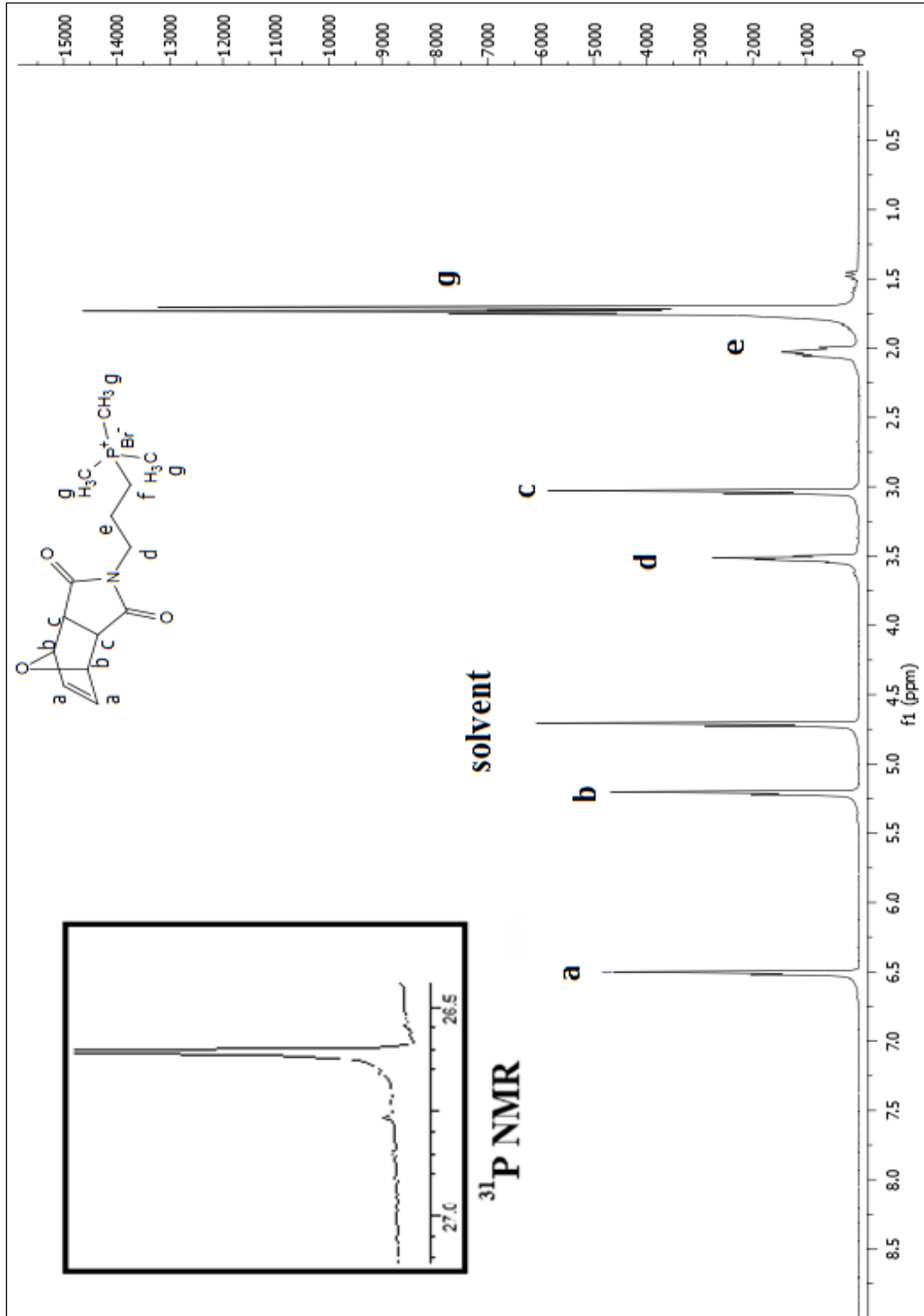


Şekil 6.7 P_Phe monomerininin ^{13}C NMR Spektrumu

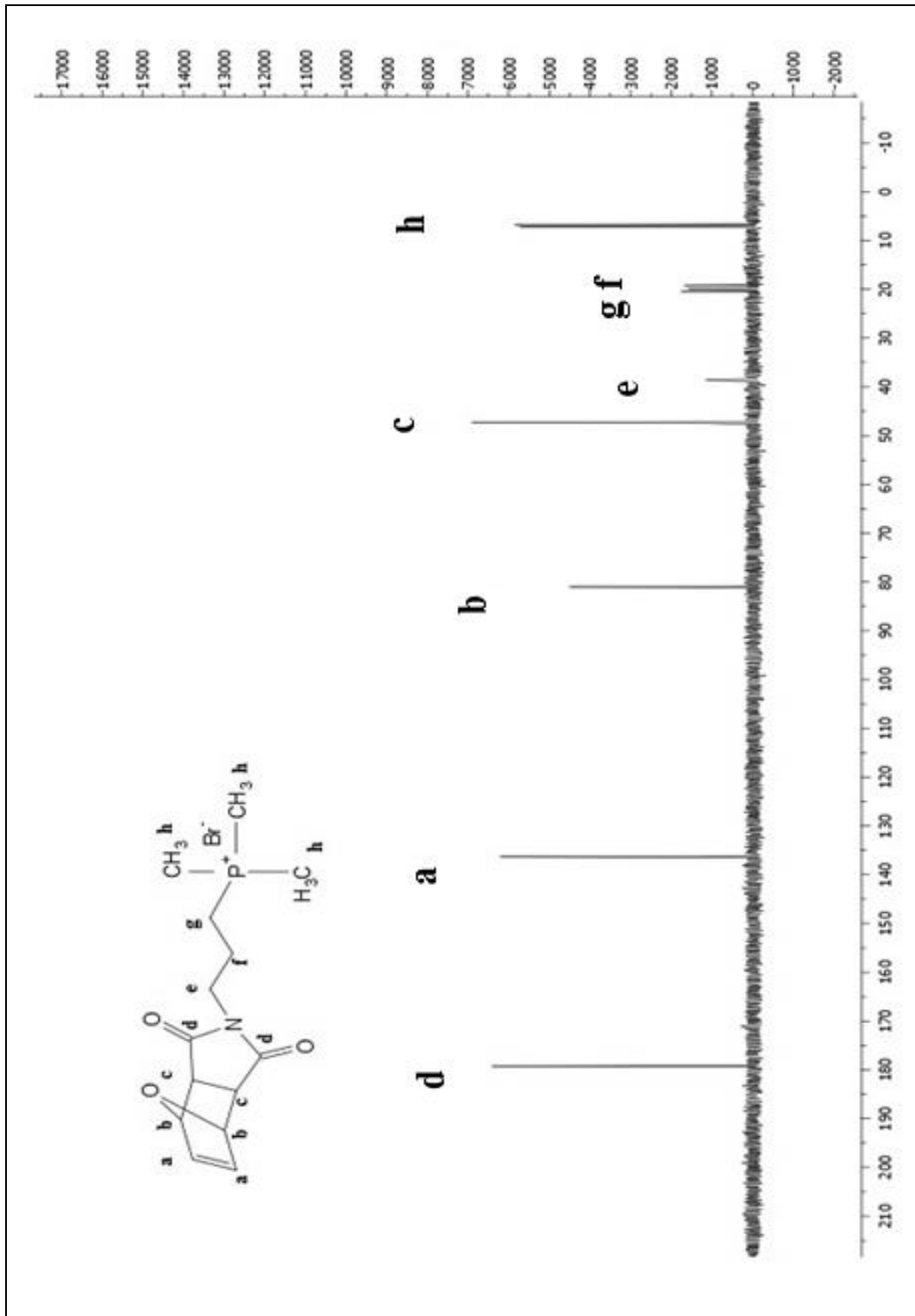


Şekil 6.8 P_Metoksi_Phe monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları

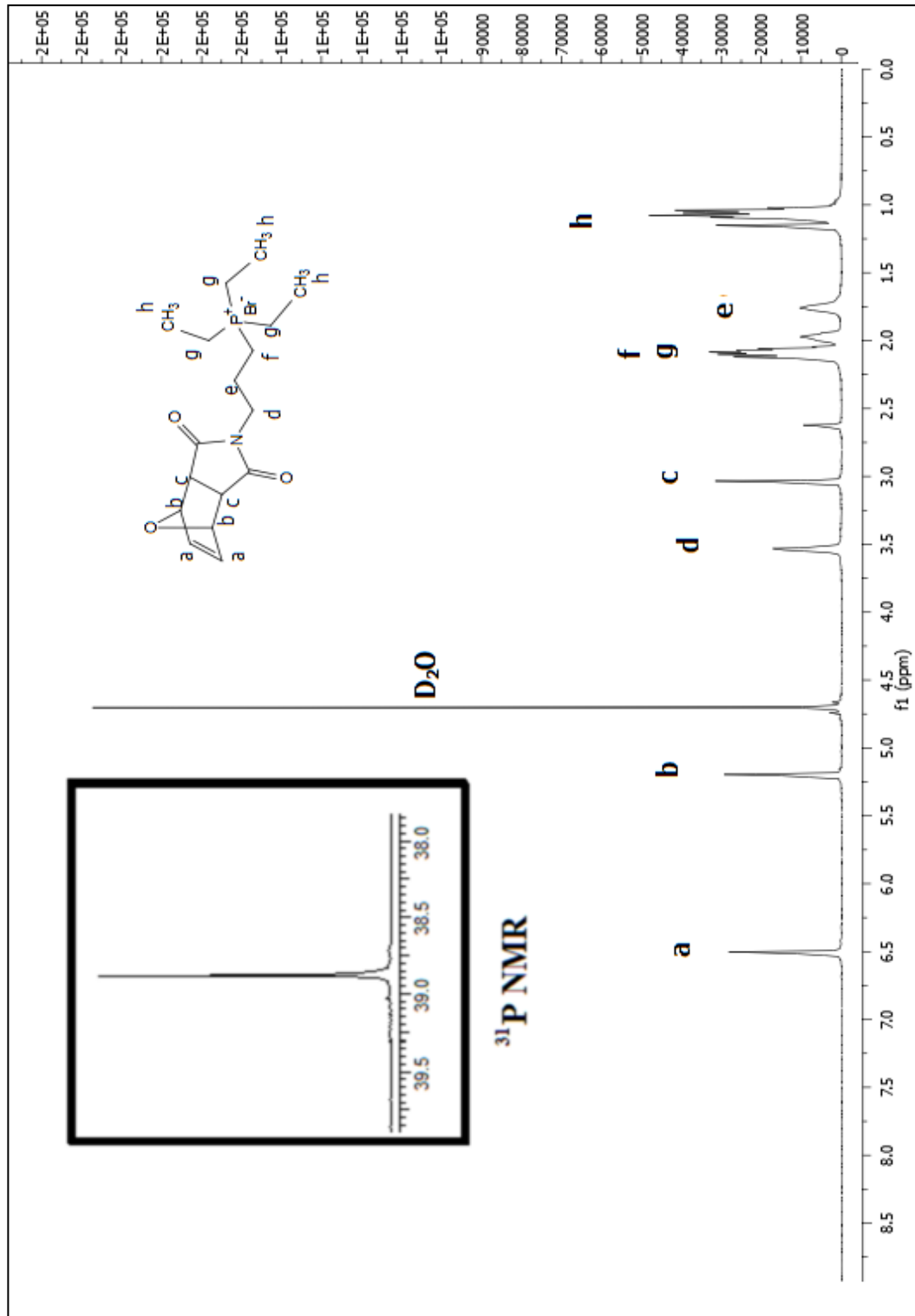




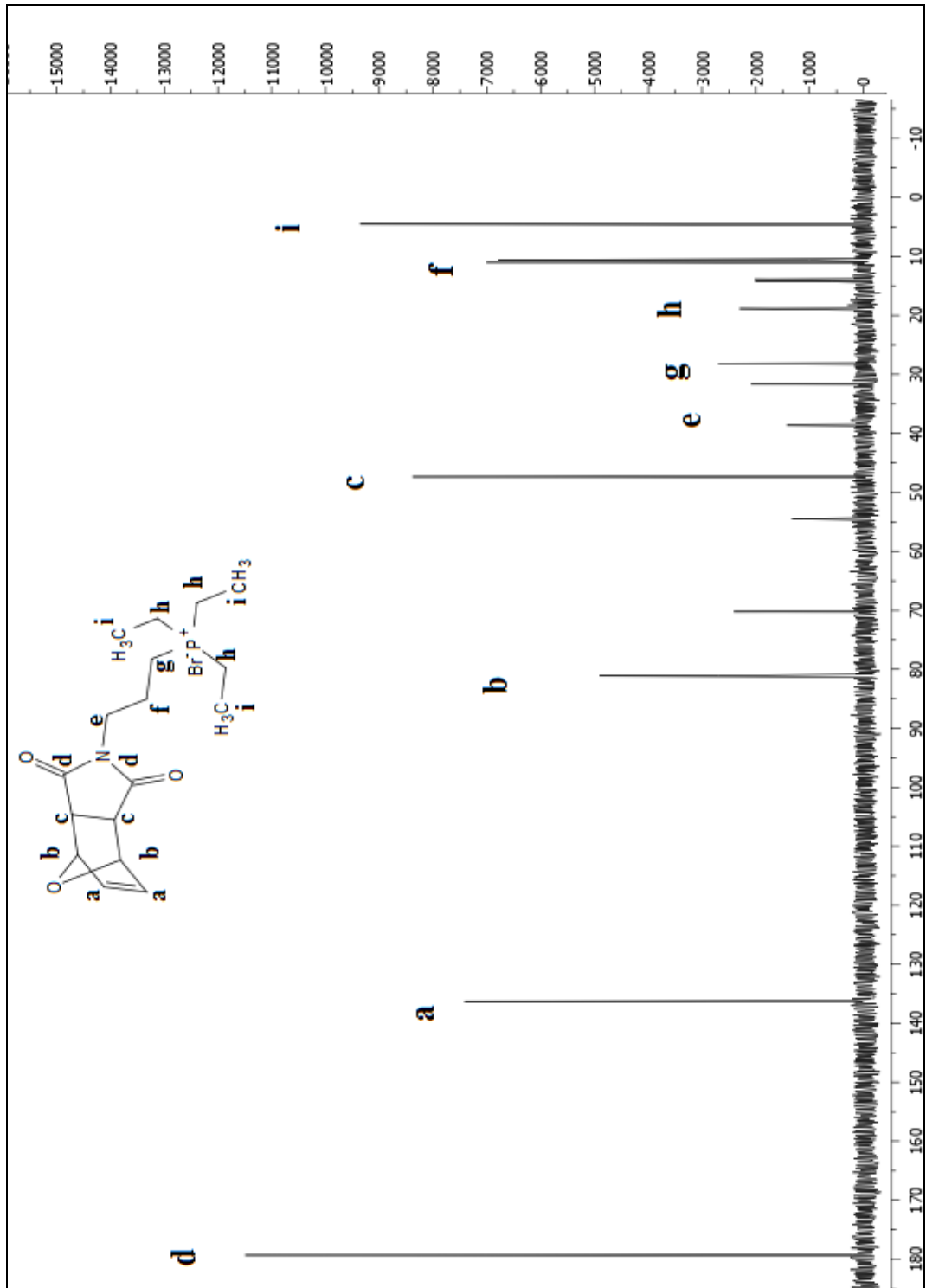
Şekil 6.10 P_Metil monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları



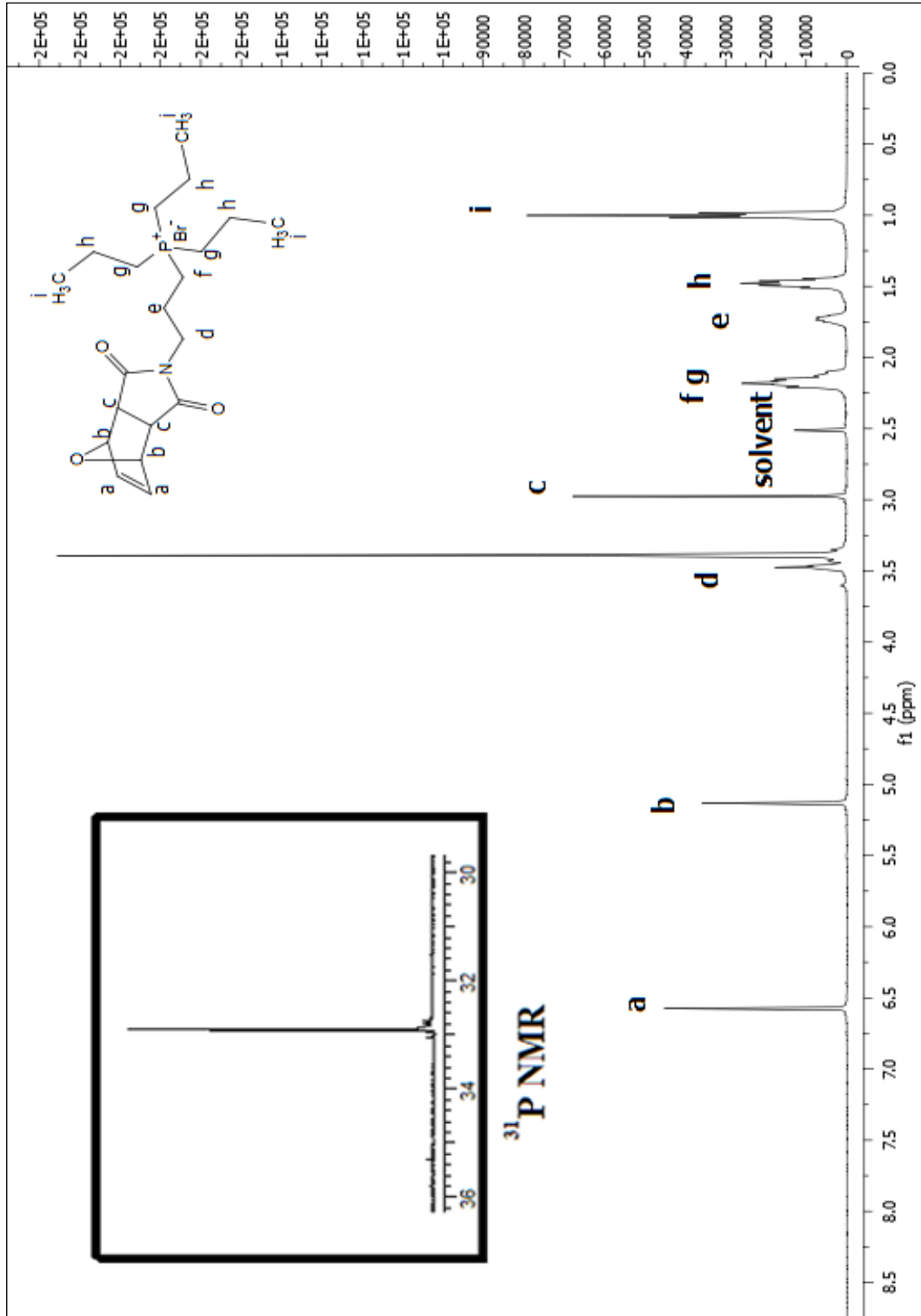
Şekil 6.11 P_Metil monomerinin ^{13}C NMR Spektrumu



