



**BİS-FERROSENİL-SÜBSTİTÜE SİKLOTETRAFOSFAZEN
TÜREVLERİNİN ANTİMİKROBİYAL VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİ
VE DNA ETKİLEŞİMLERİ**

Süheyla Pınar ÇELİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2018

Süheyla Pınar ÇELİK tarafından hazırlanan “BİS-FERROSENİL-SÜBSTİTÜE SİKLOTETRAFOSFAZEN TÜREVLERİNİN ANTİMİKROBİYAL VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİ VE DNA ETKİLEŞİMLERİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Leyla AÇIK

Biyoloji Ana bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan: Prof. Dr. Nurşen SARI

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Doç. Dr. Nuran ASMAFİLİZ

Kimya Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 24/12/2018

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

.....
Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Süheyla Pınar ÇELİK

24/12/2018

BİS-FERROSENİL-SÜBSTİTÜE SİKLOTETRAFOSFAZEN TÜREVLERİNİN ANTİMİKROBİYAL VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİ VE DNA ETKİLEŞİMLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Süheyla Pınar ÇELİK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2018

ÖZET

Bu çalışma kapsamında NN donörlü diamin bileşiğinin oktaklorosiklotetrafosfazen ($N_4P_4Cl_8$; tetramer) ile tepkimesinden oluşan kısmen sübstitüe bis-ferrosenil-2-trans-6-dispiro- (2), bileşiğinin aşırı miktarda sekonder aminler (pirolidin, morfolin, piperidin, 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan [DASD]), diaminler (N-metiletilendiamin ve N-metil-1,3-propandiamin) ve dioller (2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandiol ve 2,2-dimetil-1,3-propandiol) ile etkileştirilmesinden oluşan tamamen ve kısmen sübstitüe siklotetrafosfazen bileşiklerinin çeşitli patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi, DLD-1 kolon kanser ve L929 fibroblast hücre hatları üzerine sitotoksik aktivitesi ve DNA üzerine etkisi incelenmiştir. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemi ile; yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren bileşiklerin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK), minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimal fungisidal konsantrasyon (MFK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan bileşiklerin genelinin mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği, diamin sübstitüe bileşiklerin etkinliğinin ise diğer bileşiklere oranla daha yüksek olduğu ve bileşiklerin MİK değerlerinin oldukça düşük konsantrasyonlardan büyük konsantrasyonlara değiştiği (15,63-2000 μM) gözlenmiştir. Bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri WST-1 yöntemi ile belirlenmiştir. Kullanılan siklotetrafosfazen bileşiklerinin DLD-1 kolon kanser ve L929 fibroblast hücre hatlarına konsantrasyona (200-12,5 $\mu g/ml$) bağlı olarak etki gösterdiği, diamin sübstitüe bileşiklerin etkinliğinin diğer bileşiklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile bileşiklerin DNA ile olan etkileşimleri incelenmiş ve bu etkinin bileşiklerin DNA'ya G/G ve A/A nükleotitlerinden bağlanma ve DNA'da kırıklar oluşturma şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak diamin sübstitüe bileşiklerin antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerinin diğer bileşiklere oranla daha yüksek olduğu; diamin ve pirolidin sübstitüe bileşiklerin DNA ile olan etkileşimlerinin morfolin, DASD, piperidin ve dialkoksi sübstitüe bileşiklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 20326

Anahtar Kelimeler : Bis-ferrosenil-sübstitüe siklotetrafosfazen, sitotoksisite, DNA etkileşimi

Sayfa Adedi : 88

Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES AND DNA INTERACTIONS OF
BIS-FERROSENYL-SUBSTITUTE CYCLOTETRAPHOSPHASE DERIVATIVES

(M.Sc. Thesis)

Süheyla Pınar ÇELİK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2018

ABSTRACT

In extent of this study, partly-substituted bis-ferrosenil-2-trans-6-dispiro- (**2**) is formed from the reaction of NN donor diamine compound with octachlorocyclotetraphosphazane ($N_4P_4Cl_8$; tetramer) and interaction of this compound with the excess amount of secondary amines (pyrrolidine, morpholine, piperidine, 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan [DASD]), diamines (N-methyletilendiamine and N-metil-1,3-propandiamine), diols (2,2,3,3-tetrafloro-1,4-butandiol and 2,2-dimethyl-1,3-propandiol) caused generation of completely and partly substituted cyclotetraphosphazane compounds which antimicrobial activation on various pathogen microorganisms, cytotoxic activities on DLD-1 colon cancer and L929 fibroblast cell lines and the interaction with plasmid DNA is examined. The antimicrobial activities of the compounds was determined by agar well diffusion method; the minimum inhibitor concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) and minimal fungicidal concentration (MFK) values of the compounds which have high antimicrobial activities were determined by microdilution method. Most of the compounds used in the study showed antimicrobial activity on microorganisms and the activities of the diamine substituted compounds were higher than the other compounds and MIC values of the compounds was found in considerably low concentrations (15,63-2000 μM). The cytotoxic activities of the compounds were determined by the WST-1 method. It has been determined that the cyclotetraphosphazene compounds have a concentration dependent effect on DLD-1 colon cancer and L929 fibroblast cell lines (200-12.5 $\mu g/ml$) and the activities of the diamine substituted compounds are higher than the other compounds. Interactions of the compounds with plasmid DNA were examined by using agarose gel electrophoresis method and the compounds were found to have DNA cleavage and binding activity of the DNA from G/G and A/A nucleotides. As a result, it has been found that the antimicrobial and cytotoxic effects of the diamine substituted phosphazenes are higher than the other compounds; interactions of the diamine and pyrrolidine substituted compounds with DNA were found to be higher than the morpholine, DASD, piperidine and dialkoxy substituted compounds.

Science Code : 20326

Keywords : Bis-ferrocenyl-substitue cyclotetraphosphazene, cytotoxicity, DNA interaction

Page Number : 88

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bana yol gösteren, benimle bilgilerini paylaşan, destek ve yardımlarını esirgemeyen, akademik alana yönelmemi sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK'a; Tezimin konusu olan kimyasal bileşikleri sağlayan Ankara Üniversitesi Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Zeynel KILIÇ, Doç. Dr. Gamze ELMAS ve Doç. Dr. Aytuğ OKUMUŞ'a; Çalışmalarımı sırasında manevi destekleri ile her zaman yanımda olan Araştırma Görevlisi Dr. Betül AYDIN, Pelin ÖZBEDEN, Merve ÇAM ve Hande KAYALAK'a ve değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma "Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi" tarafından desteklenmiştir. Proje no:15H0430006.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Fosfazenler ve Genel Özellikleri	5
2.2. Enfeksiyon Hastalıkları ve Enfeksiyona Sebep Olan Mikroorganizmalar	6
2.2.1. Bakteriler	7
2.2.2. Mayalar	10
2.3. Antimikrobiyal Maddeler	11
2.3.1. Antibakteriyel ilaçlar	12
2.3.2. Antifungal ilaçlar	15
2.3.3. Antimikrobiyal Direnç	16
2.4. Bazı Patojen Mikroorganizmalar ve Oluşturdıkları Enfeksiyonlar	20
2.4.1. Patojen bakteriler	20
2.4.2. Patojen mayalar.....	26
2.5. Kanser	28
2.5.1. Kanser hücreleri	29
2.5.2. Kanser hücrelerinin oluşumu	30

	Sayfa
2.5.3. Kanser türleri ve kolorektal kanser	32
2.5.4. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar	35
2.6. DNA Molekülü ve Yapısı	38
2.6.1. DNA-ilac etkileşimlerinin mekanizması	41
3. MATERYAL VE METOT	45
3.1. Materyal	45
3.1.1. Fosfazenler	45
3.1.2. Kullanılan mikroorganizmalar ve gelişme ortamları	46
3.1.3. Kullanılan hücre hatları	46
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler	47
3.1.5. Kullanılan sarf malzemeler, aletler ve cihazlar	47
3.1.6. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması	47
3.2. Metot	49
3.2.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi	49
3.2.2. Sitotoksik aktivite	50
3.2.3. Madde-DNA etkileşimi	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	53
4.1. Fosfazen Bileşiklerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri	53
4.1.1. Fosfazen bileşiklerinin MİK, MBK ve MFK değerleri	56
4.2. Fosfazen Bileşiklerinin Sitotoksik Aktiviteleri	58
4.3. Fosfazen Bileşiklerinin DNA ile Etkileşimi	61
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	87

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sağlıklı bir insan florasında bulunan mikroorganizmalar	7
Çizelge 2.2. Bazı antifungal ajanlar, hedefleri ve etki mekanizmaları	16
Çizelge 2.3. Ekzojen ve endojen kaynaklı antibakteriyel direnç mekanizmaları	18
Çizelge 2.4. Bazı patojen funguslar, antifungal ajanlar ve direnç mekanizmaları	20
Çizelge 2.5. Klinikte kullanılan bazı kemoterapötikler, etki mekanizmaları ve sınıfları	38
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve inkübasyon koşulları.....	46
Çizelge 4.1. 2, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g, 2i, 2j, 2k, 2l bileşiklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları (inhibisyon zonu mm olarak ifade edilmektedir).....	55
Çizelge 4.2. 2, 2c, 2d, 2e, 2i, 2j, 2l bileşiklerinin test suşlarına karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK değerleri μ M olarak ifade edilmektedir)	57
Çizelge 4.3. 2, 2c, 2d, 2e, 2i, 2j, 2l bileşiklerinin test suşlarına karşı minimum bakterisidal ve minimum fungisidal konsantrasyonu (MBK ve MFK değerleri μ M olarak ifade edilmektedir).....	58

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Peptidoglikan tabakanın şematik gösterimi	9
Şekil 2.2. Bakterilerde hücre duvarları	10
Şekil 2.3. Candida mayasının hücre duvar yapısı	11
Şekil 2.4. Klinik kullanımda olan antibiyotik sınıfları ve hedefleri	12
Şekil 2.5. Çeşitli hücre yapılarına etki eden antibiyotikler	13
Şekil 2.6. Kanser türlerinin cinsiyetlere göre 2012 yılında tüm dünyadaki dağılımı	29
Şekil 2.7. Aşağıdan yukarıya olgunlaşma süreci içerisindeki kolon epitel hücreleri	33
Şekil 2.8. Kolorektal kanserin oluşum evreleri.....	34
Şekil 2.9. Kolon ve rektum kanserinin bölgeler göre dağılımı	34
Şekil 2.10. Nükleotitlerde bulunan azotlu bazların yapısı	39
Şekil 2.11. Nükleik asit zincirinin yapısı	40
Şekil 2.12. Watson-Crick; çift sarmallı DNA yapısı	41
Şekil 2.13. Cis-platin-DNA etkileşimi.....	42
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bileşikler.....	45
Şekil 4.1. 2, 2b, 2e, 2i, 2j, 2l bileşiklerine maruz bırakılan L929 fibroblast hücrelerinin % canlılıkları	60

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Bakterilerin morfolojileri	8
Resim 2.2. <i>B. cereus</i> 'un mikroskopik görüntüsü	21
Resim 2.3. <i>B. subtilis</i> 'in mikroskopik görüntüsü	22
Resim 2.4. <i>S. aureus</i> 'un mikroskopik görüntüsü	23
Resim 2.5. <i>E. coli</i> 'nin mikroskopik görüntüsü	24
Resim 2.6. <i>K. pneumoniae</i> 'nin elektron mikroskobu görüntüsü	25
Resim 2.7. Kandida enfeksiyonlu hastada kalp dokusunda <i>C. albicans</i>	27
Resim 4.1. Çalışmada kullanılan bileşiklerin plazmit DNA üzerindeki etkisi. (P):Bileşik ile muamele edilmemiş plazmit DNA; (1):2000 μ M; (2):1000 μ M; (3):500 μ M; (4):250 μ M; Form I:Kapalı halkasal plazmit DNA; Form II: Açık halkasal plazmit DNA; Form III:Doğrusal plazmit DNA	62
Resim 4.2. Çalışmada kullanılan bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA'nın BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile kesimi. (P): Bileşik ile muamele edilmemiş plazmit DNA; (P/H): HindIII ile kesilmiş plazmit DNA; (P/B): BamHI ile kesilmiş plazmit DNA	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat derece
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
V	Volt
%	Yüzde işareti

Kısaltmalar

Açıklamalar

ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
DMEM	Dulbecco Modifikasyonlu Eagle Besiyeri
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FCS	Fetal Sığır Serumumu
GC	Guanin-Sitozin
LPS	Lipopolisakkarit tabaka
KKH	Kolon Kanseri Hücresi
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MFK	Minimum Fungisidal Konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NRRL	Northen Regional Research Laboratory
RNA	Ribonükleik asit

1. GİRİŞ

Fosfazenler yapılarında, tekrarlayan fosfor ve azot ($-P=N-$) atomları arasında çift bağ bulunduran, çeşitli biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Fosfazenler yapısal olarak sınıflandırıldıklarında düz, halkasal ve polimerik olmak üzere 3 farklı gruba ayrılmaktadırlar. Bu sınıflandırma içerisinde gerçekleştirdikleri yer değiştirme reaksiyonları sonucunda farklı yan gruplarla bağ oluşturup çeşitli özellikler kazanabilen siklofosfazenler oldukça dikkat çekmektedir. Siklofosfazenler tekrarlayan $[(N=PX_2)_n]$ ($X=I, Br, Cl$ ve organik gruplar) birimlerinden oluşan heterosiklik halkalardır. Araştırmacıların ilgisini en çok çeken gruplar klorosiklofosfazenler içerisinde yer alan heksaklorosiklotrifosfazen ($N_3P_3Cl_6$) ve oktaklorosiklotetrafosfazendir ($N_4P_4Cl_8$). Bunlardan oktaklorosiklotetrafosfazen hakkındaki literatür bilgisi oldukça kısıtlıdır [1]. Ayrıca ferrosen türevlerinin tetramerik fosfazen halkasına bağlanması sonucu oluşan elektroaktif ferrosenil-fosfazenler ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur [2]. Mevcut çalışmalar çeşitli fosfazen türevlerinin antikanser, antimikrobiyal ve antitüberküloz gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğunu ve göstermektedir [3]. Ancak bu çalışmada kullanılan bis-ferrosenil-süstitüe siklotetrafosfazen türevleri ile ilgili yapılan ilk biyolojik aktivite çalışması olup literatürde konuyla ilgili başka bilgi bulunmamaktadır.

Enfeksiyon hastalıkları patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan her yıl dünya çapında birçok insanın hayatını kaybetmesine sebep olan küresel bir sağlık sorunudur. Enfeksiyonel hastalıkları tedavi etme amacıyla antibiyotikler kullanılmaktadır fakat mikroorganizmaların kullanılan antibiyotiklere karşı oluşturdıkları direnç sebebiyle kullanılan mevcut ilaçlar etkisini yitirmekte ve hastalar tedaviye yanıt vermemektedir [4]. Mikroorganizmalar birden fazla direnç mekanizmasına sahip olabilmektedir ve bu mekanizmalar ilacın doğasına, mikroorganizmanın türüne, kromozomal mutasyon veya plazmit ilişkili olmasına ve konaktaki hedef bölgeye bağlı olarak etki etmektedirler [5]. 2014 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı küresel rapora göre yaygın enfeksiyon hastalıklarının kaynağı olan patojen mikroorganizmalar ve bunların antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç mekanizmaları ile ilgili bilgiler yer almaktadır. Bu mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyon hastalıklarının gelecekte büyük salgınlara sebebiyet verebileceği belirtilmiştir [4]. Bu sebeple enfeksiyonel hastalıklara neden olan ve antibiyotiklere karşı

direnç geliştirmiş olan mikroorganizmalara karşı etkili olabilecek antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi gerekmektedir [6].

Enfeksiyon hastalıkları gibi yaygın görölen bir diğeri sağık sorunu ise kanserdir. Bir veya birkaç hücrede büyüme kontrolünün kaybolması ile başlayan; invazif nitelik taşıyan ve metastaz yapma özelliğı ile kendini gösteren kanser tüm dünyada en sık görölen ve ölüm oranı en yüksek olan hastalıktır. Kanser tedavisinde standart olarak kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler ve bunun yanı sıra daha az sıklıkla gen tedavisi, aşılar, hormonal ve hedeflenmiş tedavi gibi uygulamalar kullanılmaktadır [7]. Kemoterapi için kullanılan ilaçlar tümör hücrelerine seçici olarak zarar vermekte veya bu hücrelerin proliferasyonunu kısıtlamaktadır ancak bu aktivitesini gösterirken sağıklı hücrelere de zarar verebilir ve bunun sonucunda kemik iliğı baskılanması, gastrointestinal sistem lezyonları, saç kaybı, bulantı ve klinik direnç gelişmesi gibi yan etkiler ortaya çıkabilir [8]. Bu sebeple son yıllarda araştırmacılar kanser hücrelerine seçici toksisite gösteren hedefe yönelik ilaçlar tasarlamak için yoğun çaba sarf etmektedir. Çeşitli kanser türleri vardır. Bunlardan en yaygın olanları akciğer ve meme kanseridir. Tüm kanser türleri içinde en sık görölen 3. kanser tipi olan kolorektal kanser tüm dünyada 2005 yılında 675 500 kişinin ölümüne sebep olmuşken 2015 yılında 832 000 ölümüne sebep olarak %23,2 artış göstermiştir [9]. Çeşitli fosfazen türevlerinin farklı kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi ortaya konmuştur ancak bu çalışmada kullanılan fosfazen bileşiklerinin sitotoksik aktiviteleri ile ilgili yapılan bir çalışma bulunmamaktadır [10, 11].

En önemli antikanser ilaç sınıflarından biri olan DNA-interaktif ajanların alkilleme, çapraz bağlama, topoizomeras inhibitörü ve DNA'ya bağlanma, DNA'yı kesme gibi özellikleri bulunmaktadır [8]. Bu nedenle tasarlanan ve yeni gelişmekte olan antikanser ve antimikrobiyal ajanların bu molekül üzerindeki etkileri önem arz etmektedir.

Bu çalışma kapsamında ferrosenkarboksaldehit ile N-metil-1,3-propandiaminin etkileştirilmesi sonucu elde edilen Schiff bazının NaBH_4 ile indirgenmesi ile oluşan NN donörlü diamin bileşiğinin oktaklorosiklotetrafosfazen ($\text{N}_4\text{P}_4\text{Cl}_8$; tetramer) ile tepkimesinden oluşan kısmen süstitüe bis-ferrosenil-2-trans-6-dispiro- (2), bileşiğinin aşırı miktarda sekonder aminler (pirolidin, morfolin, piperidin, 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan [DASD]), diaminler (N-metiletilendiamin ve N-metil-1,3-propandiamin) ve dioller (2,2,3,3-tetrafloro-1,4-bütandiol ve 2,2-dimetil-1,3-propandiol) ile etkileştirilmesinden oluşan

tamamen ve kısmen süstitüe siklotetrafosfazen bileşiklerinin çeşitli patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi, DLD-1 kolon kanseri ve L929 fibroblast hücre hatları üzerine sitotoksik aktivitesi ve plazmit DNA ile olan etkileşimi incelenmiştir. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarında sentezlenmiş olan fosfazen bileşiklerinin insan patojeni olan *Bacillus cereus* NRRLB-3711, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus hirae* ATCC 9790, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Proteus vulgaris* RSKK 96029, *Klepsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus typhimurium* ATCC 14028 bakterileri ve *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* NRRL Y-12968 mayaları üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi kuyu difüzyon yöntemi ile incelenmiş; antimikrobiyal aktivite gösteren bileşiklerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerleri ise mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir. Bileşiklerin DLD-1 kolon kanser ve L929 fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla WST-1 yöntemi, bileşiklerin plazmit DNA üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla da agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Bileşiklerin DNA'ya bağlanıp bağlanmadığını anlamak eğer bağlanma varsa hangi nükleotidden bağlandığını anlamak için bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA'ya *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleazları ile kesime tabi tutulmuştur. Bu çalışma tetramer ile ferrosenilaminlerin, ferrosenildiaminlerin ve ferrosenildiollerin reaksiyonu sonucu elde edilen yeni bisferrosenil süstitüe siklotetrafosfazen türevleri ile yapılan ilk biyolojik aktivite çalışması olup; çalışma sonunda elde edilen verilerin toplumun sağlık sorunları arasında kendilerine önemli bir yer edinmiş olan enfeksiyon hastalıkları ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçların geliştirilmesinde ve yeni kimyasal ürünlerin sentezlenmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fosfazenler ve Genel Özellikleri

Sıralı $(P=N)_n$ ($n=3-12$) birimlerinden oluşan fosfazenler organik karakter taşıyan, bilinen ilk anorganik halkalı bileşiklerdir. Fosfor ve azot elementleri arasındaki çift bağ anorganik olduklarını gösterirken organik çözücülerde çözünmeleri organik karaktere sahip olduklarını göstermektedir [1, 12]. Fosfazenler $-P=N-$ bağına sahip bileşikler arasında en çok çalışılan grup olup ayrıca inorganik makro moleküller arasında en kalabalık sınıfa sahiptir [12]. İlk fosfazen bileşiği olan heksaklorosiklotrifosfazen ($N_3P_3Cl_6$) 1834 yılında sentezlenmiş olup Gladstone, Halmer ve Wichelhous tarafından fosfazen bileşiğinin molekül formülünün $(NPCl_2)_3$ olduğu ispatlanmıştır. $(NPCl_2)_n$ yapısındaki bileşikler 1890'lı yıllarda Stokes tarafından çalışılmış ve $n=4, 5, 6$ ve 7 olan bileşiklerin halkalı yapıda oldukları açıklanmıştır [13, 14]. 1950'leri takip eden yıllarda fosfazenlerin farklı organik gruplarla verdikleri tepkimelerden yararlanılarak farklı özellikler taşıyan birçok organofosfazen bileşiği sentezlenmiştir [15]. Fosfazenler yapısal olarak düz zincirli $[(R)HN=PX_3, X_2P(Y)N=PX_3]$ (R :alkil; X : halojen, alkil, aril, alkoksi, amino; Y : O, S), halkalı $[(NPX_2)_n]$ (F, Cl, Br : $n=3-12$) ve polimerik $[X_2P(Y)-(N=PX_2)_n-N=PX_3]$ (R =alkil, X =halojen, alkil, aril, alkoksi, amino; $Y=O, S$) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Fosfazen bileşiklerinde isimlendirme yapılırken halkalı olanlar siklo olarak isimlendirilir. Tri, tetra, penta ve poli örnekleri polimerizasyon derecesini nitelendirmek için kullanılır. Bileşiklerin geometrik izomerleri geminal ve non-geminal ifadeleri ile belirtilir. İki dişli ligandlar olması durumunda spiro-, ansa-, bino- örnekleri kullanılmaktadır [15]. Günümüze kadar olan sürede sentezlenmiş olan çok sayıda düz zincirli, halkalı ve polimerik fosfazen türevleri bulundurdıkları aktif merkez sayesinde farklı gruplarla süstitüsyon tepkimeleri vererek kazandıkları farklı özellikler sayesinde kendilerine olan ilgiyi artırmış ve çeşitli alanlarda kullanılmalarını sağlamıştır. Fosfazen bileşiklerinin kullanım alanlarından bazıları; yeni fosfazen bileşikleri için çıkış maddeleri, karbon temelli bileşiklerde süstitüe grup olmaları, boya ve katalizörlere destek maddeleri, subra moleküller için kaynak [16, 17], biyolojik uyumlu materyaller, elastomerik yapıdaki polimerler, yanmaz fiberler, yarı iletken maddeler [18], yapay nükleazlar ve ilaç tasarlamadır [19].

2.2. Enfeksiyon Hastalıkları ve Enfeksiyona Sebep Olan Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, bir veya daha fazla hücreye sahip mikroskobik canlıları ve hücre yapısında olmayan virüsleri içeren, geniş bir gruptur [20]. Konak canlı ve mikroorganizmalar iki şekilde bir araya gelmektedir. Bunlardan ilki, birliktelik sırasında konak canlının zarar gördüğü; diğeri ise konak canlının herhangi bir olumsuz etkiyle karşılaşmadığı ve genellikle fayda gördüğü durumdur. Birinci durumda konağa zarar veren mikroorganizmalar patojen olarak adlandırırken patojen mikroorganizmalar canlıda enfeksiyona sebep olabilmektedir [21]. Patojen mikroorganizmaların vücuda yerleşmesi ve çoğalması ya da doğal florada bulunan mikroorganizmaların aşırı miktarda çoğalması sonucu çeşitli etki ve toksinler meydana gelir. Dokuların bu etki ve toksinlere karşı gösterdikleri tepki enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyona sebep olan mikroorganizmalar dört gruba ayrılmaktadırlar; virüs, bakteri, fungus ve parazitler [20].

İkinci durumda konak canlıda doğal olarak bulunan ve normal koşullarda insan sağlığı için faydalı olan bu mikroorganizmalar ise mikrobiyom, flora veya mikrobiyota olarak adlandırılmaktadır [21].

Mikroflora vücudun farklı bölgelerinde değişiklik göstermektedir. Deride *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Malassezia*, *Micrococcus*, *Pityrosporum* ve *Propionibacterium*; ağızda *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Geotrichum*, *Capnocytophaga* ve *Eikenella*; solunum sisteminde *Neisseria* ve *Haemophilus*; sindirim sisteminde *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Methanobrevibacter* ve *Eubacterium*; ürogenital sistemde *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Mycobacterium* ve *Torulopsis* cinsleri yer almaktadır. Ayrıca bunların dışında vücutta birden fazla bölgede yer alan cinslerde bulunmaktadır. Örneğin; *Corynebacterium* cinsi bakteriler deri, ağız, solunum sistemi ve ürogenital sistem florasında, *Lactobacillus* cinsi bakteriler ağız, sindirim sistemi ve ürogenital sistem florasında, *Peptostreptococcus* cinsi bakteriler sindirim sistemi ve ürogenital sistem florasında yer almaktadır. Bunlara ek olarak *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Candida*, *Klebsiella* ve *Proteus* cinsi mikroorganizmalarda vücutta birden fazla bölgede bulunmaktadır. Vücudun çeşitli bölgelerinde yer alan mikroorganizma cinsleri Çizelge 2.1’de gösterilmektedir [20].

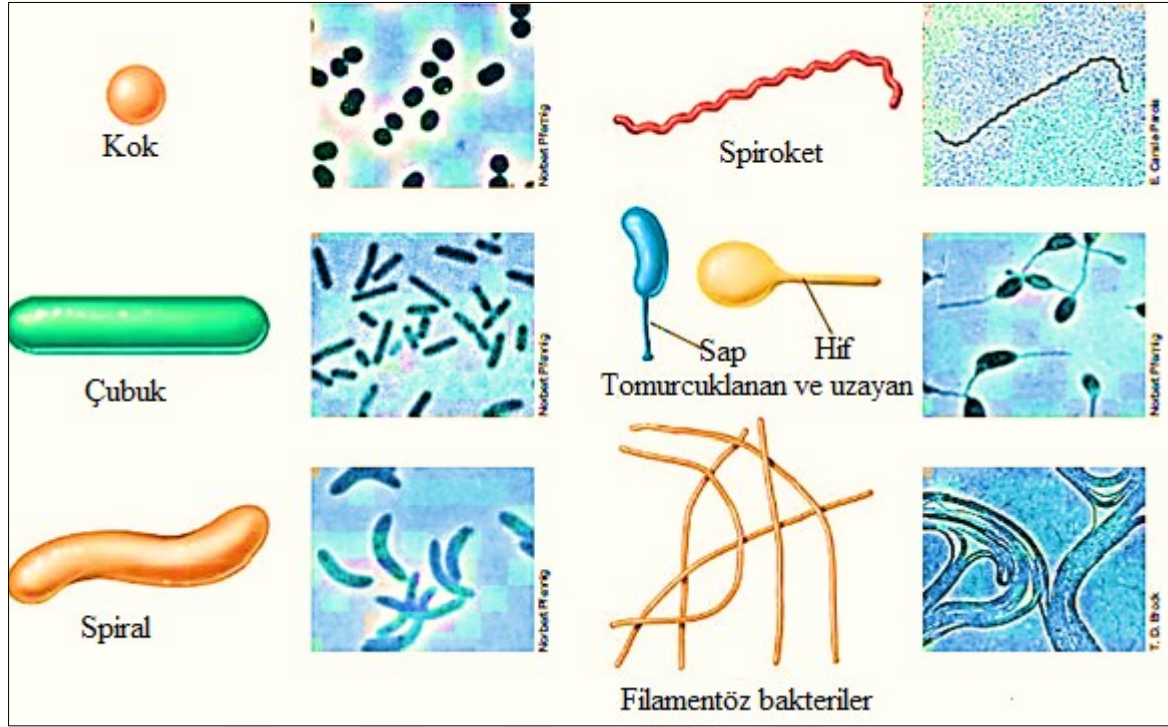
Çizelge 2.1. Sağlıklı bir insan florasında bulunan mikroorganizmalar [20]

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

Fosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı bu tez çalışması kapsamında çalışılan mikroorganizma grupları olan bakteri ve funguslarla alakalı bilgiler verilmektedir.

2.2.1. Bakteriler

Prokaryotik hücre yapısında olan, tek hücreli mikroskobik canlı gruplarından biri bakterilerdir. Hücre morfolojileri kok, spiral, spiroket, basil ve filamentöz gibi çok çeşitli olabilmektedir (Resim 2.1) [20].

