



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**3-(TRİMETOKSİSİLİL) PROPİL DİMETİL
OKTADESİL AMONYUM Klorür (ANTİMİC)
ÜRÜNÜNÜN OLASI ANTİBAKTERİYEL
ETKİ MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

İlknur ŞİRİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON-2021



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**3-(TRİMETOKSİSİLİL) PROPİL DİMETİL
OKTADESİL AMONYUM Klorür (ANTİMİC)
ÜRÜNÜNÜN OLASI ANTİBAKTERİYEL
ETKİ MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

İlknur ŞİRİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON-2021

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi İlknur ŞİRİN'in hazırladığı "3-(trimetoksisilil) Propil Dimetil Oktadesil Amonyum Klorür (Antimic) Ürününün Olası Antibakteriyel Etki Mekanizmasının Araştırılması" başlıklı çalışma Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18.03.2021

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../2021 tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eseri olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

21.01.2021
İlknur ŞİRİN
(İmza)

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan canım annem ve canım babama ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitime başlamam hususundaki görüşleri ve teşvikleri için değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Feride Sena SEZEN ve sayın Doç. Dr. Arzu ÖZEL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın planlanmasında, hazırlanmasında ve sürdürülmesinde bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, maddi ve manevi desteğiyle yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Arzu ÖZEL'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın gerek deneysel gerekse teorik aşamalarında içinde bulunduğu yoğun doktora dönemine rağmen bilgisini, tecrübesini ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Burak BARUT'a teşekkür ederim Ayrıca tez çalışmamda yer alan hücre kültürü ve sitotoksite çalışmalarının gerçekleştirilmesini sağlayan KTÜ Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Can Özgür YALÇIN hocama teşekkür ederim. Yüksek lisans tez çalışmamda kullandığım TPOAC etken maddesini tedarik etmemizi sağlayan Sabancı Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Nano Mühendislik Programı öğretim üyesi sayın hocam Prof. Dr. Yusuf MENCELOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı, 8057 numaralı BAP08 projesi kapsamında maddi açıdan destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca yaşadığım her türlü sıkıntıda görüşlerini ve yardımlarını benimle paylaşmaktan çekinmeyen sevgili Arş. Gör. Fikret YANAR'a, desteklerini her daim üzerimde hissettiğim sevgili dostlarıma ve verdikleri emeklerin karşılığını asla ödeyemeyeceğimi bildiğim canım annem Saliha ŞİRİN ve canım babam Osman ŞİRİN'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İlknur ŞİRİN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antibakteriyel Direnç	3
2.1.1. Antibakteriyellerin Tarihçesi	3
2.1.2. Antibakteriyellerin Faydaları	6
2.1.3. Antibakteriyel Direnç Gelişimi ve Bakteriyel Direnç Mekanizmaları	7
2.1.4. Antibakteriyel Direncin Nedenleri ve Sonuçları	10
2.1.5. Direnç Gelişimini Azaltmak İçin Alınabilecek Önlemler	12
2.2. Dezenfeksiyon ve Dezenfektanlar	13
2.2.1. Dezenfeksiyon Tarihi ve Önemi	13
2.2.2. Dezenfeksiyon Yöntemleri	15
2.2.3. Dezenfektanların Sınıflandırılması	16
2.2.4. Dezenfektanların Etki Mekanizmaları	17
2.3. Kuarterner Amonyum Bileşikleri	20
2.4. DNA ve Yapısı	24
2.4.1. DNA Nükleaz Aktivitesi	30
2.5. Topoizomerazlar	33
2.5.1. Tip I Topoizomerazlar	34

2.5.2. Tip II Topoizomerazlar	37
2.6. Topoizomerazların İnhibisyonu	40
2.7. MTT Sitotoksosite Testi	42
3. GEREÇ ve YÖNTEM	45
3.1. Gereçler	45
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	45
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	46
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	47
3.2. Yöntem	48
3.2.1. DNA Nükleaz Çalışması	48
3.2.2. Topoizomeraz Enzim İnhibisyonları	48
3.2.2.1. <i>E. coli</i> Topoizomeraz I İnhibisyonu	49
3.2.2.2. <i>E. coli</i> DNA Giraz İnhibisyonu	49
3.2.2.3. <i>E. coli</i> Topoizomeraz IV İnhibisyonu	49
3.2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	50
3.2.3.1. Hücre Dizisinin Açılması, Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması	50
3.2.4. MTT Hücre Canlılık Testi	51
4. BULGULAR	53
4.1. DNA Nükleaz Etkinliği	53
4.2. Topoizomeraz Enzim İnhibisyonları	55
4.2.1. <i>E. coli</i> Topoizomeraz I İnhibisyonu	55
4.2.2. <i>E. coli</i> DNA Giraz İnhibisyonu	55
4.2.3. <i>E. coli</i> Topoizomeraz IV İnhibisyonu	56
4.3. MTT Hücre Canlılık Testi	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
6. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	85