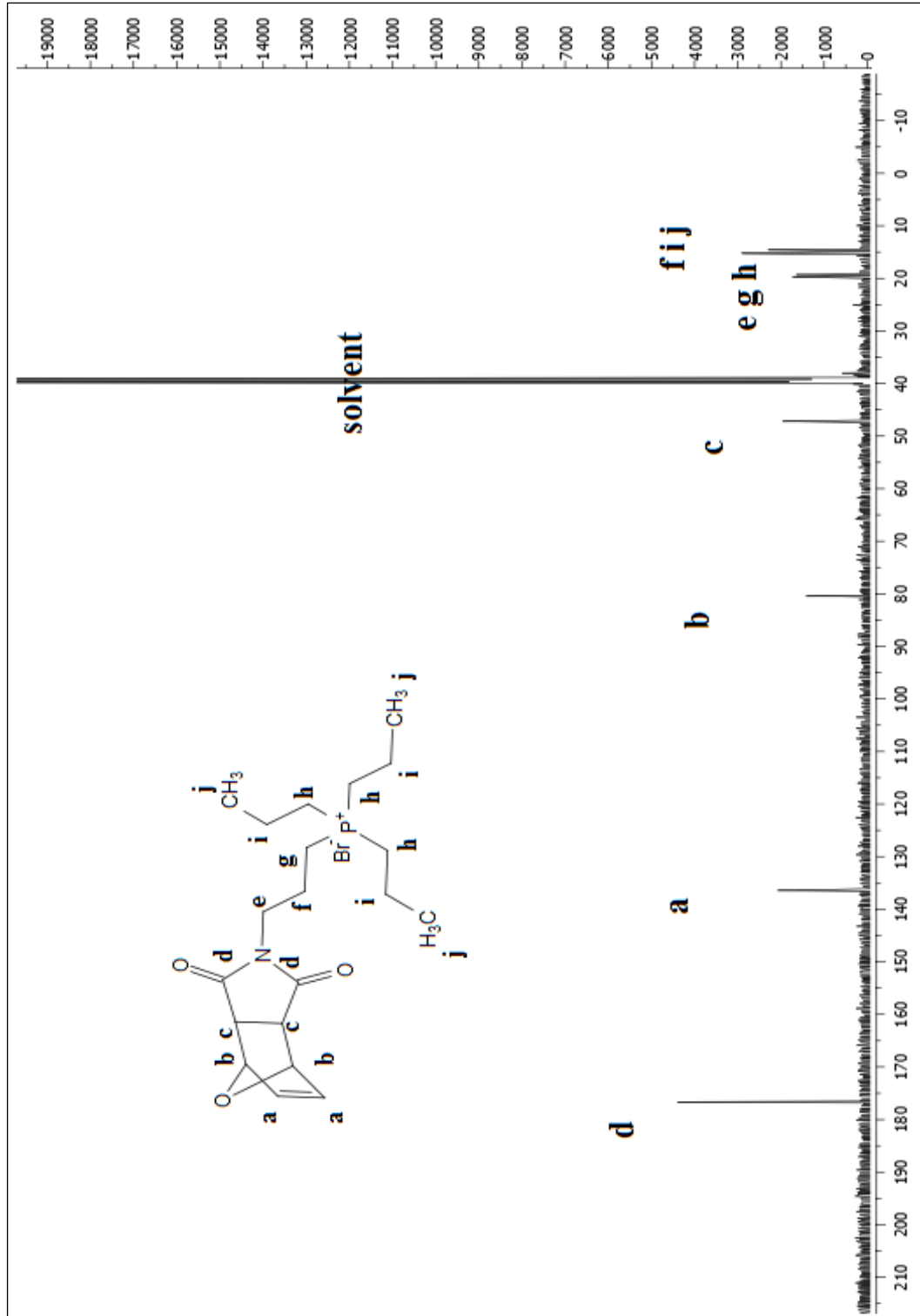
Şekil 6.12 P_Etil monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları



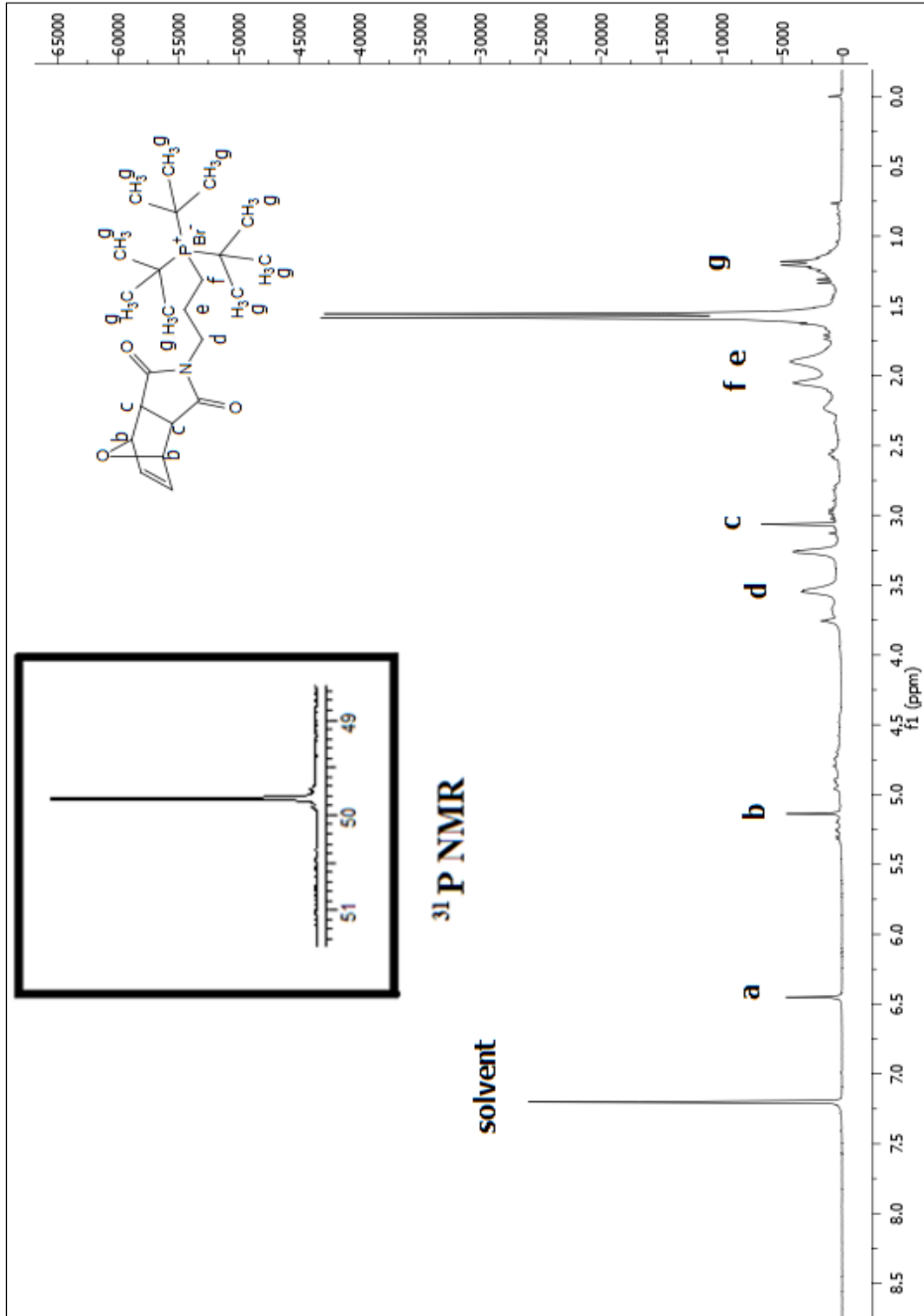
Şekil 6.13 P_Etil monomerininin ^{13}C NMR Spektrumu



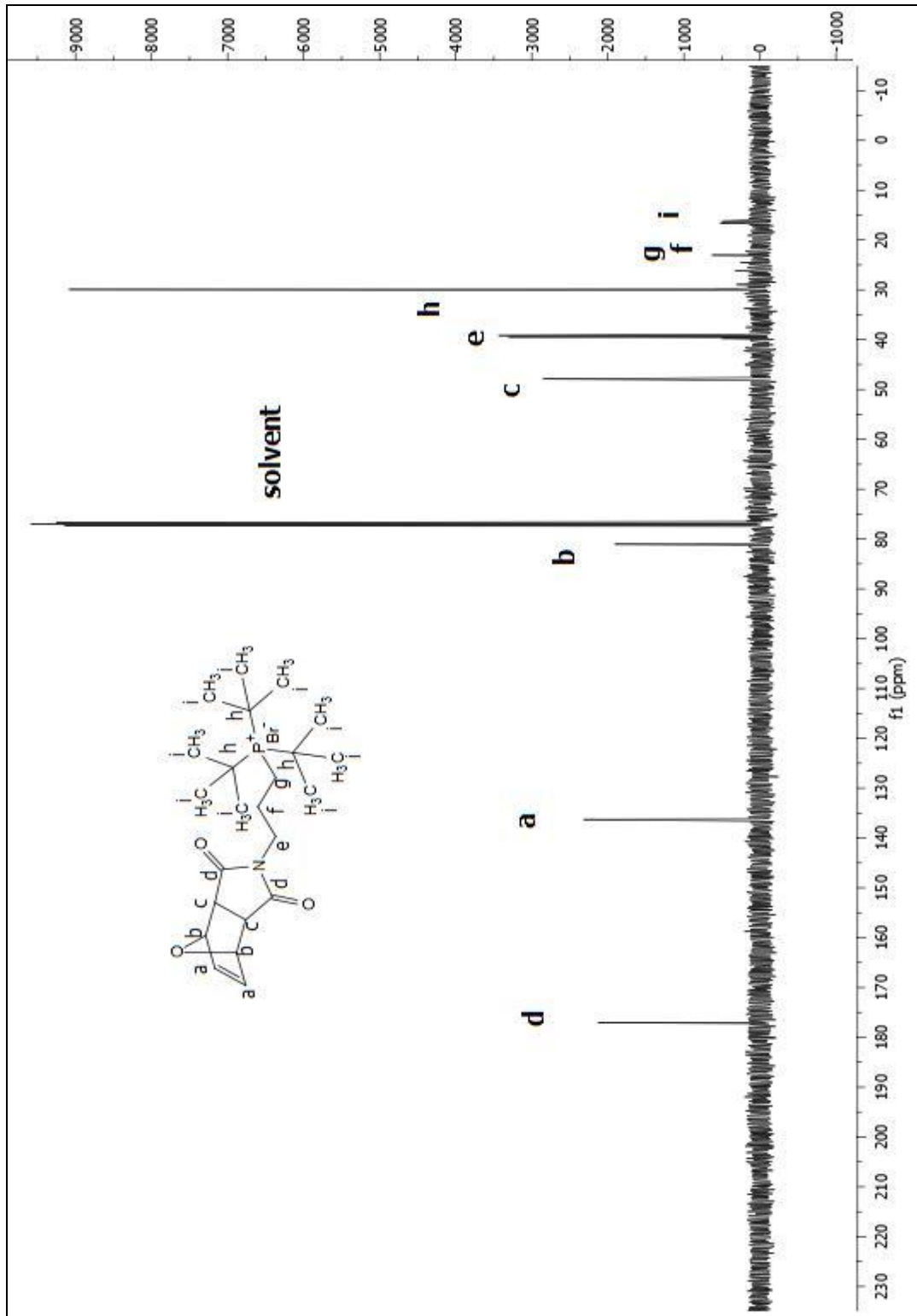
Şekil 6.14 P_Propil monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları



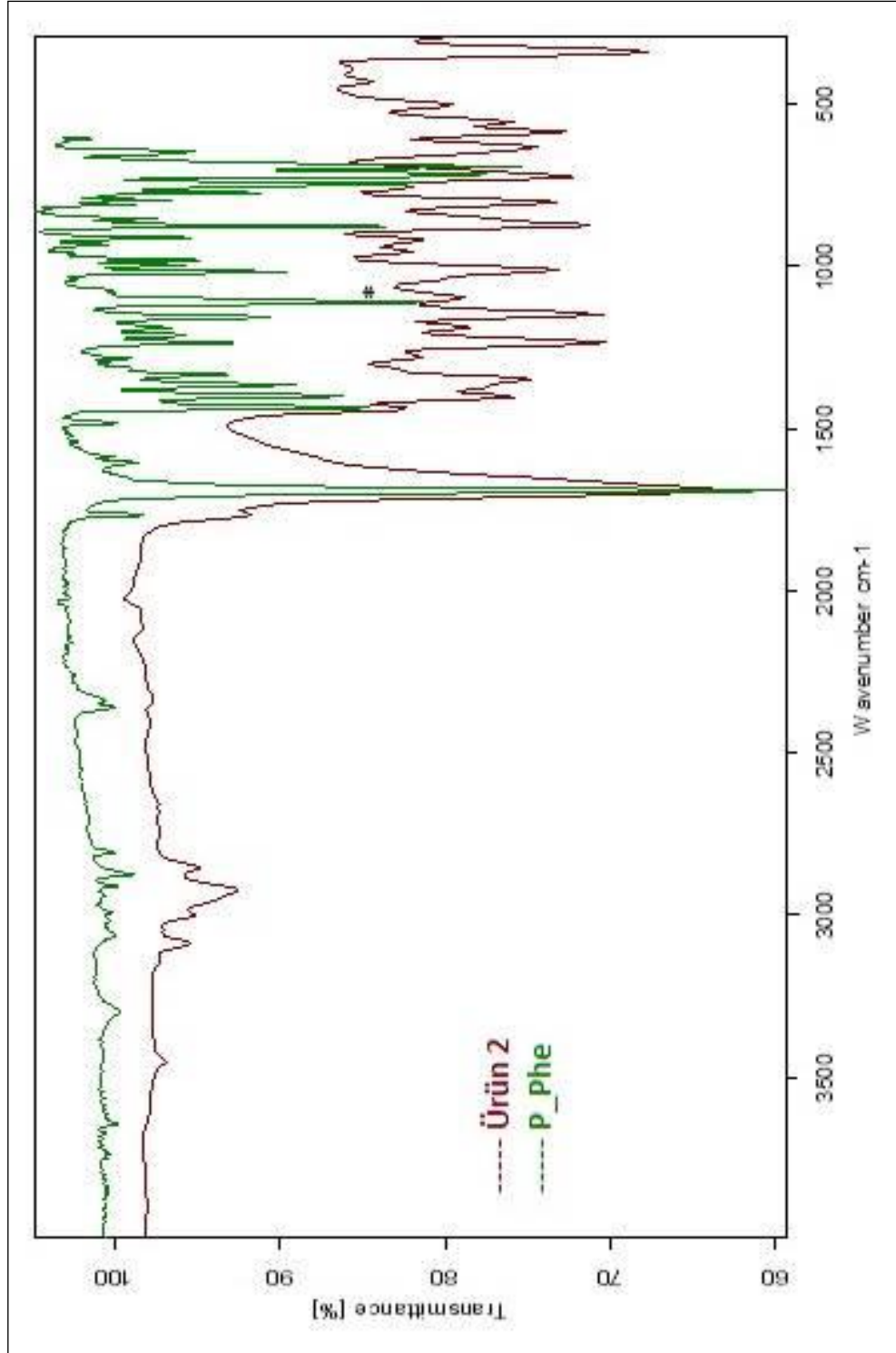
Şekil 6.15 P_Propil monomerinin ^{13}C NMR Spektrumu



Şekil 6.16 P_t -Bütil monomerinin ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları



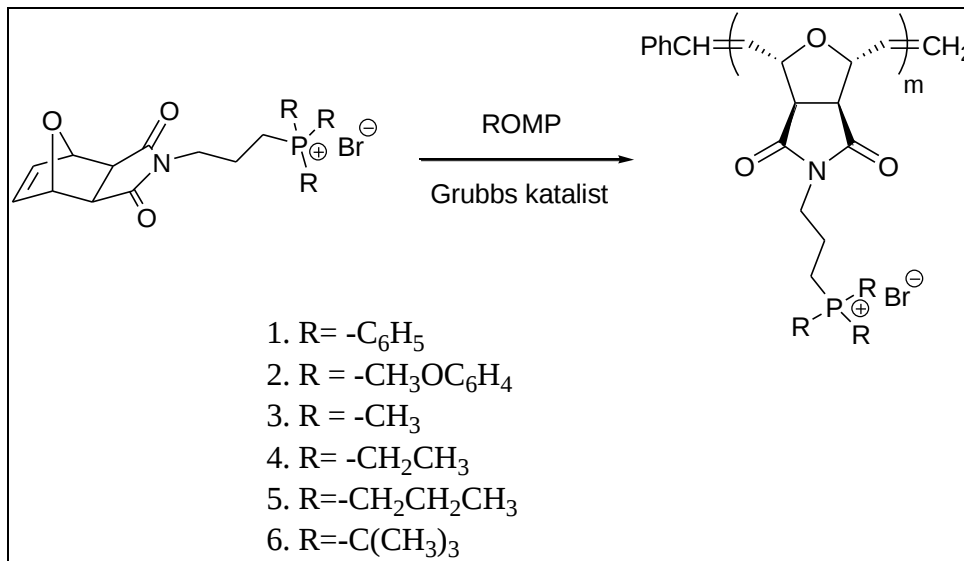
Şekil 6.17 P_t-Bütil monomerinin ^{13}C NMR Spektrumu



Şekil 6.18 Proje kapsamında sentezlenen Ürün 2 ve P_Phe monomerlerinin FTIR spektrumları (*P⁺-Phe bandı)

6.1.2 Polimer Sentezi

Okzanorbornen monomerleri halka açılma polimerizasyonu için iyi bir monomerdir. Grubbs katalist varlığında okzanorbornen halkası açılır ve metatez reaksiyonu sonucu katılma reaksiyonu verir. Günümüzde özellikle yeni nesil olarak belirtilen, hava, su ve fonksiyonel gruplara karşı tolerans gösteren metatez katalistleri kullanılmaktadır. Bu katalistlerin başında Grubbs katalist olarak bilinen 2nd Grubbs ve 3rd jenerasyon Grubbs katalistleri gelmektedir. Tez kapsamında sentezlediğimiz homopolimerlerin sentetik yapısı Şekil 6.19'da gösterilmektedir. Polimerizasyon sırasında fosfonyum grubu içeren monomerler çözünürlüklerine göre bir çözücüde (DCM/MeOH/DMF) çözüldükten sonra, Grubbs katalist diklorometan içerisinde çözüldükten sonra polimerizasyon kabına eklendi. Yaklaşık bir saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra %30 etilvinil eter (DCM içinde) katalisti sonlandırmak için ortama eklendi ve yaklaşık 15 dakika karıştırıldı. Polimer kendisini çözmeyen bir sıvı içerisinde (örneğin; THF veya dietil eter) eklenerek çöktürüldü.