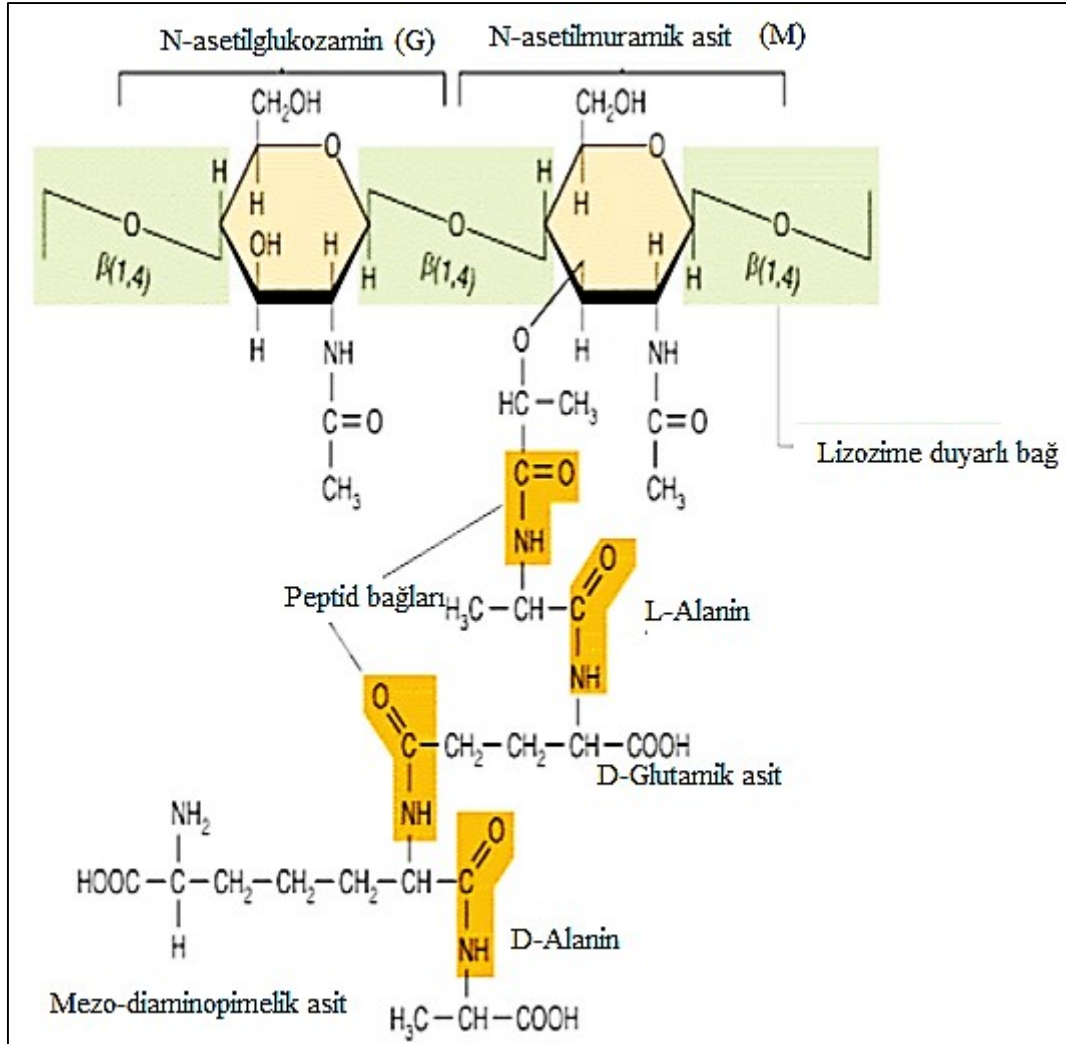


Resim 2.1. Bakterilerin morfolojileri [20]

Prokaryotik hücreler yapı olarak ökaryotlardan farklıdır. Bu hücrelerde zarla çevrili organeller yoktur. DNA, sitoplazmada serbest halde bulunur ve bu sebepten DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon, temel metabolik olaylar ve solunum sitoplazmada gerçekleşmektedir. Genetik bilgi tek bir halkasal kromozomda depolanmaktadır. Bakteri kromozomu yapısal olarak ökaryotik kromozomdan daha basit yapıda, daima çift iplikli tek bir DNA molekülünden oluşmuş ve genellikle halkasaldır. Bakteriyal kromozom bazen nükleoid olarak adlandırılan bir yapı içerisinde sıkışmış olarak bulunur ve büyüklük olarak farklı türlerde çeşitlilik göstermektedir. Bakterilerde genetik varyasyon plazmitler, bakteriyofajlar ve transpozonlar aracılığıyla sağlanmaktadır. Bir sitoplazma zarı sitoplazmayı çevreler ve zar yapısında, salgı ve sinyal proteinleri ve permeazlar bulunur [22]. Bakteri hücrelerinde en dışta mureinden oluşan bir hücre duvarı bulunur. Bu hücre duvarı bakteriler arasında farklılık göstermektedir [22].

Hans Christian, Gram boyama tekniğini kullanarak bakteri hücrelerinin hücre duvarında bulunan bu farklılıklardan yararlanmış ve Gram pozitif ve Gram negatif olarak bakterileri ayırmıştır [23]. Hücre duvarı Gram pozitif bakterilerde tek tabakalı ve kalınken Gram negatif bakterilerde çok tabakalıdır. Her iki hücre duvarında da ortak olarak peptidoglikan (murein) tabaka bulunmaktadır. Peptidoglikan N-asetilmuramikasit ve N-asetilglukozamin

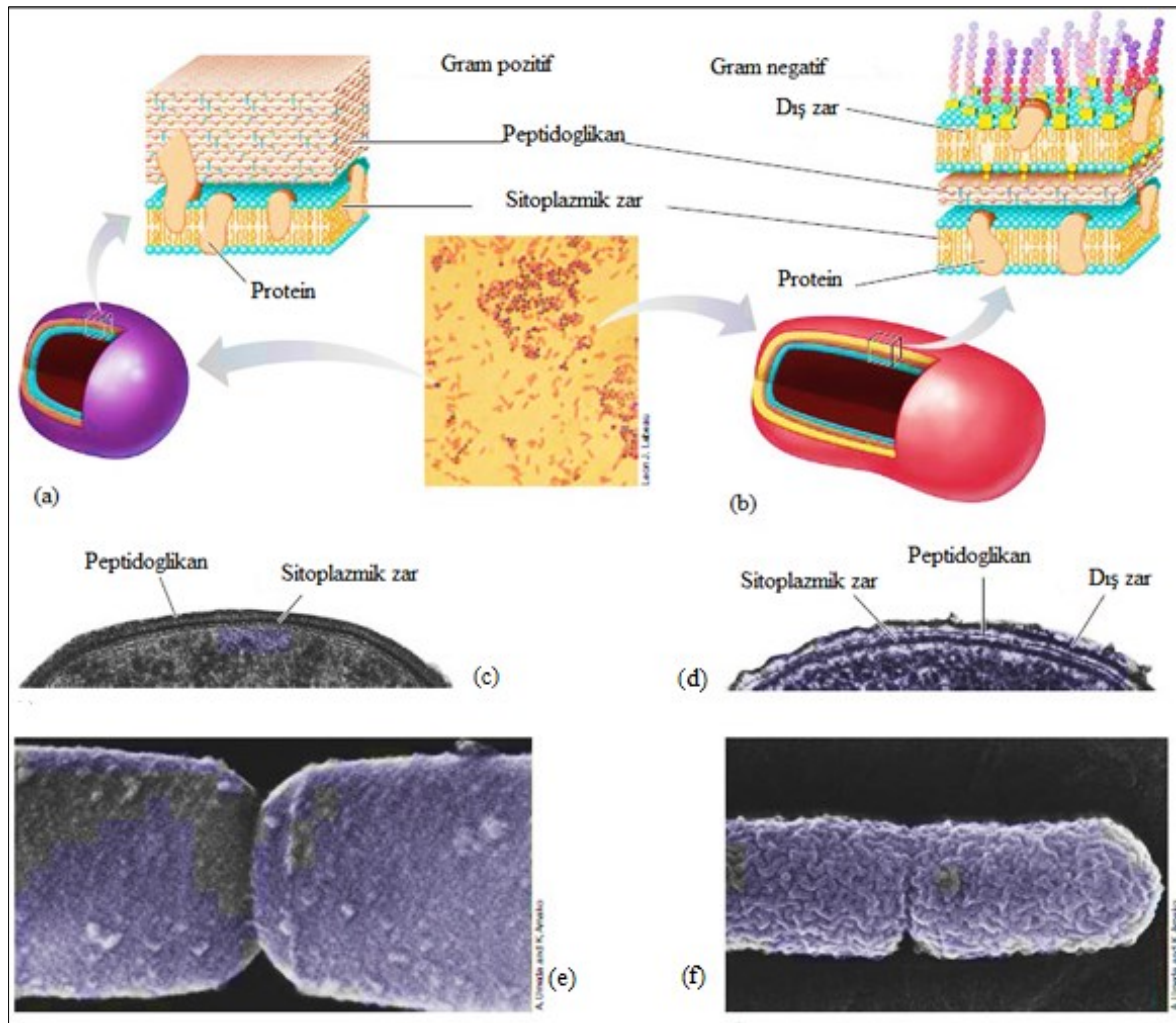
bileşenlerinin β -1,4 glikozit bağı ile bir araya gelmesinden oluşan bir polisakkarit zinciridir. Tetrapeptid kısım ise D-glutamikasit, diaminopimelikasit, L-alanin, D-alanin gibi aminoasitler içermektedir (Şekil 2.1). Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında teikoik asit bulunmaktadır. Teikoik asit içerdiği fosfat gruplarından dolayı hücre yüzeyinin negatif yüklü olmasına neden olmaktadır [20, 24].



Şekil 2.1. Peptidoglikan tabakanın şematik gösterimi [25]

Gram negatif bakterilerde hücre duvarı çok tabakalıdır. Peptidoglikan tabakanın dışında bir dış zar bulunmaktadır ve iki zar arasında Gram pozitif bakterilerde bulunmayan periplazmik boşluk yer almaktadır. Periplazmik boşlukta protein, sindirim enzimleri, su ve besin maddeleri bulunmaktadır. Lipopolisakkarit (LPS) tabakası da denilen bu dış zar polisakkarit içermektedir ve çift katlı lipitten oluşmaktadır. LPS dış zar yapısı olarak bakterinin dış

etmenlere karşı kendini savunmasında da görev almaktadır. Şekil 2.2’de Gram pozitif (a) ve Gram negatif (b) hücre duvarlarının çizimleri ve Gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* ve Gram negatif bir bakteri olan *Escherichia coli*’ye ait gram boyama fotoğrafı yer almaktadır. Gram pozitif (c) ve Gram negatif (d) bakterilere ait transmisyon elektron mikrografları ve Gram pozitif (e) ve Gram negatif (f) bakterilere ait taramalı elektron mikrografları gösterilmektedir [20, 24].

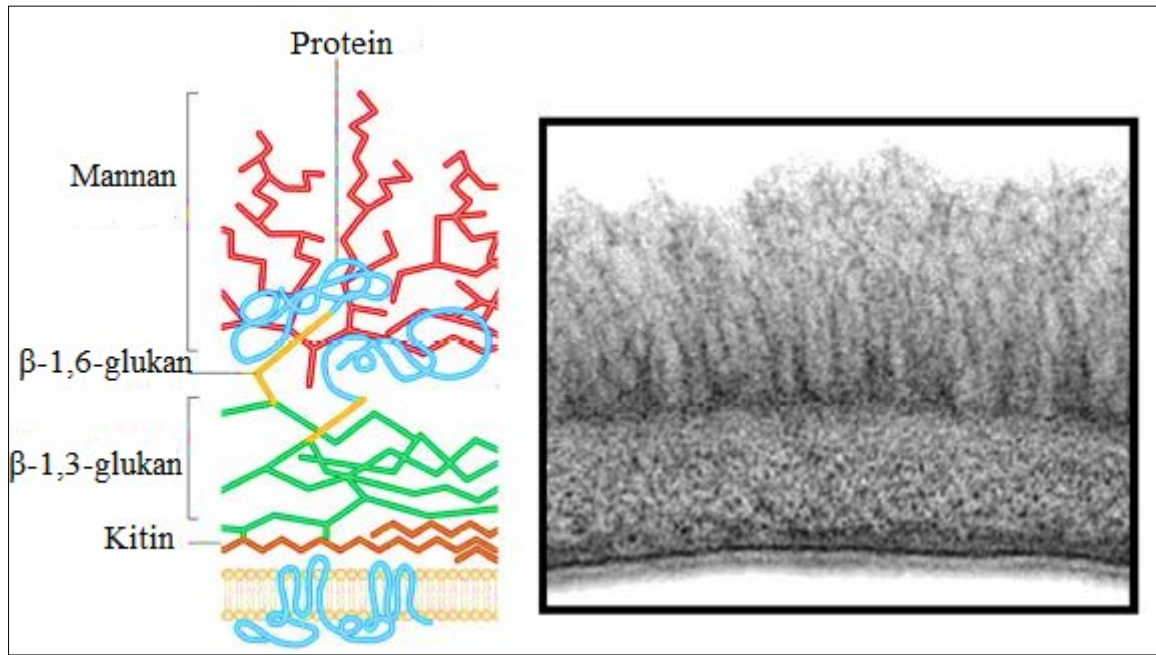


Şekil 2.2. Bakterilerde hücre duvarları [20]

2.2.2. Mayalar

Tek hücreli ökaryotik canlılar olan mayalar, funguslar içerisinde yer alır. Hücre zarı ve hücre duvarı bulunan elips şeklinde morfolojiye sahip canlılardır. İçerisinde çeşitli yapılar (lipid, protein, polifosfat, inorganik iyonlar) bulunan maya hücre duvarının % 80-90'ı polisakkarit yapıdadır [26]. Hücre duvarı glukanlar, kitin ve mannoproteinlerden oluşur ancak fungal

türler arasında hücre duvarı içeriği farklılıklar göstermektedir. Yapıda temel olan glukandır. Hücre duvarında iç kısımda hidrojen bağı ile birbirine tutunmuş β -(1,3) glukon ve kitin bulunur. Bu yapıya β -(1,6) glukon, mannan ve çeşitli proteinler bağlıdır. Mikro fibriller yapıda şekillenen glukonlar dayanıklı bir hücre duvarı yapısı sağlamaktadır. Bazı yapısal proteinlerinde yerini alabilen mannoproteinler hücre geçirgenliğinde görev almaktadır. Mayalarda hücre duvarının % 2-4 kadarını oluşturmakta olan kitin ise N-asetilglukozamin polimeridir (Şekil 2.3) [27, 28].



Şekil 2.3. *Candida* mayasının hücre duvar yapısı [28]

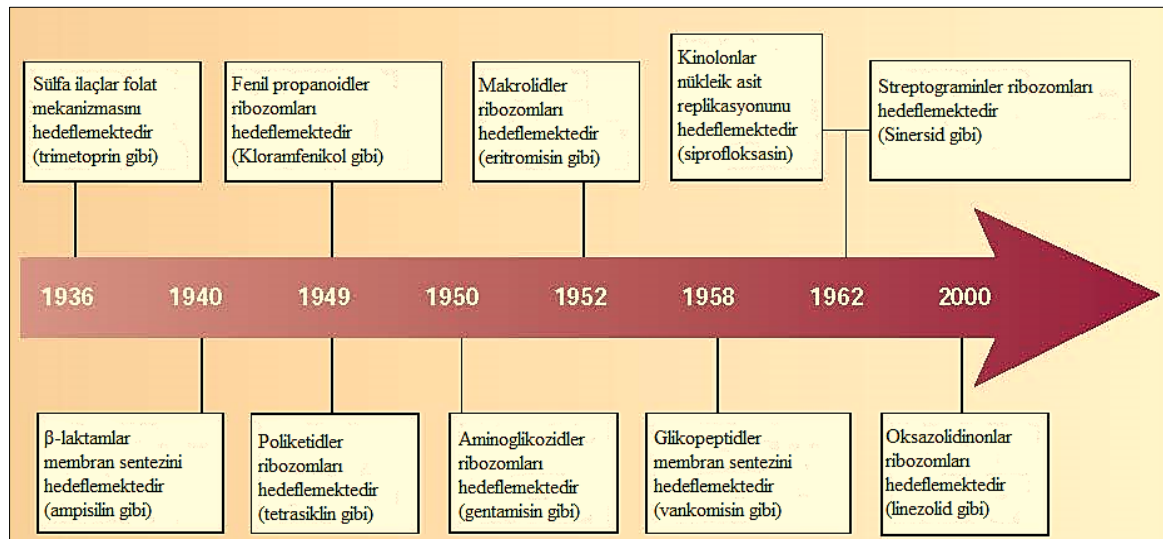
2.3. Antimikrobiyal Maddeler

Mikroorganizmaların gelişimini önleyen veya inhibe eden bileşikler olarak adlandırılan antimikrobiyal maddeler yüzyıllardır insanlar tarafından enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilen antimikrobiyal ajanlar için geçmişte “antibiyotik” terimi kullanılmış olsa da günümüzde bu terim hem mikroorganizmaların üretmiş olduğu hem de sentetik yollardan elde edilen antimikrobiyal ajanlar için kullanılmaktadır [29]. Antimikrobiyal ajanlar mikroorganizmalar üzerinde iki şekilde etki gösterebilmektedir. Bunlardan biri mikroorganizmaların üremesine etki eden mikrobiyostatik etki diğeri ise mikroorganizmaları öldüren mikrobisit etkidir.

Antimikrobiyal maddelerin kullanımında konak ve etkene bağılı faktörler önem arz etmektedir. Bu faktörler arasında en önemli olan ise kullanılan ilacın enfeksiyon etkenine karşı seçici toksisite sağlamasıdır. Bu kriterlerin dikkate alınmadığı durumlarda ise mikroorganizmalar mevcut antimikrobiyal ajanlara karşı direnç oluşturmakta bu da yeni ve daha etkili ilaç arayışlarının ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [4, 30]. Etkilediği mikroorganizmanın türüne göre antimikrobiyal ajanlar antiviral, antiprotozoal, antibakteriyel ve antifungal ajanlar olarak ayrılmaktadır. Bu çalışma kapsamında enfeksiyon etkeni olarak çeşitli bakteri ve mayalar kullanıldığı için antibakteriyel ve antifungal ajanların özelliklerinden bahsedilmiştir.

2.3.1. Antibakteriyel ilaçlar

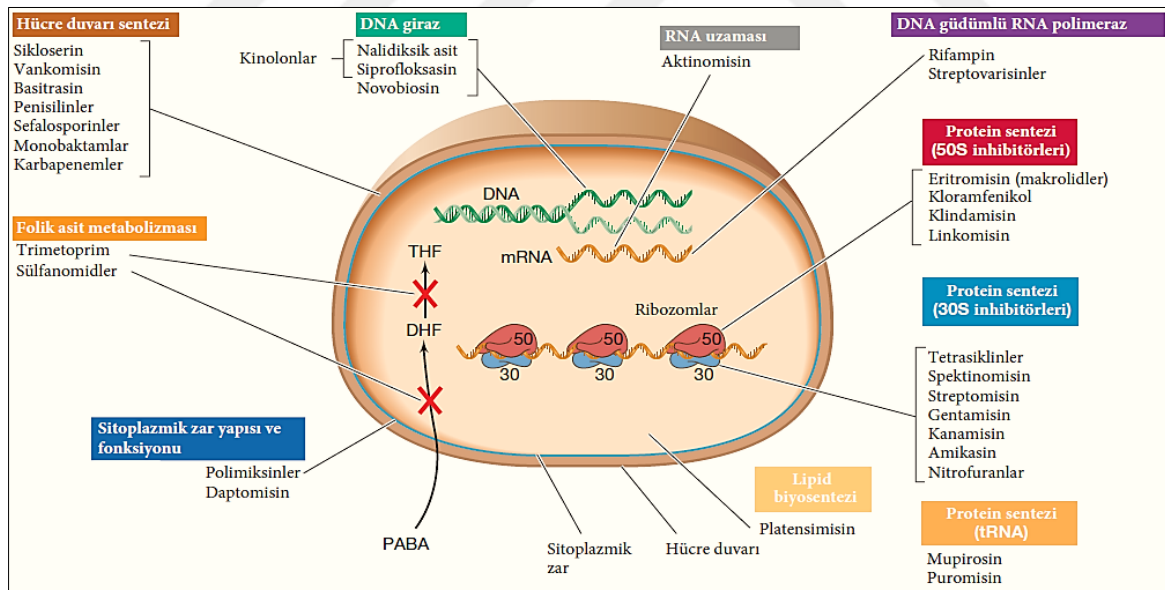
Enfeksiyon kaynaklı hastalıkları tedavi etme amacıyla kimyasal maddelerin kullanılması fikri Paul Ehrlich tarafından öne sürülmüştür. 1928’de Alexander Flemming antibiyotik olarak penisilini kullanıma sunmudur. Flemming’in keşfinden sonra antibiyotik arayışları hız kazanmış ve 1962 ve 2000 yılları arasında pek çok yeni ilaç sınıfı kullanıma sunulmuştur [31, 32]. Bu ilaç sınıfları β -laktamlar, kinolonlar, aminoglikozidler, makrolidler ve poliketidlerdir. 1962 ve 2000 yılları arasında geliştirilen bazı ilaç sınıfları Şekil 2.4’te gösterilmektedir [32].



Şekil 2.4. Klinik kullanımda olan antibiyotik sınıfları ve hedefleri [34]

Toplumdan ve özellikle hastanelerden izole edilen Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde antibakteriyel ilaçlara karşı artan direnç hem dünyada hem de ülkemizde en önemli sağlık sorunlarından bir tanesi haline gelmiştir. Bu bakterilerin neden olduğu hastane enfeksiyonlarındaki artış, hasta morbidite ve mortalitesini arttırmaktadır [33]. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerdeki çoklu ilaç direncindeki artışla birlikte bu bakterilerle oluşan enfeksiyonlara uygun tedavi seçenekleri bulmak giderek zorlaşmaktadır. Yine bu bakterilerin gerek nozokomiyal salgınlar oluşturarak gerekse tedavi sırasında kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirerek klinisyenlere yaşattıkları sıkıntılar ise yeni antibakteriyel gelişimindeki gerekliliği gündeme getirmiştir [34]. Tüm bu sebeplerden dolayı yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

Mevcut antibiyotikler etki gösterdikleri canlı grupları üzerinde farklı yapıları hedeflemektedir. Bunlar hücre duvarı, hücre zarı, nükleik asitler, protein sentezi ve folat sentezidir. Yukarıda verilen hücre yapılarına etki eden çeşitli antibiyotikler Şekil 2.5'te verilmiştir [20].



Şekil 2.5. Çeşitli hücre yapılarına etki eden antibiyotikler [20]

Hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotikler

Hücrede bu yapıya etki eden antibiyotikler genellikle peptidoglikan tabakanın sentezinde görev alan enzim ve molekülleri inhibe eder. Penisilininde içerisinde yer aldığı β (Beta)-

laktam grubu antibiyotikler hücre duvarını etkileyen antibiyotikler arasında en büyük grubu oluşturur. Bu grupta yer alan antibiyotikler isimlerini içerdikleri halkasal bir amid olan β -laktam'dan alır. B-laktam grubu antibiyotikler halkanın yapısına göre farklı alt gruplara (penemler, karbapenemler, sefamler, okzasefamler, penamlar, klavamlar, monobaktamlar) ayrılmaktadır. β -laktamlar murein sentezi sırasında görev alan transpeptidaz enzimini inhibe ederek hücre duvarı sentezini engeller ve bakteri hücresinin lizise uğramasına sebep olur [20, 35].

Hücre zarı yapısına etki eden antibiyotikler

Bu grupta yer alan antibiyotikler deterjan gibi davranır ve hücre zarının geçirgenliğini olumsuz yönde etkiler. Hücre duvarının daha kalın olması sayesinde Gram pozitif bakteriler bu grup antibiyotiklerden Gram negatif bakteriler kadar etkilenmezler. Ayrıca bakteri hücresinin hücre zarı fonksiyonları ile memeli hücresinin hücre zarı fonksiyonları benzerlik gösterdiğinden dolayı bu grupta bulunan antibiyotiklerin kullanımı organizma açısından tehlike arz etmektedir [23, 36].

Nükleik asitler üzerine etki eden antibiyotikler

Nükleik asitlere etki eden antibiyotikler genellikle bakteriyostatik etki göstermektedirler. DNA veya RNA'ya etki eden bu grup antibiyotiklerden Kinolonlar topoizomeraz enzimine, Ansamisinler RNA polimeraz enzimine, Mitomisinler ise DNA replikasyonuna etki ederek mikroorganizmayı etkilemektedir [23].

Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler

Bakteri ribozomuna etki eden bu antibiyotikler bakteri ribozomundaki 30S ve 50S alt birimlerine bağlanarak protein sentezinin 3 aşamasını; başlama, uzama ve sonlanmayı inhibe eder. Bu gruptaki antibiyotikler geniş spektrumludur ve etki gösterirken ribozom alt birimlerine dönüşümlü ya da dönüşümsüz olarak bağlanabilmektedir [23, 35].

Antimetabolitler

Bakterilerdeki folik asit sentezine etki eden bu grup antibiyotikler arasında en önemli olanı sülfonamidlerdir. Sülfonamidler folik asit sentezinde önemli bir rol alan

p-aminobenzoik asit'in (PABA) yapısal olarak benzeri olan p-aminobenzen sülfonamid'den köken alır. Bu şekilde folik asit sentezinde PABA'nın yerine geçerek tetrahidrofolat sentezini inhibe ederek etkisini gösterir [37].

2.3.2. Antifungal ilaçlar

İnsanlar ve funguslar ökaryot hücreli canlılar olduğundan hücre yapısı açısından pek çok benzerlik gösterir. Bu sebeple fungusların tedavisi zor ve seçici toksisite gösterebilecek antifungal ajan geliştirilmesi güçtür. Bu sebeple antifungal ajanların hedefledikleri yapıların funguslara özgü metabolik yollar olması beklenmektedir. Antifungal ilaçların hedefledikleri yapılar hücre duvarı bileşimleri, ergosterol sentezi, nükleik asit sentezi ve mikrotübül oluşumudur. Örneğin; poliyenler ve azoller ergosterol sentezini, nükleik asit analogları DNA sentezini, ekinokandinler hücre duvarı sentezini, polioksinler ise hücre duvarı yapısında bulunan kitin sentezine etki etmektedir. Allilamin ve tiyokarbamatlar ergosterol sentezini inhibe etmektedir [38]. Bazı antifungal ajanlar, hedefledikleri yapılar ve etki mekanizmaları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı antifungal ajanlar, hedefleri ve etki mekanizmaları [20, 38]

Antifungal ajanlar	Hedef	Etki mekanizması
Poliyenler (Nistatin, amfoterisin B, AB Lipit kompleks (ABLC), AB colloidal dispersion (ABCD), Lipozomal AB)	Ergosterol sentezi	Mantar hücre duvarı ergosterolüne bağlanarak hücre duvarı geçirgenliğini artırır. Özellikle hücre içi K ⁺ kaybı hücrenin canlılığını yitirmesine neden olur.
Azoller (ketokonazol, flukonazol, itraconazol, vorikonazol)	Ergosterol sentezi	Lanosterol 14 α demetilaz inhibisyonu, 24 metilen dihidro lanosterol demetilaz inhibisyonu
Allilamin ve tiyokarbamatlar (naltifin, terbinafin, tolnaftat)	Ergosterol sentezi	Oksidoskualen siklaz inhibisyonu
Nükleik asit analogları (5-florositozin)	DNA sentezi	5- florourasile dönüşerek RNA'nın, timine dönüşerek ise DNA'nın yapısını bozar.
Ekinokandinler (Kaspofungin)	Hücre duvarı sentezi	1- 3 beta D-glukan sentetaz inhibitörü
Polioksinler (Polioksin A, Polioksin B)	Kitin sentezi	Hücre duvarında kitin sentez inhibitörü

2.3.3. Antimikrobiyal Direnç

Mikroorganizmaların kendilerine karşı kullanılan antimikrobiyal maddelere duyarlı olmamaları ya da önceden duyarlıyken daha sonra bu maddelerden etkilenmemeleri durumuna antimikrobiyal direnç denilmektedir [39]. Antimikrobiyal direnç, direnci oluşturan mikroorganizmanın türüne göre adlandırılmaktadır. Bu tez çalışmasında patojen bakteri ve mayalar üzerinde çalışıldığı için antibakteriyel ve antifungal direnç konuları irdelenecektir.

Antibakteriyel direnç

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde karşılaşılan en büyük sıkıntı patojen mikroorganizmaların mevcut antibiyotiklere karşı geliştirmiş oldukları dirençtir. Günümüzde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde karşılaşılan en büyük sıkıntı

mikroorganizmaların savunma mekanizmaları gereğince antibiyotiklere karşı geliştirdiği dirençtir. Antibakteriyel direnç doğal ve kazanılmış direnç olmak üzere iki şekilde olabilmektedir [39].

1. Doğal direnç: Bir türe ait tüm suşların bazı antibakteriyel ilaçlardan etkilenmemesi doğal direnç ya da duyarsızlık olarak adlandırılmaktadır. Bu direnç patojenin içinde mutasyon ve seleksiyon yoluyla kendiliğinden (endojen) oluşabilmektedir. Bu direnç yapısal ve biyokimyasal özellikler ile bakterinin doğasına bağlı oluşur. Bu dirence sahip bakteriler antibiyotiklerin bağlanma bölgesini içermeyebilir ya da antibiyotiklerin kimyasal yapısındaki farklılıklar ile bunlara karşı düşük seviyede geçirgenlik gösterir [40].
2. Kazanılmış direnç: Doğal şekilde antibiyotiklere duyarlı olan bakterilerin sonradan antibiyotiklerden etkilenmemesi kazanılmış direnç olarak adlandırılmaktadır. Kazanılmış direnç, horizontal gen transferi (HGT) yoluyla çevredeki organizmalardan (antibiyotik üreticiler, kommensaller, insan dışı patojenler, vs) geçerek (ekzojen) oluşabilmektedir [39, 41]. Kazanılmış direnç biyokimyasal kaynaklı ve genetik kaynaklı gelişebilmektedir. Biyokimyasal kaynaklı direnç ise dört farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bunlar; antibiyotik inaktivasyonu sonucu gelişen, hedef molekülün değişmesi sonucu gelişen, aktif pompa sistemleri ve hücre duvarı permeabilite sonucu değişimi sonucu gelişen ve diğer direnç mekanizmalarıdır [41].

Endojen kaynaklı direnç hedef afinitesini azaltan basit mutasyonlar (Rifamisin, streptomisin gibi), hedefin yeniden modellenmesini veya afinitesini azaltan çok basamaklı mutasyonlar (florokinolonlar, β -laktamlar, vankomisin gibi), genel efluks mekanizmaları (*Pseudomonas* için kullanılan pekçok antibiyotik sınıfı), alımın azaltılması (porin veya permeaz kaybı) (karbapenemler), aktivasyon kaybı (metronidazol) ve hedefin artışı (fosfomisin) şeklinde gerçekleşmektedir. Ekzojen kaynaklı direnç mekanizmaları cinse özgü dışı atım (tetrasiklin), cinse özgü yıkım (aminoglikozidler), hedef korumu/modifikasyon (makrolidler), indirgenmiş- afinite hedefi ile yer değiştirme (trimetoprim) ve hedefin ayrılması (fusidik asit) şeklinde gerçekleşmektedir. Kullanımda olan mevcut antibiyotiklere karşı bakterilerin geliştirdiği ekzojen ve endojen kaynaklı direnç mekanizmaları Çizelge 2.3'te gösterilmektedir [39].