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Kimyasal yapılarına göre dezenfektanlar	17
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan cihazlar	45
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	46
Tablo 4.	Etkin maddenin HaCaT hücre hattına karşı sitotoksisite sonuçları	57
Tablo 5.	SDS'nin HaCaT hücre hattına karşı sitotoksisite sonuçları	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Salvarsanın kimyasal yapısı	4
Şekil 2. Prontosilin kimyasal yapısı	4
Şekil 3. Antibakteriyel ilaçların keşif evreleri	6
Şekil 4. Bakteriyel direnç mekanizmaları	9
Şekil 5. Dezenfektanların etki mekanizmaları	19
Şekil 6. Kuarterner amonyum bileşiklerinin genel yapısı	20
Şekil 7. KAB'lerin kimyasal yapıları	21
Şekil 8. KAB'lerin antibakteriyel etki mekanizmaları	22
Şekil 9. TPOAC'ın kimyasal yapısı	24
Şekil 10. DNA molekülünün çift sarmal yapısı	26
Şekil 11. Pürin ve pirimidin bazlarının kimyasal yapıları	27
Şekil 12. Pentoz şekerlerinin kimyasal yapıları	27
Şekil 13. DNA'daki küçük ve büyük oluklar	28
Şekil 14. DNA'nın A-, B- ve Z- formları	29
Şekil 15. Oksidatif ve hidrolitik DNA kesimin mekanizmaları	31
Şekil 16. Plazmid DNA formları	32
Şekil 17. Topoizomerazların sınıflandırması	34
Şekil 18. Ökaryotik tip IA topoizomeraz enzimi	35
Şekil 19. <i>E. coli</i> DNA topoizomeraz I'in 67 kDa N-terminal fragmanının yapısı	36
Şekil 20. Tip I/tip II topoizomerazlar ve kataliz mekanizmaları	37
Şekil 21. Tip II topoizomerazların yapısı	38
Şekil 22. Tip II topoizomerazların etki mekanizması	39
Şekil 23. <i>E. coli</i> DNA giraz enziminin yapısı	40
Şekil 24. MTT'nin formazana dönüşümü	44
Şekil 25. TPOAC bileşiğinin süpersarmal plazmid DNA ile 15, 30 ve 60 dakikalık inkübasyonu sonrasında süpersarmal DNA oranı	54
Şekil 26. Etken maddenin HaCaT hücre hattına karşı sitotoksikite sonuçları	58
Şekil 27. SDS'nin HaCaT hücre hattına karşı sitotoksikite sonuçları	59

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Agaroz jel elektroforezi	50
Resim 2.	TPOAC bileşğinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (15 dakika 37 °C)	53
Resim 3.	TPOAC bileşğinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (30 dakika 37 °C)	53
Resim 4.	TPOAC bileşğinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (60 dakika 37 °C)	53
Resim 5.	TPOAC bileşğinin <i>E.coli</i> topoizomeraz I inhibisyonu	55
Resim 6.	TPOAC bileşğinin <i>E. coli</i> DNA Giraz inhibisyonu.	56
Resim 7.	TPOAC bileşğinin <i>E. coli</i> topoizomeraz IV inhibisyonu	56

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ATMACs	Alkiltrimetilamonyum bileşikleri
ATP	Adenozin trifosfat
BACs	Benzilalkildimetilamonyum bileşikleri
BSA	Sığır serum albümin
CDC	Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri
DADMACs	Dialkildimetilamonyum klorür bileşikleri
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Ditiyoeritol
EB	Etidyum Bromür
ECHA	European Chemicals Agency
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPA	Environmental Protection Agency
HaCaT	İnsan keratinositi
HGT	Horizontal gen transferi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRIPT	İnsan Yineleyici Yama Testi
KAB	Kuarterner amonyum bileşikleri
ME	β -merkaptöetanol
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolyum bromür
NAD(P)H	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO·	Nitrik oksit radikali
O₂·	Süperoksit radikali
PBP	Penisilin bağlayan protein
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat

TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
TOPRIM	Topoizomeraz-primaz
TPOAC	3-(trimetoksisilil) propil dimetil oktadesil amonyum klorür
Simgeler	
ppm	Parts per million
nm	Nanometre
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
rcf	Relative centrifugal force/field
mA	Miliamper
V	Volt
Å	Angstrom
Formüller	
HCl	Hidroklorik asit
KCl	Potasyum klorür
MgCl₂	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum klorür

ÖZET

3-(Trimetoksisilil) Propil Dimetil Oktadesil Amonyum Klorür (Antimic) Ürününün Olası Antibakteriyel Etki Mekanizmasının Araştırılması

DNA, tüm biyolojik ve fizyolojik fonksiyonlarımızdan sorumlu olan en önemli genetik materyaldir. DNA'nın yeniden replike olabilmesi için topoizomeraaz adı verilen bir grup enzime ihtiyaç vardır. Bu enzimler DNA iplikçiklerinin açılıp tekrar birleştirilmesiyle DNA topolojisini düzenleyen, DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyon ve onarımı gibi işlemlerin sürdürülmesini sağlayan önemli enzimlerdir. Topoizomeraazların inhibisyonuyla, hücre döngüsünün ligasyon aşaması bloke olup, genomun bütünlüğü zarar görmekte ve hücrede apoptozise yol açan tek ve çift sarmallı kopmalar meydana gelmektedir. Bu nedenle topoizomeraaz enzimleri, yeni antibakteriyel ajanların keşfi ve geliştirilmesi bakımından oldukça önemli hedeflerdir.