Şekil 6.19 Çalışma kapsamında sentezlenen polimerlerin sentetik şeması

Çalışmamız kapsamında kullanılan polimer serileri 3.000 ve 10.000 g.mol⁻¹ olmak üzere iki farklı ortalama molekül ağırlığı hesaplanarak sentezlendi. Bu bölümde 3.000 g.mol⁻¹ ortalama molekül ağırlığına sahip olan P_Phe_3K polimerin molekül ağırlığı hesaplanması örnek olarak gösterilecektir. Bu kapsamda öncelikle polimerizasyon derecesi (PD) hesaplanmıştır. Polimerizasyon derecesi (PD), belirlediğimiz molekül ağırlığına sahip polimer zincirindeki monomerlerin ortalama sayısını vericidir.

3.000 g.mol⁻¹ ortalama molekül ağırlığına sahip olan P_Phe_3K polimerinin polimerizasyon derecesi (PD);

P_Phe monomerinin molekül ağırlığı (MA) = 548,19 g.mol⁻¹

Grubbs 3 katalistinin molekül ağırlığı (MA) = 884,98 g.mol⁻¹

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

$$\text{Polimerizasyon Derecesi (PD)} = \frac{3000}{548,19} \quad (6.2)$$

$$\text{Polimerizasyon Derecesi (PD)} = 5,472 \quad (6.3)$$

Sentez için P_Phe monomerinden 0,2 g (0,364 mmol) alındı ve elde ettiğimiz PD değerinden yola çıkarak kullanılacak olan Grubbs 3 katalist miktarı belirlendi ve 3.000 g.mol⁻¹ molekül ağırlığındaki P_Phe polimeri için gerekli miktarlar hesaplanmış oldu;

$$\text{Polimerizasyon Derecesi (PD)} = \frac{[\text{Monomer}]}{[\text{Katalist}]} \quad (6.4)$$

$$5,472 = \frac{0,000364}{[\text{Katalist}]} \quad (6.5)$$

$$\text{Katalist} = 0,00006 \text{ mol} \quad (6.6)$$

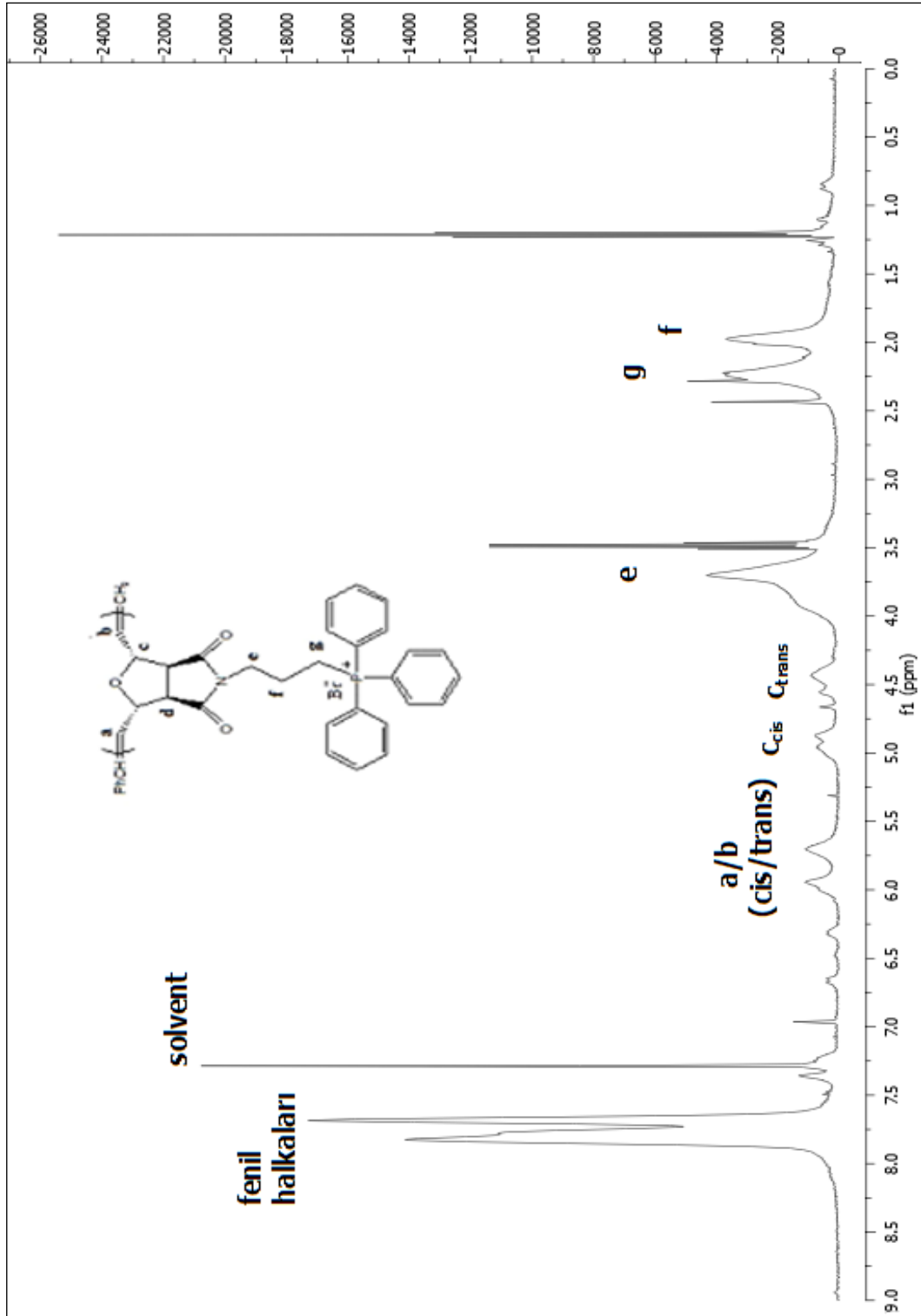
Kullanılacak olan Grubbs 3 katalist miktarı (g);

$$0,00006 = \frac{\text{Kullanılacak Olan Grubbs 3 Katalist Miktarı (g)}}{884,98 (\frac{g}{mol})} \quad (6.7)$$

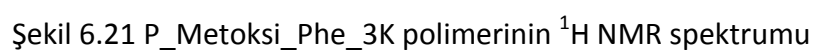
$$\text{Kullanılacak Olan Grubbs 3 Katalist Miktarı} = 0,058 \text{ g} \quad (6.8)$$

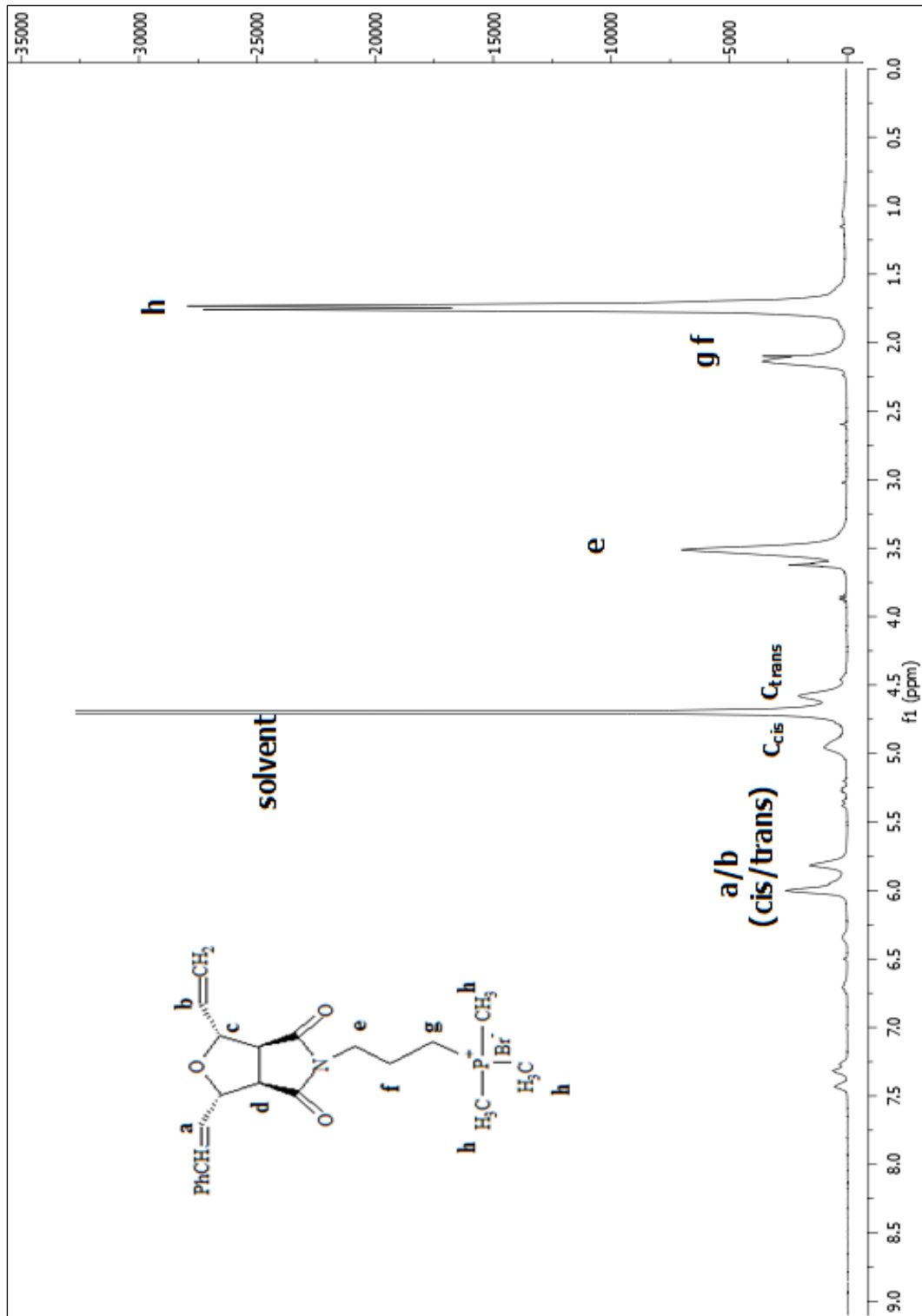
Çalışmamız kapsamında kullanılan polimerlerin her biri için benzer hesaplama işlemi yapılarak ortalama molekül ağırlığı hesaplandı ve sentez işlemi gerçekleştirildi.

Şekil 6.20-6.25'e bakacak olursak monomerlerin birleşerek polimer oluşturdıkları bölgenin protonları (cis/trans) yaklaşık 6.0 ppm'de görülmektedir. Halka açılması sonucu oluşan cis protonları 6.0 ppm civarında (c_{cis}), trans protonları ise 5.5 ppm civarında (c_{trans}) gelmektedir. Polimerlerdeki cis ve trans protonlarının integrasyonu alındığında cis/trans oranının %45/55 şeklinde olduğu görülmektedir. Polimerlerin ^{31}P NMR analizi yapıldığında karakteristik P^+ sinyali görülmüştür. Örneğin P_Phe_10K polimerinin ^{31}P NMR spektrumunda 24.5 ppmde P^{+} 'a ait sinyal görülmüştür.