Çizelge 2.3. Ekzojen ve endojen kaynaklı antibakteriyel direnç mekanizmaları [39]

Ekzojen	Cinse özgü efluks (dışa atım) (Tetrasiklin, makrolidler)
	Cinse özgü yıkım/modifikasyon (β -laktamlar, aminoglikozidler, kloramfenikol, streptogramin A, metronidazol, fosfomisin)
	Hedef koruma/modifikasyon (Tetrasiklin, makrolidler, linkosamidler, oksazolidinonlar, streptograminB)
	İndirgenmiş-afinite hedefi ile yerdeğiştirme (β -Laktamlar, vankomisin, trimetoprim, mupirosin, sulfonamidler)
	Hedefin ayrılması (Florokinolonlar, fusidik asit)
Endojen	Hedef afinitesini azaltan basit mutasyonlar (Rifamisin, streptomisin, trimetoprim, fusidik asit)
	Hedefin yeniden modellemesini veya afinitesini azaltan çok basamaklı mutasyonlar (Florokinolonlar, oksazolidinonlar, daptomisin, vankomisin, polimiksin, β -laktamlar)
	Genel efluks mekanizmaları (<i>Pseudomonas</i> için kullanılan birçok sınıf, diğer türler için kullanılan bazı sınıflar)
	Alımın azaltılması (porin veya permeaz kaybı) (Karbapenemler, fosfomisin)
	Aktivasyon kaybı (Metronidazol- <i>H. pylori</i> için)
	Hedefin artışı (Fosfomisin)

Antifungal direnç

Artan fungal enfeksiyonlar ve bu enfeksiyonların tedavisinin zor olması sebebiyle yaygın ve uzun süreli antifungal ajan kullanımına bağlı olarak zaman içerisinde funguslar bu ajanlara karşı direnç geliştirmiştir. Antifungal ajanlarla yapılan tedaviye fungusların duyarsız kalması durumu antifungal direnç olarak adlandırılmaktadır. Fungusların ilaçlara karşı sahip oldukları direnç üç farklı şekildedir. Bunlardan birincisi; mikroorganizmanın antifungal ajan ile karşılaşmadan önce sahip olduğu primer (yapısal) direnç, ikincisi; mikroorganizmanın antifungal ajanla karşılaştıktan sonra geliştirdiği sekonder direnç, üçüncüsü ise fungal izolatlar sayesinde gelişen klinik dirençtir [42, 43]. Günümüzde sıklıkla kullanılan antifungal ilaç sınıfları arasında poliyenler, azoller, alilaminler, 5-flusitozin ve ekinokandinler bulunmaktadır. Fungusların genotiplerinde meydana gelen bazı mutasyonlar

fenotiplerine yansımakta ve antifungal ilaçlara karşı direnç kazanmasını sağlamaktadır. Örneğin; terbinafin gibi alilaminler ergosterol biyosentezini, amfoterisin B gibi poliyenler plazma zarındaki ergosterolü etkilemektedirler. Böylece membran geçirgenliğini bozarlar. 5-flusitozinler primidin metabolizması ve DNA sentezini engelleyerek, ekinokandinler ise β -1,3 glukan sentezini inhibe edip hücre duvarı yapısını bozarak etki göstermektedir [44]. *C. albicans*'ın sekonder azol direnci için üç farklı mekanizma olduğu görülmüştür. Birinci mekanizmada aktif dışa atım yoluyla azol birikimi azalmaktadır. İkinci yolda bağlanma bölgesinin (14 α -sterol-demetilaz, *ERG11* tarafından kodlanır) değişmesi veya aşırı ifadesi görülmektedir. Üçüncü mekanizmada ise ergosterol yolağındaki mutasyonlar (*ERG3* tarafından kodlanan hasarlı Δ -5,6-desatüraz) sonucunda fonksiyon kaybı oluşmaktadır. Bu üç mekanizma azol varlığında daha az toksik sterol birikimine izin vermektedir [43]. Bazı patojen fungusların direnç geliştirdiği antifungal ajanlar ve bu ajanlara karşı geliştirdiği direnç mekanizmaları Çizelge 2.4'te yer almaktadır [43].

Çizelge 2.4. Bazı patojen funguslar, antifungal ajanlar ve direnç mekanizmaları [43]

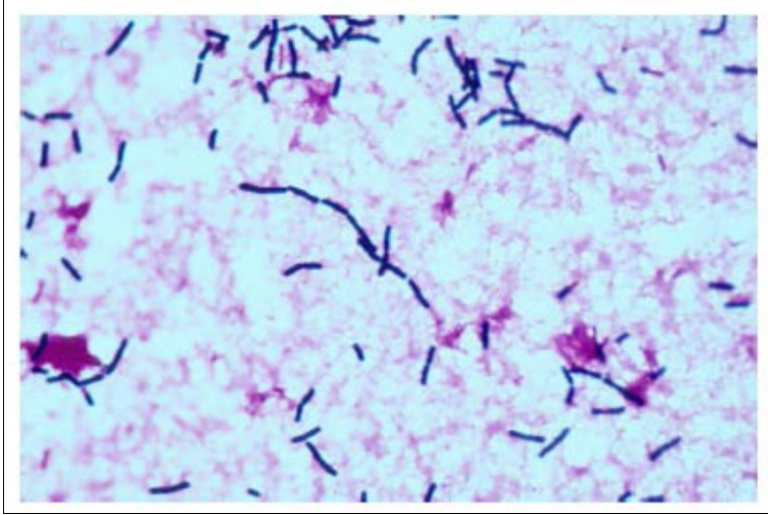
Antifungal ajan	Patojen mikroorganizma	Etki mekanizması
Flukanazol	<i>Candida albicans</i>	*İlacın dışa atımının artması *İlacın hedef bölgeye bağlanmasının azalması *Hedef bölgenin aşırı ifade edilmesi *Alternatif sterollerin birikimi
	<i>Candida glabrata</i>	*İlacın dışa atımının artması *Alternatif sterollerin birikimi *Hedef bölgenin aşırı ifade edilmesi
	<i>Candida tropicalis</i>	*İlacın dışa atımının artması
	<i>Candida krusei</i>	*İlacın hedef bölgeye bağlanmasının azalması *İlaç geçirgenliğinin azalması
Amfoterisin B	<i>Candida albicans</i>	*İlaç ile zarın birleşmesinin azalması *Oksidatif hasarın azalması
Flusitosin	<i>Candida albicans</i>	*Alımın azalması
Terbinafin	<i>Candida albicans</i>	*İlacın dışa atımının artması

2.4. Bazı Patojen Mikroorganizmalar ve Oluşturdukları Enfeksiyonlar

2.4.1. Patojen bakteriler

Bacillus cereus

Bacillaceae familyası içerisinde yer alan *B. cereus* toprak, su, süt ve süt tozunda yaygın olarak bulunan aerob sporlu bir bakteridir. Boyu 3-5 µm ve eni 1-1,2 µm olan oldukça büyük bir basildir. Sporları santral veya sub terminal ve oval şekillidir. Kapsülsüz, hareketli ve Gram pozitifdir (Resim 2.2) [45].

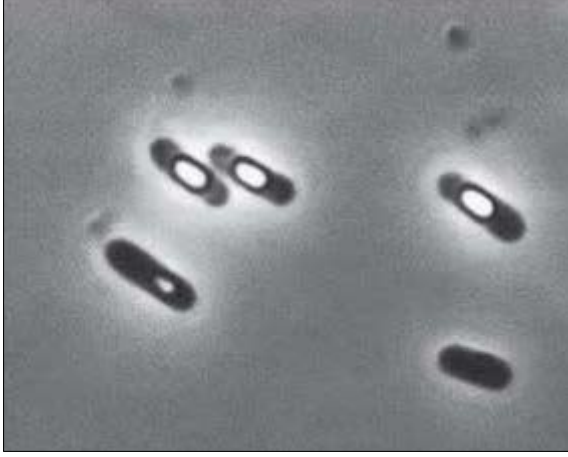


Resim 2.2. *B. cereus*'un mikroskopik görüntüsü [45]

Gıdalarla yayılan hastalıklarla ilişkili olarak iki tür gıda zehirlenmesi sendromundan sorumludur. Bu sendromlara bakterinin içerdiği enterotoksin sebep olmaktadır. Enterotoksin kompleksi bir, sürgün yaptıran (diyareli tip) ve iki, kusturan (enterik tip) toksin olarak isimlendirilen iki komponentten oluşmaktadır. Aynı zamanda *B. cereus* yıkıcı bir oküler patojendir. Bunların dışında *B. cereus*'a ait ciddi yaralanmalar sonucunda ya da cerrahi müdahale sonrası kontaminasyonla meydana gelen ciddi semptomları olan vakalar olduğu da bildirilmiştir. Bu vakaların birinde *B. cereus*'un içerdiği plazmidin, patojenitesi daha yüksek olan *Bacillus anthracis*'in içerdiği hastalık etkeni plazmidi arasında % 99,6 oranında benzerlik olduğu saptanmıştır [45, 46]. *B. cereus* geniş spektrumlu beta laktamaz üretmesi sayesinde penisilin, ampicilin ve sefalosporine dirençlidir [45].

Bacillus subtilis

Bacillaceae familyası içerisinde bulunan *B. subtilis* başlıca toprak, gübre, bitki, hayvan, su ve süt olmak üzere doğada yaygın olarak bulunur. Boyu yaklaşık olarak 1,5-3 μm , eni ise 0,5-0,8 μm 'dir. Hareket için peritrih kirpikleri bulunur. Sporları oval ve sub terminaldir. Kapsülsüz, aerop, Gram pozitif bir bakteridir. Bazı varyantları kapsüllü ve hareketsiz formda bulunabilirler (Resim 2.3) [47-49].

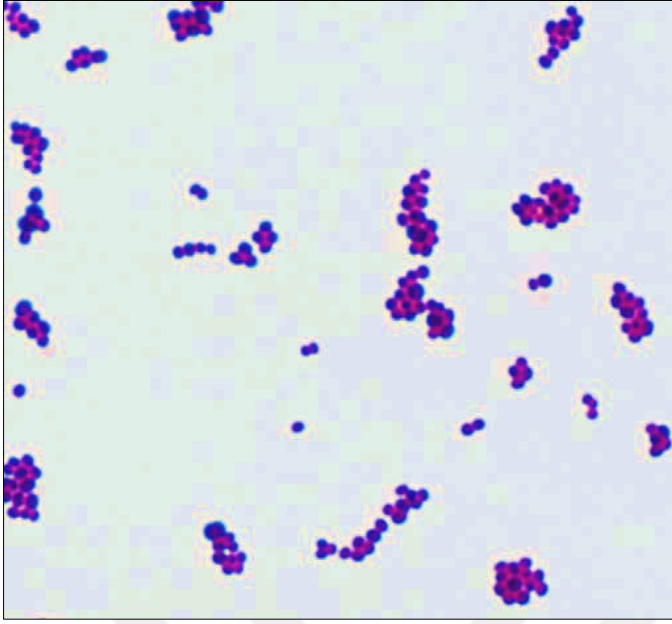


Resim 2.3. *B. subtilis*'in mikroskopik görüntüsü

Normal şartlarda saprofit olmasına rağmen doğrudan doku veya göz içerisine girmesi sonucu iridosiklit ve panoftalmi gibi göz yangılarına sebep olabilir. Ekmeğin yumuşayarak bozulmasına neden olur ve bazı gıda kaynaklı zehirlenmelerden sorumlu olduğundan kuşulanılmaktadır. Bazı bakterilere karşı inhibitör etki gösteren subtilin maddesi *B. subtilis*'ten elde edilmektedir. Fare peritonuna verildiğinde ölüme yol açtığı bilinmektedir [47-49].

Staphylococcus aureus

Staphylococcaceae familyasının bir üyesi olan *S. aureus*, doğada yaygın olarak bulunabilen stafilokoklar en çok kuşların ve memelilerin muköz membranları ve derilerinde bulunur. Konakta bulundukları bölgeyle simbiyotik bir ilişki içerisindeyler [50]. Stafilokoklar yaklaşık olarak 1 µm çapındadırlar. Morfolojik olarak kok şeklindedirler (Resim 2.4). Bölünme sonucu meydana gelen hücreler birbirlerinden ayrılmazlar ve üzüm salkımı şeklinde görünürler. Altın sarısı ve tebeşir beyazı koloniler oluştururlar. Bazik boyalarla kolay boyanırlar ve Gram pozitifler. Aerob ve fakültatif anaerob bakterilerdir. Üremeleri için gerekli olan ısı aralığı geniştir (6,5 °C-45 °C) [50, 51].



Resim 2.4. *S. aureus*'un mikroskopik görüntüsü [51]

Kutanöz bariyerin hasar görmesi, medikal ekipmanlarla implantasyon sonucu dokuya girmesi gibi pek çok sebeple patojen olabilirler. Piyojenik enfeksiyonlar, solunum yolu enfeksiyonları, gıda zehirlenmeleri, toksik şok gibi sağlık sorunlarına sebep olan *S. aureus* bu hastalıkları α -toksin, β -toksin, toksin A ve diğerleri aracılığıyla sağlamaktadır. Bu toksinler vücutta sistemik şok hemoliz deri soyulması gibi sorunlara yol açmaktadır. Stafilocokların pek çok çevresel koşula karşı direnci çok yüksektir. Antimikrobiyal ilaçlara karşı ise başlangıçta duyarlı iken daha sonra hızla direnç geliştirmişlerdir. Bazı boyaların bakteriyostatik etkilerine karşı duyarlıdır. 1950'li yıllarda beta laktamazlarla gelişen penisilin direnci ortaya çıkmış ve bu direnci makrolid, tetrasiklin, ve aminoglikozid antibiyotik dirençleri izlemiştir [4, 20].

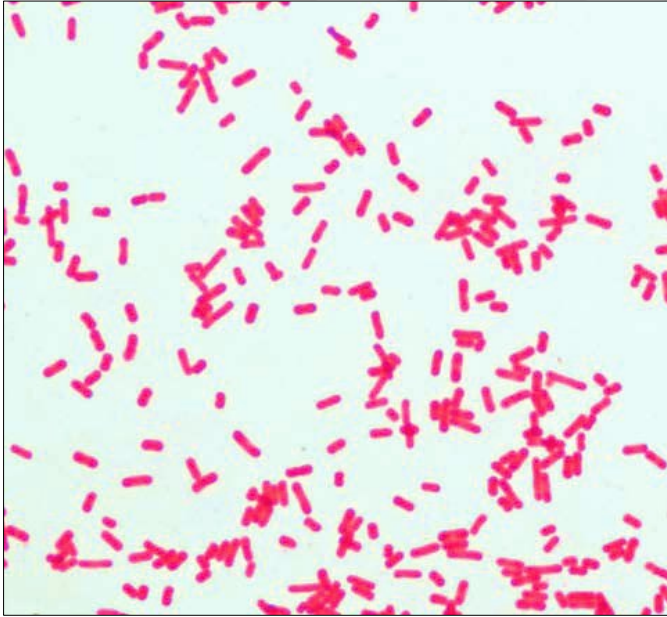
Enterococcus faecalis ve Enterococcus hirae

Enterococcaceae familyasının bir üyesi olan bu bakteriler laktik asit bakterileri arasındadır. Konak bakımından zengin olan bu türler hayvanların sindirim sisteminde ve insanların ağız ve gastrointestinal bölgesinde bulunan fırsatçı patojen bakterilerdir. Tekli, ikili veya kısa zincirli şekillerde bulunan, Gram pozitif, kok formunda, katalaz negatif, spor oluşturmeyen ve fakültatif anaerob bakteridir. *Enterococlar* endokardit, kolesistid, sepsis, menenjit, idrar yolu enfeksiyonu, cerrahi yaralardan kaynaklı enfeksiyonlar gibi birçok enfeksiyona sebep olmaktadır [52]. *Enterokokların* patojenitelerinde çok sayıda virülans faktör rol

oynamaktadır. Bu bakterilerin konağın bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlayan hücre duvarıyla alakalı enterokokal yüzey proteini bu virülans faktörlerden biridir, bir diğeri ise hemoglobin ve diğeri biyoaktif maddeleri parçalayan jelatinazdır [53]. Hastane enfeksiyonlarında önemli bir rol oynayan bu bakteriler önemli antibiyotik gruplarından pek çoğuna karşı direnç kazanmıştır. Bu antibiyotikler β -laktamlar, aminoglikozidler, glikopeptidler ve florokinolonlardır. Ayrıca ciddi insan patojeni olan diğeri bakteriler için aktarılabilen direnç genlerinin kaynağı olarak dikkate alınmaktadır. [54].

Escherichia coli

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *E. coli* memelilerin ve kuşların bağırsak florasında doğal olarak bulunan ve normal koşullarda canlı için faydalı olan, fırsatçı patojen bakteridir [55]. Gram negatif, basil şeklinde, peritrik kirpikli, boyu yaklaşık olarak 1-2 μm ve çapı 0,1-0,2 μm olan bakterilerdir (Resim 2.5) [39, 56].



Resim 2.5. *E. coli*'nin mikroskopik görüntüsü [39]

Sahip oldukları antijenler çok çeşitlidir ve antijenik yapıları karmaşıktır. Bazı *E. coli* suşları aynı veya yakın suşlara karşı bakterisidal proteinler (bakteriyosin) üretmektedir [57]. Düşük miktarlarda bile enfeksiyona sebep olan *E. coli* hamile kadınlarda yeni doğan sepsisi, doğum enfeksiyonu, üriner sistem enfeksiyonu ve intra-amniyotik enfeksiyon gibi çeşitli enfeksiyonel hastalıkların kaynağıdır. Bahsedilen enfeksiyon hastalıklarının tedavisini

güçleştiren nokta *E. coli*'nin antibiyotiklere karşı sahip olduğu dirençtir. *E. coli* oral antibakteriyel ajan olarak en çok kullanılan florokinolonlara ve hastanelerde enfeksiyona karşı intravenöz tedavide en sık kullanılan 3. Nesil sefalosporinlere karşı direnç geliştirmiştir [58].

Proteus vulgaris

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *P. vulgaris* dahil olduğu familyanın genel özelliklerine sahip, hareketli, sporsuz ve kapsülsüz bir bakteridir. Toprak, su ve insanların kolon florasında yer almaktadır. *P. vulgaris*'in patojen suşları fare peritonuna verildiğinde 48 saat içerisinde canlının ölümüne neden olmaktadır. Bunun sebebi bakterinin toksik lipopolisakkarit fraksiyonlarıdır. İnsanda sıklıkla üriner enfeksiyonlar, böbrek taşı oluşumu, tetanoz, yeni doğan sepsisi, osteomyelit ve hastane enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. Proteus kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde tür tayini çok önemlidir çünkü indol pozitif türlerin aminoglikozidlere dirençli olduğu bildirilmiştir [59].

Klebsiella pneumoniae

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *K. pneumoniae* insan ve hayvanlarda bağırsak ve üst solunum yollarında ayrıca toprak ve suda bulunmaktadır. Gram negatif, hareketsiz, çomak formunda, bakteriyolojik boyalarla boyanabilen, boyu 1-2 µm ve çapı 0,5-0,8 µm olan, polisakkarit yapıda kapsüle sahip patojen bakteri türüdür (Resim 2.6) [60, 61].



Resim 2.6. *K. pneumoniae*'nin elektron mikroskobu görüntüsü [61]

K. pneumoniae'nin sebep olduğu en önemli enfeksiyon pnömonidir. Ayrıca bu bakteri uygun ortam ve koşullarda idrar yolu enfeksiyonu, karaciğer absesi, menenjit, karın içi enfeksiyonlar, sepsis, osteomyelit gibi pek çok hastalığa sebep olmaktadır [62]. Bahsi geçen enfeksiyon hastalıklarının antibiyotiklerle tedavisi sonucunda bu bakterinin antibiyotiklere karşı direncinin yüksek olduğu anlaşılmıştır. Özellikle karbapenem direnci genlerinin tamamı bu bakteridedir ve diğer pek çok bakterinin karbapenem direnci kazanmasını sağlayan *K. pneumoniae*'deki bu direnç genleri olduğu bilinmektedir. Bu bakterinin direnç geliştirdiği bir diğer antibiyotik çeşidi de β -laktamlardır [4].

Salmonella typhimurium

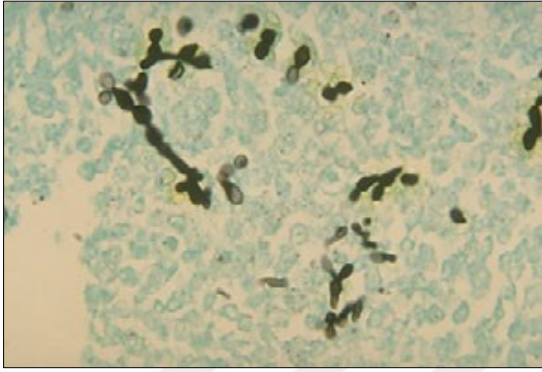
Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *S. typhimurium* kontamine su ve gıdalarla aracılığıyla insanlar ve hayvanlar gibi çeşitli konakların gastrointestinal sistemine yerleşerek enfeksiyona sebep olan gastroenterit bir türdür. *S. typhimurium* basil morfolojisinde, sporsuz, fakültatif aerob ve Gram negatiftir [63]. *S. typhimurium*'un da içinde yer aldığı *Salmonella* cinsi dünyanın birçok bölgesinde gıda zehirlenmelerindeki en önemli etkenlerden biridir. Ayrıca tifo etkeni de yine *Salmonella* cinsi bakterilerdir. Salmonellozis adı verilen enfeksiyona sebep olmaktadır. Bu sorunların haricinde *S. typhimurium*'un asemptomatik kolonize olmasından kaynaklı menenjit, bebeklerde sepsis ve osteomyelit gibi önemli hastalıklarda görülebilmektedir. Ayrıca *S. typhimurium* sebep olduğu hastalıkların tedavisini zorlaştıracak şekilde çoklu antibiyotik direncine sahip bir mikroorganizmadır [64, 65].

2.4.2. Patojen mayalar

Funguslar tarafından meydana getirilen ve dünya üzerinde en sık rastlanan enfeksiyon kandidiyazisdir. Kandidiyazis *Candida* mayası tarafından meydana getirilir ve yaklaşık 20 türün enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir. Bu türler arasında en önemlisi *Candida albicans* olmasına karşın diğer *Candida* türlerinin de kandidemiye sebep olduğu vakalar kayıtlara geçmiştir [4, 66].

Candida albicans

C. albicans hayvanların ve insanların mukuslarında yerleşen komensel bir türdür ve fırsatçı patojenite gösterir. İnsanda vajinal enfeksiyon, oral kandidiyazis, pamukçuk, kronik mukokutanöz gibi enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. *C. albicans* kendi morfolojisinde değişiklik yapabilmekte ve maya formundan hif formuna geçiş yapabilmektedir (Resim 2.7). Ayrıca hidrolitik enzimlere sahip olması nedeni ile virülansı en yüksek olan türdür. Bu enzimler patojene kendini epitele entegre etme, doku harabiyeti ile yayılım ve yerleştiği bölgede devamlılık sağlayabilme gibi özellikler kazandırmaktadır.



Resim 2.7. Kandida enfeksiyonlu hastada kalp dokusunda *C. albicans* [20]

C. albicans çeşitli sebeplerle yerleştiği konağın bağışıklık sisteminde bir zayıflık meydana gelmesi durumunda enfeksiyona sebep olurken aynı zamanda hücre duvarında bulunan β -glukanın T-lenfesitlerde sitokin yapımını baskılayarak vücut direncini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu durum enfeksiyonun konak üzerindeki etkilerini artırırken tedavi sürecini de zorlaştırmaktadır [20, 67-69].

Candida krusei

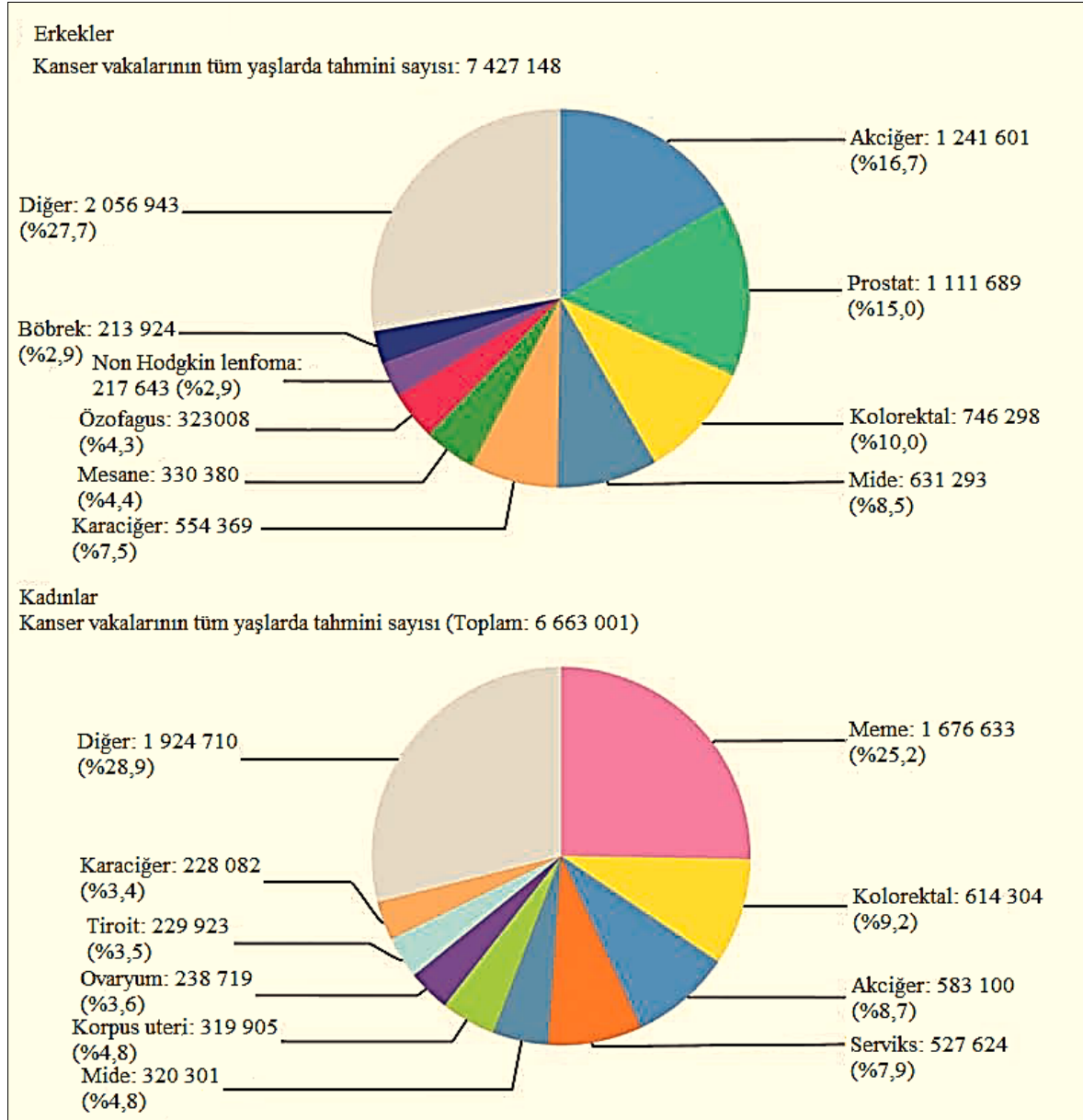
C. krusei'ye ilk defa 1991'de flukonazol profilaksi (antifungal ajan) kullanan nötropenik ve kemik iliği nakledilen hastalarda varlığı bildirilmiştir. Hifli yapıda ve uzun şekilde dizilen blastokonidyumlar meydana getirirler. Virülant oranı *C. albicans*'a göre daha düşüktür. Nötropenik kanser hastalarında daha sık görülmektedir. Ayrıca flukonazole karşı doğal dirence sahiptir [70].

Candida tropicalis

Yalancı hif üzerinde teker teker ya da ufak kümeler şeklinde oluşmuş blastokonidyumlar; ince duvarlı yuvarlak ya da armut şeklinde hücreler gibi görünmektedir. *C. albicans*'tan sonra enfeksiyon meydana getirme oranı en yüksek olan türdür. Kanseri, kemik iliği nakli, parenteral beslenme gibi durumlarda kandidemiye ve invaziv kandidiyazise sebep olmaktadır [71].

2.5. Kanseri

Kanser dünya genelinde ülke, bölge, yaş, cinsiyet, sosyo-ekonomik sınıf ayırt etmeksizin fakat farklı oranlarda insanları etkileyen, kardiyovasküler hastalıklar ve enfeksiyon hastalıklarıyla beraber en sık rastlanan ve en yüksek ölüm oranlarına sahip küresel bir sağlık sorunudur. WHO (Dünya Sağlık Örgütü)'nun 2012 yılındaki raporuna göre 14 milyon yeni kanser vakası ayrıca 8 milyon kanserle bağlantılı ölüm bildirilmiştir. Hazırlanan raporlara göre 2030 yılına kadar kanserin görülme sıklığının normalin üzerinde artış göstereceği ve korkunç boyutlara gelebileceği anlaşılmaktadır. Erkekler içerisinde 2012 yılı içerisinde en yaygın beş kanser türü akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri iken kadınlarda ise meme, kolorektal, akciğer, serviks ve mide kanseridir. Tüm dünyada kanser türlerinin cinsiyetlere göre ve dağılımı Şekil 2.6'da gösterilmiştir [7, 72, 73].



Şekil 2.6. Kanser türlerinin cinsiyetlere göre 2012 yılında tüm dünyadaki dağılımı [72]

2.5.1. Kanser hücreleri

Sağlıklı bir hücre ile kanser hücresi sahip oldukları özellikler bakımından birbirlerinden farklıdırlar. Bunlar;

- Sağlıklı hücrelerde ihtiyaç halinde gerçekleşen hücre bölünmesi, kanser hücrelerinde bölünmelerini sağlayan özgün sinyal mekanizmaları ve sınırsız telomerez aktivitesi sayesinde ihtiyaç olmadan, sınırsız sayıda ve kontrolsüz olarak gerçekleşmektedir.

- Kanser hücreleri anjiyogenez adı verilen ve hücrelerin besin ve oksijen sağlama amacıyla yeni kan damarları oluşturma yeteneğine sahiptir.
- Miyokondriyal oksidatif fosforilasyon sağlıklı hücrelerin enerji ihtiyacını karşılarken, kanser hücreleri aerobik glikoliz aracılığıyla enerji elde ederler ve şeker kullanımları sağlıklı hücrelerden daha yüksektir.
- Kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelerin diğer hücrelerle temas ettiğinde gerçekleşen büyüme inhibisyonu mekanizması devreye girmemektedir.
- Apoptoz mekanizmaları kanser hücrelerinde engellenmiştir.
- Kanser hücreleri, metastaz adı verilen ve kanser hücrelerinin kan dolaşımına katılarak diğer doku ve organlarda kanser gelişmesine sebep olan durumu gerçekleştirmektedir (Şekil 2.4) [74, 75].