Bu çalışmada, Antimic® adlı ürünün etken maddesi olan 3-(trimetoksisilil) propil dimetil oktadesil amonyum klorürün (TPOAC) olası antibakteriyel etki mekanizmasının aydınlatılabilmesi amacıyla bileşiğin DNA nükleaz aktivitesi, DNA giraz, topoizomeraaz I ve IV inhibisyon etkisi incelenmiştir. DNA kesim ve topoizomeraaz inhibisyon çalışmaları agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA nükleaz çalışmaları sonucunda bileşiğin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak DNA kesim aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Bunun yanında bileşiğin konsantrasyona bağlı olarak topoizomeraaz I, IV ve DNA giraz enzimleri üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bileşiğin topikal kullanıma uygun beşeri ve/veya veteriner bir ilaç olarak geliştirilebilme potansiyelinin olduğu düşünülerek yapılan *in vitro* MTT sitotoksosite çalışmaları sonucunda bileşiğin konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümü meydana getirdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel direnç, Dezenfektan, DNA, DNA giraz, DNA topoizomeraazlar

ABSTRACT

Investigation of Potential Antibacterial Mechanism of Action of 3-(Trimethoxysilyl) Propyl Dimethyl Octadecyl Ammonium Chloride (Antimic)

DNA is the most important genetic material as it is responsible for all biological and physiological functions. In order to DNA to be replicated again, a group of enzymes called topoisomerase are needed. These enzymes regulate DNA topology by opening and recombining DNA strands and are important for processes like DNA replication, transcription, recombination and repair. By inhibition of topoisomerases, the ligation step of the cell cycle is blocked, the integrity of the genome is impaired, and the single and double stranded breaks occur which lead to apoptosis in the cell. For this reason, topoisomerase enzymes are very important targets for the discovery and development of new antibacterial agents.

In this study, DNA nuclease activity, DNA gyrase, topoisomerase I and IV inhibition effect of the compound were investigated to elucidate the possible antibacterial action mechanism of trimethoxysilyl propyl octadecyl ammonium chloride (TPOAC), the active ingredient of the product called Antimic®. DNA cleavage and topoisomerase inhibition studies were carried out using agarose gel electrophoresis method. As a result of DNA nuclease studies, it was found that the compound showed DNA nuclease activity depending on the concentration and time. In addition, it was determined that the compound exerts inhibitory effect on topoisomerase I, IV and DNA gyrase enzymes in a concentration dependent manner. In addition, as a result of *in vitro* MTT cytotoxicity studies carried out considering that the compound has the potential to be developed as a human and/or veterinary drug suitable for topical use, it was observed that the compound caused cell death in a concentration dependent manner.

Keywords: Anti-bacterial resistance, Disinfectant, DNA, DNA gyrase, DNA topoisomerases

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Antibiyotikler, modern tıp ve ayakta tedavi hizmetlerinin temelini oluşturan yapı taşlarından biridir (1). Penisilinlerin ortaya çıkmasıyla başlayan antibiyotik dönemi, insan sağlığında uzun yıllar sürecektir iyileştirici bir etki oluşturmıştır (2). Bir zamanlar ciddi ve hatta bazen ölümcül olabilen hastalıkların çoğu antibiyotiklerin keşfiyle birlikte tedavi edilebilir ve önlenabilir hale gelmiştir (3).

Son zamanlarda giderek artan bilinçsiz antibiyotik tüketimi ile birlikte metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve vankomisine dirençli enterokoklar gibi çeşitli dirençli bakteri suşları ortaya çıkmaya başlamıştır (4). Antibakteriyel ilaçların bilinçsiz ve sık kullanımları sonucu gelişen bu bakteriyel direnç, tedavi edilemeyen enfeksiyonların oranında bir yükselişe, hastalıkların tedavi süresinde uzamaya ve sağlık hizmeti giderlerinde bir artışa neden olmuştur (2, 5). Tüm bunların sonucunda enfeksiyonlar ve dirençli mikroorganizmalara karşı etkili yeni antibakteriyel bileşiklerin arayışına olan ilgi artmıştır.

Yeni antibakteriyel bileşiklerin keşfi ve optimizasyonu her ne kadar zor olsa da son yıllarda bu amaçla yapılmış oldukça başarılı çalışmalar bulunmaktadır. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)'a etkili seftarolin ve seftobiprol, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörlerinin yeni kombinasyonları olan seftolozan/tazobaktam, seftazidim/avibaktam, imipenem/relebaktam ve meropenem/RPX7009 geliştirilmekte olan bu bileşiklere birer örnektir (6).

Piyasada mevcut olan antibakteriyel bileşikler etkilerini, bakteri hücre duvar sentezini bozarak ve litik enzimleri aktive ederek, sitoplazma membran permeabilitesini veya ribozomlarda protein sentezini bozarak göstermektedir (7). Bu bileşiklerin ana hedeflerinden bir diğeri ise bakteriyel replikasyonda önemli bir role sahip olan DNA topoizomeraz enzimleridir. DNA topoizomeraz enzimlerini inhibe eden bu bileşikler etkilerini bakteri genetik materyalinin çoğalmasını önleyerek göstermektedir (8).