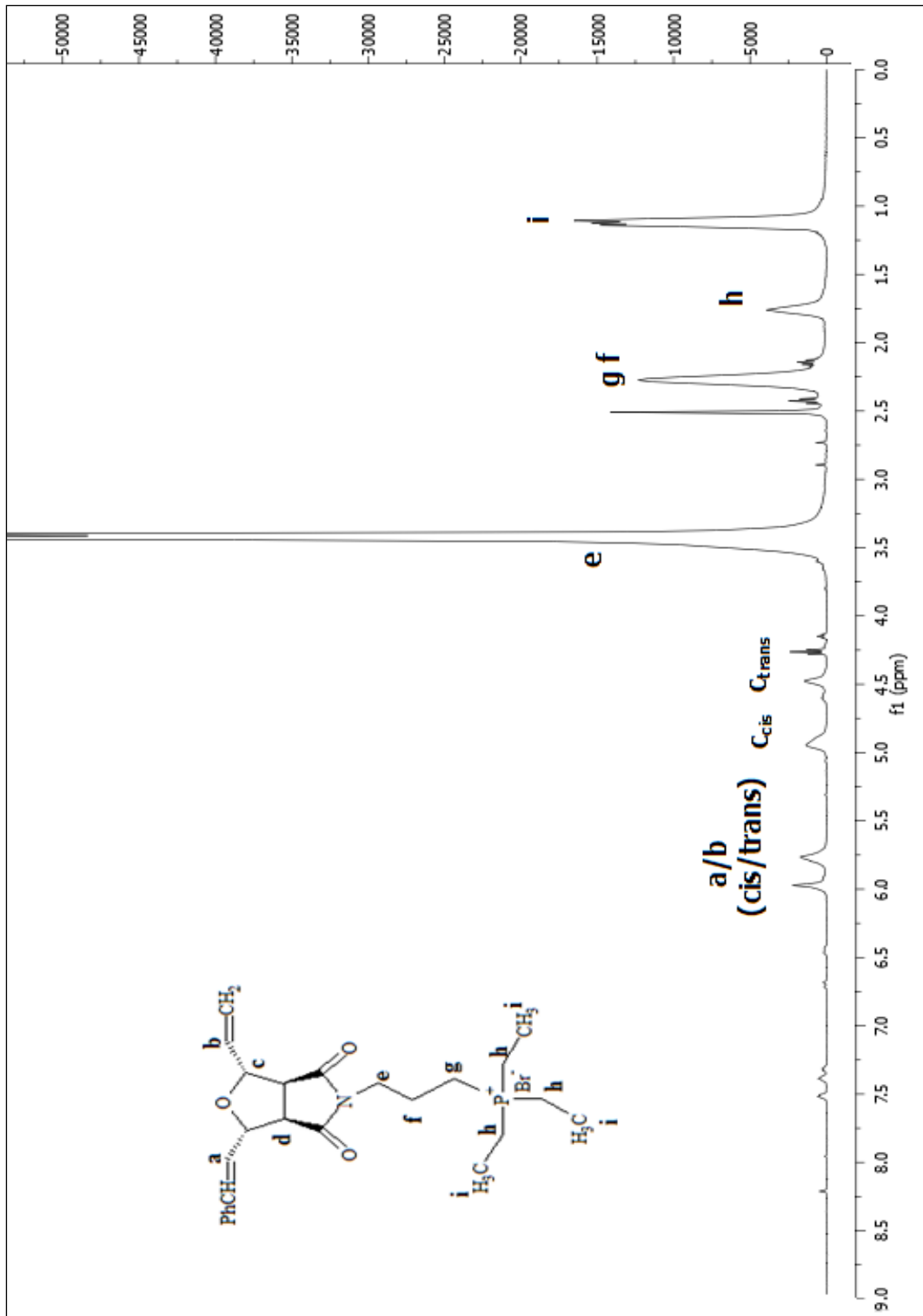


Şekil 6.20 P_Phe_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu

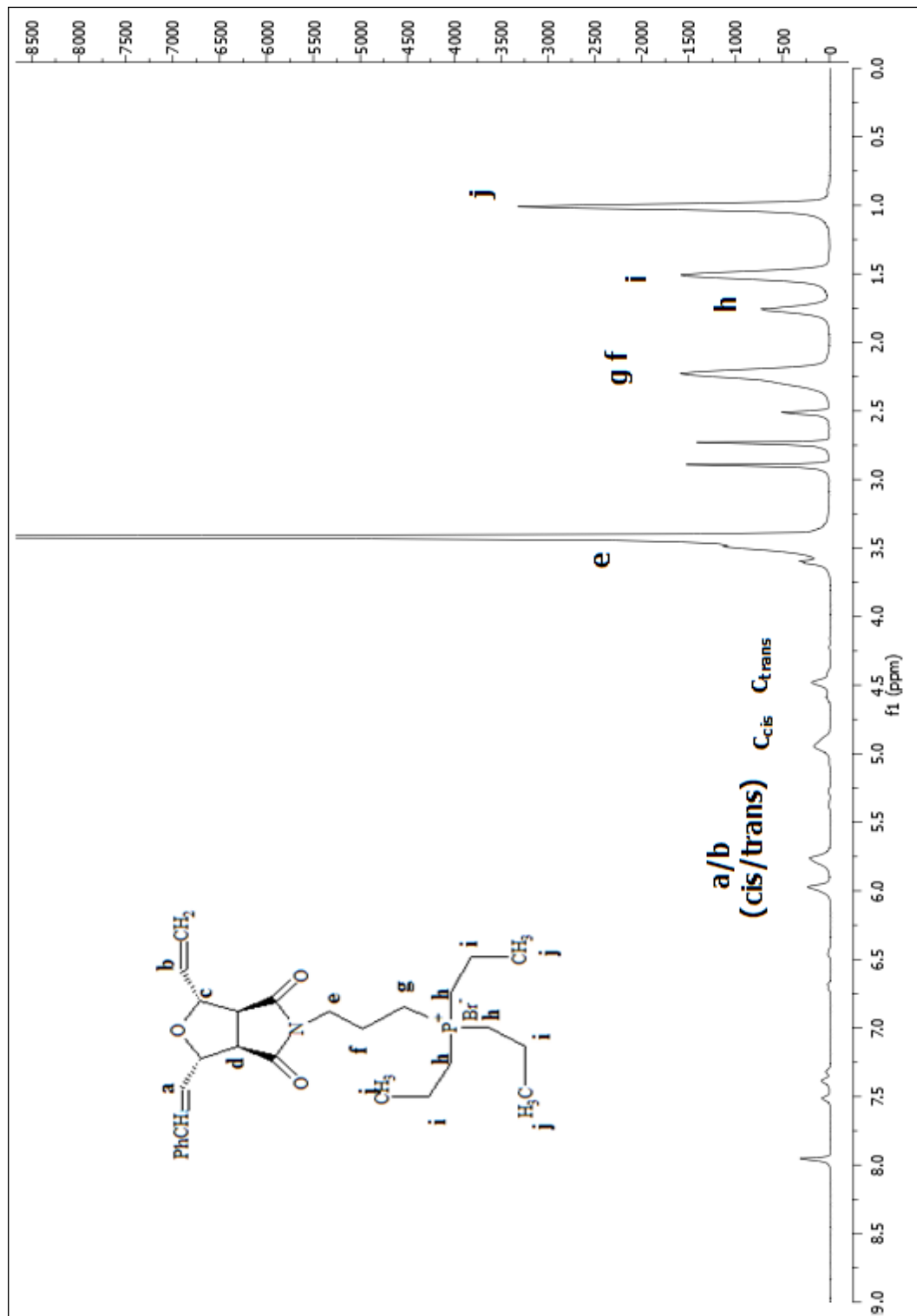




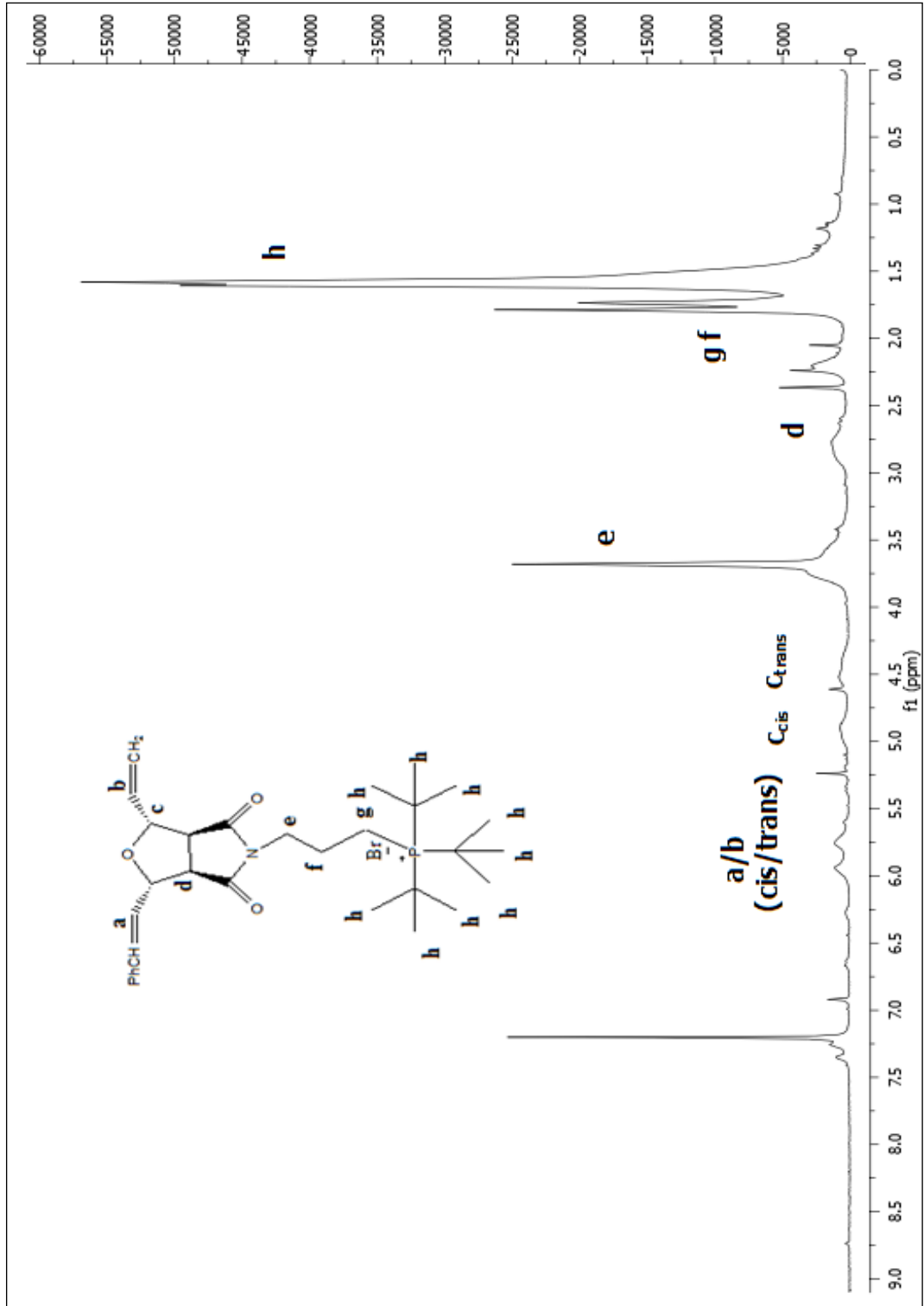
Şekil 6.22 P_Metil_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu



Şekil 6.23 P_Etil_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu



Şekil 6.24 P_Propil_3K polimerinin ^1H NMR spektrumu



Şekil 6.25 P_t-Bütıl₃K polimerinin ^1H NMR spektrumu

Şekil 6.20-6.25'te gösterilen polimerlerin ^1H NMR spektrumundan M_n analizi yapılmıştır. Grubbs 3. Jenerasyon katalistinden gelen polimerin son grubu olan fenil halkaları 7.3 ppm civarında gelmektedir ve 5 protona sahiptir. a_{cis} protonu ise 6.0 ppm civarı gelmektedir ve 2 protona sahiptir. Bu iki protonun spektrum üzerinden integrallerini alınır ve proton başına düşen integrallerinin birbirine oranının monomerin molekül ağırlığıyla çarpımı bize polimerin molekül ağırlığını (M_n) verir. (Örneğin; P_t-Bütil_3K polimerinin fenil halkası integrali referans olarak 1 alınmıştır. Bu sonuç fenil halkasında bulunan 5 proton içindir. Bu nedenle integral sonucu 5'e bölünerek proton başına düşen integral değeri bulunur. Bu referansa göre 2 proton içeren a_{cis} 'in integrali 3,71 bulunmuştur ve aynı işlem a_{cis} protonu için de yapılmıştır). P_Phe_3K, P_Phe_10K, P_Metoksi_Phe_3K ve P_Metoksi_Phe_10K polimerleri zaten fenil halkaları içerdiği için katalisten gelen fenil halkaları ile spektrum üzerinde çakışmaktadır ve bu nedenle M_n analizleri yapılamamıştır (Çizelge 6.1).

Polimerlerin M_n analizi için bir başka yöntem olan Viscotek GPCmax cihazı kullanıldı. Suda çözünmeyen P_Phe_3K, P_Phe_10K, P_Metoksi_Phe_3K P_Metoksi_Phe_10K ve P_t-Bütil_10K polimerlerin GPC ile M_n analizleri yapılamamıştır. Polimerler sisteme verilmeden önce 0.1 M asetik asit ve 0.15 M NaCl çözeltisinde çözülmüşlerdir. Çizelge 6.1'de projede sentezlenen polimerlerin GPC ile M_n tayinleri görülmektedir. Polimerlerin poli dispersite indekslerine (PDI) baktığımızda hepsinin 1'e yakın olduğu görülmektedir. Bu da sentezlediğimiz polimer zincirlerinin homojen uzunluklarda olduğunu göstermektedir.

Çizelge 6.1 Projede sentezlenen polimerlerin teorik ve GPC ile molekül ağırlıkları tayini

Polimer	$M_{n,teorik}$	$M_{n,NMR}$	$M_{n,GPC}^a$	$M_{w,GPC}^b$	$M_{z,GPC}^c$	$M_{p,GPC}^d$	PDI_{GPC}^e
P_Phe_3K	3.000	-	-	-	-	-	-
P_Phe_10K	10.000	-	-	-	-	-	-
P_Metoksi_Phe_3K	3.000	-	-	-	-	-	-
P_Metoksi_Phe_10K	10.000	-	-	-	-	-	-
P_Metil_3K	3.000	3.864	6.306	6.676	7.302	5.889	1,059
P_Metil_10K	10.000	9.430	38.137	42.036	47.308	44.835	1,102
P_Etil_3K	3.000	4.475	7.234	7.645	8.369	6.796	1,057
P_Etil_10K	10.000	14.028	14.298	15.000	16.064	14.484	1,049
P_Propil_3K	3.000	4.053	8.869	9.371	10.452	8.260	1,057
P_Propil_10K	10.000	15.534	17.277	17.409	17.545	17.975	1,008
P_t-Bütil_3K	3.000	3.698	30.911	32.769	99.950	30.650	1,060
P_t-Bütil_10K*	10.000	-	-	-	-	-	-

$M_{n,teorik}$: teorik sayıca ortalama molekül ağırlığı (Da)

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

$M_{n,GPC}^a$: GPC ile sayıca ortalama molekül ağırlığı (Da)

$M_{w,GPC}^b$: GPC ile ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (Da)

$M_{z,GPC}^c$: GPC ile z-ortalama molekül ağırlığı (Da)

$M_{p,GPC}^d$: GPC ile en yüksek pik molekül ağırlığı (Da)

PDI^e : GPC ile poli dispersite indeks ($PDI = Mw/Mn$)

* P_t-Bütil_10K polimerinin 1H NMR spektrumu analizi yapılamamıştır. Polimer suda çözünmediği için de GPC analizi yapılamamıştır.

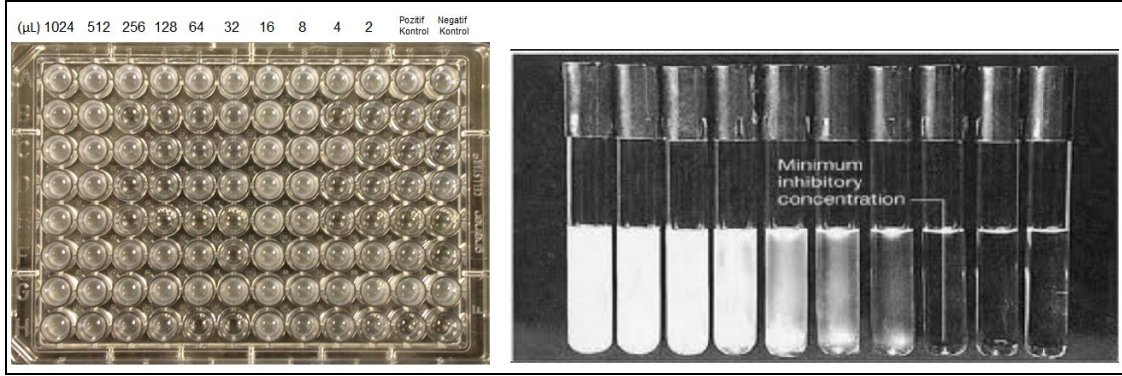
Su bazlı GPC, polietilenglikol (PEG) standartlarına göre kalibre edilmiştir. GPC sonuçlarının teorik molekül ağırlığından sapmasının en önemli nedeni sentezlediğimiz polimerlerin hidrodinamik hacimleri ile polietilenglikolün hidrodinamik hacimi arasındaki farktan doğmaktadır.

6.2 Antimikrobiyal Etkinlik

6.2.1 Polimerlerin Sıvı Fazdaki Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi

Antimikrobiyal ajanların MIC değerlerinin tespit edilmesi için dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler antimikrobiyal duyarlılık testleri için referans

yöntemlerdir. Bir mikroorganizmanın gözle görülebilir olarak üremesinin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu “Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIC)” olarak belirlenir. Proje kapsamında sentezlenen polimerlerin analizi için makrodilüsyon (tüp) ve mikrodilüsyon (96 kuyucuklu plaka) olmak üzere iki farklı yöntem uygulanmıştır (Şekil 6.26).



Şekil 6.26 Mikrodilüsyon ve makrodilüsyonun şekilsel gösterimi

Her madde 1024 µg/mL olacak şekilde çözücü madde de çözülür (su, DMSO v.s). Besiyerinde, bir gece 37°C’de üremiş mikroorganizmalardan 0,5 McF (1x 10⁶ CFU/mL) bulanıklığa sahip süspansiyonlar hazırlanır. Tüp dilüsyon için 10 adet 8 ml’lik steril tüpe 772 µL sıvı besiyeri (LB broth) eklenir. Bu tüplere sırasıyla ½ oranında MIC testi yapılan maddenin seri dilüsyonları yapılır. Üzerine 100 µL mikroorganizma süspansiyonundan eklenir. Diğer tüplerden birine sadece besiyeri konulur ve bu tüp negatif kontroldür, kalan tüpe ise sadece 100 µL mikroorganizma ve 900 µL besiyeri konulur bu tüpte pozitif kontrol olur. Tüm tüpler vortekslenir ve 37°C’de 1 gece inkübe edilir. Ertesi gün sonuçlar değerlendirilir. Üreme olmayan en son konsantrasyon minimal inhibitör konsantrasyonu olarak değerlendirilir. Aynı işlem mikrodilüsyon yöntemi için de uygulanır ve eklenecek olan besiyeri ve bakteri miktarları örneğimizin konsantrasyonuna uygun olarak değiştirilir. Hazırlanan örneklerin, 600 nm’de optical density ile absorbansı okunmuştur. Çizelge 6.2’de çalışmada kullanılan polimerlerin sıvı fazdaki MIC değerleri verilmektedir. Bu çizelge incelendiğinde özellikle fenil halkasına sahip polimerlerin (P_Phe ve P_Metoksi_Phe) bakteriyeye etkinliklerinin diğer polimer yapılarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür (<32 µg). Antibakteriyel etkinlik olarak en etkin polimerin trifenilfosfin esaslı ve 3.000 g/mol molekül ağırlığındaki polimerin olduğu görülmüştür (P_Phe_3K). Bu polimer E.coli’ye karşı 16 µg, S.aureus’a karşı ise 8

μg etkinlik göstermiştir. Bütün polimerlerin *C.albicans*'a karşı etkinliğinin düşük olduğu görülmüştür.

Çizelge 6.2 Bu çalışmada kullanılan polimerlerin MIC ^a değerleri

Polimer	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	Mn _{teorik} ^b (g/mol)	E.coli	S.aureus	C.albicans
P_Phe_3K	3.000	16	8	128
P_Phe_10K	10.000	32	16	128
P_Metoksi_Phe_3K	3.000	32	8	128
P_Metoksi_Phe_10K	10.000	64	8	128
P_Metil_3K	3.000	512	512	512
P_Metil_10K	10.000	512	512	512
P_Etil_3K	3.000	>512	64	128
P_Etil_10K	10.000	>512	>512	>512
P_Propil_3K	3.000	>512	256	256
P_Propil_10K	10.000	>512	512	512
P_t-Bütil_3K	3.000	>512	128	128
P_t-Bütil_10K	10.000	512	32	128

MIC ^a çözelti fazında kullanılan bakterinin %90-100 inhibe edildiği minimum konsantrasyonudur.

Mn_{teorik}^b değerleri polimerlerin sayıca ortalama molekül ağırlıklarıdır.