2.5.2. Kanser hücrelerinin oluşumu

Kanser kalıtım materyalinin zarar görmesi sonucu hücre döngüsünün işleyişinin bozulması ile karakterize bir hastalıktır [76]. Karsinogenez, sağlam bir vücut hücresinin genetik ve epigenetik değişiklikler sonrası kanser hücresine dönüşüm aşamalarının tümünü tanımlamaktadır. Genetik hasarın bir şekilde başlatılması, tümör süpresör genler ve protoonkogenlerin aktif rol oynadığı, bir dizi genetik ve moleküler değişiklik sonrası, irreversibl aşamaya geçiş ve nihayetinde organizmanın kanser hücreleri ile karşı karşıya kaldığı etiopatogenezinde birçok faktörün olduğu, halen tam olarak aydınlatılamamış aktif bir süreçtir. Çevresel toksik maddeler, iyonize radyasyon, beslenme bozuklukları, immün sistem anomalileri gibi birçok faktör karsinogenezi başlatabilmektedir [77].

Karsinogenez endojen kaynaklı; başlıca bozuk immün fonksiyonlar, kalıtsal bozukluklar ve ekzojen kaynaklı; başlıca UV ışınlar, onkogenik virüsler, oksidatif stres, kimyasal karsinojenler olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir [78]. Karsinogenez ile değişime uğrayan hücrelerde DNA'nın transkripsiyonu, replikasyonu, translokasyonu ya da aktivasyonunda bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler sırasında *protoonkogenlerin* ifadesi bozularak kansere sebep olurlar. Sağlıklı hücrelerin kontrollü hücre bölünmesini sağlayan ve karsinogenez sonucu hücrenin kontrollü bölünme yeteneğini kaybetmesine sebep olan genlere ise *tümör baskılayıcı gen* adı verilir. Aktivasyona geçen

onkogenler ve inaktive olan *tümör baskılayıcı genler* hücrenin; kontrolsüz bölünmesi, invazyon, anjiyogenez ve metastaz yeteneği gibi kötü huylu özellikler kazanmasına yol açmaktadır [79, 80].

Protoonkogenler ve Onkogenler

Hücre içi sinyallerin iletim mekanizmasında görev alan pek çok proteinin sentezinden sorumlu genlere *protoonkogenler* adı verilir. *Protoonkogenlerin* çeşitli sebeplerle mutasyona uğraması sonucu büyüme faktörlerinin normalden daha fazla miktarlarda üretilmesi, transkripsiyon faktörlerinin yüksek miktarlarda sentezlenmesi, hücrenin kontrole tabi olmadan bölünmesi gibi olaylara sebep olmaktadır. Bu durum *protoonkogenlerin onkogenlere* dönüşmesidir ve onkogeneze olarak tanımlanmaktadır [81, 82]. *Onkogenlerin* canlıya ait hücrelerdeki genlerin nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları, DNA yeniden düzenlemeleri ve delesyonlar gibi genetik değişimler sonucu mutasyon geçirmiş formu olduğu bilinmektedir. *Onkogenler* ayrıca *retroviral onkogenlerin* virüs aracılığıyla canlı DNA'sına aktarılmasıyla da oluşmaktadır. İyi bilinen bazı *protoonkogenler* şunlardır;

Ras geni mutasyonu; uyarı iletim sistemlerinde görev alan *Ras geni protoonkogenlerden* biridir. *Protoonkogen* ailesinden hücre yüzeyinde etkili olan en önemli reseptör GF'dir ve GF ile indüklenen mitoz bölünme sırasında *Ras geni* önemlidir.

myc geni; *Ras geninden* sonra en yaygın görülen bir diğer gen de *myc genidir*. *myc geni* ifadesi sağlıklı bir hücrede hücre döngüsünün başlarında en düşük seviyededir. Ancak onkogeneze uğramış *myc geni* sürekli ve yüksek miktarda ifade edilmekte, hücrenin sürekli olarak çoğalmasına sebep olmaktadır [83, 84].

Tümör baskılayıcı genler; kanser oluşumuna sebep olan bir diğer gen ailesidir. Bu genler fonksiyonlarını kaybederek onkogeneze sebep olmaktadır. *Tümör baskılayıcı genlerin* kansere sebep olabilmesi için defektif genin iki kromozom çifti üzerinde de bulunması gerekmektedir. Sağlıklı hücrelerde heterozigot olan bu genlere *resesif kanser genleri* denilmektedir. İlk kaydedilen *tümör baskılayıcı gen RB (retinoblasoma)*'dir. pRB, p53 ya da p21 proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyon sonucu hücre büyümesinin baskılanması engellenir ve tümör oluşur. DNA hasar gördüğünde çekirdekte ilk olarak p53 etkilidir. P21 gen ifadesinin artmasıyla pRB fosforilasyonu gerçekleşmez ve hücre G1

fazında bekletilir. Bu durum DNA’da meydana gelmiş olan hasarın onarımında önemli bir rol oynamaktadır. Hasarların onarılamaması durumunda hücre apoptoza gider. Ancak *p53*’de oluşan mutasyonlar DNA’da onarım yapılmasına engel teşkil eder ve apoptozdan kaçan hücre yoluna kanser hücresi olarak devam eder [85-87].

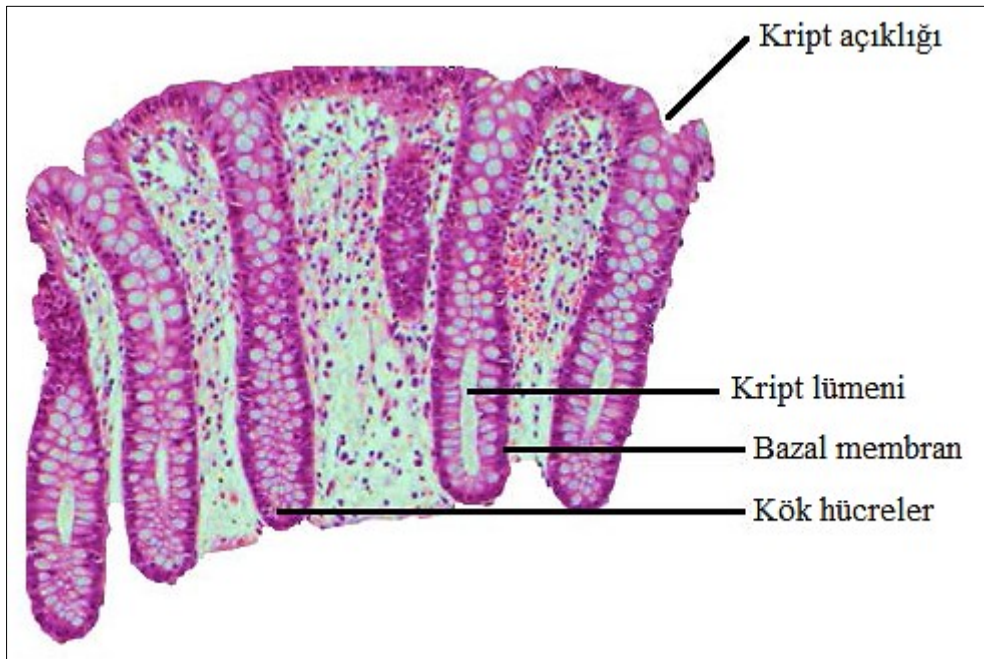
Hücrede DNA hasar gördüğünde hücre planlı olarak bu hasarı tamir etme yoluna gider ve tamir sonrası hücre sağlıklı bir şekilde işlevini yerine getirmeye devam ederse bu tür hasarlara geri dönüşümlü hasar adı verilir. Ancak tamir gerçekleşmez ve hücre fonksiyonlarını yerine getiremez hale gelirse bu tür hasarlara geri dönüşümsüz değişim adı verilir. Geri dönüşümsüz hasarlar sonrası hücre ölümü gerçekleşir ve bu iki şekilde olur; apoptoz ve nekroz. Bcl-2 proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 proteininin işleyiş mekanizmasında görev aldığı apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Hücrenin enzimatik olarak yıkımı ve makromoleküllerin yapısının bozulması sonucu hücrenin ölümü ile meydana gelen morfolojik değişimlere ise nekroz adı verilir ve hücrenin kendi enzimleri aracılığı ile meydana geliyor ise otoliz, çevresel etkenlerden kaynaklanan hidrolitik enzimler aracılığı ile meydana geliyor ise heteroliz olarak adlandırılmaktadır. Apoptoz dolaylı yollardan çevre dokularda nekroza sebep olabilirken nekroz da apoptozun başlatılmasına sebep olabilmektedir [87, 89].

2.5.3. Kanser türleri ve kolorektal kanser

Karsinogenez ile meydana gelmiş olan kanser hücreleri, hücre tipine göre dörde ayrılır. Bunlar; lökosit ve lenfositlerden oluşan lösemi ve lenfoma, kas, kıkırdak ve kemik gibi embriyonik mezodermden meydana gelen sarkoma ve bezler, deri, meme ve ürogenital dokulardan meydana gelen karsinomalardır [76]. Kanser hücrelerine dönüşen sağlıklı hücreler bulundukları dokuda kanser hücrelerinin özellikleri gereğince çoğalarak özefagus, mide, kolorektal, karaciğer, safra kesesi, pankreas, larinks, akciğer, deri (malign melanom), meme, uterus serviksi, uterus korpusu, over, prostat, böbrek, mesane, beyin, tiroit, hodgkin lenfoma, multiple myelom, lösemiler, lenfoid lösemiler, myeloid lösemiler ve diğer kanserlere sebep olmaktadır [89].

Bu tez çalışması kapsamında fosfazen bileşiklerinin sitotoksik aktivitesi dünyada en çok görülen kanser türlerinden biri olan kolorektal kanser hücre hatları üzerinde incelenmiştir.

Kolorektal kanser, yaygın ve ölümcül bir hastalıktır; dünya çapında, en sık tanı konulan kanserlerden dördüncüsü ve kanserle ilişkili ölümlerin en önemli ikinci sebebidir. *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) 2015 verilerine göre, 98.830 yeni kolon kanseri vakası ve yaklaşık 40.000 yeni rektal kanser vakası belirlenmiş olup, kolon ve rektum kanser mortalitesi yaklaşık 50.310 ölüm olarak tahmin edilmektedir [90]. 2015 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre, Türkiye’de kolorektal kanser görülme sıklığı açısından tüm kanserler içerisinde % 13.1 ile kadınlarda ve % 20.7 ile erkeklerde üçüncü Sırada yer almaktadır [91]. Kolon, kelime olarak latince kökenlidir ve kalın bağırsaklara verilen genel bir addır. Kalın bağırsakta kolon ilk 1,5-2 metrelik kısmı, rektum son 15-20 cm’lik kısmı kapsamaktadır [92]. Kolon, kalın bağırsakta elektrolitler ve suyun emilimi, dışkının rektuma iletilmesi olaylarını ve intestinal salgılar, besin kalıntıları, sindirim sıvıları ve dökülen intestinal hücrelerin bakteriler aracılığıyla metabolize edilmesini gerçekleştirmektedir [93]. Kalın bağırsağın epitel tabakası kript adı verilen girintiler içerir ve tek tabakalı silindirik epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Bazal membrana yakın bölgelerde kolonositleri oluşturacak 4 ila 6 adet kök hücre yer almaktadır. Kök hücreler kolonositleri oluşturur ve hızlı aynı zamanda sürekli bir proliferasyonun sonucu olarak kolon girintisinde yer alan hücreler kısa sürelerde yenilenmektedir. Bu üstün proliferasyon yeteneği kolonu yenilenme oranı en yüksek organ yapmaktadır (Resim 2.8) [93, 94].



Şekil 2.7. Aşağıdan yukarıya olgunlaşma süreci içerisindeki kolon epitel hücreleri [94]

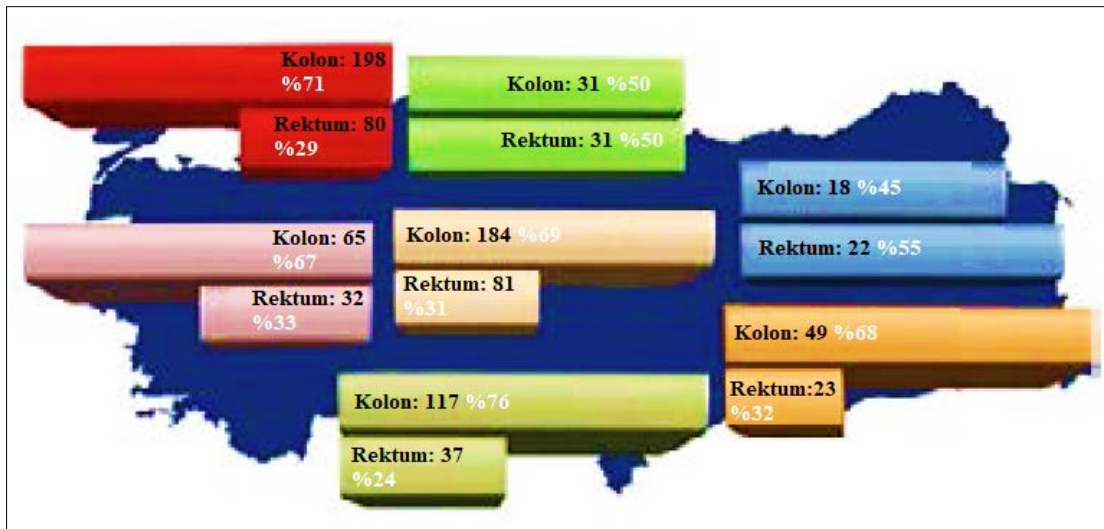
Kolonik kök hücreler EphB2^{high} veya LGR5⁺ olarak adlandırılır. Kolorektal kanser değişime uğramamış kök hücre topluluğunun kontrolsüz olarak çoğalması ile oluşmaktadır (Şekil 2.7) [95].



Şekil 2.8. Kolorektal kanserin oluşum evreleri [96]

Kolorektal kanser polip adı verilen yapılar üzerinde gelişmektedir. Kolorektal kanserin oluşması alkol, kırmızı et ya da işlenmiş et ürünleri, obezite, hayvansal yağlar, hareketsizliğe bağlı abdominal yağlanma gibi durumlardan etkilenmektedir.

Genetik, çevresel ve beslenme gibi etkenlerin varlığında KKH (Kanser Kök Hücresi)'ye dönüşen İKH (İntestinal Kök Hücre) sınırsız proliferasyon ve metastaz yeteneği kazanmakta ve başka dokulara da yerleşebilmektedir. Kolon ve rektum kanserinin ülkemizde bölgelere göre dağılımı Şekil 2.8'de verilmektedir [97, 98].



Şekil 2.9. Kolon ve rektum kanserinin bölgeler göre dağılımı [98]

Çevresel faktörlerin yanı sıra bağışıklık sistemi, sitokinler, konak ve mikrobiyom arasındaki ilişki ve inflamasyon da kolonda kanser oluşumunu tetikleyen faktörler arasında yer almaktadır [93].

Kolorektal kanserin tedavisinde kemoterapi ve bunun yanı sıra karışımlar halinde birbirleriyle uyumlu olarak işlev gösteren sitotoksik ajanlar ve radyasyon kullanılmaktadır. 5-Fluorourasil, Oxaliplatin ve İrinotekan, kolorektal kanserin adjuvan ve palyatif tedavisinde standart olarak kullanılan kemoterapi ajanlarıdır [99]. Fakat tedavide kullanılan bu yöntemler kanserin geç evrelerindeki hastalarda orta derecede başarı gösterdiğinden dolayı kolorektal kanserin tedavisinde yeni yöntemler ve daha etkili sitotoksik ajanlar gerekmektedir [100].

2.5.4. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar

Kanser tedavisi radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi uygulamalardan biri ya da birkaçı aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler arasında kemoterapi en yaygın kullanılanıdır ve kemoterapi, sağlıklı hücelere zarar verme amacı gütmeyen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmak ya da onları öldürmek için antikanser ajanların kullanılmasıdır. Antikanser ajanlar diğer birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların aksine seçici toksisite göstermez ve çeşitli yan etkilere (bulantı, saç dökülmesi, kusma, bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi) sebep olmaktadır. Her kemoterapötik ajanın hücre içinde etki etliği yapı ve etki mekanizması değişiklik göstermektedir. Antikanser ajanlar etki etme şekillerine göre alkileyici ajanlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikler, nitrosurealar, antitübülün ajanlar, hormonlar, monoklonal antikorlar ve moleküler hedefli ajanlar olarak ayrılmaktadır [101-103].

Antineoplastik (sitotoksik) ajanlar

Hardal gazının 2. Dünya savaşı esnasında sitotoksik etkilerinin keşfinden sonra kanser tedavilerinin ana bileşeni olan kemoterapötik ajanlar, halen kanser tedavisinin ana bileşeni konumundadır [104]. Birçok kemoterapötik etkilerini hücre siklusu ve DNA üzerindeki değişiklikler aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Kemoterapi spesifik olmayıp bölünen sağlıklı tüm hücreler üzerine toksik etkileri vardır. Kanser tedavisinde birçok yenilik olmasına rağmen halen tedavi aşamalarında aktif kullanımları süren kemoterapötiklerin etkinliğinin

artırılması ve toksisitesinin azaltılmasına yönelik arayışlar sürmektedir. Moleküler olaylar sonucunda çeşitli makromoleküllerin sentezlenememesi ile hücrenin yapı ve fonksiyonlarında hasar oluşmasına sitotoksikite denir [105]. Kanser ilaçlarının çoğu, etkilerini kanser hücresinin proliferasyon ve bölünme fazlarını etkileyerek gösterirler. Bazı kemoterapi ajanları, bazı spesifik kanser hücrelerine etkiliyken diğer kanser hücrelerinde etkileri sınırlı olabilir. Bu nedenle farklı sitotoksik maddelerin, farklı hücrelerdeki etkilerinin tam olarak aydınlatılması oldukça önemlidir. Her sitotoksik maddenin etki alanı ve mekanizması farklılık göstermektedir [103].

Antimetabolitler; DNA, RNA ve diğer hücre bileşenlerinin sentez zincirinde farklı basamaklarda substrat ya da koenzim olarak rol alan farklı metabolitlerin analogları olan molekulardır. Bu sayede substratı kullanan enzimler üzerinde kendilerine özgü bağlanma noktalarına karşı yarışmalı olarak bağlanıp inhibisyona sebep olurlar. Bazıları da substratla katalitik noktaya karşı yarışa girmeden sadece düzenleyici doğal metabolit ile enzimin allosterik bölgesine karşı yarışmalı olarak bağlanırlar. Diğerleri ise direkt aktif noktalara kovalent olarak bağlanıp ve metabolit sentezini geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedirler [106].

Antitübülin ajanlar; bu etki mekanizmasında ilaçlar tübüline bağlanarak mikrotübüllerin polimerizasyonlarını durdudururlar. Sonra hücre bölünmesinin metafaz fazında ortaya çıkan iğ oluşumunu durdururlar. Buna ek olarak lökosit fagositozu, kemotaksisi ve nöronlardaki aksonal iletim gibi diğer hücresel aktivitelere de etki ederler [107].

Hormonlar; Hormon üreten dokulardan (meme, uterus, prostat bezi) kaynaklı tümörler hormon bağımlı olabilmektedir. Bunlar hormon antagonistleri ile önlenebilirler. Hedef dokuda inhibitör etkiye sahip hormonlar bu dokuların tedavisinde kullanılabilir. Bu hormonlar tek başlarına nadir olarak etki ederler ancak tümörün büyümesini geciktirici etkileri bulunmaktadır [107].

Monoklonal antikorlar; kültürlerde hibridoma hücreleri tarafından üretilirler ve kanser hücresi olarak tanımlanan hedef hücrelerle reaksiyona giren molekül tiplerinden biri olarak bilinmektedirler. Bazı olgularda antikor hedefiyle bağlanıp bağışıklık sistemini aktive eder ve hücrenin lizis ya da T hücreleri tarafından öldürülmesini sağlamaktadır. Bunların dışında

olan başka monoklonal atikolar kanser hücrelerindeki inaktif büyüme faktörüne bağlanarak apoptozu başlatırlar. Geleneksel ilaçlar ile kombine olarak kullanılırlar [107].

Antitümör antibiyotikler; bu grupta çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen antibiyotik niteliğinde sitotoksik ilaçlar bulunmaktadır. Hücre siklusuna uygun olmayan ilaçlar olarak kabul edilmektedirler ve DNA, RNA ve protein sentezine etki ederler. Farklı malign tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadırlar [107].

Klinikte kullanılan bazı kemoterapötikler ve etki mekanizmaları çizelge 2.5’de gösterilmektedir [107, 108].



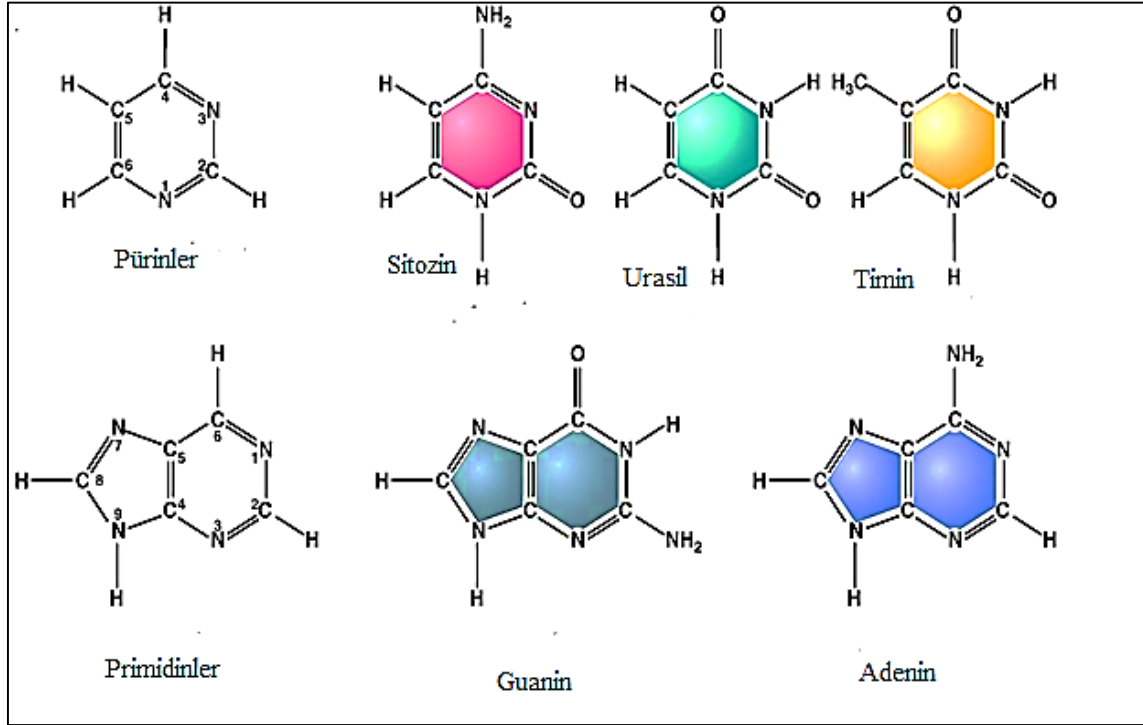
Çizelge 2.5. Klinikte kullanılan bazı kemoterapötikler, etki mekanizmaları ve sınıfları [107, 108]

Sınıf	Etki Mekanizması	Kemoterapötik Ajan
Alkilleyici Ajanlar	Hücre siklusuna özgü değildir, DNA'nın çift sarmalını parçalar, RNA, protein ve DNA sentezini baskılar	Busulfan Chlorambucil Cyclophosphamide Cisplatin Carboplatin
Antimetabolitler	Hücre döngüsünde S fazına etkilidir, DNA sarmalını kırarak veya prematür zinciri sonlandırarak DNA sentezi için gerekli enzimlerin üretimini baskılar	Cytarabine Capesitabine Gemcitabine Floxuridine
Antitümör Antibiyotikler	Hücre döngüsüne özgü değildir, nükleik asit sentezi ve işlevini değiştirerek RNA ve DNA sentezini baskılar	Bleomycin Dactinomycin Plicamycin
Nitrosurealar	Hücre döngüsüne özgü değildir, DNA replikasyonu ve onarımını engeller	Streptozocin Carmustine Lomustine
Antitübülin Ajanlar	Hücre döngüsünde M fazına etki eder, RNA ve protein sentezini baskılar	Vinblastine Topotecan Docetaxel
Hormonlar	Tümöre doğrudan etki eder ya da tümörü beslemekte olan vücut hormonlarını baskılar	Androjen Östrojen Kortikosteroidler
Monoklonal antikörler	Bireyin immün mekanizmasını aktive eder, kanser hücresinde inaktif büyüme faktörüne bağlanarak apoptozu başlatır	
Sınıflandırılmayanlar	Hücre döngüsünde S fazına etki eder	Amsacrine hydroxyurea

2.6. DNA Molekülü ve Yapısı

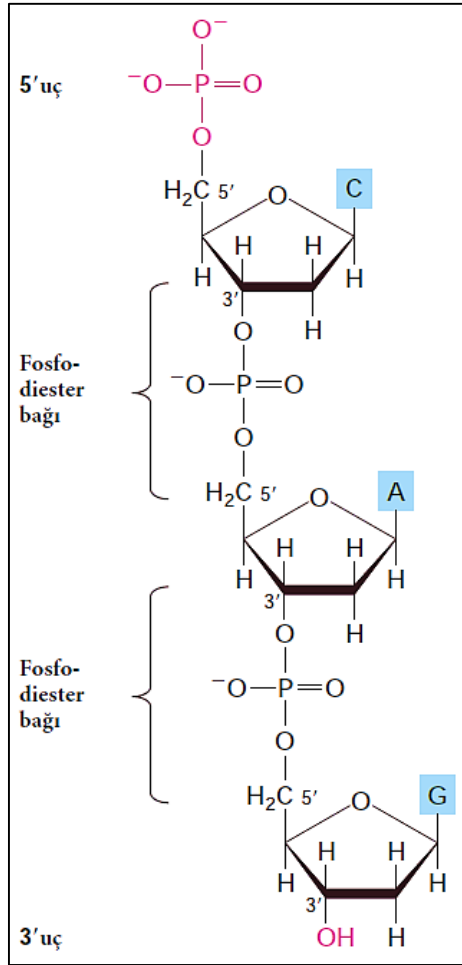
DNA hücre içinde canlıya ait kalıtsal bilgiyi taşıyan, hücrenin canlılığını koruması için gerekli metabolik faaliyetleri yerine getirirken kullanacağı enzim ve proteinlerin sentezlenmesinde görev alan yönetici moleküldür [109]. James Watson ile Francis Crick'in aydınlatığı DNA, yapı olarak nükleotitlerin bir araya gelmesinden oluşan doğrusal yapıda bir polimerdir. Nükleotitler; 5 karbonlu deoksiriboz şekeri, fosfat ve organik bazdan

oluşmaktadır. Bu organik bazlar çift halkalı yapıda olan, pürin olarak adlandırılan adenin (A) ve guanin (G), tek halkalı yapıda olan, pirimidin olarak adlandırılan sitozin (S) ve timin (T) dir (Şekil 2.9) [110, 111].



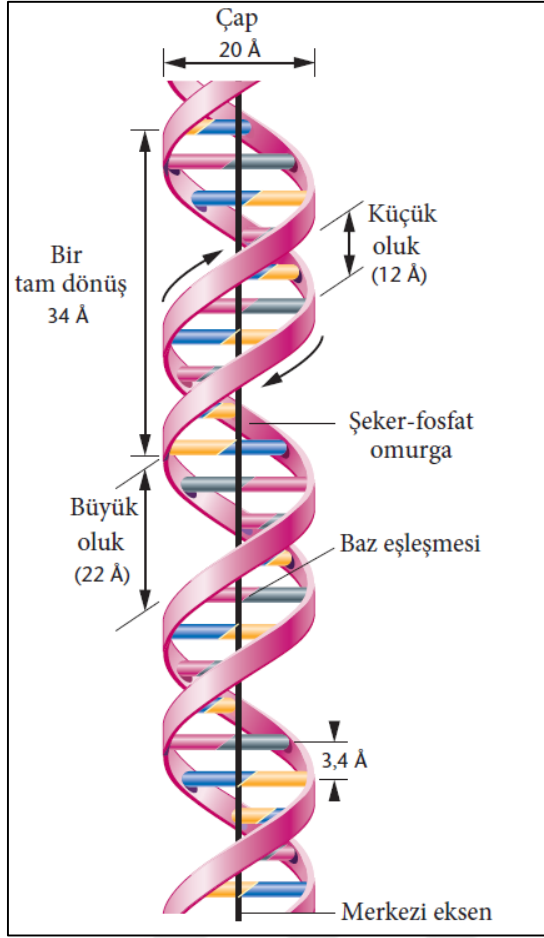
Şekil 2.10. Nükleotitlerde bulunan azotlu bazların yapısı [110]

Nükleik asitler zincir oluştururken nükleotitler arasında bağ kurulur. Bu bağa fosfodiester bağı denilmektedir. Oluşan zincir yapısı belli bir yöne doğru yönelir ve bu yön daima 5' uçta bulunan son şekerin 5' de bulunan karbona bağlı hidroksil grubu ya da fosfat bulunurken 3' uçta bulunan şekerin 3' de bulunan karbona bağlı hidroksil grubu yer almaktadır (Şekil 2.10) [111, 112].



Şekil 2.11. Nükleik asit zincirinin yapısı [113]

1953 yılında James Watson ile Francis Crick DNA'nın çift iplikli, süper sarmal yapıda olduğunu yayınlamış ve DNA çift sarmalında karşılıklı gelen nükleotitlerin bazları arasında hidrojen bağı olduğunu belirtmişlerdir (Şekil 2.11) [111, 112].