Günümüzde en önemli genetik materyal olarak kabul edilen DNA, hücre içinde süpersarmal bir yapıda bulunmaktadır (9, 10). DNA'nın yeniden replike olabilmesi için bu yapının açılması gerekmektedir (10). Bu noktada devreye topoizomeraz denilen bir grup enzim girmektedir. Topoizomerazlar, 1970 yılında James Wang tarafından *Escherichia coli* (*E.coli*)'de topoizomeraz I enziminin tanımlanmasıyla keşfedilmiştir.

James Wang topoizomerazları keşfettiğinde bu enzimler için ‘‘DNA dünyasının sihirbazları’’ demiştir. Bundan birkaç yıl sonra *E. coli* bakterisinde DNA’ya negatif süpersarmal bir yapı kazandırabilen yeni bir topoizomeraz olan DNA giraz keşfedilmiştir (7). Bu enzimler DNA iplikçiklerinin açılıp tekrar birleştirilmesiyle DNA topolojisini düzenleyen; DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyon ve onarımı gibi işlemlerin sürdürülmesini sağlayan enzimlerdir (8, 11, 12). Topoizomerazların inhibisyonuyla, hücre döngüsünün ligasyon aşaması bloke olup, genomun bütünlüğü zarar görmekte ve hücrede apoptozise yol açan tek ve çift sarmallı kopmalar meydana gelmektedir (13). Bu nedenle topoizomeraz enzimleri, yeni antibakteriyel ajanların keşfi ve geliştirilmesi bakımından oldukça önemli ilaç hedefleridir (14). Bu enzimlerin inhibisyonları antibakteriyel etkinin incelenmesi bakımından oldukça önemlidir.

Dezenfektanlar, patojenleri yok ederek mikrobiyal yükün azalmasını ve sağlık standartlarının korunmasını sağlayan ürünlerdir (15). Özellikle hastane gibi sağlık kuruluşlarında dezenfektan kullanımının doğru bir şekilde uygulanması, enfeksiyon salgınlarının ve antibiyotik reçetelerinin en aza indirilmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir (16). Kuarterner amonyum bileşikler (KAB), en yaygın kullanılan dezenfektanlar arasında yer almaktadır (17, 18). Bu tez çalışmasında NANOTEGO şirketinin ruhsatına sahip olduğu Antimic® adlı dezenfektanın etken maddesi olan alkoksisilan kuarterner amonyum yapısındaki 3-(trimetoksisilil) propil dimetil oktadesil amonyum klorür (TPOAC) bileşiği kullanılmıştır (19).

Antimic®, uygulandığı yüzeylerde çeşitli patojenlerin üremesini engellediği ve üremiş mikroorganizmaları öldürdüğü kanıtlanmış bir üründür (20). Antibakteriyel etkisi kanıtlanmış olan bu ürünün antibakteriyel etki mekanizmasına dair literatürde daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Günümüzde yalnızca dezenfektan olarak kullanılan bu maddenin antibakteriyel etki mekanizmasının aydınlatılması ile birlikte çeşitli mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılabilecek bir adjuvan olabilme potansiyeli ölçülmüş olup günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan bakteriyel dirençle mücadelede yeni bir bileşiğin literatüre kazandırılması umut edilmektedir. Bu amaçla TPOAC’ın, *E. coli* DNA nükleaz aktivitesi, DNA giraz, topoizomeraz I ve IV inhibisyon etkisi incelenmiştir. Bunun yanında etken maddenin topikal ya da sistemik kullanıma uygun beşeri ve/veya veteriner bir ilaç olarak geliştirilebilmesi potansiyelini ölçmek amacıyla MTT sitotoksikite testi yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibakteriyel Direnç

Enfeksiyon hastalıkları, günümüzdeki en önemli ölüm nedenlerinden biridir (21). Her yıl yaklaşık 17 milyon kişi bakteriyel enfeksiyonlar yüzünden hayatını kaybetmektedir (22). Özellikle Afrika gibi ülkelerde meydana gelen ölümlerin neredeyse yarısının enfeksiyon kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bakteriyel enfeksiyonların yol açtığı ölümler sadece Afrika gibi fakir ülkeleri etkilememektedir. Enfeksiyon hastalıkları ABD gibi gelişmiş ülkelerde de büyük bir sorun teşkil etmektedir (23). ABD’de her yıl yaklaşık 2.8 milyon enfeksiyon vakası görülmektedir. Ortaya çıkan bu enfeksiyonlar sonucu 35 000’den fazla kişi hayatını kaybetmektedir (24).

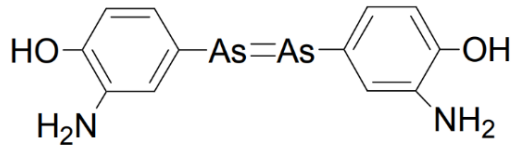
Antibakteriyeller, bakteriyel patojenlerin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarını önlemek ve tedavi etmek amacıyla kullanılan bileşiklerdir (25). Bu amaçla kullanılan bileşiklerin büyük bir çoğunluğunu antibiyotik denilen ilaçlar meydana getirmektedir. Antibiyotikler, mikroorganizmaların büyümesini durduran veya öldüren biyolojik kaynaklı ya da sentetik olarak elde edilebilen bileşiklerdir (26). Antibiyotik terimi Yunanca “anti (karşı)” ve “bios (yaşam)” kelimelerinden meydana gelmiştir (27). “*Antibiosis*” sözcüğü ise, “Mikroorganizmalar arasındaki karışıklık” anlamına gelmektedir (28). 70 yıldan daha uzun bir süredir patojenik mikroorganizmalar ile mücadelede kullanılan bu bileşikler insanlık tarihi için büyük bir öneme sahiptir (4).