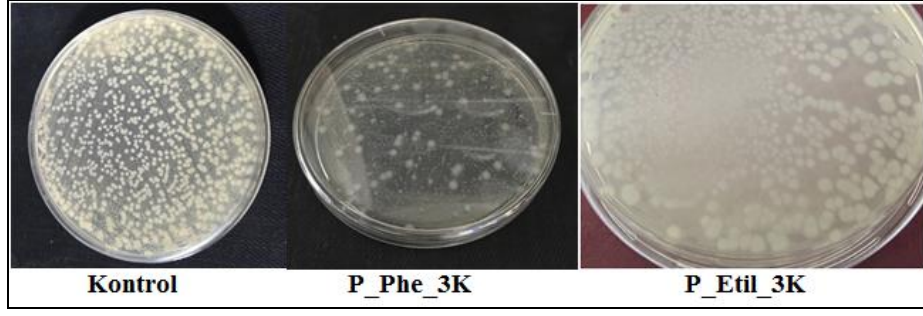
Bu veriler sonucu polimerlerin MIC değerlerine bakacak olursak; Gram negatif bakterinin (*E.coli*), Gram pozitif bakteriden (*S.aureus*) farklı olarak sahip olduğu dış zar nedeniyle sentezlediğimiz polimerlerin fosfolipit tabaka ile etkileşimi daha zor olduğu ve bu nedenle de MIC değerinin daha büyük olduğu görülmektedir. Ayrıca, güçlü yan gruplara sahip polimerlerin (*P_Phe_3K*, *P_Phe_10K*, *P_Metoksi_Phe_3K*, *P_Metoksi_Phe_10K*) molekül ağırlığı etkisine bakıldığında (3.000 ve 10.000 g/mol) antimikrobiyal etkinliğe önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

6.2.2 Polimerlerin Katı Yüzeyde Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi

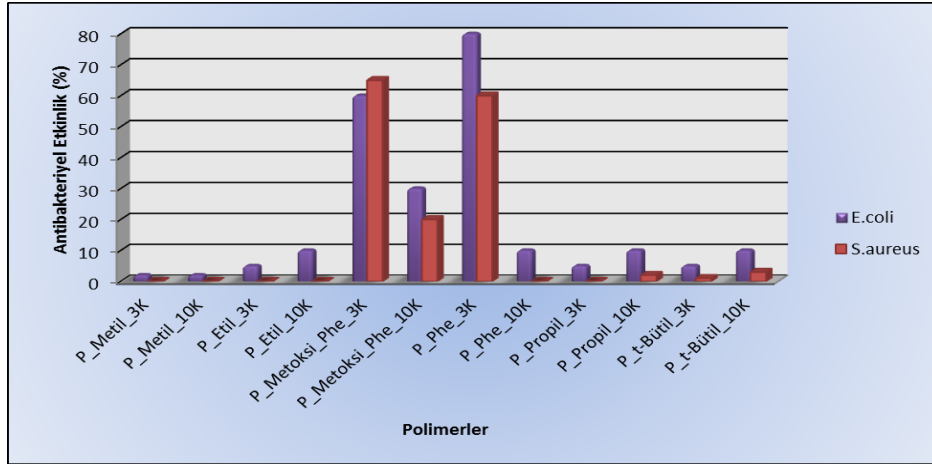
Proje kapsamında sentezlenen homopolimerlerin sıvı fazda etkinliklerinin yanısıra katı fazda (cam yüzey) etkinlikleri de çalışılmıştır. Bu kapsamda antimikrobiyal etkinlik için 1 $\mu\text{g/mL}$ polimer çözeltisi hazırlandı ve 2,5 X 2,5 cm cam yüzeylere 2000 rpm hızda spin kaplama cihazı ile kaplandı. Antibakteriyel test ATCC25922 metoduna göre *E.coli* ve *S.aureus* ile çalışılmıştır. Polimer ile kaplanmış yüzeylerin antibakteriyel aktivitesini

incelemek için airborne testing ve disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Airborne testing yöntemi için, E. Coli'nin ve S.aureus'un doymuş bir süspansiyonları 5 dakika boyunca 4000 rpm'de (oda sıcaklığı) santrifüjlendi. 10^6 CFU/mL'lik bir konsantrasyon elde etmek için hücreler, saf su içinde yeniden süspanse edildi. Elde edilen bakteri (10^6 hücre / mL) süspansiyonları test yüzeyleri (cam yüzey) üzerine püskürtüldü. Püskürtme yüzeyleri yaklaşık 5 dakika için kurutuldu ve daha sonra (VWR, 100 mm x 15 mm), boş bir steril polistiren Petri kapları içine yerleştirildi. Besin agarı bakteri püskürtülmüş yüzeyler üzerine boşaltıldı ve katılaşmaya bırakıldı. Yüzeyler 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi ve daha sonra koloniler sayıldı.

Polimerlerin cam yüzeyinden Ag nanopartiküller gibi, cam yüzeyi çevresine salınım yapıp yapmadığı test edildi. Bu çalışma sonucunda disk difüzyon oluşmadığı ve polimerlerin yüzeyden salınım yapmadığı görülmüştür. Şekil 6.27'de kontrol camının (sadece bakteri), P_Phe_3K ve P_Etil_3K ile kaplanmış camların bakteri ile etkileşmelerinin fotoğrafları gösterilmiştir. Burada özellikle sıvı fazda antibakteriyel olarak en aktiflere örnek P_Phe_3K ve aktif olmayanlara örnek olarak P_Etil_3K seçilmiştir. Yüzeyi kaplanmış cam etrafında inhibisyon bölgelerinin olmadığı, yüzeye kaplanmış bakterisidal polimerlerin camdan sızmadığını göstermiştir. Şekil 6.28'e bakacak olursak sıvı fazda olduğu gibi yine fenil halkası yapısındaki polimerlerin daha fazla (%60-80 öldürme) antibakteriyel etkinlik gösterdiği görülmektedir. Ayrıca polimerlerin E. coli'ye karşı daha etkin oldukları, S. aureus'a karşı etkinliklerinin ise düşük olduğu gözlenmektedir. Bunun sebebi; S. aureus'un dış zarında kalın bir peptidoglikan tabakanın olması ve bu tabaka yüzünden polimer zincirinin membran ile etkileşip bakteriyi öldürmesini zorlaştırması olduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 6.27 Antibakteriyel aktivitesini incelemek için kullanılan airborne testing ve disk difüzyon yönteminin gösterimi



Şekil 6.28 Çalışmada kullanılan polimerlerin yüzeydeki % antibakteriyel etkinlikleri

6.3 Sitotoksosite Çalışmaları

6.3.1 Hemolitik Konsantrasyon

Polimerlerin toksik özelliğini incelemek için hemolitik konsantrasyon (HC_{50}) değerlerine bakılır. Hemoliz; kırmızı kan hücrelerinin hücre zarında bulunan lipid tabakasının parçalanması olayıdır. Literatürdeki prosedüre göre donörlerden alınmış taze kırmızı kan hücreleri farklı konsantrasyondaki polimer çözeltilerine göre incelenmiştir. Hemoliz, Çizelge 6.3'te görüleceği üzere 414 nm'de serbest hemoglobinin abosarbansı ölçülerek incelendi. %100 hemoliz, güçlü bir yüzey aktif madde olan TRITON-X'den (Hacimce %20 DMSO içinde) 10 μ L alınıp prosedürlere göre hazırlanmış olan HRBC (taze kırmızı kan hücreleri) süspansiyonlarına eklenerek elde edildi. %50 hemolize neden olan polimer konsantrasyonunun bir üst limiti HC_{50} olarak adlandırılır, yalnız TRIS salin içeren polimersiz çözeltiden gelen absorbans %0 hemoliz olarak kabul edilir ve kontrol (blank) olarak alınır. Çalışmamızda kullanılan bazı maddeler DMSO'da

çözölmüştür fakat seyreltme yöntemi olarak konsantrasyon azaldığı için DMSO'nun hemoliz etkisi olmamıştır.

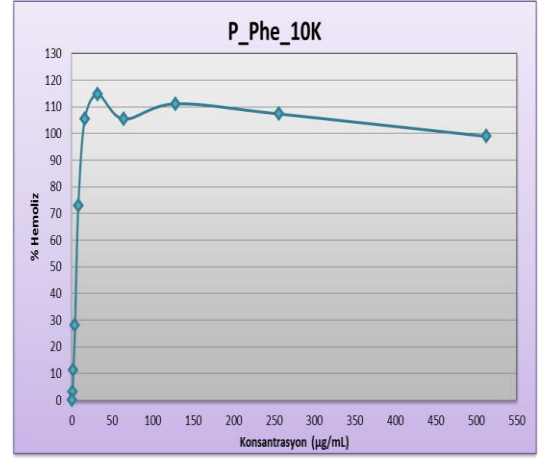
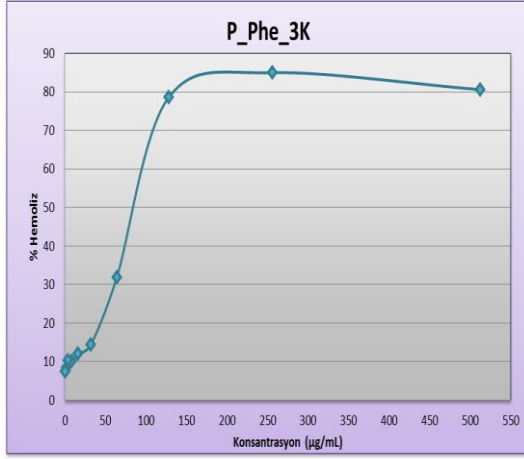
Bu çalışmamızda antibakteriyel etkinliği olan P_Phe_3K, P_Phe_10K, P_Metoksi_Phe_3K, P_Metoksi_Phe_10K ve antibakteriyel etkinliği olmayan P_t-Bütil_10K ve P_Etil_3K kullanılmıştır. Çizelge 6.4.'te çalışmamızda kullanılan polimerlerin HRBC'ye karşı %100 hemolitik aktiviteleri, Şekil 6.29-32'de ise bu aktivitelerinin grafiksel gösterimi verilmiştir. Şekil 6.31 ve Şekil 6.32'ye bakarsak antibakteriyel etkinliği olmayan P_Etil_3K ve P_t-Bütil_10K'nın kırmızı kan hücrelerini parçalama yüzdelerinin yüksek konsantrasyonda da düşük konsantrasyonda da az olduğu görölmektedir; bu durum bize P_Etil_3K ve P_t-Bütil_10K'nın toksik olmadığını gösterir. Antibakteriyel etkinliği olan P_Phe_3K, P_Phe_10K, P_Metoksi_Phe_3K, P_Metoksi_Phe_10K karşılaştıracak olursak bu polimerler ancak çok düşük konsantrasyonlarda toksik değildir; sadece P_Phe_3K'nın MIC değeriindeki konsantrasyonunda toksik etki göstermediği görölmektedir.

Çizelge 6.3 Polimerlerin HC₅₀ çalışmasında ölçölen absorbands değeri

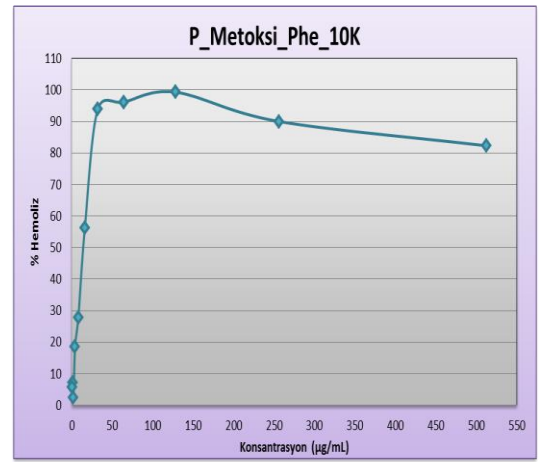
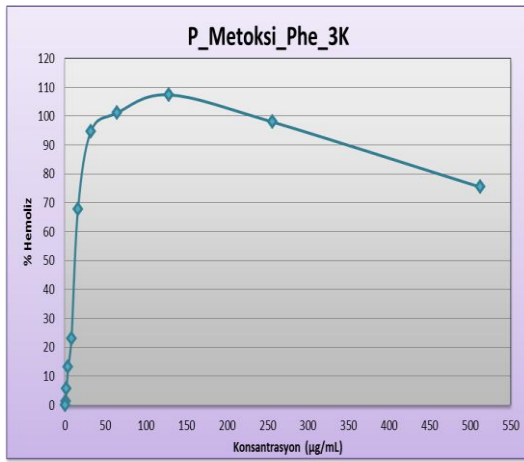
414 Nanometrede Absorbans Değeri											
Maddeler	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
P_Metoksi_Phe_3K	0,627	0,794	0,864	0,817	0,77	0,569	0,237	0,164	0,109	0,077	0,064
P_Metoksi_Phe_10K	0,678	0,735	0,804	0,78	0,763	0,483	0,273	0,205	0,085	0,119	0,11
P_t-Bütil_10K	0,411	0,651	0,079	0,076	0,073	0,087	0,07	0,058	0,054	0,061	0,052
P_Phe_3K	0,665	0,698	0,65	0,304	0,174	0,156	0,141	0,143	0,129	0,123	0,122
P_Phe_10K	0,801	0,863	0,891	0,849	0,917	0,851	0,607	0,275	0,15	0,089	0,062
P_Etil_3K	0,117	0,079	0,131	0,083	0,123	0,079	0,058	0,059	0,065	0,061	0,061
Kontroller	Blank = 0,067	DMSO = 0,543	Triton-X = 0,809								

Çizelge 6.4 Çalışmada kullanılan polimerlerin kırmızı kan hücrelerine karşı % hemolitik aktiviteleri

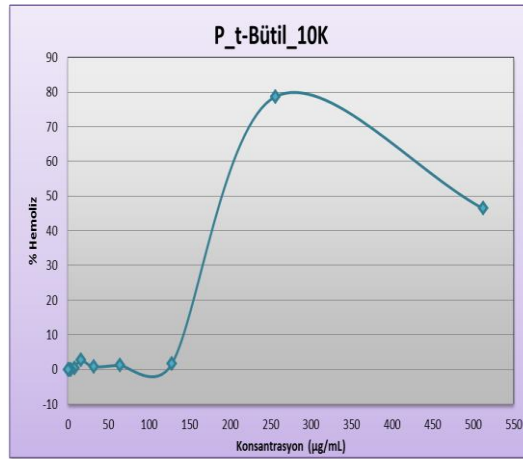
% Hemolitik Aktivite											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Maddeler	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
P_Metoksi_Phe_3K	75,5	98,0	107,4	101,1	94,7	67,7	22,9	13,1	5,7	1,3	0,0
P_Metoksi_Phe_10K	82,3	90,0	99,3	96,1	93,8	56,1	27,8	18,6	2,4	7,0	5,8
P_t-Bütil_10K	46,4	78,7	1,6	1,2	0,8	2,7	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
P_Phe_3K	80,6	85,0	78,6	31,9	14,4	12,0	10,0	10,2	8,4	7,5	7,4
P_Phe_10K	98,9	107,3	111,1	105,4	114,6	105,7	72,8	28,0	11,2	3,0	0,0
P_Etil_3K	6,7	1,6	8,6	2,2	7,5	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0



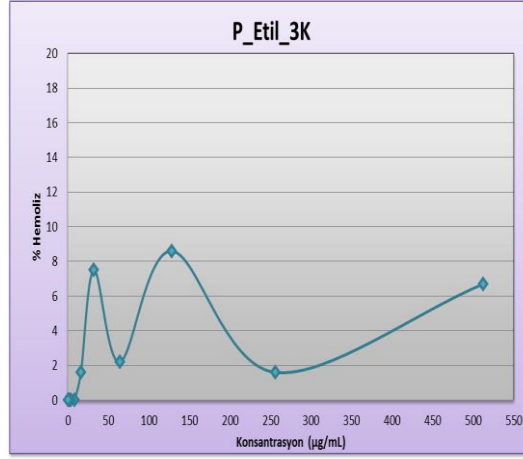
Şekil 6.29 P_Phe_3K ve P_Phe_10K'nın % hemolitik aktivitesinin grafiksel gösterimi



Şekil 6.30 P_Metoksi_Phe_3K ve P_Metoksi_Phe_10K'nın % hemolitik aktivitesinin grafiksel gösterimi



Şekil 6.31 P_t-Bütil_10K'nın % hemolitik aktivitesinin grafiksel gösterimi



Şekil 6.32 P_Etil_3K'nın % hemolitik aktivitesinin grafiksel gösterimi

P_Phe_10K, 4 µg'da hemolitik olmaya başlarken; P_Etil_3K'nın çalışılan konsantrasyon aralığında (0,5 µg/mL-512 µg/mL) hemolitik olmadığı ve böylece toksik etki göstermediği görülmektedir. Fakat P_Etil_3K'nın antimikrobiyal etkinliği düşüktür (>512 µg/mL). En iyi antibakteriyel etki gösterenlerden biri olan P_Phe_3K'nın MIC değeri olan 64 µg/mL'de hemolizi %50'nin altındadır.

6.4 Katyonik Yük Yoğunluğu Tayini

Katyonik yük tayini; sıvı fazda zeta potansiyel ile katı yüzeyde ise sodyum floresein metodu ile yapılmıştır.

Zeta potansiyel çalışması Malvern Zetasizer nano zs (633 nm dalga boyu, 175° yayılma açısı-scattering angle, -172,2 toluen sayım oranı -toluene count rate) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çalışma kapsamında suda çözünabilen, antibakteriyel etkinliği olmayan polimerlerden P_Metil_3K, P_Metil_10K, P_Etil_3K ve P_Etil_10K fosfat tamponu (pH 7.0) içinde, suda çözünmeyen ve antibakteriyel etkinliği olan polimerlerden P_Phe_3K, P_Phe_10K, P_Metoksi_Phe_3K ve P_Metoksi_Phe_10K ise DMSO içinde konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde stok çözeltisi olarak hazırlandı. Stok çözeltiden 100 µL alınarak 900 µL fosfat tamponu üzerine eklenerek son konsantrasyonun 0,1 mg/mL olması sağlandı. Zeta potansiyel cihazının küvetine konularak ölçüm alındı. Ölçüm sonunda P_Phe_3K'nın yükünün en fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 6.5).