Şekil 2.12. Watson-Crick; çift sarmallı DNA yapısı [112]

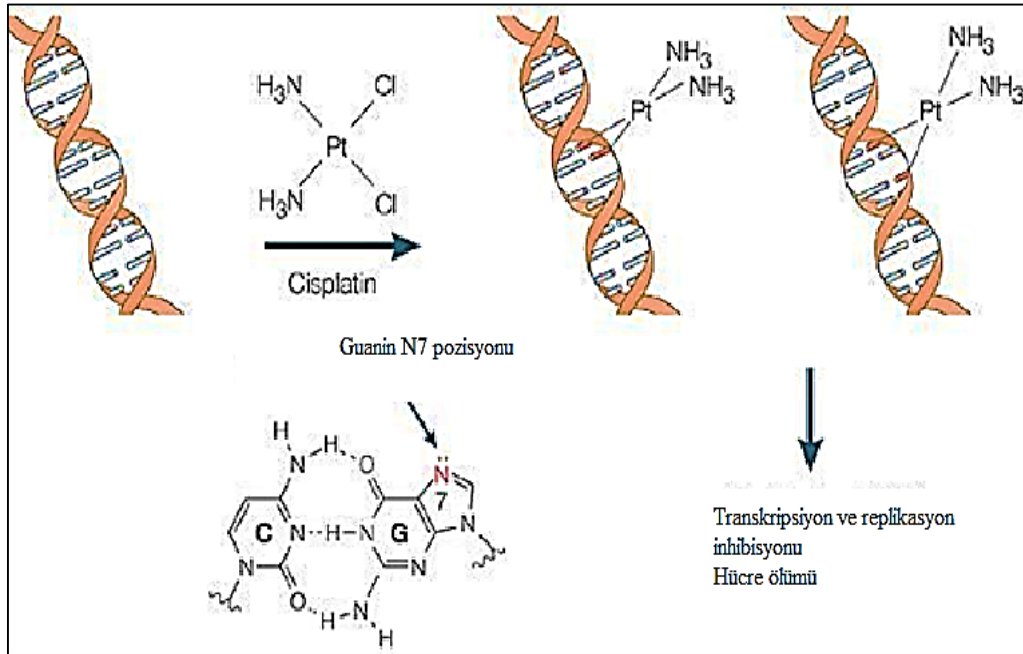
Nükleotitler arasındaki bu hidrojen bağı guaninle sitozin arasında 3, adeninle timin arasında 2 bağ olacak şekilde oluşmaktadır [111, 112].

2.6.1. DNA-ilaç etkileşimlerinin mekanizması

Antikanser ilaçlar tasarlanırken DNA'ya etki edebilen maddeler üzerine yoğunlaşılması izlenebilecek yollar arasındadır. DNA'yı hedef alan antikanser ilaçlar DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu gibi hücre için hayati olaylara etki ederek hücre fonksiyonunu düzenler ve tedavi için daha iyi bir yöntem sunar. Pek çok molekül hücre içinde antikanser özellik göstermekte ve DNA ile etkileşime geçip tümör gelişimini önlemektedir. DNA ile etkileşime geçerek hücre içi fonksiyonlara ve tümör gelişimine etki eden moleküllerin etkileşim mekanizmalarının aydınlatılması ve bu bilgiler göz önünde bulundurularak yeni antikanser ilaçlar tasarlanması kanser tedavisi açısından önemli bir faktördür [114-116].

Kovalent etkileşimler aracılığıyla bağlanma

DNA ile etkileşimin dönüşümsüz olarak gerçekleştiği kovalent etkileşimler hücrede DNA'nın replikasyonu, transkripsiyonu, RNA ve protein sentezi gibi olayların tümünü inhibisyona uğratarak hücreyi ölüme yönlendirmektedir [117, 118]. DNA'ya kovalent bağlanan en iyi antikanser ajan *cis*-platindir. *Cis*-platinin DNA'ya bağlanması Şekil 2.12'de gösterilmektedir [118]. DNA'da bulunan bazların azotları ile *cis*-platin yapısında bulunan klor grupları DNA'nın iplikleri arasında ya da iplik içinde çapraz bağlar yapar ve bu bağlar DNA'da bükülmelere sebep olur [119].



Şekil 2.13. Cis-platin-DNA etkileşimi [118]

Alkilleyici ajanlar

Birçok biyolojik moleküle alkil grubu bağlayan alkilleyici ajanlar reaktif kimyasallardandır. Alkilleyici ajanlar oksidatif stres sonucu oluşan ürünler gibi iç ya da su, yakıtlar, hava, tütün ürünleri ve gıdalar gibi dış kaynaklı olabilmektedir. Normal şartlarda alkilleyici ajanlara maruz kalmak vücutta sitotoksik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sebep olmakta ve sağlıklı hücrelere zarar vermektedir. Ancak bazı alkilleyici ajanların kanser hücrelerine zarar vermelerinden dolayı bu ajanlar kanser tedavisinde kemoterapötik olarak kullanılmaktadır. Kemoterapötik olarak kullanılan en önemli alkilleyiciler etilaminler, platin kompleksleri ve

azot hardallarıdır. Belirtilen alkilleyici ajanlar DNA'ya metil ya da alkil grubu bağlayarak DNA'da yanlış baz eşleşmeleri sağlayarak okuma çerçevesinin kaymasına sebep olmaktadır [107, 120].

Kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla bağlanma

DNA ile etkileşimin geri dönüşümlü olarak gerçekleştiği kovalent olmayan etkileşimlerin hücrede DNA'nın yapısını, DNA-protein ilişkilerini, torsiyon potansiyelini ayrıca mitokondriyal DNA'nın aktivitesini etkilediği bilinmekle birlikte bu değişimleri hangi moleküler ve biyokimyasal yollar üzerinden yaptığı tam olarak bilinmemektedir [119]. Kovalent olmayan etkileşimler üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; elektrostatik etkileşimler, oluk bağlanma ve interkalasyondur.

İnterkalasyon (Araya girme)

İnterkalasyon, DNA'nın uzaması ve torsiyonunda azalmaya sebep olan; baz çiftleri arasına çeşitli moleküllerin girmesi olarak tanımlanmaktadır [121]. DNA'nın çift iplikli sarmal yapısının sürekliliğini bozan interkalasyon; DNA'daki baz dizilimiyle ilişkili olmadan gerçekleşmektedir [119]. Bu tip etkileşimler nükleotit zincirinde kırıklara, DNA ve DNA'ya bağlı RNA sentezini inhibe eder. Ayrıca topoizomerez aktivitesini de inhibe eden interkalatörler bu sayede DNA replikasyonunu engelleyerek hücreleri öldürmektedir [122]. İnterkalatör maddeler yapıları ve interkalasyon yeteneklerinden dolayı DNA ile etkileşimleri sonrası UV ve floresans gibi çeşitli yöntemlerle görüntülenebilmesinden dolayı interkalatör temelli antikanser ajan tasarlamada önemli bir rol oynamaktadır. Bu türde interkalatörlere örnek olarak Etidyum bromür, Akridin ve Fenantridin verilebilir [123].

DNA oluklarına bağlanma

DNA molekülünün sarmal yapısında bulunan oluklara yerleşebilecek kadar küçük yapıda moleküllerin hidrojen bağı ve van der Waals etkileşimi ile bu oluklara bağlanması oluk bağlanma olarak ifade edilmektedir. Bu bağlanma şeklini kullanan moleküllerin çoğu adenin ve timin üzerinden DNA ile etkileşime geçmektedir. Oluk bağlanma konformasyonel açıdan DNA'da çok büyük farklılıklar meydana getirmemektedir ancak bazı molekül yapısı küçük olan oluk bağlayıcılar transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonunu sağlayarak etki etmektedir.

Klinikte antibiyotik ve antikanser olarak kullanılan bazı oluk bağlayıcı ajanlar Netropsin, Distamycin ve Duocarmycin'dir [124, 125].

Elektrostatik etkileşimler aracılığıyla bağlanma

Moleküllerin kendi elektrostatik yapıları sayesinde DNA'ya bağlanması ile gerçekleşen elektrostatik etkileşimler DNA'nın negatif yüklü fosfat-şeker omurgasına dışarıdan pozitif yüklü moleküllerin bağlanması olarak bilinmektedir. Bu bağlanmalar nükleotit spesifik bağlanmalar değildir ve buna örnek olarak pozitif yüklü Rutenyum (II) metal komplekslerinin DNA ile etkileşimi verilebilir [124].

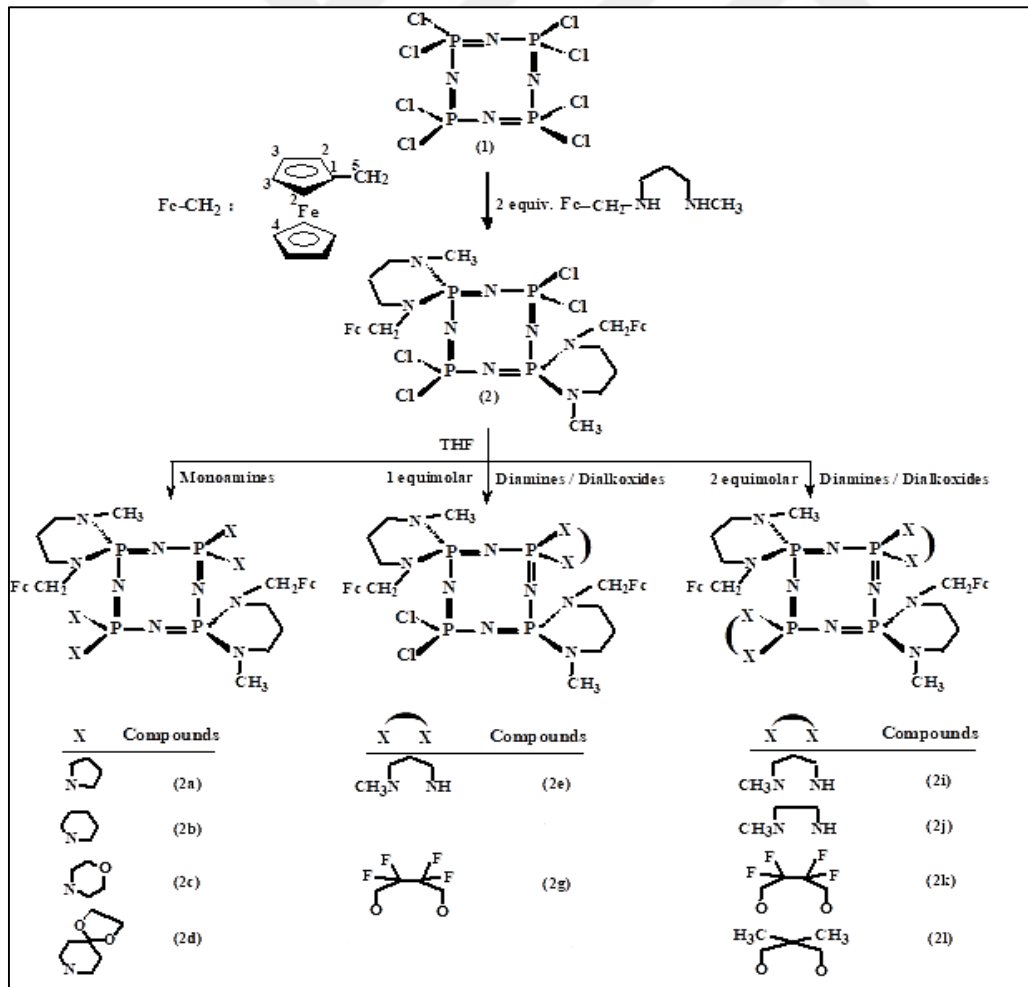


3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Fosfazenler

Araştırma materyali olarak kullanılan orijinal fosfazen bileşikleri Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Laboratuvarlarında Prof. Dr. Zeynel KILIÇ, Arş. Gör. Dr. Aytuğ OKUMUŞ ŞAHİN ve Arş. Gör. Gamze EGEMEN ELMAS tarafından sentezlenmiştir. Çalışmada kullanılan 2, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g, 2i, 2j, 2k, 2l olarak adlandırdığımız 11 farklı fosfazen bileşiğinin moleküler yapısı Şekil 3.1’de verilmiştir. Bileşikler dimethyl sulfoxide (DMSO) içerisinde çözülmüş ve 0,45 µm por çaplı enjektör ucu filtreden geçirilerek steril edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bileşikler

3.1.2. Kullanılan mikroorganizmalar ve gelişme ortamları

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonu içinden temin edilen Gram negatif *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* ve Gram pozitif *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. hirae* bakterileri ve *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* mayaları bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve gelişme koşulları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Mikroorganizmalar çalışmaya alınmadan önce stoklardan alınarak bakteriler mueller hinton agar, mayalar malt extrack agar besiyerinde uygun inkübasyon koşullarında aktifleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve inkübasyon koşulları

Mikroorganizma	Suş No	İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi	Yetiştirme Ortamı
<i>B. cereus</i> (G+)	NRRLB-3711	37 °C	24 saat	MHA
<i>B. subtilis</i> (G+)	ATCC 6633	37 °C	24 saat	MHA
<i>S. aureus</i> (G+)	ATCC 25923	37 °C	24 saat	MHA
<i>E. faecalis</i> (G+)	ATCC 29212	37 °C	24 saat	MHA
<i>E. hirae</i> (G+)	ATCC 9790	37 °C	24 saat	MHA
<i>E. coli</i> (G-)	ATCC 35218	37 °C	24 saat	MHA
<i>P. vulgaris</i> (G-)	RSKK 96029	37 °C	24 saat	MHA
<i>K. pneumoniae</i> (G-)	ATCC 13883	37 °C	24 saat	MHA
<i>S. typhimurium</i> (G-)	ATCC 14028	37 °C	24 saat	MHA
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	30 °C	48 saat	MEA
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	30 °C	48 saat	MEA
<i>C. tropicalis</i>	NRRL Y-12968	30 °C	48 saat	MEA

MHA: Mueller Hinton Agar, MEA: Malt Extract Agar

3.1.3. Kullanılan hücre hatları

DLD-1 kolon kanser hücre hatları Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi; L929 fibroblast hücre hatları ise ŞAP Enstitüsü hücre kültürü bankasından temin edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

Mueller hinton agar (Merck), Mueller hinton broth (Merck), Malt extract agar (Merck), Sabouraud dekstrozo broth (Merck) NaCl (Merck), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma), L-glutamin içermeyen fetal calf serum (FCS)'lu Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), trypsin-EDTA (Biological Industries) ve gelişme besiyeri (Biological Industries), 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H tetrazoliummonosodium salt (WST-1) (Roche), Tris (Merck), asetik asit (Merck), etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Merck), agaroz (Applichem), etidyum bromür (Sigma), etanol (Merck), sükröz (Sigma), bromfenol mavisi (Merck), ksilen siyanol (Merck), Tris-EDTA (TE).

3.1.5. Kullanılan sarf malzemeler, aletler ve cihazlar

Petri kapları (90x15 mm) (LP Italiana), mikropipet uçları (LP Italiana), mikrosantrifüj tüpleri (LP Italiana), şırınga ucu filtre (0,45 µm) (Sartorius), hücre kültür kapları (Corning), erlen, beher, mezür gibi çeşitli cam malzemeler, lateks ve nitril eldiven, drigalski spatülü, halka uçlu öze, pamuk, 10 cc şırınga, 96 kuyucuklu mikrolaka, çeşitli hacimlerde mikropipetler, otoklav (Tomy SX-500), etüv (37 °C) ve etüv (40 °C), kit saklama dolabı (+4 °C) (Sanyo), derin dondurucu (-30 ve -80 °C) (Sanyo), jel görüntüleme cihazı (Biometra), güç kaynağı, pH metre (Mettler Toledo), hassas terazi, steril kabin, soğutmalı santrifüj (Sigma), yatay elektroforez sistemi, vorteks, mikrolaka okuyucu (BIOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2), karbondioksitli etüv (Binder CB150), mikrodalga fırın (Vestel).

3.1.6. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Serum fizyolojik: %0,9 oranında NaCl distile su içerisinde çözülerek hazırlanmış ve otoklav kullanılarak 121 °C'de 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

Bakteri ve mayala için kullanılan besiyerleri: Üretici firmanın önerdiği miktarda distile su içerisinde çözülmüş ve steril edilmiş besiyerleri 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra katı besiyerleri aseptik koşullarda steril petri kaplarına 18-22 ml dökülmüştür, sıvı besiyerleri ise 10 ml'lik cam tüpler içerisine alınmıştır. Katı besiyerleri katılaştıktan, sıvı besiyerleri de soğuduktan sonra sterilite kontrolü amacıyla 1 gece etüvde bekletildikten sonra çalışmada kullanılacağı zamana kadar +4 °C'lik dolapta muhafaza edilmiştir.

Sterilizasyon işlemi: Sterilizasyon, otoklav kullanılarak 121 °C’de 1,5 atm basınçta 15 dakika yapılmaktadır.

Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu(50X): 242 g Tris base, 57,1 ml glacial asetik asit, 100 ml 0,5M EDTA (pH:8), bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

0,5M EDTA (pH 8.0): 186,12 g EDTA bir miktar distile suda çözüldükten sonra 800 ml’ye tamamlanmıştır. pH 8 olana kadar NaOH tableti eklenerek karıştırılmıştır. pH ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

1 M Tris-HCl: 12,11 g Tris tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra konsantre HCl ile pH 8’e ayarlanmıştır. pH ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlanmıştır.

TE: 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.0) ve 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) karıştırılarak son hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlanmıştır.

TAE tamponu: 50X TAE tamponundan 20 ml alınıp distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Agaroz jel: % 1 (w/v) agaroz 1X TAE tamponu içerisine alınarak mikrodalga fırın içerisinde kaynatılarak çözülmüş daha sonra belli bir süre soğutulup jel tabağına dökülmüş ve polimerleşmesi beklenmiştir.

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

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

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

3.2. Metot

3.2.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Mikroorganizmaların konsantrasyonunun McFarland standartına göre ayarlanması

Bakteriler, içinde Muller Hinton Agar bulunan petrilere, stok kültürlerden alınarak tek koloni ekimi yapılmış ve 37°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra gelişen aktif bakteri kültüründen alınarak steril serum fizyolojik bulunan tüplere aktarılmış, yoğunluğu McFarland No: 0,5 (1x10⁸ colony forming unit (cfu)/ml)) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Mayalar, Malt Extract agar bulunan petrilere ekilmiş ve 30°C’de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra gelişen aktif maya kültüründen alınarak steril serum fizyolojik bulunan tüplere aktarılmış, yoğunluğu McFarland No: 0,5 (1x10⁷ cfu/ml) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Kuyu difüzyon yöntemi

Bileşiklerin çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için besiyerlerine McFarland No: 0,5 (1x10⁷ cfu/ml) bulanıklığa ayarlanmış olan mikroorganizma çözeltisinden 100 µl alınıp besiyeri (bakteriler için Muller Hinton agar, mayalar için Malt Extract agar) yüzeyine bırakılarak drigalski spatülü ile yayma işlemi yapılmıştır. Bakteri ya da maya ekimi yapılmış besiyerlerine steril koşullar altında delgeç yardımı ile 6 mm çapında kuyular açılmıştır. Her kuyuya daha önceden hazırlanmış ve filtreden geçirilerek steril edilmiş 4000 µM konsantrasyondaki bileşiklerden 50 µl eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan bakteri ekimi yapılmış petrilere 37°C’lik etüvde 24 saat, maya ekimi yapılmış petrilere ise 30°C’lik etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak bakteriler için ampisilin ve kloramfenikol, mayalar için ketokanazol bileşiklerimizle aynı konsantrasyonda mikroorganizmalara uygulanmış ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

Mikrodilüsyon yöntemi

Fosfazen bileşiklerinin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sıvı besiyeri(bakteriler için Mueller Hinton broth, mayalar için Sabouraud Dekstroz broth) 96 kuyulu mikrolakaya her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Konsantrasyonu 4000 µM olan bileşikten 100 µl alınıp ilk kuyucuğa eklenmiş, ilk kuyudan aynı miktar alınıp sonraki kuyucuğa geçilmiştir. Diğer kuyucuklar ½ oranında dilüe olacak şekilde bileşiklerin 2000-15.63 µM arasında değişen farklı konsantrasyonları elde edilmiştir. McFarland No: 0,5 (1x10⁸ colony forming unit (cfu)/ml)) olarak ayarlanmış olan mikroorganizmalar serum fizyolojik içerisinde 1\10 oranında seyreltilmiştir ve her bir kuyuya 5 µl eklenmiştir. Negatif kontrol olarak besiyeri, pozitif kontrol olarak besiyeri ile mikroorganizma kullanılmıştır. Bakteri olan mikrolakalar 24 saat 37 °C’de, maya olan plakalar 48 saat 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bileşiklerin MİK, MBK ve MFK değerlerinin belirlenmesi için inkübasyon sonrası mikrolakalar içerisindeki her bir kuyudan 10 µl örnek alınıp bakteriler için Mueller Hinton agar, mayalar için Malt Extract agar besiyerine ekim yapılmış ve uygun inkübasyon süreleri sonrası mikroorganizmaların farklı konsantrasyonlardaki üremeleri kontrol edilmiştir. Mikroorganizma üremesinin olmadığı en düşük konsantrasyon bakteriler için minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK), mayalar için minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değeri olarak değerlendirilmiştir. Inkübasyon sonunda mikroorganizmaların üremesinin yavaşladığı ilk konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. Sitotoksik aktivite

Hücre kültürlerinin hazırlanması

Sağlıklı L929 fibroblast ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri içerisinde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) besiyerleri ile % 10 L-glutamin, %10 FCS (fetal calf serum), ve %1 antibiyotik bulunan besiyeri içerisinde, %5 CO₂’lik CO₂ etüvünde 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin ortamdaki toplanabilmesi için besiyeri flasktan uzaklaştırılmış ve hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilmiştir. Daha sonra hücreler 15 mL’lik ependorf tüplerine alınıp 2.500 rpm’de 2 dk

santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler çalışmada kullanılmaya uygun hale gelmiştir. L929 fibroblast ve DLD-1 kanser hücreleri çalışılmak üzere 48 kuyulu microplaka içine alınmıştır. Daha sonra siklotetrafosfazen bileşikler %10 DMSO içeren besiyeri içerisinde çözülüp konsantrasyonları 12.5-200 g/mL arasında olacak şekilde sağlıklı hücreler ve kanser hücrelerine uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak %10 DMSO içeren besiyeri, pozitif kontrol olarak doksorubisin kullanılmıştır. Besiyeri de eklenen microplaka 37 °C’de CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

WST-1 yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi

Bileşikler ile muamele edilen hücre hatlarının 24 saat inkübasyonun ardından hücre canlılığı üretici firmanın (Roche) söylemiş olduğu kullanım talimatları doğrultusunda uygulanan WST-1 (suda çözünür tetrazolyum tuzu) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu yöntemin temeli, canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enziminin tetrazolyum tuzunu formazana dönüştürmesi ve bu dönüşüm sonucunda oluşan renk değişiminin belirlenmesine dayanmaktadır. Bileşikler ve doksorubisin ile muamele edilmiş hücrelerin bulunduğu kuyucukların her birine 10 µl WST-1 çözeltisi eklenmiş ve 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında absorbans değerleri 420-480 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Negatif kontrol grubu ile kıyaslama yapılarak hücre canlılığı % cinsinden belirlenmiştir.

3.2.3. Madde-DNA etkileşimi

2, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g, 2i, 2j, 2k, 2l siklotetrafosfazen bileşiklerinin plazmid DNA üzerinde etkisi agaroz jel elektroforez yöntemi ile araştırılmıştır. Bileşiklerin stok çözeltileri dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanmış ve 1 saat içerisinde kullanılmıştır. 2000, 1000, 500 ve 250 µM konsantrasyonlardaki bileşikler plazmid DNA ile 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda ilaç-DNA karışımı agaroz jele yüklenmiş ve oluşan bantlar incelenmiştir. Kontrol olarak bileşik ile etkileşime konulmamış plazmid DNA’sı jeldeki birinci kuyuya yüklenmiştir.

Agaroz jel elektrofezi

% 1 (w/v) agaroz, TAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra jel tabağına dökülmüştür. Jel polimerleştikten sonra inkübasyon sonrası ilaç-DNA karışımı ile yükleme tamponu karıştırılarak jelde oluşturulan kuyulara yüklenmiş ve TAE tamponu içinde 60 V uygulanarak 3 saat süre ile doğru akımda yürütülmüştür. Elektroforez sonunda jel etidyum bromür ile boyanmıştır. Daha sonra jellerin görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra) jel görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında yapılmış ve görüntüler bilgisayar ortamında JPEG formatında kaydedilmiştir.

*Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile Restriksiyon Endonükleaz reaksiyonu

*Bam*HI enzimi DNA üzerindeki 5'-G/GATCC-3' bölgesini tanıırken *Hind*III enzimi 5'-A/AGCTT-3' bölgesini tanımaktadır. Bileşiklerin, DNA üzerindeki bu bölgelere bağlanma durumunu anlamak için DNA ile bileşikler 24 saat inkübe edilmiş daha sonra da *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile muamele edilip 2 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Enzimle muamele edilmiş ilaç--DNA karışımı TAE tamponu içinde 70 V'de 1 saat boyunca % 1 agaroz jel içerisinde yürütülüş ve elektroforez işlemi sonrasında jel etidyum bromür ile boyanmış, jellerin görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra) jel görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında yapılmış ve görüntüler bilgisayar ortamında JPEG formatında kaydedilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Fosfazen Bileşiklerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri

2, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g, 2i, 2j, 2k, 2l bileşikleri DMSO çözücüsünde çözülerek 4000 µM stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu bileşikler ve pozitif kontrol olarak kullanılan antibakteriyel (ampisilin, kloramfenikol) ve antifungal (ketokanazol) ilaçları için kuyu difüzyon yöntemi kullanılmış ve 3 tekrarlı olarak antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonunda bakterilere ve mayalara karşı oluşan inhibisyon zon çapları mm cinsinden ölçülmüş Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen verilere göre 2 bileşiği *E. coli* ATCC 35218 ve *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterilerine karşı sırasıyla 13,0±0,0 ve 15,3±0,5 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 2a bileşiği *E. coli* ATCC 35218 bakterisi ve *C. krusei* ATCC 6258 mayasına karşı sırasıyla 12,3±0,9 ve 14,0±1,0 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 2b bileşiği *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterisine ve *C. tropicalis* NRRL Y-12968 mayasına karşı sırasıyla 12,7±1,3 ve 12,3±0,5 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 2c bileşiği *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterisi ve *C. krusei* ATCC 6258 mayasına karşı sırasıyla 13,3±0,5 ve 15,7±0,5 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 2d bileşiği *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterisine karşı 18,0±0,8 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 2e bileşiği *B. cereus* NRRL B-3711, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. vulgaris* RSKK 96029, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *S. typhimurium* ATCC 14028, *E. hirae* ATCC 9790 bakterilerine ve *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258 mayalarına karşı sırasıyla 21,3±1,3, 22,0±1,4, 22,3±0,5, 14,3±0,5, 12,3±0,5, 15,7±1,3, 15,7±0,5, 13,3±0,5, 12,0±0,0, 14,5±0,5 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 2g bileşiği *E. coli* ATCC 35218, *P. vulgaris* RSKK 96029 bakterilerine ve *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258 mayalarına karşı sırasıyla 13,7±0,5, 14,3±1,3, 15,0±0,0, 14,3±0,5 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 2i bileşiği *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus* NRRL B-3711, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *P. vulgaris* RSKK 96029, *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterilerine ve *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* NRRL Y-12968 mayalarına karşı sırasıyla 21,0±0,8, 14,3±0,5, 18,0±0,8, 15,0±0,0, 13,7±0,5, 12,7±1,7, 14,3±0,9, 13,3±0,5 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 2j bileşiği *E. coli* ATCC 35218, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. vulgaris* RSKK 96029, *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterilerine ve *C. krusei* ATCC 6258 mayasına karşı sırasıyla 14,0±0,0, 12,7±0,5, 15,3±1,3, 16,0±0,8, 14,0±0,8 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. 2k bileşiği *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus* NRRL B-3711, *S. typhimurium*

ATCC 14028 bakterilerine ve *C. krusei* ATCC 6258 mayasına karşı sırasıyla $13,7\pm0,5$, $12,7\pm0,5$, $14,3\pm1,3$, $13,7\pm0,5$ mm'lik zon çapı oluşturmuştur. 2l bileşiği *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus* NRRL B-3711, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. vulgaris* RSKK 96029, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterileri ve *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* NRRL Y-12968 mayalarına karşı sırasıyla $12,3\pm0,5$, $15,7\pm0,5$, $16,7\pm0,5$, $15,3\pm0,5$, $12,3\pm0,5$, $12,0\pm0,8$, $14,7\pm0,5$, $14,0\pm0,0$, $16,0\pm0,0$, $14,3\pm0,5$, $13,5\pm0,5$ mm'lik zon çapı oluşturmuştur.

2 bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 bakterisine karşı olan etkinliği ampisilin ve kloramfenikolden yüksek çıkmıştır. 2a bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 bakterisine karşı olan etkinliği ampisilin ve kloramfenikolden yüksek çıkmıştır. 2b bileşiğinin *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterisine karşı olan etkinliği ampisilinden yüksek çıkmıştır. 2c bileşiğinin *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterisine karşı olan etkinliği ampisilinden yüksek çıkmıştır. 2d bileşiğinin bu etkinliği ampisilinin etkinliğiyle yaklaşık olarak aynıdır. 2e bileşiğinin *B. cereus* NRRL B-3711, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. vulgaris* RSKK 96029, *E. hirae* ATCC 9790 bakterilerine karşı olan etkinliği ampisilin ve kloramfenikolden yüksek çıkmıştır. *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı olan etkinliği kloramfenikolden, *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterisine karşı olan etkinliği ise ampisilinden yüksek çıkmıştır. Ayrıca *C. albicans* ATCC 10231 mayasına karşı olan etkinliği ketokanozolden yüksek çıkmıştır. 2g bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 ve *P. vulgaris* RSKK 96029 bakterilerine karşı olan etkinliği ampisilin ve kloramfenikolden, *C. albicans* ATCC 10231 mayasına karşı olan etkinliği ise ketokanozolden yüksek çıkmıştır. 2i bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus* NRRL B-3711, *P. vulgaris* RSKK 96029 bakterilerine karşı olan etkinliği ampisilin ve kloramfenikolden, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterilerine karşı olan etkinliği ise ampisilinden yüksek çıkmıştır. 2j bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 ve *P. vulgaris* RSKK 96029 bakterilerine karşı olan etkinliği ampisilin ve kloramfenikolden yüksek çıkmıştır. 2k bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus* NRRL B-3711 bakterilerine karşı olan etkinliği ampisilin ve kloramfenikolden yüksek çıkmıştır. 2l bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus* NRRL B-3711, *P. vulgaris* RSKK 96029 bakterilerine karşı olan etkinliği ampisilin ve kloramfenikolden, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterilerine karşı olan etkinliği ise ampisilinden yüksek çıkmıştır. *C. albicans* ATCC 10231 mayasına karşı olan etkinliği ise ketokanozolden yüksek çıkmıştır.