2.1.1. Antibakteriyellerin Tarihçesi

İnsan toplumunun enfeksiyonlar ile olan mücadelesi eski çağlardan beri devam etmektedir. Antik Mısır, Yunanistan, Roma gibi dünyanın çeşitli yerlerinde mikrobiyal enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla şifalı bitkiler, bal ve hayvan dışkısı gibi çeşitli doğal yöntemlerin kullanıldığı bilinmektedir (29-31). Bunun dışında Çinlilerin küflü soya fasüyesini kullanarak yaptıkları ilaçları enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullandıklarını gösteren bazı kayıtlar mevcuttur. Benzer örneklerle çoğu toplumun geçmişinde rastlamak mümkündür (28).

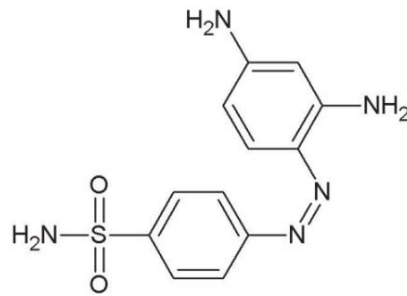
Mikroorganizma kaynaklı enfeksiyonların tedavisindeki ilk adım, 1877 yılında Pasteur ve Joubert adlı iki bilim adamı tarafından atılmıştır. Pasteur ve Joubert, yaptıkları deneyler sonucu şarbon basillerinin steril idrarda ürerken ortamda farklı bakteriler bulunması halinde üreyemediklerini ve öldüklerini keşfetmiştir (28).

Bununla birlikte mikrobiyoloji dünyasında enfeksiyonların mikroorganizmalarla tedavi edilebileceği düşüncesi gelişmiştir (28). Takip eden dönemlerde Alman bakteriyolog Paul Ehrlich tarafından ilk antimikrobiyal ajan olan salvarsan maddesi sentezlenmiştir (32). Arsenik bazlı bu madde uzun yıllar sifilizin erken dönem tedavisinde kullanılmıştır (27, 31). Şekil 1’de salvarsanın kimyasal yapısı gösterilmiştir (33).



Şekil 1. Salvarsanın kimyasal yapısı (Lloyd’dan, 33)

Sentetik yolla üretilmiş ilk antibakteriyel olan prontosil, 1935 yılında Gerhard Domagk tarafından sentezlenmiştir. Bir azo boya olan bu madde, *in vivo* antibakteriyel etkisini *p*-aminofenilsülfonamide metabolize olduktan sonra göstermektedir (34). Domagk bu buluşuyla 1938’de Nobel Tıp Ödülü’ne layık görülmüştür (35). Şekil 2’de prontosilin kimyasal yapısı gösterilmiştir (36).



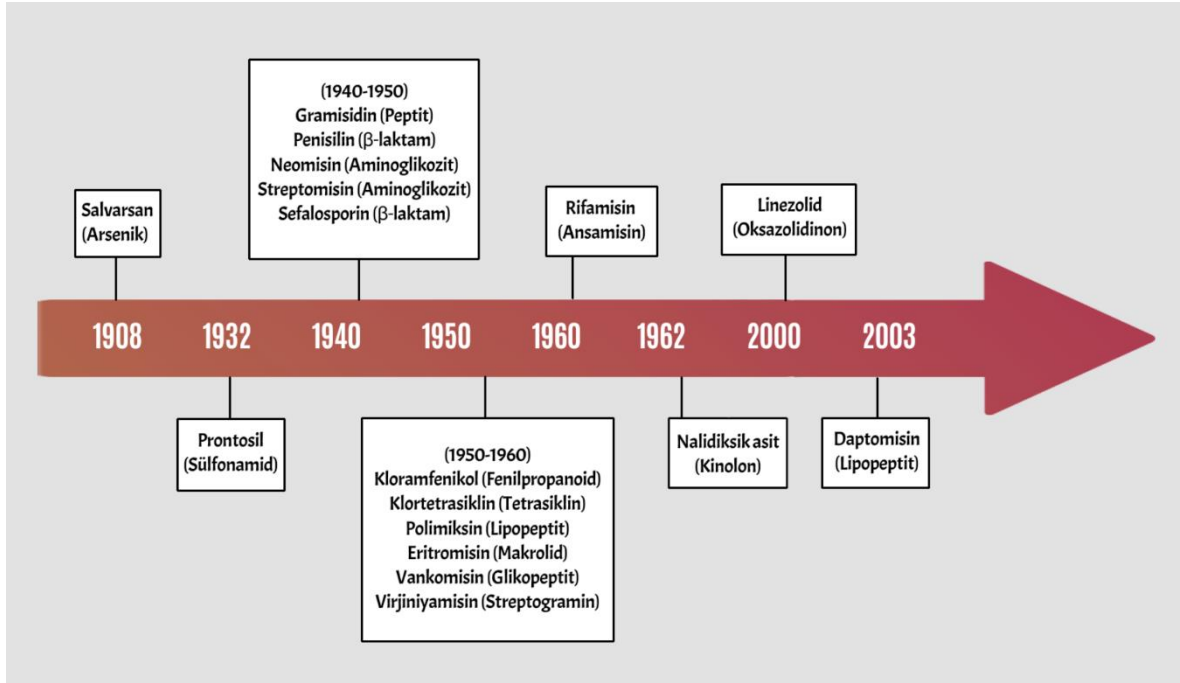
Şekil 2. Prontosilin kimyasal yapısı (Ünsalan’dan, 36)

Prontosilin keşfiyle birlikte sülfanamidler de piyasaya çıkmaya başlamıştır (34). Modern anlamda kemoterapi ilk olarak bu bileşiklerin kullanıma girmesiyle başlamıştır (27). Ayrıca insanlarda sistematik olarak kullanılan ilk antibiyotikler bunlardır (35).