Çizelge 6.5 Polimerlerin zeta potansiyel sonuçları

Polimer	Zeta Potansiyeli (mV)
P_Phe_3K	7,98
P_Phe_10K	0,177
P_Metoksi_Phe_3K	-6,59
P_Metoksi_Phe_10K	-0,0323
P_Metil_3K	0,259
P_Metil_10K	-0,112
P_Etil_3K	0,048
P_Etil_10K	0,245

Katı yüzeylerdeki katyonik yük yoğunluğu tayini sodyum floresein metodu ile yapılmıştır[115], [116]. Katyonik yük yoğunluğunu katı yüzeyde belirlemek için; 1 mg/mL konsantrasyonundaki polimerler ile kaplanmış ve kaplanmamış lameller (2,5 cm X 2,5 cm) destile suda hazırlanmış %1 floresein sodyum tuzunda 10 dakika bekletildi. Floresan işaretleyiciler, negatif yükleri sebebiyle, katyonik bölgelere kuvvetlice bağlandı ve reaksiyona girmeyen moleküller destile suyla iyice yıkanarak ortamdaki uzaklaştırıldı. Camlar, destile suda hazırlanmış %0,5'lik hekzadesiltrimetilamonyum klorür $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+\text{Cl}^-(\text{CH}_3)_3$ çözeltisine (4 mL) alındı ve 30 dakika sonikasyon uygulanarak bağlanmış floresein moleküllerinin bu çözeltiye geçmesi sağlanmış oldu. Bu işlem sonrasında her birine 0,6 mL doymuş NaHCO_3 (pH = 8.3) eklendi. Çözeltilerin floresan şiddeti 450 nm'de ölçüldü ve floresein sodyum tuzu çözeltisi farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizildi.

Polimer içeriği farklı olan polimer kaplı yüzeylerin boyanmasıyla, floresein bağlanması sonucu yapılan (+) yük tayini/cm², yaklaşık $3,81 \times 10^{14}$ - $5,67 \times 10^{15}$ arasında olduğu saptanmıştır. Bu çalışma ışığı altında yük yoğunluğu ve antibakteriyel aktivite arasında ilişki gözlenmiştir. Çizelge 6.2'den hatırlayacağımız P_Phe polimerinin yüksek aktivite gösterdiği (16 µg/mL) ve bu duruma paralel olarak Çizelge 6.6'da gördüğümüz üzere yüzeydeki yük yoğunluğunun en yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca bu polimerin yük yoğunluğu $5,67 \times 10^{15}$ (10 kDa için) ve $1,74 \times 10^{15}$ (3kDa için) olarak bulunmuş ve literatür verilerine göre aktivitenin beklenen yük yoğunluğuna paralel olduğu görülmüştür [118].

Çizelge 6.6 Polimerlerin Sodyum Floresein metodu ile içerdikleri katyonik yük yoğunlukları

Polimer	Katyonik Yük Yoğunluğu (yük. cm ⁻²)
Kontrol Cam	0
P_Metil_3K	7,04 x 10 ¹⁴
P_Metil_10K	3,81 x 10 ¹⁴
P_Etil_3K	5,54 x 10 ¹⁵
P_Etil_10K	6,71x 10 ¹⁴
P_Propil_3K	5,94 x 10 ¹⁴
P_Propil_10K	6,94 x 10 ¹⁴
P_t-Bütil_3K	6,45 x 10 ¹⁴
P_t-Bütil_10K	5,24 x 10 ¹⁴
P_Phe_3K	1,74 x 10 ¹⁵
P_Phe_10K	5,67 x 10 ¹⁵
P_Metoksi_Phe_3K	9,88 x 10 ¹⁴
P_Metoksi_Phe_10K	8,71 x 10 ¹⁴

Çizelge 6.6.'da yüksek molekül ağırlığındaki polimerlerin (10K), düşük molekül ağırlığındaki polimerlerinden (3K) kantitatif olarak daha düşük (+) yük miktarı verdiği görülmüştür. Floresan kompleksleşme yöntemi ile yüzey üzerinde bulunan polimer tabaka içindeki tüm yükler belirlenmeyebilir. Bunun sebebi polimer zincirinin temel yapısı hidrofobik oluşu ve bunun sonucu olarak molekül ağırlığı arttıkça zincirlerin etkileşme sarmalı artması ve iyonik yapıda olan floresein problemlerinin polimer matriksi içerisine nüfuz etmesini engellemesidir.

6.5 Temas Açısı Ölçümü

Cam yüzeyin hidrofilik değişimini aynı zamanda kuarternizasyonunu teyit etmek için temas açısı yöntemi kullanıldı. Çizelge 6.7'de temas açısı (contact-angle) statik ve bunlardan hesaplanan yüzey enerjisi verileri gösterilmektedir. Özellikle, fenil halkası içeren P_Phe ve P_Metoksi_Phe homopolimerlerinin hidrofobik özelliği yüksek çıktığı gözlenmiştir. P_Phe_10K, %7.4 polarlık gösterirken, P_Metil_3K polimeri %63.3 polarlık gösterdiği izlenilmiştir. Molekül ağırlığı arttıkça polarlık özelliğinde düşüş olduğu görülmüştür.

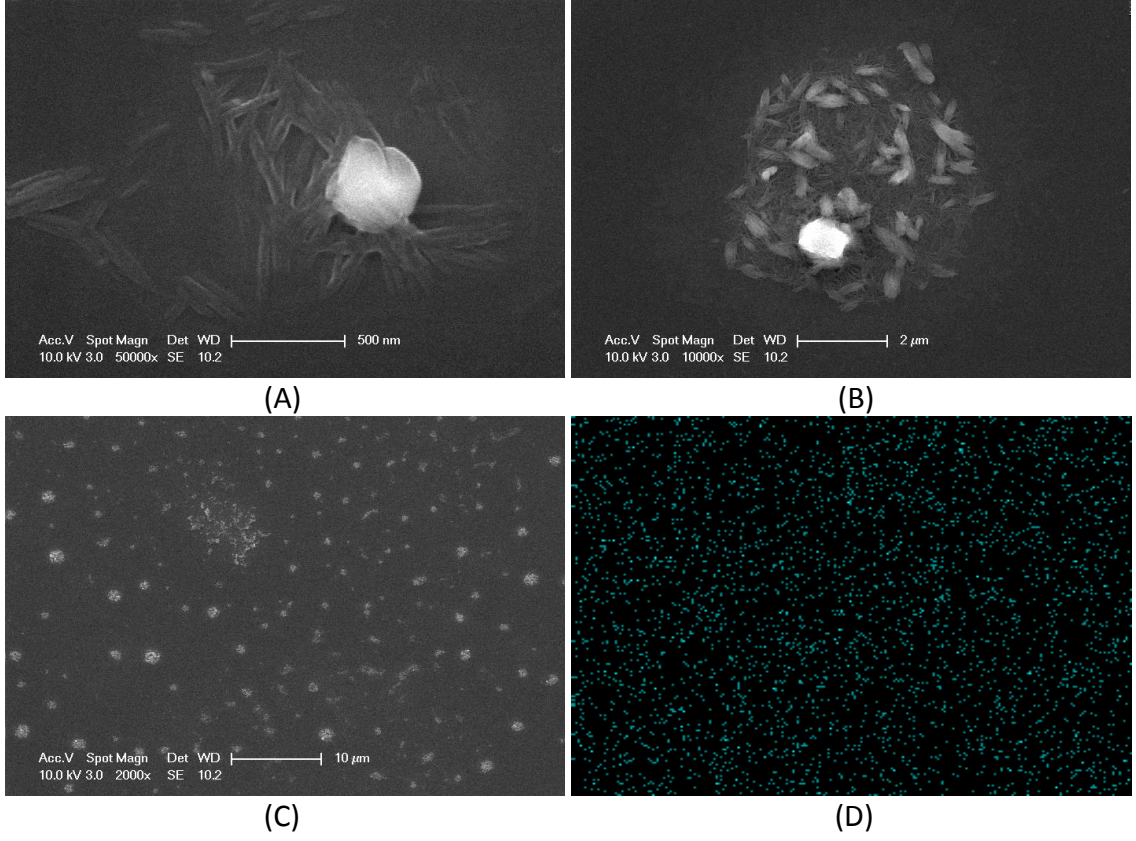
Çizelge 6.7 Polimerlerin temas açıları ölçüm sonuçları

Örnek	Su ile temas açısı (°)	Yüzey enerjisinin dağılan kısmı (Dispersive component) (mN/m)	Yüzey enerjisinin polar kısmı (mN/m)	Polarlık (%)
Cam kontrol	44,4 ± 4	23,7 ± 2,7	23,6 ± 1,5	50,1 ± 1,1
P_Metil_3K	26,8 ± 15,7	19,1 ± 1,8	32,9 ± 6,2	63,3 ± 2,8
P_Metil_10K	23 ± 13	30,8 ± 1,2	25,6 ± 4,7	45,3 ± 4
P_Etil_3K	26,4 ± 10	26,2 ± 6,8	26,8 ± 3,2	50,5 ± 4,4
P_Etil_10K	35,5 ± 15,5	32,9 ± 0,4	21,6 ± 6,4	39,6 ± 7,5
P_Propil_3K	34 ± 21	30,4 ± 0,1	21,3 ± 12,5	41,2 ± 12,1
P_Propil_10K	54,4 ± 26	32,6 ± 0,9	12,5 ± 9,8	23,1 ± 15,7
P_t-Bütil_3K	42,7 ± 24,5	30,5 ± 1,2	18,1 ± 10,8	37,2 ± 18,5
P_t-Bütil_10K	30,6 ± 6,7	30,9 ± 1,1	22,4 ± 3,3	42,1 ± 3,1
P_Phe_3K	62,7 ± 7	35,7 ± 1,3	8,2 ± 2,5	18,7 ± 4,6
P_Phe_10K	76,6 ± 4,1	38,6 ± 4,7	3,1 ± 1	7,4 ± 1,6
P_Metoksl_Phe_3K	62,5 ± 5,5	36,8 ± 1,7	9 ± 1,8	19,7 ± 2,7
P_Metoksi_Phe_10K	63,7 ± 10	35,7 ± 3,2	8,1 ± 3,3	18,5 ± 5,6

Temas açısı için eğilimleri arasındaki fark sadece yüzeydeki makromoleküllerin varlığına verilemez. Bunun nedeni moleküllerin hidrofobik kısmı, yüzeydeki üç boyutlu yapısı ve katyonik yük miktarı temas açısı ölçümlerini önemli ölçüde etkilediğini unutmamamız gerekir.

6.6 SEM Analizi

Yüzeydeki fosfonyum (+) iyon analizi SEM ile de incelenmiştir. FEI-Philips ESEM-FEG XL30 X-Ray mapping (Fosfor için) yapılarak yüzey analizi gerçekleştirilmiştir. Polimerin yüzeye uniform olarak dağıldığı görülmektedir. SEM analizinde fosfor miktarı kantitatif olarak tespit edilememiş, kalitatif olarak tespit edilmiştir. Kantitatif analiz çalışmalarında Cam ve Si-wafer yüzeyleri P_Phe_3K polimeri ile kaplanarak çalışılmıştır. Görüntü alınmasında, cam yüzeyi Pt yerine, karbon ile kaplanmıştır. Pt'nin hem kontrastı azaltması hem de P ve Pt pikleri ile çakışması sebebi ile karbon kaplama yapılmıştır. Kaplamasız camdan görüntü alınamamıştır. Si-Waferda kaplamasız görüntü alınmış ancak 1 mg/mL konsantrasyonunda P miktarı kantitatif olarak belirlenememiştir. EDS çalışmalarında %2'den aşağısı hata payının altında kaldığı için kalitatif olarak değerlendirme yapılmıştır. Yüzey kaplamada 5 mg/mL polimer solüsyonu kullanılarak Si-wafer üzerine spin kaplama yapılarak görüntü ve mapping yapılmıştır (Şekil 6.33). Mapping çalışmasında kantitatif P tayini düşük çıkmıştır (%3,6).



Şekil 6.33 P_Phe_3K polimerinin SEM görüntüleri ((A)=500 nm, B= 2 μm, (C)=10 μm, (D)= fosfor mapping))

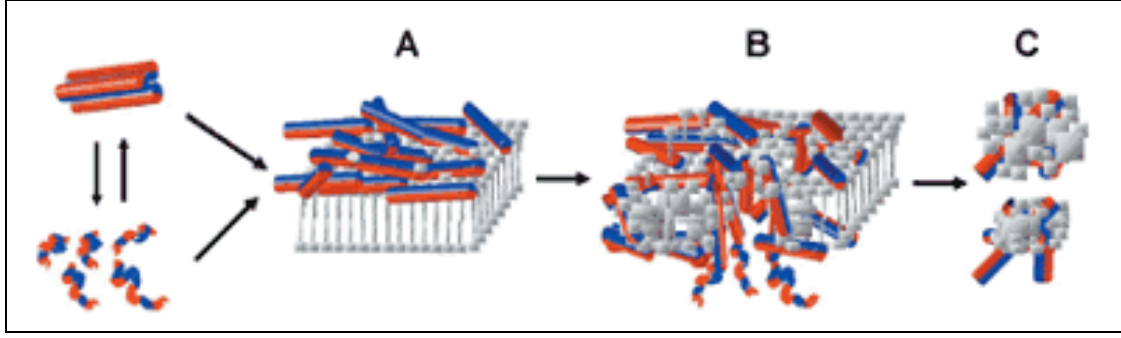
6.7 Polimerlerin Bakteriler ile Etkileşmesinin Biyofiziksel Teknikler ile İncelenmesi

Bakterilerin hücre duvarı negatif(-) yüklü olduğu için katyonik polimerlerin katyonik uçları, bu negatif yüklü hücre duvarlarıyla etkileşerek polimerin bakteri hücresi içine adsorbsiyonu sağlanır. Elektrostatik etkileşme sonucu bakterinin ölümü gerçekleşir. Yapılan biyofiziksel çalışmalarda katyonik grupların yanı sıra, hidrofobik etkileşme de önemli rol oynadığı bulunmuştur. Bakteri çeperinde bulunan uzun zincirli yağ asitlerinin polimerde bulunan hidrofobik gruplar ile etkileşmesi sonucu hücre zarında varolan düzenin bozulmasına yol açar. Bu düzensizlik iç basınç-dış basınç farkı oluşmasına ve sonuç olarak zarın parçalanmasına sebep olur.

Polikatyonik yüzeyler için önerilen iki ana antibakteriyel mekanizma vardır. Bunlardan biri, polikatyoniklerin biyomembran ile etkileşmesi; diğeri ise Ca^{+2} ve Mg^{+2} katyon değişimidir. Bu kapsamda birçok çalışma yapılmasına karşın, polimerle kaplı yüzeylerin antibakteriyel mekanizması hala araştırılmaktadır [116].

Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının değiştiği mekanizmaya göre pozitif yüklü katyonik polimer anyonik bir yüzey olan lipopolisakkarit (LPS) tabakasıyla etkileşir. Katyonik polimerlerin LPS'e olan afiniteleri iki değerlikli katyonlar olan ve LPS'i bir arada tutan Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'dan üç kat daha fazla olduğu için antibakteriyel polimerlerde bu iyonlar yarişmalı olarak yer değiştirirler. Bunun sonucunda katyonik polimerler hücre yüzeyinde birikerek LPS'i kısmen nötralize eder ve dış membranın normal bariyer bütünlüğünü bozarlar. Bütünlüğünü yitirmiş dış membran bu şekilde hidrofobik yapılar, küçük proteinler, antimikrobik maddeler ve en önemlisi katyonik polimerler için geçirgen hale gelir. Böylece katyonik polimerler kendi destekledikleri yolla dış membrandan geçerek fosfolipit yapıdaki sitoplazma membranına ulaşmış olurlar. İkinci aşama sitoplazma membranının geçilmesidir. Antimikrobik etkili katyonik polimerlerin bakterinin dış membranından geçmesi, bu maddelerin öldürücü etkileri için gerekli fakat yeterli değildir. Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için asıl öldürücü olan katyonik polimerlerin negatif yüklü sitoplazma membranı ile elektrostatik olarak etkileşmesidir. Bu olay sırasında katyonik polimerler hidrofilik grupları ile membran fosfolipitlerinin hidrofobik zincirleri karşı karşıya gelir, polimerler membrana paralel bir konum alarak membranın bütünlüğünü bozan kanalların oluşmasına yol açarlar. Bu olayı açıklamak için antimikrobiyal etkinlik gösteren peptitlerin kilim (carpet) modeli örnek alınır [119].

Kilim modeline göre; bakteri hücresinin negatif yüklü yüzeyinde bulunan fosfolipit gruplar ile pozitif yüklü polimer arasındaki ilk etkileşim elektrostatik olarak gerçekleşir. Antimikrobiyal peptitlerin ve sentetik türevlerinin hidrofilik yüzleri membrandaki fosfolipit gruplarla karşılıklı gelecek şekilde hedef hücrenin yüzeyine bağlanarak hücreyi bir kilim gibi örterler. Bu durumdaki polimerler yeterli konsantrasyona ulaştıktan sonra polimer molekülleri dönerek membranın hidrofobik kısmına doğru bakacak şekilde yeniden yerleşirler ve deterjanlara benzer bir etki göstererek membranın parçalanmasına yol açarlar [120].



Şekil 6.34 Kilim (carpet) modeli mekanizmasının şematik gösterimi [120]

Şekil 6.34'te antimikrobiyal polimerlerin kilim (carpet) modeli mekanizması görülmektedir. A kısmında; antimikrobiyal polimerlerin membrana nüfuzu görülmektedir. B kısmında; polimerlerin mavi ile gösterilen membran zarına doğru bakan hidroforik bölümü, kırmızı kısımlar ise solvante bakan hidrofilik bölümünü göstermektedir. C kısmında ise; membranı parçaladığı görülmektedir. Mekanizma kapsamında hücre duvarında boşluk oluşturulması (pore) ve molekülün hücre duvarından içeri geçerek hücre içinde enzim, DNA ile etkileşmesi ve sonucunda bakterinin ölümüne sebep olması da mevcuttur [120]. Ancak antimikrobiyal ROMP polimerlerinin özellikle kilim (carpet) modelini izlediği görülmüştür.