Çizelge 4.1. 2, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g, 2i, 2j, 2k, 2l bileşiklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları (inhibisyon zonu mm olarak ifade edilmektedir)

Mikroorganizmalar		Bileşikler											Pozitif kontrol		
	2	2a	2b	2c	2d	2e	2g	2i	2j	2k	2l	Amp	C	Keto	
<i>E. coli</i> ATCC 35218	13,0 ±0,0	12,3 ±0,9	-	-	-	-	13,7 ±0,5	21,0 ±0,8	14,0 ±0,0	13,7 ±0,5	12,3 ±0,5	-	8,0 ±0,0	NS	
	-	-	-	-	-	21,3 ±1,3	-	14,3 ±0,5	-	12,7 ±0,5	15,7 ±0,5	-	-	NS	
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711															
	-	-	-	-	-	22,0 ±1,4	-	18,0 ±0,8	12,7 ±0,5	-	16,7 ±0,5	14,3 ±1,0	20,7 ±1,2	NS	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	22,3 ±0,5	-	15,0 ±0,0	-	-	15,3 ±0,5	31,7 ±1,2	17,3 ±0,6	NS	
	-	-	-	-	-	14,3 ±0,5	-	-	-	-	12,3 ±0,5	27,0 ±0,1	20,0 ±0,1	NS	
<i>P. vulgaris</i> RSKK 96029	-	-	-	-	-	12,3 ±0,5	14,3 ±1,3	13,7 ±0,5	15,3 ±1,3	-	12,0 ±0,8	-	-	NS	
	-	-	12,7 ±1,3	13,3 ±0,5	-	15,7 ±1,3	-	12,7 ±1,7	-	-	14,7 ±0,5	-	23,7 ±0,6	NS	
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	15,3 ±0,5	-	-	-	18,0 ±0,8	15,7 ±0,5	-	-	16,0 ±0,8	14,3 ±1,3	14,0 ±0,0	19,0 ±1,0	38,0 ±1,0	NS	
	-	-	-	-	-	13,3 ±0,5	-	-	-	-	-	-	-	NS	
<i>E. hirae</i> ATCC 9790															
	-	-	-	-	-	12,0 ±0,0	15,0 ±0,0	-	-	-	16,0 ±0,0	NS	NS	11,0 ±1,0	
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	-	14,0 ±1,0	-	15,7 ±0,5	-	14,5 ±0,5	14,3 ±0,5	14,3 ±0,9	14,0 ±0,8	13,7 ±0,5	14,3 ±0,5	NS	NS	20,3 ±0,6	
	-	-	12,3 ±0,5	-	-	-	-	13,3 ±0,5	-	-	13,5 ±0,5	NS	NS	15,7 ±1,5	
<i>C. tropicalis</i> NRRL Y-12968															

Amp: Ampisilin, C: Kloramfenikol, Keto: Ketokonazol, NS: Not Studied (Çalışılmamış)

4.1.1. Fosfazen bileşiklerinin MİK, MBK ve MFK değerleri

2, 2c, 2d, 2e, 2i, 2j, 2l bileşikleri ve pozitif kontrol olarak kullanılan antibakteriyel (ampisilin, kloramfenikol) ve antifungal (ketokanazol) ilaçları için mikrodilüsyon tekniği ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK), Minimum Fungisidal Konsantrasyon (MFK) değerleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda gözlemlenen MİK değerleri Çizelge 4.2’de, MBK ve MFK değerleri Çizelge 4.3’te belirtilmiştir. Bileşiklerin MİK değerlerinin <15,63-2000 µM arasında değiştiği tespit edilmiştir. 2 bileşiğinin *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterisine karşı gösterdiği MİK değerinin 250 µM olduğu belirlenmiştir. 2c bileşiğinin *C. krusei* ATCC 6258 mayasına karşı gösterdiği MİK değerinin 125 µM olduğu belirlenmiştir. 2d bileşiğinin *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterisine karşı gösterdiği MİK değerinin 500 µM olduğu belirlenmiştir. 2e bileşiğinin MİK değerinin *B. cereus* NRRL B-3711 ve *B. subtilis* ATCC 6633 bakterilerine karşı 2000 µM olduğu *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 13883 ve *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterilerine karşı 250 µM olduğu belirlenmiştir. 2i bileşiğinin MİK değerinin *B. subtilis* ATCC 6633 bakterisine karşı 2000 µM, *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı 250 µM olduğu belirlenmiştir. 2j bileşiğinin MİK değerinin *P. vulgaris* RSKK 96029 ve *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterilerine karşı 250 µM olduğu belirlenmiştir. 2l bileşiğinin MİK değerinin *B. cereus* NRRL B-3711 bakterisine karşı 1000 µM, *B. subtilis* ATCC 6633 bakterisine karşı 2000 µM, *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı 125 µM ve *C. albicans* ATCC 10231 mayasına karşı <15,63 µM olduğu belirlenmiştir.

2e bileşiğinin *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterisine karşı gösterdiği etki ampisilin ve kloramfenikolden daha düşük konsantrasyonda çıkmıştır. 2l bileşiğinin *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı gösterdiği etki kloramfenikolden, *C. albicans* ATCC 10231 mayasına karşı gösterdiği etki ketokanozolden daha düşük konsantrasyonda çıkmıştır.

Bileşiklerin MBK ve MFC değerlerinin 15,63->2000 µM arasında değiştiği tespit edilmiştir. 2 bileşiğinin *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterisine karşı gösterdiği MBK değerinin 500 µM olduğu belirlenmiştir. 2c bileşiğinin *C. krusei* ATCC 6258 mayasına karşı gösterdiği MFK değerinin 250 µM olduğu belirlenmiştir. 2d bileşiğinin *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterisine karşı gösterdiği MBK değerinin 1000 µM olduğu belirlenmiştir. 2e bileşiğinin MBK değerinin *B. cereus* NRRL B-3711 ve *B. subtilis* ATCC 6633 bakterilerine karşı >2000 µM olduğu *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 13883 ve *S. typhimurium* ATCC

14028 bakterilerine karşı 500 µM olduğu belirlenmiştir. 2i bileşiğinin MBK değerinin *B. subtilis* ATCC 6633 bakterisine karşı >2000 µM, *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı 500 µM olduğu belirlenmiştir. 2j bileşiğinin MBK değerinin *P. vulgaris* RSKK 96029 ve *S. typhimurium* ATCC 14028 bakterilerine karşı 500 µM olduğu belirlenmiştir. 2l bileşiğinin MBK değerinin *B. cereus* NRRL B-3711 bakterisine karşı 2000 µM, *B. subtilis* ATCC 6633 bakterisine karşı >2000 µM, *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı 125 µM ve MFK değerinin *C. albicans* ATCC 10231 mayasına karşı 15,63 µM olduğu belirlenmiştir.

2e bileşiğinin *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterisine karşı gösterdiği etki ampisilin ve kloramfenikolden daha düşük konsantrasyonda çıkmıştır. 2l bileşiğinin *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı gösterdiği etki kloramfenikolden, *C. albicans* ATCC 10231 mayasına karşı gösterdiği etki ketokanozolden daha düşük konsantrasyonda çıkmıştır.

Çizelge 4.2. 2, 2c, 2d, 2e, 2i, 2j, 2l bileşiklerinin test suşlarına karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK değerleri µM olarak ifade edilmektedir)

Bileşikler /Pozitif kontrol	Mikroorganizmalar							
	<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. vulgaris</i> RSKK 96029	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
2						250		
2c								125
2d						500		
2e	2000	2000	250		250	250		
2i		2000	250					
2j				250		250		
2l	1000	2000	125				<15,63	
Amp	156	<19,5	<19,5	-	1250	<19,5	NS	NS
C	156	78	156	-	625	156	NS	NS
Keto	NS	NS	NS	NS	NS	NS	312,5	<19,5

Amp: Ampisilin, C: Kloramfenikol, Keto: Ketokonazol, NS: (Çalışılmamış)

Çizelge 4.3. 2, 2c, 2d, 2e, 2i, 2j, 2l bileşiklerinin test suşlarına karşı minimum bakterisidal ve minimum fungisidal konsantrasyonu (MBK ve MFK değerleri μM olarak ifade edilmektedir)

Bileşikler /Pozitif kontrol	Mikroorganizmalar							
	<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. vulgaris</i> RSKK 96029	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
2						500		
2c								250
2d						1000		
2e	>2000	>2000	500		500	500		
2i		>2000	500					
2j				500		500		
2l	2000	>2000	125				15,63	
Amp	156	<19,5	<19,5	-	1250	<19,5	NS	NS
C	156	78	156	-	625	156	NS	NS
Keto	NS	NS	NS	NS	NS	NS	312,5	<19,5

Amp: Ampisilin, C: Kloramfenikol, Keto: Ketokonazol, NS: (Çalışılmamış)

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde bileşiklerin mikroorganizmaları inhibe ettiği ve tamamen öldürdüğü konsantrasyonlar arasında çok büyük farklılıklar görülmemektedir.

4.2. Fosfazen Bileşiklerinin Sitotoksik Aktiviteleri

2, 2b, 2e, 2i, 2j, 2l bileşiklerinin ve pozitif kontrol olarak doksorubisinin 200-12,5 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişen konsantrasyonları L929 fibroblast ve DLD-1 kolon kanser hücre hatları üzerinde göstermiş olduğu sitotoksik aktivite WST-1 yöntemi ile incelenmiştir. Bileşiklerin L929 fibroblast hücrelerine karşı gösterdiği sitotoksik etkileri Şekil 4.1’de; DLD-1 kolon kanser hücrelerine karşı gösterdiği sitotoksik etkileri Şekil 4.2’de gösterilmektedir.

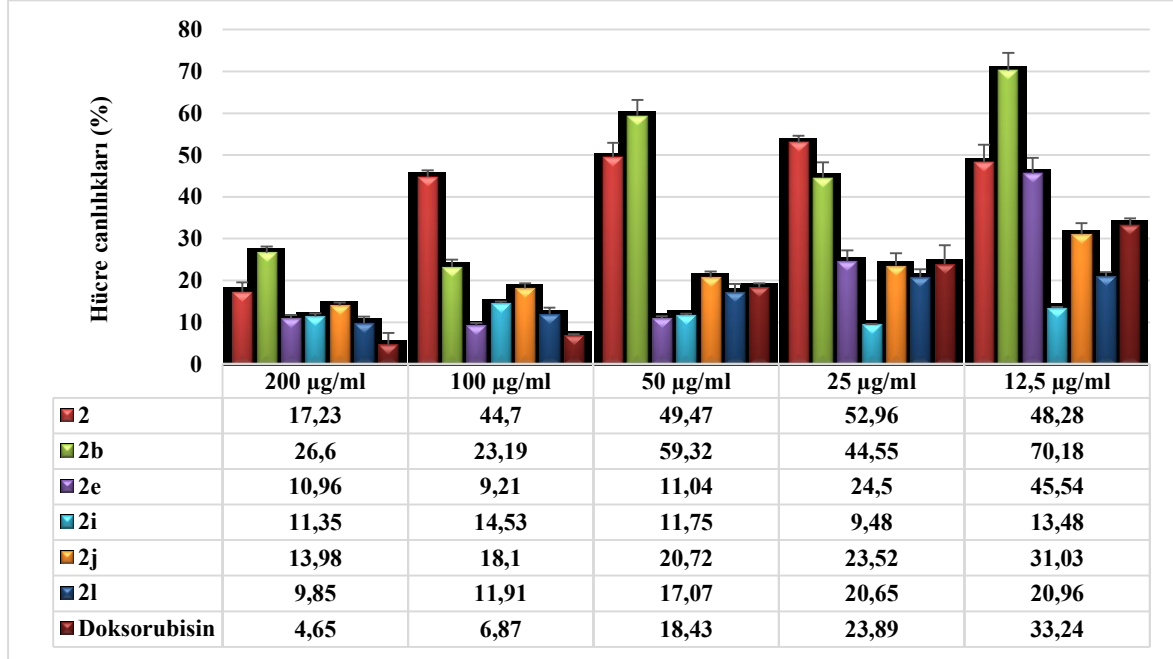
2 bileşiğinin 200-12,5 $\mu\text{g/ml}$ aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında L929 fibroblast hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 17,23; 44,70; 49,47; 52,96 ve 48,28 olarak

hesaplanmıştır. 2b bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında L929 fibroblast hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 26,60; 23,19; 59,32; 44,55; 70,18 olarak hesaplanmıştır. 2e bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında L929 fibroblast hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 10,96; 9,21; 11,04; 24,50; 45,54 olarak hesaplanmıştır. 2i bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında L929 fibroblast hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 11,35; 14,53; 11,75; 9,48; 13,48 ve DLD-1 kolon kanser hücrelerinin % canlılıkları ise sırasıyla 14,20; 15,71; 16,72; 11,68; 16,05'dir. 2j bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında L929 fibroblast hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 13,98; 18,10; 20,72; 23,52; 31,03 olarak hesaplanmıştır. 2l bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında L929 fibroblast hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 9,85; 11,91; 17,07; 20,65; 20,96 olarak hesaplanmıştır.

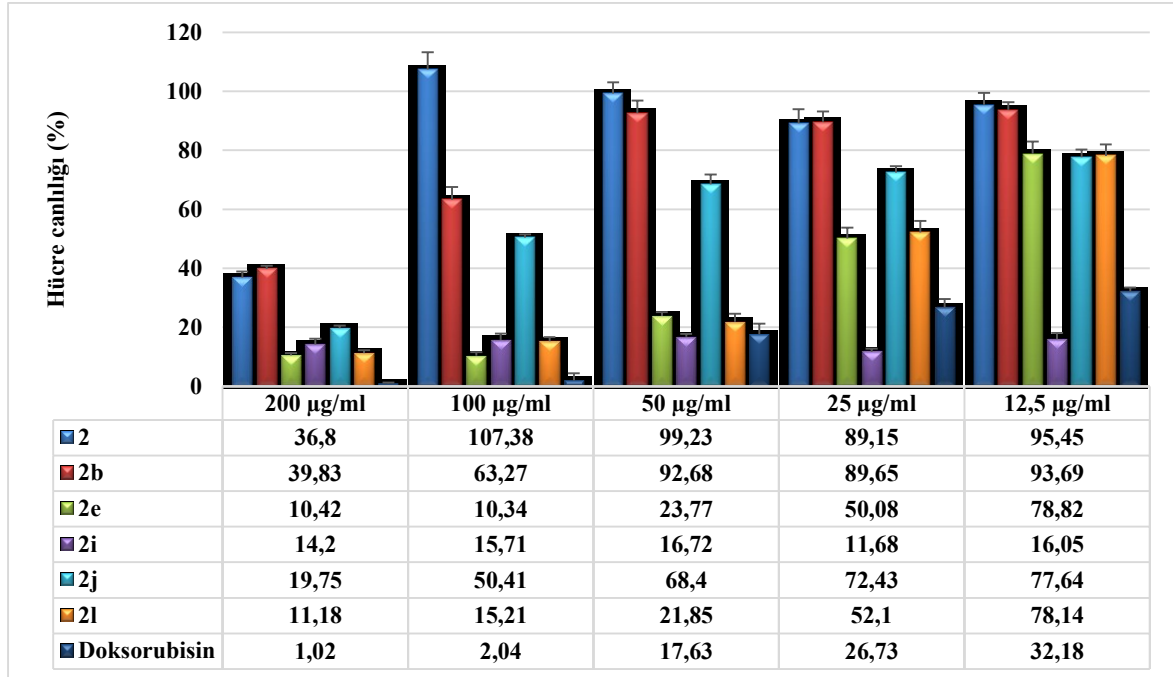
2 bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında DLD-1 kolon kanser hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 36,80; 107,38; 99,23; 89,15; 95,45 olarak hesaplanmıştır. 2b bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında DLD-1 kolon kanser hücrelerinin % canlılıkları sırasıyla 39,83; 63,27; 92,68; 89,65; 93,69 olarak hesaplanmıştır. 2e bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında DLD-1 kolon kanser hücrelerinin % canlılıkları ise sırasıyla 10,42; 10,34; 23,77; 50,08; 78,82 olarak hesaplanmıştır. 2j bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında DLD-1 kolon kanser hücrelerinin % canlılıkları ise sırasıyla 19,75; 50,41; 68,40; 72,43; 77,64 olarak hesaplanmıştır. 2l bileşiğinin 200-12,5 µg/ml aralığında değişen 5 farklı konsantrasyonu karşısında DLD-1 kolon kanser hücrelerinin % canlılıkları ise sırasıyla 11,18; 15,21; 21,85; 52,10; 78,14 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen verilere göre 2i dışındaki bileşiklerin konsantrasyonları arttıkça gösterdikleri sitotoksik etki artmıştır. 2i bileşiğinin sitotoksik etkisi konsantrasyonuyla ters orantılı olarak gerçekleşmiştir. 2, 2b, 2e, 2j ve 2l bileşiklerinin L929 fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkisinin DLD-1 kolon kanser hücrelerine karşı olan etkisinden yüksek olduğu belirlenmiştir. 2, 2b, 2e, 2j ve 2l bileşiklerinin L929 fibroblast ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerine karşı olan etkinliğinin antikanser ajan olan doksorubisinden düşük olduğu belirlenmiştir. 2i bileşiğinin L929 fibroblast hücrelerine karşı olan sitotoksik etkisinin

doksorubisinden daha düşük, DLD-1 kolon kanseri hücrelerine karşı olan sitotoksik etkisinin doksorubisinden yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.1. 2, 2b, 2e, 2i, 2j, 2l bileşiklerine maruz bırakılan L929 fibroblast hücrelerinin % canlılıkları



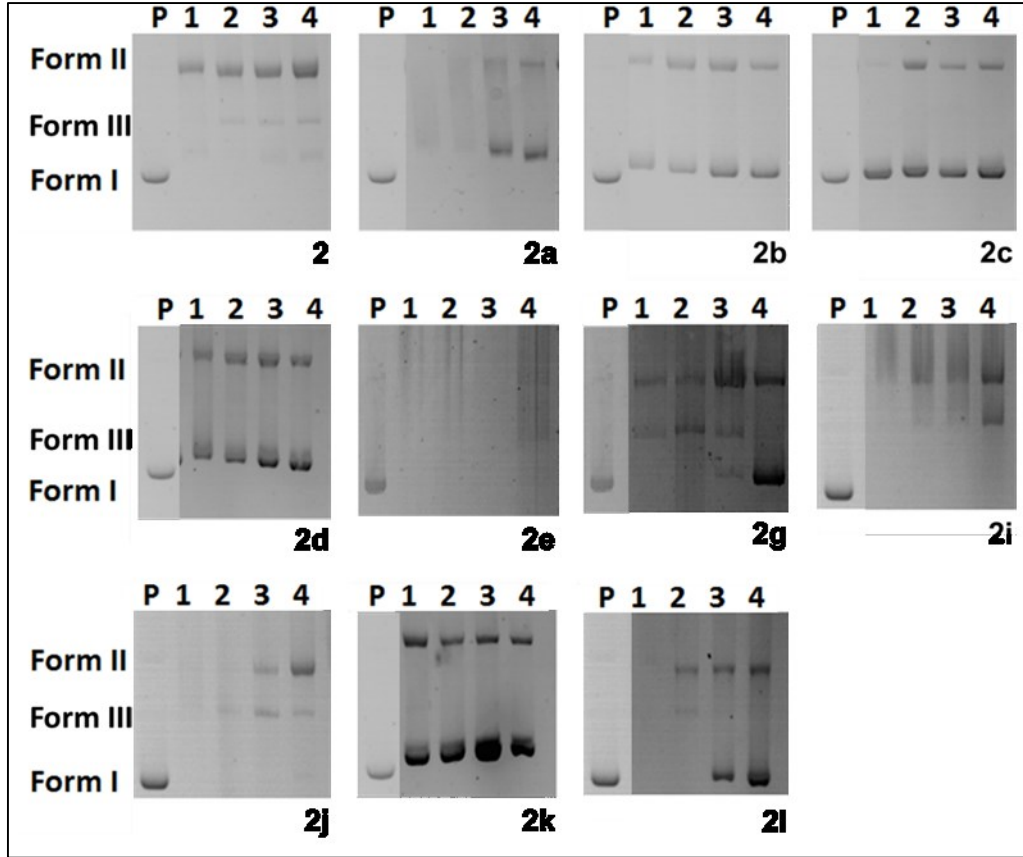
Şekil 4.2. 2, 2b, 2e, 2i, 2j, 2l bileşiklerine maruz bırakılan DLD-1 kolon kanser hücrelerinin % canlılıkları

4.3. Fosfazen Bileşiklerinin DNA ile Etkileşimi

Çalışmada kullanılan 2, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g, 2i, 2j, 2k, 2l bileşiklerinin 2000 μ M ile 250 μ M arasında değişen konsantrasyonlarının plazmit DNA ile etkileşimleri agaroz jel elektroforezi ile araştırılmıştır.

Bisferrosenil-2-trans-6-spiro-siklotetrafosfazen (2) bileşiğinin DNA ile etkileşiminde yüksek konsantrasyonlarda Form I DNA ortadan kalkmıştır. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda Form I DNA'nın hareketliliğini yavaşlatıcı yönde etki ettiği belirlenmiştir. 2 bileşiğinin açık halkasal yapıda olan Form II DNA'nın yoğunluğunu artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca DNA'da kırıklar olduğunu gösteren doğrusal yapıda olan Form III gözlenmiştir. Pirolidin süstitüenti taşıyan 2a bileşiğinin DNA ile etkileşiminde yüksek konsantrasyonlarda Form I ve Form II DNA ortadan kalkmıştır. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda Form I DNA'nın hareketliliğini yavaşlatıcı yönde etki ettiği ve yoğunluğunu artırdığı belirlenmiştir. Piperidin süstitüenti taşıyan 2b bileşiğinin DNA ile etkileşiminde Form I ve Form II DNA'nın hareketliliğini yavaşlattığı ve Form II DNA'nın yoğunluğunu artırdığı belirlenmiştir. Morfolin süstitüenti taşıyan 2c bileşiğinin DNA ile etkileşiminde Form I ve Form II DNA'nın hareketliliğini yavaşlattığı ve Form I DNA'nın yoğunluğunu artırdığı belirlenmiştir. DASD süstitüenti taşıyan 2d bileşiğinin DNA ile etkileşiminde Form I ve Form II DNA'nın hareketliliğini yavaşlattığı, Form I ve Form II DNA'nın yoğunluğunu artırdığı belirlenmiştir. Diamin süstitüenti taşıyan 2e bileşiğinin DNA ile etkileşimine bakıldığında Form I ve Form II DNA smear olarak gözlenmiştir. Dialkoksi süstitüenti taşıyan 2g bileşiğinin DNA ile etkileşiminde yüksek konsantrasyonlarda Form I DNA ortadan kalkmıştır. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda Form I DNA'nın hareketliliğini yavaşlatıcı yönde etki ettiği belirlenmiştir. 2g bileşiğinin açık halkasal yapıda olan Form II ve süper sarmal yapıda olan Form I DNA'nın yoğunluğunu artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca DNA'da kırıklar olduğunu gösteren doğrusal yapıda olan Form III gözlenmiştir. Diamin süstitüenti taşıyan 2i bileşiğinin DNA ile etkileşiminde tüm konsantrasyonlarda Form I DNA ortadan kalkmıştır. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda Form II DNA'da gözlenmemiştir. DNA'da kırıklar olduğunu gösteren Form III DNA gözlenmiştir. Diamin süstitüenti taşıyan 2j bileşiğinin DNA ile etkileşiminde yüksek konsantrasyonlarda DNA smear olarak gözlenmiştir ve düşük konsantrasyonlarda Form I DNA ortadan kalkmıştır. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda Form II DNA'da gözlenmemiştir. Düşük konsantrasyonlarda Form II DNA'nın yoğunluğu

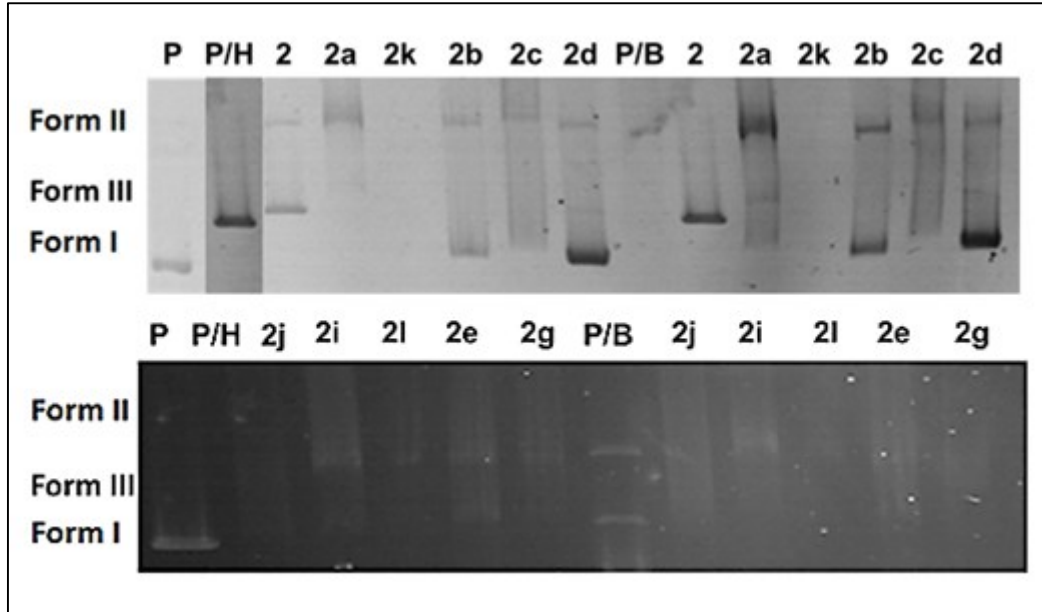
artmıştır, ayrıca Form III DNA gözlenmiştir. Dialkoksi sübstitüenti taşıyan 2k bileşiğinin DNA ile etkileşimine bakıldığında Form I ve Form II DNA'nın yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir. Dialkoksi sübstitüenti taşıyan 2l bileşiğinin DNA ile etkileşiminde en yüksek konsantrasyonda DNA smear olarak gözlenmiştir ve yine yüksek konsantrasyonda Form I DNA'ya rastlanmamış ve Form III DNA gözlenmiştir.



Resim 4.1. Çalışmada kullanılan bileşiklerin plazmit DNA üzerindeki etkisi. (P):Bileşiklerle muamele edilmemiş plazmit DNA; (1):2000 µM; (2):1000 µM; (3):500 µM; (4):250 µM; Form I:Kapalı halkasal plazmit DNA; Form II: Açık halkasal plazmit DNA; Form III:Doğrusal plazmit DNA

Bileşiklerin DNA'daki nükleotitlere bağlanma durumlarını belirlemek için en yüksek konsantrasyon ile muamele edilmiş plazmit DNA'nın *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleazlar ile enzim kesimleri yapılmıştır (Resim 4.2). *Bam*HI enzimi DNA üzerindeki 5'-G/GATCC-3' bölgesini tanıırken; *Hind*III enzimi 5'-A/AGCTT-3' bölgesini tanımaktadır. 2 bileşiği ile etkileşime girmiş DNA'nın enzim kesimine bakıldığında bileşiğin DNA'ya A/A ve G/G nükleotitlerinden bağlanmadığı enzim kesiminin gerçekleştiği belirlenmiştir. 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g, 2i ve 2l bileşikleriyle etkileşime girmiş DNA'nın enzim

kesimine bakıldığında her iki enziminde DNA'yı kesmediği ve maddelerin DNA'ya A/A ve G/G nükleotitlerinden bağlandığı belirlenmiştir.



Resim 4.2. Çalışmada kullanılan bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA'nın *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleazları ile kesimi. (P): Bileşiklerle muamele edilmemiş plazmit DNA; (P/H): *Hind*III ile kesilmiş plazmit DNA; (P/B): *Bam*HI ile kesilmiş plazmit DNA



5. TARTIŞMA

Günümüzde enfeksiyon hastalıkları ülkemizde ve dünyada halk sağlığı açısından büyük bir tehdit unsurudur. Yeni geliştirilen kuvvetli etkiye sahip antimikrobiyal ajanlar olmasına rağmen mikroorganizmalarında aynı hızda gelişmesi ve klinik kullanımda olan antiikrobiyal ajanlara karşı direnç oluşturmaları enfeksiyon hastalıklarının tedavisini zorlaştırmaktadır. Bu durum bilim insanlarını mikroorganizmaların direnç mekanizmalarına rağmen etkili olabilecek konak canlı için daha az toksik olan antimikrobiyal ajanlar geliştirmeye yönlendirmiştir. Bu süreçte fosfazenler üzerine yapılan pek çok çalışma göstermiştir ki fosfazen bileşikler ve çeşitli türevleri mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkiye sahiptir. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında kullanılan kısmen süstitüe bis-ferrosenil-2-trans-6-dispiro-siklotetrafosfazen ve bu bileşiğin pirolidin, morfolin, piperidin, 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD), diamin ve diol süstitüentleri taşıyan türevlerinin 9 patojen bakteri ve 3 patojen maya üzerine antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. 2e (diamin) bileşiğinin *B. subtilis*’e etkisinin kloramfenikolden yüksek olduğu belirlenmiştir. 2e (diamin), 2g (dialkoksi) ve 2l (dialkoksi) bileşiklerinin *C. albicans* mayası üzerine kontrol olarak kullanılan ketokonazolden daha yüksek etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer bileşikler pozitif kontrollerle karşılaştırıldığında mikroorganizmalar üzerinde daha düşük antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm mikroorganizmalar göz önüne alındığında diamin süstitüenti taşıyan 2e, 2i, 2j bileşiklerinin ve CH₃ (metil) grubu bağlı dialkoksi süstitüenti taşıyan 2l bileşiğinin; pirolidin (2a), piperidin (2b), morfolin (2c), DASD (2d) ve F (flor) bağlı dialkoksi (2g, 2k) süstitüenti taşıyan bileşiklerden ve çıkış bileşiği olan bisferrosenil-2-trans-6-dispiro-siklotetrafosfazen bileşiğinden daha aktif olduğu belirlenmiştir. Bileşiklerin bakteriler içerisinde Gram negatif bakteriler üzerinde Gram pozitif bakterilere oranla daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bileşikler bakteriler üzerine, mayalar üzerine olduğundan daha yüksek etki göstermiştir. Çalışmada antimikrobiyal aktiviteye sahip olan bileşiklerin bu etkiyi oldukça düşük konsantrasyonlarda (<15,63-2000 µM) gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde tetramerik fosfazenlerle ilgili çalışma sayısı oldukça azdır. Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin özellikle *B. subtilis* ve *C. albicans*’ın sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen antimikrobiyal ajanlardan olma potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar literatürdeki bilgiyi desteklemektedir ve bu bileşiklerle yapılan ilk antimikrobiyal aktivite çalışması olma özelliğindedir.