Antibiyotik çağının en önemli dönemi 1928’de Alexander Fleming’in penisilini keşfetmesiyle başlamıştır (37). Bir bakteriyolog olan Fleming, çıktığı bir tatil sonrası laboratuvarına geri döndüğünde banko üzerinde bıraktığı *S. aureus* kolonisini bir çeşit küf ile kontamine olmuş halde bulmuştur. Dahası küfe yakın yerlerde bakteri üremesinin durduğu, küften uzak yerlerde ise kolonilerin normal olduğunu görmüştür. Bunun üzerine küfe neden olan mantarı saf olarak izole edip ayrı bir kültür ortamında yetiştirmiş ve benzer etkinin görülüp görülmeyeceğini test etmek amacıyla çeşitli bakteriler (özellikle gram pozitif bakteriler) üzerinde deneyler yapmıştır. Yaptığı deneyler sonucu bu mantarın bakterileri öldürüp çoğalmalarını engelleyen bir madde salgıladığını farketmiştir. Mantarın *Penicillium* türü olmasından ilham alarak bu maddeye “penisilin” adını vermiştir (34, 38). Penisilinin keşfedilmesiyle birlikte tıp dünyasında adeta yeni bir dönem başlamıştır. Özellikle II. Dünya Savaşı sırasında yaralı askerlerin penisilin ile başarılı bir şekilde tedavi edilmesi bu bileşiğin ününü giderek artırmıştır (32). 1942’de ABD, çeşitli girişimlerle penisilin üretimini artırmaya çalışmıştır. 1945’te ise halka penisilin sağlanmaya başlanmıştır. Penisilinin kullanıma girmesiyle birlikte Amerika’daki ölümlerin oranı önemli derecede azalmıştır (37). Fakat kısa bir süre sonra etkinliğine karşı direnç gelişmeye başlayınca bilim adamları yeni antibiyotik arayışlarına girişmiştir (29, 30).

Yeni antibakteriyellere olan ihtiyaç arttıkça, zamanla sülfonamidler, aminoglikozitler, sefalosporinler, tetrasiklinler, makrolidler ve kinolonlar gibi antibiyotik grupları ortaya çıkmaya başlamıştır (37). Şekil 3’te antibakteriyellerin keşif evreleri gösterilmektedir (39). 1940 ile 1960’lı yıllar arasındaki bu dönem antibiyotik keşiflerinin peşi sıra geldiği bir dönem olmuştur (24). Hatta birçok kaynakta bu dönem için antibiyotik tarihinin “Altın çağı” bile denilmektedir (31, 37). Bu süre zarfında şu an kullanmakta olduğumuz antibakteriyellerin çoğu keşfedilmiştir (37). Ancak bu hızlı keşif döneminden sonra antibakteriyel buluşları giderek azalmaya başlamıştır (29, 30). Antibiyotik keşif ve geliştirme çalışmalarının iyice azaldığı 1990’lı yıllar, bazı araştırmacılar tarafından “antibiyotik sonrası dönem” olarak adlandırılmaktadır (27).

Yine de son zamanlarda yeni antibiyotik geliştirilmesi adına yapılan oldukça başarılı çalışmalar bulunmaktadır. MRSA’ya etkili seftarolin ve seftobiprol, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörlerinin yeni kombinasyonları olan seftolozan/tazobaktam, seftazidim/avibaktam, imipenem/relebaktam ve meropenem/RPX7009 geliştirilmekte olan yeni antibiyotiklere birer örnektir (6).



Şekil 3. Antibakteriyel ilaçların keşif evreleri (Wright'dan, 39)

2.1.2. Antibakteriyellerin Faydaları

19. yüzyılda dünyadaki ölümlerin en başında bulaşıcı hastalıklar gelmekteydi (40). 2005 yılında yapılan bir araştırmaya göre, 1930 yılında başta zatürre ve verem olmak üzere yaklaşık 300 000 Amerikalı bulaşıcı hastalıklar yüzünden hayatını kaybetmiştir (41). Penisilin keşfedilmesiyle birlikte bulaşıcı hastalıkların tedavisi kolaylaşmaya başlamıştır (30). Antibakteriyeller kullanıma girmeden önce *S. aureus*'a bağlı bakteriyemilerin oranı oldukça yüksekti. Yara enfeksiyonlarının çoğu amputasyon ile tedavi ediliyordu. Antibakteriyellerin tedaviye girmesiyle birlikte cerrahi tedavi prosedürleri değişmiştir. Böylece enfeksiyonlu hastaların tedavileri kolaylaşmıştır (42).