6.7.1 Bakteri ve Polimer Etkileşmesinin Zeta Potansiyel ile Ölçülmesi

Suda çözünen polimer (P_Etil_3K) için sadece 10^6 CFU/mL konsantrasyonundaki E.coli'nin, suda çözünmeyen polimerler (P_Phe_3K, P_Metoksi_3K) için 900 μ L E.coli üzerine 100 μ L DMSO ilave edilmiş çözeltinin zeta potansiyeli ölçülerek blank elde edildi. Suda çözünen ve çözünmeyen polimerden 0,5 mg/mL konsantrasyonundan 100 μ L alındı ve üzerlerine 900 μ L'şer E.coli eklenerek zeta potansiyelleri ölçüldü. E. coli'nin zeta potansiyeli 0,00161 mV bulunmuştur. DMSO'nun bakteri üzerine öldürücü etkisi olup olmadığı anlaşılması için E. coli'ye DMSO eklenerek zeta potansiyeli ölçülmüş ve 0,0437 mV sonucu bulunarak DMSO'nun bakterileri öldürmeye karşı kayda değer bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Teorik olarak; polimerlerin, bakterinin hücre membranı ile etkileşerek bakteriyi öldürmesi sonucu olarak fosfolipitlerin serbest hale geçmesi; polimer antibakteriyel etkisi arttıkça da fosfolipitlerden gelen negatif yük sebebiyle zeta potansiyel sonucunun negatif olması beklenmektedir. Çizelge 6.5'ten hatırlayacağımız gibi antibakteriyel etkinliği yüksek P_Phe_3K'nın zeta potansiyeli 7,98

mV iken bakteri ile birlikte ölçümünde -17,1 mV bulunmuştur (Çizelge 6.8). MIC'i >512 µg/mL olan P_Etil_3K'nın zeta potansiyeli 0,048 mV iken bakteri ile birlikte ölçüldüğünde -0,0303 mV sonucunu vermiştir. Teorik olarak beklenildiği gibi antibakteriyel etkinliği yüksek olan P_Phe_3K ve P_Metoksi_Phe_3K'nın antibakteriyel etkinliği olmayan P_Etil_3K'ya oranla negatif yük artışı çok daha fazladır.

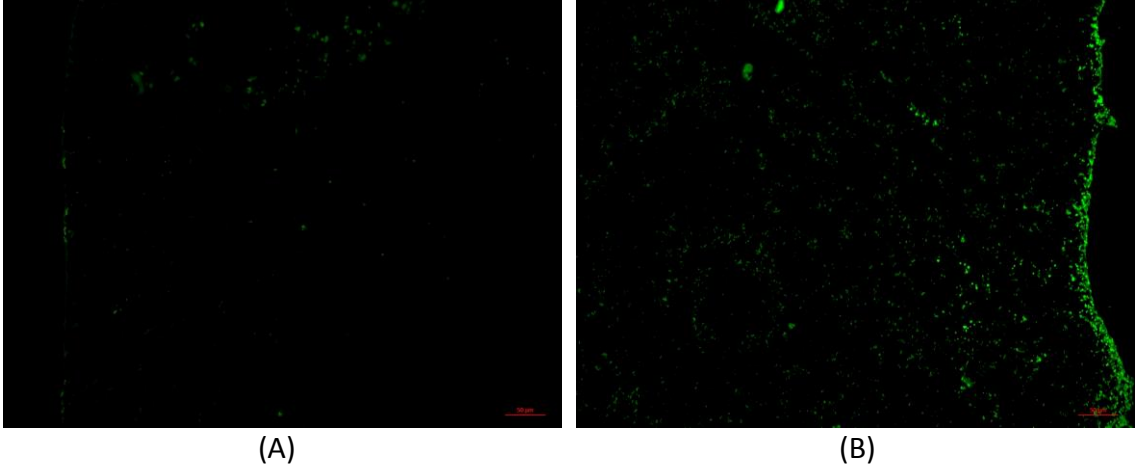
Çizelge 6.8 Polimerlerin bakteri ile birlikte zeta potansiyel ölçüm sonuçları

	Zeta Potansiyeli (mV)
E.coli	0,00161
E.coli+DMSO	0,0437
E.coli+P_Phe_3K	-17,1
E.coli+P_Metoksi_Phe_3K	-15,1
E.coli+P_Etil_3K	-0,0303

6.7.2 Floresan Mikroskopu ile Bakteri Polimer Etkileşmesinin Görüntülenmesi

Çalışmada polimer kaplı cam yüzeylerde Sybr Green boyar maddesi kullanılarak polimerlerin bakteri ile etkileşmesi incelenmiştir. Ölü bakteriler boyar madde sayesinde mavi ışık altında 497 nm'de floresan özellik göstererek yeşil renk vermektedir.

Taze hazırlanmış 1 Mcfarland *S. aureus*'tan 100 µL bir eppendorf tüpe koyuldu. Üzerine, bakterilerin DNA'sı ile etkileştiğinde yeşil renk veren 0,01 mol Sybr Green'den 35 µL eklendi. Karışım, vortekslendikten sonra 2 mg/mL konsantrasyonunda P_Phe_3K polimeri ile kaplanmış cam yüzeyin üzerine sürüldü. Cam yüzeyin kuruması için 15 dakika beklenildi ve floresan mikroskopu altında bakıldı. Cam yüzeyine kaplanmış polimerler bakterisidal etki gösterdikleri için hücre membranındaki fosfolipitlerle etkileşerek hücreyi parçalarlar. Bu parçalanma sonucu ortamda bakterinin serbest DNA'sı bulunur. Sybr Green bu serbest DNA'lar ile etkileşerek floresan mikroskopu altında yeşil gözüktürler. Kalitatif olarak yeşil renklerin sayısındaki artış, ölü bakterilerin sayısı ile orantılıdır. Şekil 6.35'te polimer ile kaplanmamış kontrol camın (A) ve P_Phe_3K ile kaplanmış cam yüzeyinin (B) floresan mikroskopu görüntüleri görülmektedir. Şekil 6.35 (B)'de görüldüğü gibi antibakteriyal aktivite gösteren P_Phe_3K kaplı yüzeyde yeşil renk önemli miktarda yoğun görülmektedir.



Şekil 6.35 Floresan mikroskop görüntüleri ((A)=polimer kaplanmamış kontrol cam, (B)=P_Phe_3K kaplı cam)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, farklı alkil ve aromatik grupları içeren (fenil, metoksifenil, metil, etil, propil, tert-bütil) amfifilik fosfonyum tuzu esaslı ROMP homopolimerleri sentezlendi. Homopolimerlerin molekül ağırlıkları 3.000 ve 10.000 g/mol olarak belirlendi. Monomer ve polimerlerin karakterizasyonu (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR ve FTIR) sonrası sıvı ve katı yüzeyde antimikrobiyal etkinlik çalışmaları yapıldı. Özellikle aromatik gruplar bulunduran homopolimerlerin en yüksek aktivitede ($<16\text{ }\mu\text{g}$) olduğu bulundu. Polimerlerin sitotoksikite çalışmaları hemolitik konsantrasyon (HC_{50}) değerleri ölçülerek belirlendi. Antimikrobiyal etkin polimerlerin hemolitik olduğu buna karşın etil fosfonyum tuzu esaslı polimerin 0,5-512 μg aralığında hemolitik olmadığı görüldü.

Sıvı fazdaki antimikrobiyal etkinliğin yanında polimer ile kaplanmış cam yüzeylerde de antimikrobiyal test çalışmaları yapıldı. Aromatik fosfonyum tuzu esaslı polimerlerin sıvı fazdaki aktifliğine benzer şekilde katı yüzeyde de etkin polimerler oldukları görüldü. 3.000 g/mol ağırlığındaki fenil fosfonyum tuzu esaslı polimerin (P_Phe_3K) E. coli'ye karşı etkinliği 5 dakikada %80 verime ulaştığı görüldü.

Polimerlerin (+) yük tayini sodyum floresein ve zeta potansiyel metotları ile incelenmiştir. Sodyum floresein metodunda (+) yük/ cm^2 yaklaşık $3,81 \times 10^{14}$ - $5,67 \times 10^{15}$ arasında olduğu saptanmış, en aktif polimer olan P_Phe'nin yük yoğunluğu $5,67 \times 10^{15}$ (10 kDa için) ve $1,74 \times 10^{15}$ (3 kDa için) bulunmuştur.

Polimerlerin yüzeydeki hidrofobik özelliği temas açısı ile incelenmiştir. Özellikle fenil halkası içeren (P_Phe, P_Metoksi_Phe) homopolimerlerin hidrofobik özelliğinin yüksek olduğu görülmüştür.

Biyofiziksel çalışma kapsamında polimer ile kaplı cam yüzeyler üzerine bakteri çözeltisi sürülmesiyle ölen bakterileri görüntüleme amacıyla Sybr Green boyar maddesi kullanılarak floresan mikroskopu altında cam yüzeyler incelenmiştir. Bu çalışma öncesi cam yüzeylerde polimerlerin uniform kaplandığı SEM analizi ile görüntülenmiştir. Özellikle aktif polimer olan P_Phe_3K'nın bakterileri diğer polimerlere oranla hızlı bir şekilde ve daha fazla öldürdüğü mikroskop altında gözlenmiştir.

Sentezlenen polimerlerin yeni nesil antibiyotikler için bir data bankası oluşturacağı gibi, kateter tüplerinin yüzeyinin kaplanması, implant malzemeler (yara bandı, sargı bezi gibi) alanlarda da kullanılabileceği öngörülmektedir. Bu kapsamda geniş spektrum aktivite ve yüzeyde hücre toksikoloji çalışmalarına gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Krauss H., W.A., Appel M., Enders B., Graevenitz A. V., Isenberg H. D., Schie-fer H. G., Slenczka W., Zahner H., (2003). "Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans", ASM Press. American Society for Microbiology: 456.
- [2] "Enfeksiyon Nedir", <http://www.osmortadogu.com/birimler-enfeksiyon.hak>, 22 Haziran 2015.
- [3] "Bulaşıcı Hastalıkların Tarihçesi", http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/sb/bh/bulasici_tarih.asp, 22 Haziran 2015.
- [4] PS., B., (1981). "Nosocomial infection control: an overview", Rev Infect Dis: 640-648.
- [5] Haley RW, C.D., White JW, Morgan WM, Emori TG., (1985). "The nationwide nosocomial infection rate: a new need for vital statistics", Am J Epidemiol: 159-167.
- [6] Pittet, D. Tarara, D. ve Wenzel, R.P., (1994). "Nosocomial Bloodstream Infection in Critically Ill Patients: Excess Length of Stay, Extra Costs, and Attributable Mortality", Jama, 271: 1598-1601.
- [7] Pollock, E. Ford-Jones, E.L. Corey, M. Barker, G. Mindorff, C.M. Gold, R. Edmonds, J. ve Bohn, D., (1991). "Use of the Pediatric Risk of Mortality score to predict nosocomial infection in a pediatric intensive care unit", Critical care medicine, 19: 160-165.
- [8] Karahocagil, M.K. Yaman, G. Gökteş, U. Sünnetçioğlu, M. Çıkman, A. Bilici, A. Yapıcı, K. ve İrfan, A., (2011). "Hastane enfeksiyon etkenlerinin ve direnç profillerinin belirlenmesi", Van Tıp Dergisi, 18: 27-32.
- [9] Allegranzi, B. Bagheri Nejad, S. Chraiti, M. Combescure, C. Attar, H. ve Pittet, D., (2011). "Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide", Geneva: World Health Organization: 1-34.

- [10] Haley, R.W. Culver, D.H. White, J.W. Morgan, W.M. Emori, T.G. Munn, v.P. ve Hooton, T.M., (1985). "The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in us hospitals", American journal of epidemiology, 121: 182-205.
- [11] Yılmaz, G. Çevik, M. ve Şardan, Y., (2002). "Hastane infeksiyonlarının sürveyansı ve Amerika Ulusal Nozokomiyal İnfeksiyon Sürveyans Sistemi: I", Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 6: 55-71.
- [12] Ayliffe, G.A. Collins, B. ve Taylor, L.J., (1982). Hospital-acquired infection: principles and prevention: Bristol, UK; John Wright & Sons Ltd.
- [13] Otkun, M. Akata, F. Teker, B. Aka, F. Tatman-Otkun, M. Tuğrul, M. ve DüNDAR, V., (1997). "Trakya Üniversitesi Hastanesinde hastane infeksiyonları: 1995 yılı sonuçları", İnfeks Derg, 11: 23-27.
- [14] Görenek, L. Beşirbellioğlu, B. Gül, C. Tabak, F. ve Hacıbektaşoğlu, A., (1997). "GATA Eğitim Hastanesinde hastane infeksiyonu insidansı", Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 1: 97-100.
- [15] "Types of Healthcare-associated Infections", <http://www.cdc.gov/HAI/infectionTypes.html>, 18 Mart 2014.
- [16] Hoşoğlu, P.D.S., "Hastane Enfeksiyonları", <http://www.dicle.edu.tr/Contents/411bbb3c-e0cc-4498-976c-f802e54a67ed.pdf>, 22 Haziran 2015.
- [17] Aygün, G., (2008). "Damar İçi Kateter Enfeksiyonlarının Önlenmesi ve Kontrolü", İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Hastane Enfeksiyonları Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi: 79-88.
- [18] H., L., (2000). "Katatere Bağlı Enfeksiyonlardan Korunma", ANKEM Dergi: 468-472.
- [19] Prof. Dr. Sercan Ulusoy, P.D.H.A., Prof. Dr. Semih Başkan, Doç Dr. Mutlu Arat, (2005). "Damar İçi Kateter İnfeksiyonlarının Önlenmesi Kılavuzu", Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 9.
- [20] Altay, E., (2013). ROMP(ring opening metathesis polymerization) metodu ile katyonik polinorbornen türevlerinin sentezi, karakterizasyonu ve antimikrobiyal etkinliğinin incelenmesi, Kimya YTÜ, 123.
- [21] "Bakteriler hakkında bilgi", www.nkfu.com/bakteriler-hakkinda-bilgi, 22 Haziran 2015.
- [22] Barış, Ç.Ç. ve Kırbaşlar, F.G., (2015). "A Study of Certain Biology and Biotechnology Concepts in Secondary School and High School Course Books in Terms of Scientific Competency", Procedia-Social and Behavioral Sciences, 174: 420-426.
- [23] "Bakteri", <http://tr.wikipedia.org/wiki/Bakteri>, 22 Haziran 2015.
- [24] Nordqvist, C., "what is bacteria? what are bacteria?", <http://www.medicalnewstoday.com/articles/157973.php>, 18 Kasım 2014.

- [25] Sayar, D.A., "Mikrobiyolojinin tarihçesi", <http://www.doktorlar.de/makaleler/63-mikrobiyolojinin-tarihcesi.html>, 22 Haziran 2015.
- [26] Bilgehan, H., (2005). Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi: (Uygulama konuları ile): Fakülteler Kitabevi Barış yayınları.
- [27] "Bacillus", www.mikrobiyoloji.org, 22 Haziran 2015.
- [28] Todar, K., The Genus Bacillus, http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus_2.html, 22 Haziran 2015.
- [29] Arrangement of cocci, <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap04/lecture2.htm>, 22 Haziran 2015.
- [30] "Spiral bacteria", http://en.wikipedia.org/wiki/Spiral_bacteria, 22 Haziran 2015.
- [31] Ishige, T. Honda, K. ve Shimizu, S., (2005). "Whole organism biocatalysis", Current opinion in chemical biology, 9: 174-180.
- [32] Polatlı, A., "bakterilerde sınıflandırma", <http://www.makaledizin.com/bilim-makaleleri/bakterilerde-siniflandirma.htm>, 22 Haziran 2015.
- [33] Akkaya, S.E, O.A., Öztürk, E., Cavak, Ş., "biyoloji", http://img.eba.gov.tr/ekitapftp/biyoloji/9/derskitabi/meb/biyoloji_9_derskitabi_meb_biyoloji_FfLow.pdf, 22 Haziran 2015.
- [34] Gram, H.C.J. ve Friedlaender, C., (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt-und Trockenpräparaten: Theodor Fischer's medicinischer Buchhandlung.
- [35] Medicinehack, "Gram staining - procedure, mechanism, explanation", <http://www.medicinehack.com/2012/02/gram-staining-procedure-mechanism.html>, 22 Haziran 2015.
- [36] Şakar, S., (2008). "Çevre mikrobiyolojisi 1 ders notları".
- [37] Ders notları: Temel mikrobiyoloji 2, <http://biyosalkarsav.blogspot.com.tr/2014/07/ders-notlar-temel-mikrobiyoloji-1.html>, 22 Haziran 2015.
- [38] "Mikroorganizmaların özellikleri", http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Mikroorganizmalar%C4%B1n%C3%96zellikleri.pdf, 22 Haziran 2015.
- [39] "Functional Anatomy of Prokaryotic and Eukaryotic Cells", Available at: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap04/lecture4.htm>.
- [40] Alışkan, D.D.H.E., "Bakterilerin yapısı, üreme özellikleri ve genetiği", <http://www.baskent-adn.edu.tr/dokumanlar/bakteri%20ders.pdf>, 22 Haziran 2015.
- [41] "Bakterilerin yapısı ve sınıflandırılması", <http://www.biyolojidersnotlari.com/dokuz-eylul-universitesi-bakterilerin-yapisi-ve-siniflandirilmasi.html>, 22 Haziran 2015.