Tüm dünyayı etkisi altına alan ve halk sağığı sorunlarının başında gelen bir diğerk hastalık ise kanserdir. Kanser tedavisi masraflı aynı zamanda zor olan bir hastalıktır. Tedavi için pek çok yöntem olmakla birlikte bunlar arasında en yaygın kullanılanı kemoterapidir. Ancak kemoterapi kanseri tedavi etmekle birlikte tedavinin yanında getirdiğı pek çok sağıık sorununa sebep olmaktadır. Bunun sebebi klinik kullanımda olan antikanser ajanların seçici toksisiteye sahip olmamaları ya da kullanım sonrası vücuttan atılmasının zor olmasıdır. Bütün bu sebepler araştırmacıları bu tür olumsuz özelliklere daha az ya da hiç sahip olmayan antikanser ajanlar geliştirmeye yöneltmektedir. Araştırmalar sonucunda fosfazen bileşiklerinin sitotoksik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir ancak tetrafosfazenler ile ilgili çalışmalar yetersizdir. Bu çalışma bis-ferrosenil-2-trans-6-dispiro-siklotetrafosfazen ve türevleri ile yapılan ilk sitotoksik aktivite çalışmasıdır. Sitotoksik aktivite çalışmasının sonucunda bileşiklerin aktivitesinin konsantrasyona bağılı olarak değışiklik gösterdiği ve bileşikler arasında sadece diamin sübstitüenti taşıyan 2i bileşiğinin DLD-1 kolon kanser hücreleri üzerine kontrol olarak kullanılan antikanser ajan doksorubisinden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Kullanılan diğerk bileşiklerin L929 fibroblast hücrelerine ve DLD-1 kolon kanser hücrelerine karşı etkinliğinin birbirlerine yakın değerkler olduğu belirlenmiştir. Bu değerkler L929 fibroblast hücrelerinde doksorubisinden yüksek, DLD-1 kolon kanser hücrelerinde ise doksorubisinden düşüktür. Sonuçlar dikkate alındığında 2i bileşiğinin antikanser ajan olma potansiyelinin yüksek olduğu görülmüştür.

Antikanser ajanların birçoğı DNA'ya etki ederek kanseri tedavi etmektedir. Bu sebeple antikanser ajanlar geliştirilirken ilaçların DNA ile olan etkileşimleri oldukça dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin plamit DNA ile olan etkileşimlerine bakıldığında tüm bileşiklerin DNA'ya etki ettiği gözlenmiştir. Özellikle diamin sübstitüenti taşıyan bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda DNA'nın formlarını parçaladığı gözlenmiştir. Tüm fosfazen bileşiklerinin plazmit DNA'nın hareketliliğini azaltıcı yönde etki ettiği belirlenmiştir. Ayrıca diamin ve dialkoksi sübstitüenti taşıyan bileşiklerin DNA'da kırılmalara sebep olduğu belirlenmiştir. Bileşikler ile etkileşime girmiş olan DNA'nın enzim kesimine bakıldığında 2 bileşiğinin DNA'ya G/G ve A/A bölgelerinden bağlanmadığı, diğerk bileşiklerin ise bu bölgelerden DNA'ya bağlandığı belirlenmiştir. Tetramerik fosfazenlerle ilgili bu konudaki bilgiler literatürde kısıtlıdır. Bu veriler çalışmada kullanılan bileşikler ile ilgili ilk bilgilerdir ve bileşiklerin DNA ile etkileşimlerine bakıldığında bu bileşiklerin sitotoksik aktivitesinin bu etkileşimlerinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Biyolojik aktiviteyle ilgili çalışmalara bakıldığında fosfazen temelli bileşiklerin antimikrobiyal ve antikanser ajan olma potansiyellerinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Fosfazenlerin sahip olduğu biyolojik aktivite fosfazenin temel yapısına bağlı olan yan gruplara göre farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan ferrosenil siklotetrafosfazen bileşikleri de değişik oranlarda antimikrobiyal aktivite ve sitotoksik etki göstermiş ve DNA ile etkileşime girmiştir. Çalışmalardan elde edilen veriler göz önüne alındığında bileşiklerin sahip olduğu biyolojik aktiviteye yapılarında bulunan ferrosen birimi ile birlikte diamin, dialkoksi, pirolidin, piperidin, morfolin ve DASD gruplarının sebep olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan tüm bileşiklerde yer alan ve güçlü elektrokimyasal özelliği olan ferrosen demir II iyonunun iki siklopentadienil halka arasında yer aldığı bir bileşiktir. Oldukça kararlı bir yapıda olan bu bileşik 1951 yılında keşfedilmiştir ve organometalik kimya için başlangıç olarak kullanılmıştır. Çeşitli türevlerinin hazırlanabilmesini sağlayan sıvı ve aerobik ortamdaki kararlılığı ve olumlu elektrokimyasal özellikleri sayesinde ferrosen ve türevleri biyolojik uygulamalar için oldukça popüler bir moleküldür [126].

Çalışmada kullanılan bileşikler yapı olarak büyük olmalarından ve düzlemsel yapıda olmadığından dolayı hücre içindeki yapılara etki etmek için hücre duvarını geçmesi mümkün görünmemektedir. Aynı sebepten dolayı bileşiklerin DNA' da bulunan nükleotitler arasına girip interkalasyon aracılığıyla DNA ile etkileşime girmesi mümkün görünmemektedir. Fakat fosfor atomlarından birine bağlı olarak bulunan ferrosen birimi pozitif yüklü ve düzlemsel yapıda olduğu için negatif yüklü DNA molekülünün arasına girerek etkileşime girmiş olabileceği ve ferrosen birimi ile birlikte DNA arasına giren bileşiklere bağlı yan grupların DNA'ya etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir. Bileşiklerin bu şekilde DNA'nın yapısını bozup replikasyonu engelleyerek kullanılan hücre hatları üzerine sitotoksik etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

Berberoğlu ve diğerleri (2016) spiro-ansa-spiro ve spiro-bino-spiro tetramerik fosfazen türevlerinin sitotoksik aktiviteleri, antimikrobiyal ve ile DNA ile etkileşimlerini araştırmışlardır. Bileşiklerden 13 ve 16'nın L929 fibroblast ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin yüksek olduğunu ve IC50 değerlerinin antikanser ajan olarak kullanılan sis-platinden daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bu

bileşiklerin etkinliğinin sisplatin kadar yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu tez kapsamında çalışılan fosfazen bileşiklerinin bazılarının DLD-1 kolon kanser hücre hatları üzerinde yine sisplatin kadar etkili olduğu belirtilmiştir. Bileşiklerin on bakteri ve üç maya suşu üzerindeki antimikrobiyal aktivitesine bakmışlar ve bileşik 16 dışındaki bileşiklerin oldukça düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiğini; bileşik 16'nın bu tez çalışmasında kullanılan fosfazen bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesine benzer şekilde mayalar üzerinde etkinlik gösterdiğini bulmuşlardır. Bileşiklerin DNA ile etkileşimlerine bakıldığında bileşik 12, 13, 14 ve 18'in bu çalışmada kullanılan bileşiklerle benzer şekilde DNA'nın hareketine ve DNA yoğunluğuna etki ettiğini tespit etmişlerdir [127].

Asmafiliz ve diğerleri (2013) sentezledikleri tetramorfolin mono- ve bisferrosenilmetilspirosiklotrifosfazen (8a–12a) bileşiklerinin çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesini ve plazmit DNA ile etkileşimlerini incelemişlerdir. 8a, 9a, 11a ve 12a bileşiklerinin *B. cereus* (NRLL B-3008) (G+), *S. aureus* (ATCC 25923) (G+), *B. subtilis* (ATCC 29213) (G+), *E. faecalis* (ATCC 292112) (G+), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (G–), *E. coli* (ATCC 25922) (G–), *P. vulgaris* (ATCC 8427) (G–) ve *E. coli* (ATCC 35218) (G–) bakterileri ile *C. tropicalis* (ATCC 13803) ve *C. albicans* (ATCC 10231) mayaları üzerindeki antimikrobiyal etkilerini araştırmış ve kloramfenikol, ampisilin (antibakteriyal) ve ketokanazol (antifungal) gibi antibiyotiklerle karşılaştırıldığında herhangi bir antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığını saptamışlardır. Bu sonuçlar ışığında bu tezde kullanılan fosfazen bileşiklerin yukarıda bahsedilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. 8a, 9a, 11a ve 12a bileşiklerinin DNA ile 24 saat inkübasyonu sonrasında agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve daha sonra etidyum bromürle muamele edilip görüntüleme yapılmıştır. Elde edilen görüntüler incelendiğinde 11a ve 12a bileşiklerinin DNA'nın hareketliliğine etki ettiği belirlenmiştir. Ayrıca restriksiyon endonükleazlar ile enzim kesimleri yapıldığında enzimlerin DNA'yı kesmediği belirlenmiştir. Bu sonuçları değerlendirdiklerinde tetramorfolin bileşiklerin DNA'nın konformasyonunda değişimlere sebep olduğu sonucuna varmışlardır. Bu bileşiklerin DNA'yla girdiği bu etkileşim ve enzim kesiminde DNA'nın kesilmemiş olması bu tez çalışmasında kullanılan fosfazen bileşiklerinin DNA etkileşimleriyle benzerlik göstermektedir. [128].

Akbaş ve diğerleri (2016) fosfazenyum tuzlarının antimikrobiyal etkilerini, sitotoksik aktivitelerini ve DNA ile etkileşimlerini araştırmışlardır. Bileşiklerin DLD-1 kolon kanseri

hücre hattı üzerine etkileri incelenmiş ve 125 μM konsantrasyonda 11a, 13a, 14a ve 15a bileşiklerinin hücre canlılığını %40'a kadar düşürdüğünü tespit etmişlerdir. En yüksek konsantrasyon olan 1259 μM 'da ise tüm bileşiklerin yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu görmüşlerdir. Bu çalışmada benzer etki 2i bileşiğinde görülmüştür. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerine bakıldığında tüm bileşiklerin Gram pozitif bir bakteri olan *B. subtilis*'e karşı etkili olduğunu; *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis* ve *S. typhimurium* bakterilerine karşı herhangi bir etkilerinin olmadığını belirlemişlerdir. Tetrapiperidino fosfazenium tuzları olan 13a, 14a ve 15a bileşiklerinin bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin de üzerinde etkili olduğu *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* mayalarına karşı aktivite gösterdikleri tespit edilmiş ve bu tuzların fosfazen ligandlarının da aynı mayalar üzerinde etkili olduğu söylenmiştir. Bu çalışmanın aksine bu tez çalışmasında bileşiklerin Gram negatif bakteriler üzerine olan etkisi daha fazladır ayrıca mayalar üzerinde pozitif kontrole oranla önemli bir etki gözlenmemiştir [129]. Bileşiklerin MİK, MBK ve MFK değerlerinin bakteriler için 312,5 ile 1250 μM ; mayalar için ise <19,5 ile 156 μM arasında olduğunu belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında ise MİK, MBK ve MFK değerleri <15,63 ile 2000 μM arasında değişmektedir ve bu değerler bu çalışmada elde edilmiş olan değerlerden daha iyi sonuçlar elde edildiğini göstermektedir. Bileşiklerin pBR322 plazmit DNA ile etkileşimlerine bakıldığında 13a, 14a ve 15a bileşiklerinin plazmit DNA'nın hareket ve yoğunluğunda düşüşe sebep olduğu; bileşik 14a ve 15a'nın aynı zamanda DNA'yı parçaladığını tespit etmişlerdir. DNA'daki bu etki bu tez çalışmasındakine benzerdir. Plazmit/bileşik karışımları *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile muamele edildiğinde enzimlerin DNA'yı kesebildiği görülmüş ve bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin çoğunun DNA'ya bu nükleotitlerden bağlandığı ve kesimin gerçekleşmediği gibi farklılıklar görülmektedir [130].

Elmas ve diğerleri (2014) 2-trans-6-dikloro asa (ansa-spiro-ansa) (1b, 2b, 1c ve 2c) ve 2-trans-6-dikloro mono-ferrosenil-spiro-ansa siklotetrafosfazen (3a, 3b, 4a, 4b, 5a ve 5c) bileşiklerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri, sitotoksik etkileri ve DNA ile etkileşimlerini araştırmışlardır. Bileşiklerin MCF-7 meme kanser hücre hattındaki sitotoksik aktivitesini incelediklerinde bileşik 1b ve 2b'nin 1 mg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını %40 düşürmüştür ve aynı konsantrasyondaki sisplatin hücre canlılığını %35 düşürmüştür ancak diğer bileşiklerin belirgin bir sitotoksik etki göstermediğini belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen bileşiklerin ve ayrıca başlangıç

bileşiği ($N_4P_4Cl_8$), piperidin, DASD (1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5] dekan), aminopodand 1 ve 2'nin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlar; 2b, 2c ve 5a bileşiklerinin *B. subtilis*'e karşı etkili olduğunu; 3b, 4b ve 5b bileşiklerinin *B. cereus*'a karşı zayıf antimikrobiyal aktivite gösterdiğini; 5a bileşiğinin *E. coli* ATCC 35218 bakterisine karşı yine zayıf antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasındaki veriler değerlendirildiğinde *B. subtilis*'e karşı olan etkinin benzer olduğu ancak *E. coli* ATCC 35218'e karşı olan etkinliğin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bileşiklerin bu tez çalışmasındaki maddelere benzer olarak antifungal etkilerinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir. 5000- 312 μM arasında değişen konsantrasyonlardaki bileşikler ile 24 saat inkübe edilmiş plazmit DNA'nın agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen görüntüler incelendiğinde 3a-5a ve 3b-5b bileşiklerinin DNA'yı kesme yeteneğinin olduğunu görmüşler ve bu etkiye bileşiklerdeki redoks aktif ferrosen biriminin sebep olabileceğini söylemişlerdir [131]. Ferrosen birimi bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin yapısında da bulunmaktadır ve DNA'daki bu etkinin benzerliğinin bu birimden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tümer ve diğerleri (2013) mono (1a– 5a), geminal (gem-1b–5b), non-geminal (cis-1b, cis-5b ve trans-2b–5b), tri (1c–5c) ve tetra-substitüe fosfazen (1d–5d) bileşiklerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerini, sitotoksik etkilerini ve DNA etkileşimlerini belirlemişlerdir. 1d, 2d ve 4d bileşiklerinin HeLa kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi bir antikanser ajan olan sisplatin ve paklitaksel ile karşılaştırıldığında 2d bileşiğinin 1d ve 4d bileşiklerine göre daha aktif olduğunu; 2d bileşiğinin özellikle 5 ve 10 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarında pozitif kontrol olarak kullanılan sisplatin ve paklitaksel kadar inhibisyon etkisinin olduğunu görmüşlerdir. 2d bileşiğinin potansiyel sitotoksik etkisini incelemek için bu bileşikler muamele edilmiş HeLa kanser hücrelerinin canlılığını 96 saat süre ile takip etmişler ve sonuçta bileşiğin ilk 48 saatte hücre canlılığını azalttığını ve 72 saat sonra tekrar bir hücre azalmasına sebep olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak pendant ferrosenil ve dört vanillin grubunun siklotrifosfazenlerin HeLa hücre hattına karşı antiproliferatif etkisini artırdığını söylemişlerdir. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesine bakıldığında 5a, cis-1b, 2c ve 1d bileşiklerinin patojen bakterilere karşı aktif olduğunu ancak bu etkinin standart antibiyotikler olan ampicilin ve kloramfenikol kadar yüksek olmadığını tespit etmişlerdir. Ferrosenil siklotrifosfazen türevlerinin antimikrobiyal aktivitesinin P atomuna bağlanan substitüentlere (pirolidin, 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekan, morfolin ve vanillinato grupları) bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini söylemişlerdir. Bu tez kapsamında kullanılan bileşiklerin

antimikrobiyal aktivitesinin de bu çalışmaya benzer şekilde P atomuna bağlanan gruplara göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Bileşiklerin 312-5000 μM arasında değişen konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiş plazmit DNA üzerindeki değişiklikler araştırıldığında bileşik 2d'nin en yüksek iki konsantrasyonunun süper sarmal DNA'nın yoğunluğunu önemli derecede artırdığını; madde konsantrasyonu azaldıkça form I'in hızında artış olurken form II'nin hızında azalma meydana geldiğini ve süper sarmal plazmit DNA'yı küçük parçalara kestiğini gözlemlemişlerdir. gem-1b ve cis-1b bileşiklerinin konsantrasyonu azaldıkça form I DNA'nın hız ve yoğunluğunda azalma olduğunu; 1d bileşiğinin konsantrasyonu arttıkça form I DNA'nın hız ve yoğunluğunda artış olduğunu ve aynı zamanda DNA'nın kesilmesinden kaynaklanan form III bandının varlığını tespit etmişler; diğer bileşiklerin de benzer aktiviteye sahip olduğunu görmüşlerdir. Bu tez çalışmasında ise benzer şekilde bileşiklerin DNA'yı küçük kesmesinden kaynaklı oluşan form III DNA gözlenmiş ve DNA'nı hızını azaltan yönde etki ettiği belirlenmiştir. Bileşikler ile muamele edilmiş plazmit DNA *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile kesilmek istendiğinde DNA'nın kesilmediği görülmüş ve bu tez çalışmasındaki bileşiklerin pek çoğunda olduğu gibi DNA'ya bu enzimlerin kesim bölgelerinden bağlandığı belirlenmiştir. Ferrosen biriminin bulunması bileşiklerin DNA'ya karşı olan etkisinin bu tezdeki ile benzerlik göstermesine sebep olabileceğini düşündürmektedir [132].

Koçak ve diğerleri (2013) kısmen substitüe spiro-ansa-spiro fosfazen (3) ve spiro-bino-spiro fosfazen (4) bileşiklerinin $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6$ ve dibenzo-diaza-podandın (2) reaksiyonundan tam heterosiklik amin (pirolidin, piperidin, morfolin ve 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekan - DASD) substitüe spiro-ansa-spiro 5a-5d ve spiro-bino-spiro 6a-6d siklotrifosfazen bileşiklerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin çeşitli patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA etkileşimlerini incelemişlerdir. Başlangıç bileşiği ($\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6$), pirolidin, piperidin, morfolin, DASD ve dibenzo-diaza podandının (2) sentezlenen fosfazen türevleri (3, 4, 5a-5d ve 6a-6d) ile birlikte antimikrobiyal aktivitesine bakıldığında $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6$ bileşiğinin *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* NRRL-B-3711 ve *E. coli* ATCC 25922 bakterilerine; piperidinin *B. cereus* NRRL-B-3711, morfolinin *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve DASD'ın *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. cereus* NRRL-B-3711 bakterilerine karşı zayıf antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. 3, 4, 5a-5d ve 6a-6d fosfazen türevleri herhangi bir antimikrobiyal etki göstermezken heterosiklik aminler ve başlangıç bileşiğinin de antifungal etkiye sahip olmadığını; yalnızca 6a bileşiğinin *Candida*

tropicalis mayasına karşı 15 mm'lik zon çapı ile oldukça iyi bir antifungal etkisinin olduğunu tespit etmişler ve bu etkinin bileşiğin spiro-bino-spiro yapısı ve pirolidinil yan gruplarından meydana gelmiş olabileceğini söylemişlerdir. 5000 ile 625 μ M arasında değişen konsantrasyonlardaki başlangıç bileşiği ($N_3P_3Cl_6$), pirolidin, piperidin, morfolin, DASD ve dibenzo-diaza podandı (2) ve sentezlenen fosfazen türevlerinin (3, 4, 5a–5d ve 6a–6d) pBR322 plazmit DNA ile etkileşimleri incelendiğinde pirolidin, morfolin ve 2 bileşiğinin plazmit DNA üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını; piperidin ve DASD'ın yalnızca form I DNA'nın hareketliliği üzerinde küçük bir azalmaya sebep olduğunu; $N_3P_3Cl_6$ başlangıç bileşiğinin ise önemli bir konformasyonel değişime yol açtığını görmüşlerdir. Diğer fosfazen türevlerinin DNA üzerinde çok az bir etkisinin bulunmasına rağmen kısmen substitüe fosfazen türevleri spiro-ansa-spiro 3 ve spiro-bino-spiro 4'ün form II DNA'nın hareketlilik ve yoğunluğunu artırdığını tespit etmişlerdir. Bu bileşiklerin DNA'ya olan etkileri karşılaştırıldığında bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin DNA üzerine olan etkilerinin daha düşük konsantrasyonlarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [133].

Elmas ve diğerleri (2012) oktaklorosiklotetrafosfazenler ($N_4P_4Cl_8$) ile N_2O_2 verici-tip aminopodandın (1a, 1b, 1g ve 1h) reaksiyonu sonucu spiro-ansa-spiro (2a, 2b, 2g ve 2h) ve ansa-spiro-ansa (3a ve 3b) fosfazenler olarak isimlendirilen iki tip bileşik elde etmişler; kısmi substitüe spiro-ansa-spiro fosfazenlerin (2a ve 2b) tetrahidrofuran içindeki pirolidin ve morfolin ile reaksiyonuyla tetrapirolidino (2c ve 2d) ve morfolino (2e ve 2f) türevlerini; ansa-spiro-ansa fosfazenler (3a ve 3b) ile içindeki pirolidin ve morfolin ile reaksiyonuyla ise gem-2-trans-6-dikloropirolidinofosfazenler (3c ve 3d) ve -morfolinofosfazenleri (3e ve 3f) sentezlemişler ve bu bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA etkileşimlerini incelemişlerdir. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarında tetrapirolidinosiklotetrafosfazen türevlerinin (2c ve 2d) Gram pozitif bakterilere karşı zayıf antimikrobiyal aktivite gösterdiğini; rasemik gem-2-trans-6-dikloropirolidinosisiklotetrafosfazen türevlerinin (3c ve 3d) yalnız *Candida tropicalis*'e karşı orta derecede antifungal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Başlangıç bileşiği ($N_4P_4Cl_8$), pirolidin, morfolin, 1a, 1b, 1g ve 1h bileşiklerinin de aynı mikroorganizmalara olan etkisine bakıldığında morfolin ve $N_4P_4Cl_8$ 'in *P. aeruginosa*'ya; 1b ve $N_4P_4Cl_8$ 'in *B. cereus*'a; 1b'nin *E. coli*'ye; 1h'nin *S. aureus*'a; 1g'nin *B. subtilis*'e karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin de mayalar üzerine zayıf etki gösterdiği belirlenmiştir. Başlangıç bileşiği ($N_4P_4Cl_8$), pirolidin, morfolin, 1a, 1b, 1g, 1h ve siklotetrafosfazen türevleri 2a–2f ve 3a–3f ile pBR322 plazmit

DNA'nın etkileşimi incelendiğinde $N_4P_4Cl_8$ haricinde 1a, 1b, 1g ve 1h bileşiklerinin plazmit DNA üzerinde bir etkisinin olmadığını; 2e, 3c ve 3e bileşiklerinin ise DNA'yı kesme yeteneğinin olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan ferrosenil siklotetrafosfazen bileşiklerinin DNA üzerine gösterdikleri etki bu çalışmada kullanılan bileşiklerden daha yüksektir. Restriksiyon analizi sonucuna göre 2b ve 2d haricindeki 2a-2f ve 3a-3f bileşiklerinin DNA'ya GG bölgesinden bağlandığını tespit etmişlerdir [134].

İlter ve diğerleri (2010) heksaklorosiklotrifosfazatrien ($N_3P_3Cl_6$) ile N-alkil-N-ferrosenilmetiletilen diaminler ve sodyum [3-(N-ferrosenilmetilamino)-1-propanoksid] (3) ile reaksiyonu sonucunda spirosiklik monoferrosenil tetraklorofosfazenleri (1a–3a); 1a-3a bileşiklerinin pirolidin ile reaksiyonuyla tetrapirolidinofosfazenleri (1b–3b); 1a bileşiğinin morfolin ile reaksiyonuyla geminal-morfolino fosfazen (1c); 2a ve 3a bileşiklerinin morfolin ile reaksiyonuyla dietilaminotrimorfolino (2c) ve tam substitüe morfolino (3c) bileşiklerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin antimikrobiyal, antitüberküloz aktivitesi ve DNA ile etkileşimini incelemişlerdir. Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesine bakıldığında tüm test bakterileri içinde fosfazen bileşiklerine karşı en duyarlı olanların *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *B. cereus* olduğunu; 1b bileşiğinin *E. fecalis*, *S. aureus* ve *B. subtilis*; 2b bileşiğinin *S. aureus*, *C. albicans* ve *C. tropicalis*; 3c bileşiğinin *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde etkili iken 3b bileşiğinin test mikroorganizmalarının çoğunda en yüksek etki gösteren bileşik olduğunu tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise pirolidin substitüe 2a bileşiğinin antimikrobiyal aktivitesinin bu çalışmadaki pirolidin substitüe 3b bileşiği kadar yüksek olmadığı belirlenmiştir. 1b, 2b, 3b ve 3c bileşiklerinin pUC18 plazmit DNA ile olan etkileşimini incelediklerinde bileşiklerin DNA'yı kesme aktivitesinin olduğunu ve plazmit DNA'nın hareketi üzerinde değişikliğe sebep olduğunu; 3b bileşiğinin ise form I ve II DNA üzerinde diğer bileşiklere göre daha güçlü etki gösterdiğini belirlemişler; restriksiyon analizine bakıldığında fosfazen türevlerinin bu tez çalışmasındaki bileşiklerin çoğu gibi DNA'ya G/G ve A/A nükleotitlerinden bağlandığını tespit etmişlerdir [135].

Başterzi ve diğerleri (2015) kısmen substitüe spiro-ansa-spiro-siklotrifosfazenlerdeki (7 ve 8) Cl atomlarının pirolidin, 4-(2-aminoetil)morfolin (AEM) ve 1,4-dioksa-8-azaspiro[4,5]dekan (DASD) ile yer değiştirme reaksiyonu sonucu heterosiklik amin substitüe siklotrifosfazenleri (9a-c ve 10a-c) elde etmişler ve bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerini araştırmışlardır. $N_3P_3Cl_6$, pirolidin, AEM, DASD, dibenzo-diaza podandlar (3

ve 4) ve fosfazen türevlerinin (5000 μM) antimikrobiyal aktivitesini incelemişler ve çıkış bileşiği $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6$, heterosiklik aminler ve dibenzo-diaza podandlar (3 ve 4) ve fosfazen türevlerinin (6, 8, 10a ve 10b) bu tez dahilinde çalışılan bileşikler gibi *E. coli* ATCC 35218 üzerinde antimikrobiyal aktivitesi olduğunu; MİK değerlerine bakıldığında fosfazen 7'nin *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* ve *E. coli* 25922 bakterilerine karşı oldukça aktif olduğunu ve MİK değerlerinin 78 ile $>1250 \mu\text{M}$ arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Spiro-ansa-spiro 7, 8 ve onun analogu olan fosfazenin *E. coli* 35218 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi karşılaştırıldığında spiro-ansa-spiro 7'nin 8 üyeli halkasının 9 ve 7 üyeli ansa halkasına göre daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin Mik değerleri bu çalışmadakilere oranla daha düşük konsantrasyonlar olduğu belirlenmiştir. Heterosiklik amin substitüe spiro-ansa-spiro 9a-c, 10a-c ve analog fosfazenin durumuna bakıldığında ise sırasıyla 9 üyeli ansa halkası, pirolidin ve AEM grubu içeren 10a ve 10b bileşiklerinin *E. coli* 35218 üzerinde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimleri incelendiğinde pirolidin, AEM ve spiro-bino-spiro 6'nın plazmit DNA üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını ve DASD'nin form I DNA'nın hareketliliğini artırdığını tespit etmişlerdir. $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6$ 'nın plazmit DNA'nın zincirlerinde çentik oluşturarak hızlı hareket eden form I'i daha yavaş hareket eden form II'ye dönüştürdüğünü; fosfazen türevleri 5, 7, 8, 9b ve 9c'nin form I DNA'nın hareketini artırırken 9a'nın yavaşlamaya yol açtığını belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan bazı bileşiklerin bu tez çalışmasında kullanılan bileşikler ile DNA'nın hareketliliğine benzer etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Siklotrifosfazenlerin L929 fibroblast hücreleri ve A549 akciğer kanser hücreleri üzerindeki toksik etkilerine bakıldığında sağlıklı hücreler olan fibroblast hücrelerinde yalnızca 9'nın en yüksek konsantrasyonda toksik etki gösterdiğini, bu tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin aksine diğer bileşiklerin fibroblast hücreleri üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını belirlemişlerdir. A549 akciğer kanser hücrelerinin durumuna bakıldığında ise maddelerin artan konsantrasyona göre toksik etkisinin arttığını ve en yüksek toksik etkiyi 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda 9c maddesinin gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca maddelerin A549 akciğer kanser hücrelerine karşı toksik etkisinin L929 fibroblast hücrelerinden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan bileşikler ise 2i bileşiği dışında hem DLD-1 kolon kanser hücrelerine hem de L929 fibroblast hücrelerine benzer sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir [136].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tezi kapsamında yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar ve öneriler şöyledir.