Antibakteriyeller tıp ve cerrahi alanında büyük gelişmelerin yaşanmasını sağlamıştır. Kemoterapi alan hastalarda, diyabet, son dönem böbrek yetmezliği, romatoid artrit gibi kronik hastalıkları olan hastalar ve organ nakli, eklem replasmanları veya kalp ameliyatı gibi karmaşık operasyonlar geçirmiş olan hastalarda meydana gelebilecek enfeksiyonlar antibiyotikler sayesinde başarıyla önlenmiş ve tedavi edilmiştir (30). 2018 yılında yapılan bir çalışmaya göre 1920'li yıllarda ABD'de ortalama yaşam süresinin 56.4 yıl olması beklenirken artık 80 yıl olduğu görülmüştür (29).

Hayvancılıkta bulaşıcı enfeksiyon hastalıklarının yol açtığı morbidite ve mortalite oranının azaltılmasında etkili olmuşlardır (29, 43). Ayrıca sanitasyon hizmetlerinin az olduğu ülkelerde gıda kaynaklı enfeksiyonların önlenmesini sağlamışlardır (30, 41). Tüm bu faydalarına rağmen yaygın ve bilinçsiz kullanımları sonucunda etkinliklerine karşı zamanla direnç gelişmiştir (4).

2.1.3. Antibakteriyel Direnç Gelişimi ve Bakteriyel Direnç Mekanizmaları

Bakterilerin antibakteriyellere karşı göstermiş oldukları direnç, penisilinin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra ortaya çıkmıştır. Penisiline karşı direnç gelişince bilim adamları yeni β -laktam grubu antibiyotikler geliştirmiştir. Metisilin bu amaçla geliştirilen bir antibiyotiktir. İlerleyen zamanlarda metisiline dirençli bakteri suşları görülmeye başlanınca MRSA'yı tedavi etmek amacıyla vankomisin adı verilen yeni bir antibiyotik geliştirilmiştir. Ne yazık ki zamanla bu bileşiğe de direnç geliştiği görülmüştür (29, 30). Sülfonamidlerin piyasaya sürülmesinden sonraki 2 yıl içinde sülfonamid direnci rapor edilmiştir (44). Aminoglikozitler 1944'te tanıtılmıştır. 1950'lerde ise aminoglikozit dirençli *S. aureus* suşları ortaya çıkmıştır (45). Yine 1950'li yıllarda tetrasiklin, streptomisin ve kloramfenikol direnci bulunmuştur. 2000'lerde linezolid ve daptomisin piyasaya sürülmüştür. Bundan sonraki 5 yıl içinde bu antibiyotiklere de direnç geliştiği bildirilmiştir (42, 46). Sonuç olarak 1960'lardan 1980'li yılların başlarına kadar, ilaç endüstrisi direnç problemiyle baş edebilmek adına birçok yeni antibakteriyel geliştirmiştir (30). Ancak mikroorganizmalar, kendilerini öldürmek amacıyla geliştirilen bu bileşiklere karşı eninde sonunda direnç kazanmayı başaramışlardır (47).

Mikroorganizmaların, ilaçların öldürücü etkilerine karşı koyabilme yeteneğine direnç denilmektedir. Eğer bu durum antibiyotiklere karşı gelişirse antibiyotik direnci olarak adlandırılmaktadır (48). Doğal (içsel), kazanılmış (genotipik) ve çevre şartlarına bağlı direnç olmak üzere üç farklı direnç bulunmaktadır (49, 50). Doğal direnç, bir türün yapısal ya da biyokimyasal özelliklerinden dolayı sahip olduğu direnç olarak tanımlanmaktadır (51). Gram pozitif bakterilerin, etkisini hücre duvarının dışındaki zara nüfuz ederek gösteren bir antibiyotiğe karşı dirençli olmaları buna örnek gösterilebilir. Burada antibakteriyel etkili bileşiğin etki göstereceği hedef molekülün var olmaması doğal dirençten sorumludur (52). Eğer bir bakteri türü bir antimikrobiyale karşı doğal dirence sahipse ise o türün bütün kökenleri aynı dirence sahip olmaktadır (47, 48).