- [42] Bağlan, H.P., "Bakteri ve yapısı", Güncel gastroenteroloji, 7.
- [43] "Phospholipase Inhibitors", <http://chem3513-2007.pbworks.com/w/page/15648433/Phospholipase%20Inhibitors>, 22 Haziran 2015.
- [44] Gabriel, G.J. Som, A. Madkour, A.E. Eren, T. ve Tew, G.N., (2007). "Infectious disease: connecting innate immunity to biocidal polymers", Materials Science and Engineering: R: Reports, 57: 28-64.
- [45] Prevention, C.f.D.C.a., "Antibiotic Resistance Threats in the United States", <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>, 22 Haziran 2015.
- [46] Ganewatta, M.S. ve Tang, C., (2015). "Controlling macromolecular structures towards effective antimicrobial polymers", Polymer, 63: A1-A29.
- [47] "Antibiyotik direnci nasıl gelişiyor", <http://jurnaller.com/2014/12/antibiyotik-direnci-nasil-gelisiyor/>, 22 Haziran 2015.
- [48] Saçak, M., (2008). Polimer kimyası: Gazi kitapevi.
- [49] Akdeste, Z., (2013). Polimer teknolojileri ders notları.
- [50] Gürses, P.D.A., (2008). "Polimerlerin sentezi", <https://serapguney25.files.wordpress.com/.../2-polimerlerin-sentezi.pptx>, 22 Haziran 2015.
- [51] Wikipedia, "Polistiren", http://tr.wikipedia.org/wiki/Polistiren#/media/File:Polystyrene_formation_tr.PNG, 22 Haziran 2015.
- [52] Industry, T.E.C., "Polymers: an overview", <http://www.essentialchemicalindustry.org/polymers/polymers-an-overview.html>, 22 Haziran 2015.
- [53] Emiroğlu, S.E., (1999). Metil metakrilatin yük transfer kompleksleri varlığında serbest radikal fotopolimerizasyonu, İTÜ Kimya ABD, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- [54] Çözüm, I., "İyonik zincir (katılma) polimerizasyonu", http://lisans.cozum.info.tr/dersler/polimer_kimyasi/polimerizasyon/iyonik_zincir_polimerizasyon.html, 22 Haziran 2015.
- [55] Szwarc, M., (1956). "'Living' polymers".
- [56] Bielawski, C.W. ve Grubbs, R.H., (2007). "Living ring-opening metathesis polymerization", Progress in Polymer Science, 32: 1-29.
- [57] Patten, T.E. ve Novak, B.M., (1991). "" Living" titanium (IV) catalyzed coordination polymerizations of isocyanates", Journal of the American Chemical Society, 113: 5065-5066.
- [58] Lehman, S.E. ve Wagener, K.B., (2003). "ADMET polymerization", Handbook of Metathesis: Catalyst Development: 283-353.
- [59] Wagener, K. Boncella, J. ve Nel, J., (1991). "Acyclic diene metathesis (ADMET) polymerization", Macromolecules, 24: 2649-2657.

- [60] Baughman, T.W. ve Wagener, K.B., (2005). Recent advances in ADMET polymerization, ed. Metathesis polymerization. Springer, 1-42.
- [61] Calderon, N., (1972). "Olefin metathesis reaction", Accounts of Chemical Research, 5: 127-132.
- [62] Benson, S.W. Cruickshank, F. Golden, D. Haugen, G.R. O'neal, H. Rodgers, A. Shaw, R. ve Walsh, R., (1969). "Additivity rules for the estimation of thermochemical properties", Chemical Reviews, 69: 279-324.
- [63] Jacobson, H. ve Stockmayer, W.H., (1950). "Intramolecular reaction in polycondensations. I. The theory of linear systems", The Journal of Chemical Physics, 18: 1600-1606.
- [64] Benedicto, A.D. Claverie, J.P. ve Grubbs, R.H., (1995). "Molecular weight distribution of living polymerization involving chain-transfer agents: computational results, analytical solutions, and experimental investigations using ring-opening metathesis polymerization", Macromolecules, 28: 500-511.
- [65] Chen, Z.-R. Claverie, J.P. Grubbs, R.H. ve Kornfield, J.A., (1995). "Modeling ring-chain equilibria in ring-opening polymerization of cycloolefins", Macromolecules, 28: 2147-2154.
- [66] Vougioukalakis, G.C. ve Grubbs, R.H., (2009). "Ruthenium-Based Heterocyclic Carbene-Coordinated Olefin Metathesis Catalysts[†]", Chemical Reviews, 110: 1746-1787.
- [67] Trnka, T.M. ve Grubbs, R.H., (2001). "The development of L2X2Ru CHR olefin metathesis catalysts: an organometallic success story", Accounts of Chemical Research, 34: 18-29.
- [68] Robert, H., "Grubbs - Interview", http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2005/grubbs-interview.html, 22 Haziran 2015.
- [69] Leitgeb, A. Wappel, J. ve Slugovc, C., (2010). "The ROMP toolbox upgraded", Polymer, 51: 2927-2946.
- [70] "Schrock metathesis catalysts", <https://en.wikipedia.org/wiki/File:SchrockMetathesisCatalysts.png>, 22 Haziran 2015.
- [71] Süpüren, G. Kanat, E. Çay, A. ve Tarakçıoğlu, I., (2006). "Antimikrobiyal Lifler", Tekstil ve Konfeksiyon, 2.
- [72] Döşler, S. Gürler, B. ve Gerçeker, A.A., (2006). "Geleceğin antibiyotikleri: antimikrobik etkili katyonik peptitler", ANKEM Dergi, 20: 44-54.
- [73] Muhsir, S., "Antimikrobik Etkili Katyonik Peptitler", www.mustafaaltinisik.org.uk/s-KatyonikPeptitler.ppt, 22 Haziran 2015.
- [74] Melittin, <https://en.wikipedia.org/wiki/Melittin>, 22 Haziran 2015.
- [75] "Cecropin", <https://en.wikipedia.org/wiki/Cecropin#/media/File:2IGR.pdb.png>, 22 Haziran 2015.

- [76] "Nisin", <https://en.wikipedia.org/wiki/Nisin>, 22 Haziran 2015.
- [77] Journal, T.E., (2006). " The Use of Nisin (E 234) as a Food Additive ".
- [78] Tew, G.N. Liu, D. Chen, B. Doerksen, R.J. Kaplan, J. Carroll, P.J. Klein, M.L. ve DeGrado, W.F., (2002). "De novo design of biomimetic antimicrobial polymers", Proceedings of the National Academy of Sciences, 99: 5110-5114.
- [79] Bekem Soylu, Ö. ve Öztürk, Y., "Defensinler ve H. pylori Enfeksiyonundaki Roller", <http://www.deu.edu.tr/UploadedFiles/Birimler/17991/215-221.pdf>, 22 Haziran 2015.
- [80] Cengiz, T. Mısırlıgil, A. ve Aydın, M., (2005). Tıp ve Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Yayınevi.
- [81] Gürpınar, S. ve Kırcan, Ş., (2010). "Antimikrobiyal Peptidler", İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 36: 61-66.
- [82] Tashiro, T., (2001). "Antibacterial and bacterium adsorbing macromolecules", Macromolecular Materials and Engineering, 286: 63-87.
- [83] Worley, S. ve Sun, G., (1996). "Biocidal polymers", Trends in Polymer Science, 4: 364-370.
- [84] Stiriba, S.E. Frey, H. ve Haag, R., (2002). "Dendritic polymers in biomedical applications: from potential to clinical use in diagnostics and therapy", Angewandte Chemie International Edition, 41: 1329-1334.
- [85] Lim, S.-H. ve Hudson, S.M., (2003). "Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals", Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews, 43: 223-269.
- [86] Thorsteinsson, T. Loftsson, T. ve Masson, M., (2003). "Soft antibacterial agents", Current medicinal chemistry, 10: 1129-1136.
- [87] Kenawy, E.R. ve Mahmoud, Y.A.G., (2003). "Biologically active polymers, 6", Macromolecular Bioscience, 3: 107-116.
- [88] Ilker, M.F. Nüsslein, K. Tew, G.N. ve Coughlin, E.B., (2004). "Tuning the hemolytic and antibacterial activities of amphiphilic polynorbornene derivatives", Journal of the American Chemical Society, 126: 15870-15875.
- [89] Takano, S. Tamegai, H. Itoh, T. Ogata, S. Fujimori, H. Ogawa, S. Iida, T. ve Wakatsuki, Y., (2011). "ROMP polymer-based antimicrobial films repeatedly chargeable with silver ions", Reactive and Functional Polymers, 71: 195-203.
- [90] Kreutzwiesner, E. Noormofidi, N. Wiesbrock, F. Kern, W. Rametsteiner, K. Stelzer, F. ve Slugovc, C., (2010). "Contact bactericides and fungicides on the basis of amino - functionalized poly (norbornene) s", Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 48: 4504-4514.
- [91] Lienkamp, K. Madkour, A.E. Musante, A. Nelson, C.F. ve Tew, G.N., (2008). "Antimicrobial polymers prepared by ROMP with unprecedented selectivity: a molecular construction kit approach", Journal of the American Chemical Society, 130: 9836-9843.

- [92] Eren, T. Som, A. Rennie, J.R. Nelson, C.F. Urgina, Y. Nüsslein, K. Coughlin, E.B. ve Tew, G.N., (2008). "Antibacterial and hemolytic activities of quaternary pyridinium functionalized polynorbornenes", *Macromolecular Chemistry and Physics*, 209: 516-524.
- [93] Kuroda, K. ve DeGrado, W.F., (2005). "Amphiphilic polymethacrylate derivatives as antimicrobial agents", *Journal of the American Chemical Society*, 127: 4128-4129.
- [94] Arnt, L. ve Tew, G.N., (2002). "New poly (phenyleneethynylene) s with cationic, facially amphiphilic structures", *Journal of the American Chemical Society*, 124: 7664-7665.
- [95] Arnt, L. ve Tew, G.N., (2003). "Cationic facially amphiphilic poly (phenylene ethynylene) s studied at the air-water interface", *Langmuir*, 19: 2404-2408.
- [96] Al-Badri, Z.M. Som, A. Lyon, S. Nelson, C.F. Nüsslein, K. ve Tew, G.N., (2008). "Investigating the effect of increasing charge density on the hemolytic activity of synthetic antimicrobial polymers", *Biomacromolecules*, 9: 2805-2810.
- [97] Mowery, B.P. Lee, S.E. Kissounko, D.A. Epand, R.F. Epand, R.M. Weisblum, B. Stahl, S.S. ve Gellman, S.H., (2007). "Mimicry of antimicrobial host-defense peptides by random copolymers", *Journal of the American Chemical Society*, 129: 15474-15476.
- [98] Madkour, A.E. Koch, A.H. Lienkamp, K. ve Tew, G.N., (2010). "End-functionalized ROMP polymers for biomedical applications", *Macromolecules*, 43: 4557-4561.
- [99] Song, A. Parker, K.A. ve Sampson, N.S., (2009). "Synthesis of copolymers by alternating ROMP (AROMP)", *Journal of the American Chemical Society*, 131: 3444-3445.
- [100] Song, A. Walker, S.G. Parker, K.A. ve Sampson, N.S., (2011). "Antibacterial studies of cationic polymers with alternating, random, and uniform backbones", *ACS chemical biology*, 6: 590-599.
- [101] Dathe, M. Nikolenko, H. Meyer, J. Beyermann, M. ve Bienert, M., (2001). "Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge", *FEBS letters*, 501: 146-150.
- [102] Arnt, L. Nüsslein, K. ve Tew, G.N., (2004). "Nonhemolytic abiogenic polymers as antimicrobial peptide mimics", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42: 3860-3864.
- [103] Hancock, R.E., (1998). "Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria", *Clinical Infectious Diseases*, 27: S93-S99.
- [104] Radzishhevsky, I.S. Rotem, S. Bourdetsky, D. Navon-Venezia, S. Carmeli, Y. ve Mor, A., (2007). "Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers", *Nature biotechnology*, 25: 657-659.

- [105] Wimley, W.C., (2010). "Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model", *ACS chemical biology*, 5: 905-917.
- [106] Kanazawa, A. Ikeda, T. ve Endo, T., (1994). "Synthesis and antimicrobial activity of dimethyl-and trimethyl-substituted phosphonium salts with alkyl chains of various lengths", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38: 945-952.
- [107] Kenawy, E.R. Abdel - Hay, F.I. El - Shanshoury, A.E.R.R. ve El - Newehy, M.H., (2002). "Biologically active polymers. V. Synthesis and antimicrobial activity of modified poly (glycidyl methacrylate - co - 2 - hydroxyethyl methacrylate) derivatives with quaternary ammonium and phosphonium salts", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 40: 2384-2393.
- [108] Chang, H.-I. Yang, M.-S. ve Liang, M., (2010). "The synthesis, characterization and antibacterial activity of quaternized poly (2, 6-dimethyl-1, 4-phenylene oxide) s modified with ammonium and phosphonium salts", *Reactive and Functional Polymers*, 70: 944-950.
- [109] Xue, Y. Pan, Y. Xiao, H. ve Zhao, Y., (2014). "Novel quaternary phosphonium-type cationic polyacrylamide and elucidation of dual-functional antibacterial/antiviral activity", *RSC Advances*, 4: 46887-46895.
- [110] Bansal, R. Pathak, R. Jha, D. Kumar, P. ve Gautam, H.K., (2014). "Enhanced Antimicrobial Activity of Amine-Phosphonium (N-P) Hybrid Polymers Against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria", *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64: 84-89.
- [111] Bazzi, H.S. ve Sleiman, H.F., (2002). "Adenine-Containing Block Copolymers via Ring-Opening Metathesis Polymerization: Synthesis and Self-Assembly into Rod Morphologies", *Macromolecules*, 35: 6917-9620.
- [112] Çoban, A.Y., "MİK Mikrodilüsyon ve Makrodilüsyon Hazırlanması ve Ekimi " <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf>, 22 Haziran 2015.
- [113] Herigstad, B. Hamilton, M. ve Heersink, J., (2001). "How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria", *Journal of Microbiological Methods*, 44: 121-129.
- [114] Sambhy, V. Peterson, B.R. ve Sen, A., (2008). "Multifunctional silane polymers for persistent surface derivatization and their antimicrobial properties", *Langmuir*, 24: 7549-7558.
- [115] Tiller, J.C. Liao, C.J. Lewis, K. ve Klibanov, A.M., (2001). "Designing surfaces that kill bacteria on contact", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 5981-5985.
- [116] Kügler, R. Bouloussa, O. ve Rondelez, F., (2005). "Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces", *Microbiology*, 151: 1341-1348.

- [117] Lienkamp, K. ve Tew, G.N., (2009). "Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides –A Versatile Ring - Opening Metathesis Polymerization Based Platform for the Synthesis of Selective Antibacterial and Cell - Penetrating Polymers", *Chemistry-A European Journal*, 15: 11784-11800.
- [118] Murata, H. Koepsel, R.R. Matyjaszewski, K. ve Russell, A.J., (2007). "Permanent, non-leaching antibacterial surfaces—2: How high density cationic surfaces kill bacterial cells", *Biomaterials*, 28: 4870-4879.
- [119] Zhang, L. Rozek, A. ve Hancock, R.E., (2001). "Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes", *Journal of Biological Chemistry*, 276: 35714-35722.
- [120] Shai, Y., (2002). "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides", *Peptide Science*, 66: 236-248.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Naime Ceren SÜER
Doğum Tarihi ve Yeri : 21.04.1989 - FATİH
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ncerens@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lise	Fen Bilimleri	Orhan Cemal Fersoy Lisesi (YDA)	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2013-2015	Yıldız Teknik Üniversitesi	Asistan Öğrenci
2010	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	Stajyer
2013-2015	TÜBİTAK 113S355 Projesi	Bursiyer

YAYINLARI

Bildiri

• Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. Suer, N. C., Demir, C., Eren, T.,(2014). “Antibacterial Activity of ROMP Based Homopolymer Containing Phosphonium Salts”,1st European Conference on Smart Inorganic Polymers, 21-23 Eylül 2014, Maribor.
2. Demir, C., Suer, N. C., Eren, T. (2014). “The Synthesis and Characterization of Phosphonium-Containing Polyelectrolytes and Investigation of Their Antibacterial Activity”, 1st European Conference on Smart Inorganic Polymers, 21-23 Eylül 2014, Maribor.
3. Eren, T., Demir, C., Suer, N. C., Kocagoz, T., A. Unubol, N. (2015). “Antimicrobial Properties of Phosphonium Based ROMP Polymers”, International Symposium on Polymers From Renewable Resources, 8 Mayıs 2015, İstanbul.

• Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Suer, N. C., Demir, C., A. Unubol, N., A. Yapaöz, M., Kocagöz, T., Eren, T. (2015). “Fosfonyum Grupları İçeren Polielektrolitlerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Katı Yüzeyde Antibakteriyel Etkinliklerinin İncelenmesi”, 27. Ulusal Kimya Kongresi, 23-28 Ağustos 2015, Çanakkale.
2. C., Demir, Suer, N. C., A. Unubol, N., A. Yapaöz, M., Kocagöz, T., Eren, T. (2015). “ROMP Metodu ile Sentezlenmiş Fosfonyum İçeren Polimerlerin Sıvı Fazda Antibakteriyel Etkinliğinin İncelenmesi”, 27. Ulusal Kimya Kongresi, 23-28 Ağustos 2015, Çanakkale.

Proje

1. 113S355, “Fosfonyum Grupları İçeren Polielektrolitlerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antibakteriyel Etkinliklerinin İncelenmesi” (TÜBİTAK), Yüksek Lisans Öğrencisi Bursiyer.
2. 2015-01-02-YL12, “Fosfonyum Grupları İçeren Romp Polimerlerinin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Antibakteriyel Etkinliklerinin İncelenmesi” (BAP), Yüksek Lisans Öğrencisi Araştırmacı.