1. Bu çalışma ferrosenkarboksaldehit ile 2-trans-6-dispiro-siklotetrafosfazen bileşiklerinin reaksiyonu sonucu meydana gelen kısmen süstitüe bis-ferrosenil-2-trans-6-dispiro-siklotetrafosfazenlerin pirolidin, morfolin, piperidin, 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (DASD), diaminler ve dioller ile reaksiyona sokulması sonucu elde edilmiş tam ve kısmen süstitüe ferrosenil siklotetrafosfazen bileşikleri ile yapılan ilk biyolojik aktivite çalışmasıdır.
2. Yapılan çalışma kapsamında ferrosenil siklotetrafosfazen bileşiklerinin çeşitli patojen bakteriler ve mayalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve bileşiklerin oluşturduğu inhibisyon zon çaplarına bakıldığında diamin ve dialkoksi süstitüenti taşıyan bileşiklerin mikroorganizmalar üzerinde daha etkili olduğu, tüm bileşiklerin bakteriler üzerine mayalara göre ve Gram negatif bakteriler üzerine Gram pozitiflere göre daha yüksek etki gösterdiği belirlenmiştir. Yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren bileşiklerin MİK, MBK ve MFK değerleri belirlenmiş ve mikroorganizmaları düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği veya öldürdüğü (<15,63-2000 µM arasında) tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular göz önüne alındığında kullanılan bileşiklerin antimikrobiyal ajan olma potansiyeli ortaya çıkmıştır ayrıca daha ileri araştırmalar ile bileşiklerin mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyal etkinin mekanizmasının belirlenmesi önem taşımaktadır.
3. Bu tez kapsamında çalışılan ferrosenil siklotetrafosfazen türevlerinin L929 fibroblast ve DLD-1 kolon kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 yöntemi ile belirlenmiş ve fosfazen bileşiklerinin etkisi bir antikanser ilaç olan doksorubisin ile karşılaştırılmıştır. Fosfazen bileşiklerinden diamin ve dialkoksi süstitüenti taşıyan 2e, 2i, 2j ve 2l bileşiklerinin sitotoksik etkisinin diğer bileşiklerden yüksek olduğu belirlenmiştir. 2i (diamin süstitüe) bileşiğinin L929 fibroblast hücrelerine olan etkisi doksorubisinden düşük olduğu belirlenmiştir. Yine 2i bileşiğinin DLD-1 kolon kanser hücrelerine olan etkisinin düşük konsantrasyonlarda doksorubisinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucu elde edilen veriler değerlendirildiğinde diamin ve dialkoksi süstitüenti taşıyan bileşiklerin antikanser ajan olarak değerlendirilebileceği anlaşılmıştır.

Kanserin tedavisinde kullanılan pek çok bileşik incelenmiş ve incelemeler sonucunda ideal bir antikanser ajanın temel özellikleri belirlenmiştir. Bunlar:

- Cis konumunda, DNA azotları ile yer değiştirebilecek bir çift sert eksi yüklü ligand bulunmalıdır (klor veya oksijen gibi).
- Hücre zarından geçebilmeli ve suda çözünür olmalıdır.
- Diğer iki ligand tepkimede etkinliği olmayan primer ya da sekonder aminler olmalıdır [137].

Bu özelliklere bakıldığında bu bileşiklerin su içerisinde çözünebilen cis konumunda formları ile yapılacak olan in vivo çalışmalar sonucu antikanser ajan olma potansiyeli yüksek bileşiklerin ortaya çıkacağı düşünülmektedir.

4. Çalışmada kullanılan bileşiklerin DNA ile etkileşimi agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiş ve bileşiklerin çoğunun kapalı halkasal yapıda olan DNA'yı parçaladığı ayrıca DNA'nın kırılmasına sebep olarak doğrusal yapıda olan form III bandının oluşmasına sebep olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda bileşiklerin DNA ile etkileşime girerek DNA'nın hareketliliğini azalttığı belirlenmiştir. Bu durumun bu bileşiklerin DNA'ya kovalent olmayan elektrostatik etkileşimler aracılığı ile bağlanmış olabileceğini düşündürmektedir. Bileşikle etkileşime girmiş DNA'nın *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile enzim kesimleri yapılmış ve bazı bileşiklerin DNA'ya bu bölgelerden bağlandığı tespit edilmiştir. DNA'ya bu bölgelerden bağlanmadığı tespit edilen bileşiklerin farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA üzerinde farklı bölgelere bağlanıp bağlanmadığının belirlenmesi önerilmektedir.
5. Bu tez kapsamında çalışılmış olan tüm biyolojik aktivite deneylerinin sonuçları göz önüne alındığında özellikle diamin ve dialkoksi sübstitüenti taşıyan bileşiklerin daha yüksek aktiviteye sahip olduğu anlaşılmıştır. Etkinliği çok daha yüksek bileşiklerin sentezlenmesi durumunda bu bilgilerin dikkate alınması önerilmektedir.

Çalışmalar sonrası çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde bis-ferrosenil-2-trans-6-dispirosiklotetrafosfazen türevlerinin şimdiye kadar çalışılmış olan diğer fosfazen bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri dikkate alınarak geliştirilmeleri dahilinde iyi birer antimikrobiyal ve antikanser ajan olabileceği ve yeni çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Chandrasekhar, V., Thilagar, P., and Pandian, B. M. (2007). Cyclophosphazene-Based Multi-Site Coordination Ligands. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(9-10), 1045-1074.
2. Chandrasekhar, V., Senthil Andavan, G. T., Nagendran, S., Krishnan, V., Azhakar, R. and Butcher, R. J. (2003). Cyclophosphazene hydrazides as scaffolds for multi-ferrocenyl assemblies: Synthesis, structure, and electrochemistry. *Organometallics*, 22(5), 976-986.
3. Bovin, J.O., Galy, J., Labarre, J.F. and Sournies, F. (1978). Cyclophosphazenes as novel potential antitumor agents: x-ray crystal structure of the octapyrrolidino cyclotetra phosphazene, $N_4P_4(NC_4H_8)_8$. *Journal of Molecular Structure*, 49(2), 421-423.
4. World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance, *WHO Report*, France, 1-65.
5. Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., and Singh, R. (2014). Antibiotic Resistance Among Commercially Available Probiotics. *Food Research International*, 57, 176-195.
6. Barker, K. F. (1999). Antibiotic resistance: a current perspective. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48(2), 109-124.
7. Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
8. Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J. L. and Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, 85(5), 2265-2289.
9. Feigin, V. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388, 1459-1544.
10. Işıklan, M., Sayın, L., Sonkaya, Ö., Hökelek, T., Türk, M. and Oğuztüzün, S. (2016). Synthesis, structural characterization, and cytotoxic activity of new spirocyclic octachlorocyclotetraphosphazenes. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 191(9), 1216-1222.
11. Gümüşderelioğlu, M. and Gür, A. (2002). Synthesis, characterization, in vitro degradation and cytotoxicity of poly [bis (ethyl 4-aminobutyro) phosphazene]. *Reactive and Functional Polymers*, 52(2), 71-80.
12. Chaplin, A. B., Harrison, J. A., and Dyson, P. J. (2005). "Revisiting the Electronic Structure of Phosphazenes", *Inorganic Chemistry*, 44(23), 8407-8417.
13. Stokes H. N. (1895). On the Chloronitrides of Phosphorus. *American Chemistry, Journal*, 17; 275-291.

14. Stokes, H. N. (1897). On the chloronitrides of phosphorus (II). *American Chemistry, Journal*, 19; 782-795.
15. Allcock, H. R. (1972). Recent Advances in Phosphazene (Phosphonitrilic) Chemistry. *Chemical Reviews*, 72(4), 315-356.
16. Coles, S. J., Davies, D. B., Eaton, R. J., Hursthouse, M. B., Kiliç, A., Mayer, T. A., and Yenilmez, G. (2002). Chiral configurations of spermine-bridged cyclotriphosphazatrienes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (3), 365-370.
17. Hertzsch, T., Budde, F., Weber, E., and Hulliger, J. (2002). Supramolecular-Wire Confinement of 12 Molecules in Channels of the Organic Zeolite Tris (o-phenylenedioxy) cyclotriphosphazene. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(13), 2281-2284.
18. Allcock, H. R. (2003). *Chemistry and Applications of Polyphosphazenes*. Wiley-Interscience. 744
19. Zhu, X.-F., Liang, Y.-H., Zhang, D., Wang, L., YE, Y., and Zhao, Y. (2011). Synthesis and Characterization of Side Group-Modified Cyclotetraphosphazene Derivatives, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 186(2):281-286.
20. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. and Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of microorganisms* (Thirteenth Edition). London: Pearson, 84-756.
21. Curtis, M. M., and Sperandio, V. (2011). A complex relationship: the interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host. *Mucosal Immunology*, 4(2), 133-138.
22. Küçüker, M.A., Tümbay, E. ve Erturan, Z. (2002). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
23. Cohen, J. Powderly, W. and Opal, S. (2010). *Infectious Diseases* (Third Edition). China: Mosby, 1275-1287.
24. Talaro, K. P. (2005). Mc Graw Hill Education (Fifth edition). *Foundations in Microbiology*, 36-48.
25. Ortora, G., Funke, B.R. and Case, C. L. (2004). Pearson Benjamin Cummings, San Francisco (Eight edition) *Microbiolgy An Introduction*, 25-46.
26. Gow, N. A., Latge, J. P. and Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis and function. *Microbiology spectrum*.
27. Molina, M., Gil, C., Pla, J., Arroyo, J., and Nombela, C. (2000). Protein localization approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microscopy Research and Technique*, 51, 601-612.
28. Gow, N. A., Latge, J.-P. and Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology spectrum*, 5(3), 1-25.

29. Mishra, S. K. and Agrawal, D. (2012). Concise Manual of Pathogenic Microbiology. United States of America: *Wiley*, 17-24.
30. Saran, B., and Karahan, Z. C. (2010). Antimikrobiyal ajanlara genel bakış. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 1: 216-20.
31. Aktuğlu, Y. (1989). Klinikte Antibiyotik Kullanımı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayını, 156, 1-71.
32. Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology*, 1(1), 65-69.
33. Souli, M, Gallani, I, and Giamarellou, H. (2008). Emergence of extensively drug resistant and pan-drug resistant Gram negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance*;13(47):20.
34. Ferrara, M. (2006). Potentially multidrug-resistant nonfermentative gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*; 27:183-95.
35. Wright, D. G. (2003). Mechanisms Of Resistance To Antibiotics, *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 563-569.
36. Sağduyu, H. (1989). Aminoglikozid Antimikrobiyaller, *Kükem Dergisi* 9(1), 85-88.
37. Rogers, K. (2011). Infectious Diseases. United States: Britannica Educational Publishing.
38. Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 382-398.
39. Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 71-109.
40. Madhavan, H. N. and Sowmiya, M. (2011). Mechanisms of development of antibiotic resistance in bacteria among clinical specimens. *Journal of Clinical and Biomedical Sciences*, 1, 42-48.
41. Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41- 46.
42. Şenol, E. (2005). Antifungal tedavide kombine kullanım, *Flora*, 10(3), 103-107.
43. Kontoyiannis, D. P. and Lewis, R. E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *The Lancet*, 359, 1135-1144.
44. Shao, Y., Zhang, W., Gou, H., Pan, L., Zhang, H. and Sun, T. (2015). Comparative studies on antibiotic resistance in *lactobacillus casei* and *lactobacillus plantarum* food control, *Frontiers in Microbiology*, 50, 250-258.
45. Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382-398.

46. Arnesen, L. P. S., Fagerlund, A., and Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579-606.
47. Sietske, A., and Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 1-4.
48. Mielich-Süss, B., and Lopez, D. (2015). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 17(3), 555-565.
49. Jorgensen, J. H. and Pfaller, M. A. (2015). *Manual of Clinical Microbiology*. United States of America: ASM Press, 403-421.
50. Demiret, N. N., ve Karapınar, M. (2000). *Süt Ürünlerinde Staphylococcus aureus. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri 6. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı*. Tekirdağ: Rebel yayıncılık, 78-85.
51. Miessler, G.L., and Tarr, D. A. (1999). *Inorganic Chemistry*, (2. Baskı), Prentice Hall, Inc., 706s, Northfield, Minnesota.
52. Brooks, F., Butel, J. S., and Morse, S. (1998). *Medical microbiology, appleton & lange. Connecticut*, 740.
53. Herkmén B.T. ve Türkyılmaz S. (2016). Mastisitli sığırlardan izole edilen *Enterococcus faecium* izolatlarında gel E, esp ve efaAfm genlerinin varlığının incelenmesi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(2), 54-60.
54. Castillo-Rojas, G., Mazari-Hiriart, M., de León, S. P., Amieva-Fernández, R. I., Agis-Juárez, R. A., Huebner, J. and López-Vidal, Y. (2013). Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: Antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *Plos One*, 8(4), e59491.
55. Unat, E. (1982). *Tıp Bakteriolojisi ve Virolojisi*, İstanbul: Dergah Tıp Yayınları, 1182.
56. Todar, K. (2008). Pathogenic *E. coli*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. *Today's Online Text Book of Bacteriology*, 16-20.
57. Brooks, G. F., Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. (2010). *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. New York: McGraw-Hill, 175-178.
58. Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C., Naas, T., Carattoli, A. and Martínez-Medina, M. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437-463.
59. Uslu, H., Şengül, G., ve Aktaş, O. (2011). *Proteus Vulgaris*'in Neden Olduğu Nadir Bir Kraniyal Osteomyelit Olgusu. *Balkan Medicinal Journal*, 28, 113-115.
60. Tunalı, Y. (2009). *Farmasötik Mikrobiyoloji Uygulamaları*, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları, 65.
61. Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L. and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661.

62. Bilgehan, H. (2000). *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, (10. Baskı). İzmir: Barış Yayınları, 59-69.
63. Lee, K. M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R. and Hsieh, J. (2015). Review of Salmonella detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264-276.
64. Cohen, M. J., Tauxe, R.V. (1986). Drug resistant Salmonella in the United States :an epidemiologic perspective, *Science*, 234 : 964-969.
65. Coburn, B., Grassl, G. A. and Finlay, B. (2007). Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112-118.
66. Tümbay, E. (2009). Candida, Cryptococcus ve tıbbi önemi olan diğer mayalar, *Klinik Mikrobiyoloji*, (Cilt 2), (9. Baskı). (Ed. A. Başustaoğlu, A. Kubar, Ş.T. Yıldırım, M. Tanyüksel), Ankara: Atlas Kitapçılık, 1762-1764.
67. Tatçı, Ç. (1999). *Bazı Bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 35.
68. Calderone, R. A. and Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of Candida albicans. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327-335.
69. McCullough, M., Ross, B. and Reade, P. (1996). Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 25(2), 136-144.
70. Wingard, J. R., Merz, W. G., Rinaldi, M. G., Johnson, T. R., Karp, J. E., and Saral, R. (1991). Increase in Candida krusei infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *New England Journal of Medicine*, 325(18), 1274-1277.
71. Chen, Y.-L., Yu, S.-J., Huang, H.-Y., Chang, Y.-L., Lehman, V. N., Silao, F. G. S., Bigol, U. G., Bungay, A. A. C., Averette, A. and Heitman, J. (2014). Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of Candida tropicalis. *Eukaryotic cell*, 13, 7, 844-854.
72. Stewart, B. and Wild, C. P. (2014). *World cancer report 2014*, WHO Report, France, 16-54.
73. Yardım, N., Mollahaliloglu, S., Başara, B. B. (2009). *Türkiye'de Kanser Durumu ve Uluslararası Göstergeler İle Uyumunun Değerlendirmesi*, Tuncer, A. M., Özgül, N., Olcayto, E. ve Gültekin, M., Türkiye'de Kanser Kontrolü, T.C. Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı, Ankara, 51-63.
74. Chan, G.C., Chan, W.K. and Sze, D.M. (2009). The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology Oncology*, 2, 25.
75. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 100(1), 57-70.

76. Almeida, C. A., and Barry, S. A. (2010). *Cancer: Basic Science and Clinical Aspects*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1-23.
77. Bhatt, A. P., Redinbo, M. R., and Bultman, S. J. (2017) The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 67(4), 326-44.
78. Akgün, H., Balkan, A., Bilgin, A.A., Çalı, G. Ü., Dalkara, S., Erdoğan, H., Demir, D., Ertan, M., Gökhan, N., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç, S. ve Tozkoparan, B. (2004). *Farmasötik Kimya-Temel Kavramlar*, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
79. Ringer, D.P. and Schnipper, L.E. (2001). Principles of Cancer Biology. İn: R.E. Lenhard, R.T. Osteen, T. Gansler (Eds.), *Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society*, 21-35.
80. Dalay, N. (2000). *Kanser Biyolojisi*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 48-53.
81. Scriver, C. R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (2001). *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: Mc Graw-Hill, 613-74.
82. Pazarbaşı, A. and Kasap, M. (2003). *Kanser Genetiği*. Dergi Park, 12, 328-330.
83. Çoğullu, Ö., Alpman, A., Durmaz, B., ve Özkinay, F. (2007). Mitoz ve mayozun moleküler temelleri. *Journal of Medical Sciences*, 27, 725-735.
84. Liu, D. and Wang, L. (1994). Onkogenes, Protein Tyrosine Kinases, and Signal Transduction. *Journal Biomedical Science*, 2, 65-82.
85. Kopnin, P. (2000). Targets of onkogenes and tümör suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 1, 2-27.
86. Almasan, A., Yin, Y., Kelly, R., Lee, E., Bradley, A., Bertino, J. and Wahl, G. (1995). Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 92(54), 36-40.
87. Su, Z., Yang, Z., Xu, Y. and Chen, Y. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14(1), 48.
88. Akşit, H. ve Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 55-63.
89. Eser, S. (2015). Türkiye’de yaşam boyu kanser olma yığılımlı riskleri. *Turk J Public Health*; 13(2), 87-96.
90. İnternet: National Comprehensive Cancer Network (NCCN). URL: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.nccn.org%2Fprofessionals%2Fphysician_gls%2Ff_guidelines.asp&date=2019-01-02, Son Erişim Tarihi: 22.05.2015.

91. İnternet: Türkiye kanser istatistikleri. URL: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/1026-2015-y%C4%B1%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html>.<http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fhsgm.saglik.gov.tr%2Ftr%2Fkanser-istatistikleri%2Fyillar%2F1026-2015-y%C4%B1%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html&date=2019-01-02>
92. Manosroi, A., Akazawa, H., Akihisa, T., Jantrawut, P., Kitdamrongtham, W., Manosroi, W., and Manosroi, J. (2015). In vitro anti-proliferative activity on colon cancer cell line (HT-29) of Thai medicinal plants selected from Thai/Lanna medicinal plant recipe database "MANOSROI III". *Journal Ethnopharmacol*, 161, 11-17.
93. Raskov, H., Pommergaard, H.-C., Burcharth, J. and Rosenberg, J. (2014). Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, 20(48), 18151.
94. Fredericks, E., Dealtry, G. and Roux, S. (2015). Molecular aspects of colorectal carcinogenesis: a review. *Journal of Cancer Biology and Research*, 3(1), 1057.
95. Asmafiliz, N., Kilic, Z., Ozturk, A., Suzen, Y., Hokelek, T., Acik, L., Celik, Z. B., Koc, L. Y., Yola, M. L. and Ustundag, Z. (2013). Phosphorus-Nitrogen Compounds: Part 25. Syntheses, Spectroscopic, Structural and Electrochemical Investigations, Antimicrobial Activities, and DNA Interactions of Ferrocenyldiaminocyclotriphosphenes. *Phosphorus Sulfur*, 188(12), 1723-1742.
96. Roper, J., and Hung, K. E. (2013). Molecular Mechanisms of Colorectal Carcinogenesis. In Haigis, K. M. (Eds.), *Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer*. New York: Springer, 25-65
97. Zeuner, A., Todaro, M., Stassi, G. and De Maria, R. (2014). Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic. *Cell Stem Cell*, 15(6), 692-705.
98. Aykan, N. F., Yalçın, S., Turhal, N. S., Özdoğan, M., Demir, G., Özkan, M., Yaren, A., Camcı, C., Akbulut, H. and Artaç, M. (2015). Epidemiology of colorectal cancer in Turkey: A cross-sectional disease registry study (A Turkish Oncology Group trial). *Turkish Journal of Gastroenterology*, 26(2), 145-153.
99. Jemal, A., Simard, E. P., Dorell, C., Noone, A. M., Markowitz, L. E., Kohler, B., and Cronin, K. A. (2013). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)–associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 105(3), 175-201.
100. Hajiaghaalipour, F., Kanthimathi, M. S., Sanusi, J., and Rajarajeswaran, J. (2015). White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. *Food Chemistry*, 169, 401-10.
101. Avendaño, C. and Menendez, J. C. (2015). Medicinal chemistry of anticancer drugs. United States of America: *Elsevier Science*, 1-8.

102. Kintzel, P.E. (2001). Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management. *Drug Safety*, 24, 19-38.
103. Oktar, N. (2009). *K562 Hücre Dizisinde Fosfin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkisinin Mtt (3-[4,5-dimethylthiazole-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromide; Thiazolyl Blue) ile Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
104. DeVita, V. T., Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*; 68(21), 8643-8653.
105. Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C. A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R. A., and Dai, R. M. (2013). Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*, 342(6161), 967-970.
106. Kayaalp, S. O. (1998). *Tıbbi Farmakoloji* (8. Baskı), Ankara: Hacettepe Kitapçılık, 376-411.
107. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. and Flower, R. J., and Henderson, G. (2012). *Rang and Dale's Pharmacology*, New York, 673-688.
108. Can, G. (2005). Side Effects of Antineoplastic Drugs and Nursing Approaches. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, 2(2), 8-15.
109. Rauf, S., Gooding, J. J., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A. and Khalid, A. M. (2005). Electrochemical approach of anticancer drugs--DNA interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(2), 205-217.
110. Klug, W.S., Cummings, M.R. and Spencer, C.A. (1997). *Concepts of genetics*. New York: Prentice Hall Englewood Cliffs.
111. Watson, J. D. and Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356), 737-738.
112. Wing, R., Drew, H., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. and Dickerson, R. (1980). Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature*, 287, 755-758.
113. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. and Martin, K. C. (2016). *Molecular Cell Biology*. (Seventh Edition). United States of America: W. H. Freeman Company, 6-22.
114. Li, H., Mei, W.J., Xu, Z.H., Pang, D.W., Ji, L.N. and Lin, Z.H. (2007). Electrochemistry of a novel monoruthenated porphyrin and its interaction with DNA, *Journal Electroanal Chemistry*, 600, 243–250.
115. Dehghan, G., Dolatabadi, J. E., Jouyban, A., Zeynali, K. A., Ahmadi, S. M. and Kashanian, S. (2011). Spectroscopic studies on the interaction of quercetin-terbium (III) complex with calf thymus DNA. *DNA and Cell Biology*, 30(3), 195-201.
116. Hasanzadeh, M. and Shadjou, N. (2016). Pharmogenomic study using bio and nanobioelectrochemistry: Drug-DNA interaction. *Materials Science and Engineering C*, 1003-1004.

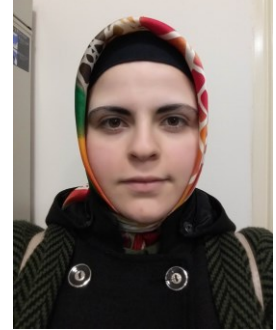
117. Mc Evoy, G.K. (2004). AHFS 2004 Drug Information. Bethesda. Maryland: American Society of Health-System Pharmacists, *Inc*, 929-945.
118. Sirajuddin, M., Ali, S. and Badshah, A. (2013). Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry Photobiology*, 124, 1-19.
119. Sirajuddin, M., Ali, S. and Badshah, A. (2013). Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 124, 1-19.
120. Fu, D., Calvo, J. A. and Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(2), 104-120.
121. Leung, C. H., Chan, D. S. H., Ma, V. P. Y. and Ma, D. L. (2013). DNA-Binding Small Molecules as Inhibitors of Transcription Factors. *Medicinal Research Reviews*, 33(4), 823-846.
122. Wilhelm, M., Mukherjee, A., Bouvier, B., Zakrzewska, K., Hynes, J. T. and Lavery, R. (2012). Multistep Drug Intercalation: Molecular Dynamics and Free Energy Studies of the Binding of Daunomycin to DNA. *Journal of American Chemical Society*, 134(20), 8588-8596.
123. Top, M., Er, O., Congur, G., Erdem, A. and Lammrecht, F. (2016). Intracellular uptake study of radiolabeled anticancer drug and impedimetric detection of its interaction with DNA. *Talanta*, 160, 157-163.
124. Rajendiran, V., Palaniandavar, M., Periasamy, V. and Akbarsha, M. (2012). New [Ru(5,6-dmp/3,4,7,8-tmp)2(diimine)]²⁺ complexes: Non-covalent DNA and protein binding, anticancer activity and fluorescent probes for nuclear and protein components. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 116, 151-162.
125. Palchaudhuri, R. and Hergenrother, P. J. (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 497-503.
126. Van Staveren, D. R. and Metzler-Nolte, N. (2004). Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chemical Reviews*, 104(12), 5931-5986.
127. Berberoğlu, İ., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Türk, M., Soltanzade, H. and Dal, H. (2016). Phosphorus nitrogen compounds: Part 34. Syntheses, structural investigations, cytotoxic and biological activities of spiro-ansa-spiro and spiro-bino-spiro tetrameric phosphazene derivatives. *Inorganica Chimica Acta*, 446, 75-86.
128. Asmafiliz, N., Kilic, Z., Ozturk, A., Suzen, Y., Hokelek, T., Acik, L., Celik, Z. B., Koc, L. Y., Yola, M. L. and Ustundag, Z. (2013). Phosphorus-Nitrogen Compounds: Part 25. Syntheses, Spectroscopic, Structural and Electrochemical Investigations, Antimicrobial Activities, and DNA Interactions of Ferrocenyldiaminocyclotriphosphenes. *Phosphorus Sulfur*, 188(12), 1723-1742.

129. Akbas, H., Okumus, A., Kilic, Z., Hokelek, T., Suzen, Y., Koc, L. Y., Acik, L. and Celik, Z. B. (2013). Phosphorus-nitrogen compounds part 27. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing secondary amino and pendant (4-fluorobenzyl)spiro groups. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 294-307.
130. Akbaş, H., Okumuş, A., Karadağ, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Aydın, B. and Türk, M. (2016). Phosphorus–nitrogen compounds. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123(2), 1627-1641.
131. Elmas, G., Okumuş, A., Koç, L. Y., Soltanzade, H., Kılıç, Z., Hökelek, T., Dal, H., Açık, L., Üstündağ, Z. and Dündar, D. (2014). Phosphorus–nitrogen compounds. Part 29. Syntheses, crystal structures, spectroscopic and stereogenic properties, electrochemical investigations, antituberculosis, antimicrobial and cytotoxic activities and DNA interactions of ansa-spiro-ansa cyclotetraphosphazenes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 662-676.
132. Tümer, Y., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Yola, M. L., Solak, A. O., Öner, Y. and Dündar, D. (2013). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 28. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing vanillinato and pendant ferrocenyl groups. *Journal of Molecular Structure*, 1049, 112-124.
133. Koçak, S. B., Koçoğlu, S., Okumuş, A., Kılıç, Z., Öztürk, A., Hökelek, T., Öner, Y. and Açık, L. (2013). Syntheses, spectroscopic properties, crystal structures, biological activities, and DNA interactions of heterocyclic amine substituted spiro-ansa-spiro-and spiro-bino-spiro-phosphazenes. *Inorganica Chimica Acta*, 406, 160-170.
134. Elmas, G., Okumus, A., Kilic, Z., Hokelek, T., Acik, L., Dal, H., Ramazanoglu, N. and Koc, L. Y. (2012). Phosphorus-Nitrogen Compounds. Part 24. Syntheses, Crystal Structures, Spectroscopic and Stereogenic Properties, Biological Activities, and DNA Interactions of Novel Spiro-ansa-spiro- and Ansa-spiro-ansa-cyclotetraphosphazenes. *Inorganic Chemistry*, 51(23), 12841-12856.
135. İlter, E. E., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Açık, L., Yavuz, M., Bali, E. B., Solak, A. O., Büyükkaya, F., Dal, H. and Hökelek, T. (2010). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 19. Syntheses, structural and electrochemical investigations, biological activities, and DNA interactions of new spirocyclic monoferrocenylcyclotriphosphazenes. *Polyhedron*, 29(15), 2933-2944.
136. Baştırzi, N. S., Koçak, S. B., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Çelik, Ö., Türk, M., Koç, L. Y., Açık, L. and Aydın, B. (2015). Syntheses, structural characterization and biological activities of spiro-ansa-spiro-cyclotriphosphazenes. *New Journal of Chemistry*, 39(11), 8825-8839.
137. Miessler, G.L., Tarr, D.A. (1999). *Inorganic Chemistry*, (İkinci Baskı), Prentice Hall, Inc., 706s, Nortfield, Minnesota.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇELİK, Süheyla Pınar
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 03.06.1993, Tokat
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0 (541) 362 85 39
 e-mail : pinarsuheylacelik@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2015
Lise	Tokat Mehmet Akif Ersoy Lisesi	2011

Yabancı Dil

İngilizce
 Almanca

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Yıldırım, Y., Çetin, A., Özkan, H., Yavuz, S., Açık, L., and Çelik, S. P. (2018). Synthesis and DNA binding of new adenine derivatives incorporating 5-((Alkylthio)-1,3,4-oxadiazol-2-yl) methyl moiety. *Medicinal Chemistry Research*, 27(8), 2027-2033.
2. Tümer, Y., Asmafiliz, N., Zeyrek, C. T., Kılıç, Z., Açık, L., Çelik, P. S., Türk, M., Tunalı, B. Ç., Ünver, H., and Hökelek, T. (2018). Syntheses, spectroscopic and crystallographic characterizations of cis- and trans-dispirocyclic ferrocenylphosphazenes: Molecular dockings, cytotoxic and antimicrobial activities. *New Journal of Chemistry*, 42, 1740-1756.

3. Elmas, G., Okumuş, A., Cemaloğlu, R., Kılıç, Z., Çelik, S. P., Açık, L., Tunalı, B. Ç., Türk, M., Çerçi, N. A., Güzel, R., and Hökelek, T. (2017). Phosphorus-nitrogen compounds. part 38. Syntheses, characterizations, cytotoxic, antituberculosis and antimicrobial activities and DNA interactions of spirocyclotetraphosphazenes with bis-ferrocenyl pendant arms. *Journal of Organometallic Chemistry*, 853, 93-106.
4. Elmas, G., Okumuş, A., Kılıç, Z., Çelik, S. P., and Açık, L. (2017). The Spectroscopic and Thermal Properties, Antibacterial and Antifungal Activity and DNA Interactions of 4-(Fluorobenzyl)Spiro(N/O) Cyclotriphosphazanium Salts. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 4(3), 993-1016.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Celik, S. P., Acik, L., Elmas, G., Kılıc, Z. (2017 22-25 May). Investigations of antimicrobial activities and DNA interactions of bisferrocenyl-2-trans-6-dispiro-cyclotetra phosphazenes. *VI. International Congress of Molecular Medicine Istanbul*; Poster Bildiri.

Proje

1. 2-Piridil-Spiro-Siklotrifosfazenlerin ve Tuzlarının Klasik ve/veya Mikrodalga Yöntemleri ile Sentezi, Yapılarının Karakterizasyonu, Antimikrobiyal, Antitüberküloz ve Sitotoksik Aktivitelerinin İncelenmesi. (2018). TÜBİTAK, Proje no:210z105

Hobiler

Desenli peçete koleksiyonu yapmak, kurşun kalem koleksiyonu yapmak



GAZİ GELECEKTİR...