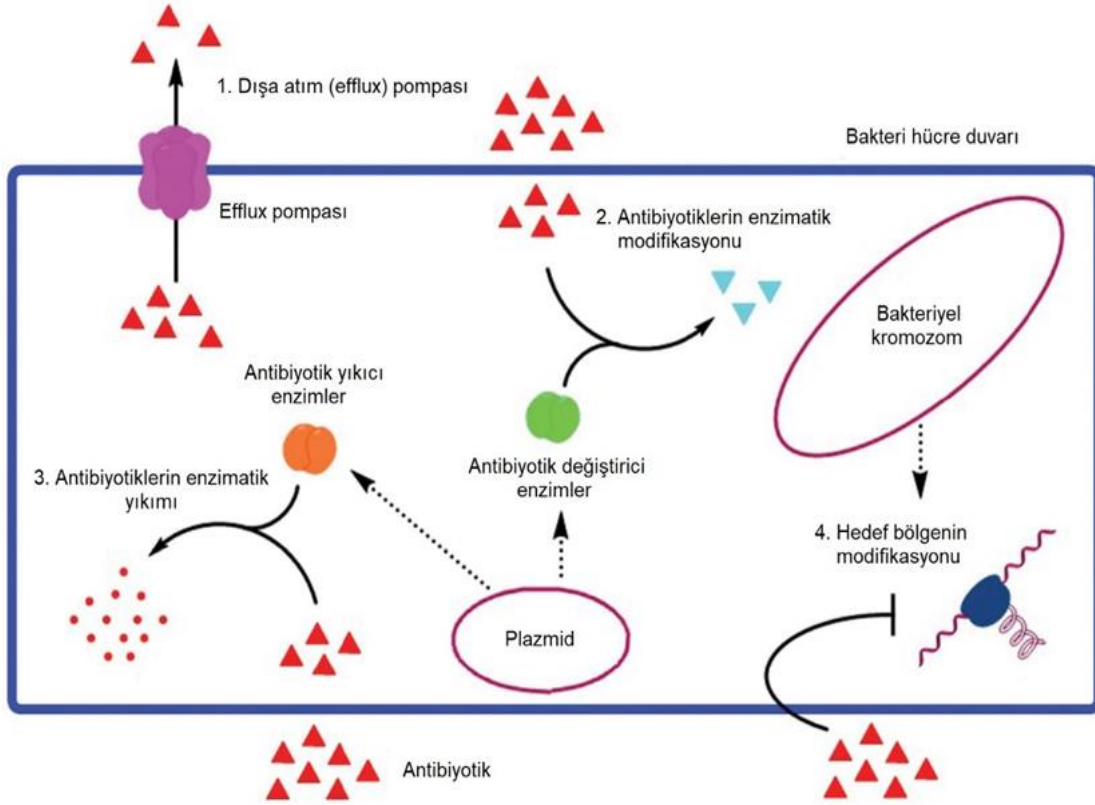
Kazanılmış direnç, normalde antibiyotiklerden etkilenen bir bakteri türünün, kromozom, plazmid gibi genetik materyalindeki mutasyonlarla ya da farklı bakterilerden konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyon gibi yollarla direnç geni kazanmaları sonucu ortaya çıkan direnç olarak tanımlanmaktadır (48, 51). İlk temasta belirli bir bakteri türünde etkili olduğu bilinen antimikrobiyal bir bileşik, tekrarlanan aralıklarla o mikroorganizmaya karşı kullanılırsa bu bakteride kazanılmış direnç gelişebilmektedir (48). Antibakteriyel dirençteki asıl mekanizmanın bu olduğu düşünülmektedir (47).

Bunların dışında bir antimikrobiyale karşı direnç kazanmış bir mikroorganizma, eğer bu bileşiğe yapı veya etki mekanizması yönünden benzer başka bileşiklere de direnç gösterirse bu durum çapraz direnç (cross-resistance) olarak adlandırılmaktadır. Aynı mikroorganizma eğer yapı olarak ve etki mekanizması bakımından farklı birden fazla antimikrobiyale karşı dirençli hale gelirse bu duruma çok ilaca dirençlilik (multiple-drug resistance) denilmektedir (52).

Bakterilerin antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları direnç mekanizmaları genel olarak şunlardır:

1. Antibiyotiğin enzimatik bozunma yoluyla etkisiz hale getirilmesi,
2. Antibiyotik hedef molekülünün modifikasyonu,
3. Hücre zarı geçirgenliğinin değiştirilmesi,
4. Hücre içi antibiyotik konsantrasyonunu inhibe edici seviyenin altında tutmak için dışa atım (efflux) pompalarının ekspresyonu (53).

Şekil 4'te bakteriyel direnç mekanizmaları gösterilmektedir (29).



Şekil 4. Bakteriyel direnç mekanizmaları (Aslam'dan, 29)

Antibiyotiğin enzimatik bozunma yoluyla etkisiz hale getirilmesine *S. aureus* örnek olarak gösterilebilir. *S. aureus*, klinikte dirençli olduğu en iyi bilinen bakterilerden biridir. Penisilin piyasaya ilk çıktığı zamanlarda bu bakteri türü üzerinde etkili olmuştur. Zamanla penisilini etkisiz hale getiren penisilinazı üreten suşların ortaya çıkmasıyla birlikte penisilin direnci meydana gelmiştir (32).

Bir diğer direnç mekanizması olan hedef molekülün modifikasyonuna örnek olarak florokinolonlar verilebilir. Bu mekanizma ile patojenler, antibiyotik hedef molekülü olan *gyrA* ve *parC* bölgelerinde meydana gelen çeşitli mutasyonlarla antibiyotiklerin toksik etkilerinden kurtulmayı başarmaktadır (39).

Bir başka örnek ise penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) meydana gelen değişiklikler sonucu ortaya çıkan dirençtir. Normalde penisilin molekülü PBP'lere geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanıp bakterilerde peptidoglikan sentezini önlemektedir. Fakat PBP'lerde meydana gelen değişiklik sonucu antibiyotik hedef moleküle bağlanamamakta ve direnç gelişmektedir (48).

Hücre zarı geçirgenliğinin değiştirilmesi sonucu direnç kazanımına *Pseudomonas aeruginosa* suşları örnek olarak gösterilebilir. Hücre zarındaki OprD adı verilen spesifik bir gözenegin mutasyonu ile birlikte zarın geçirgenliği azalmakta ve bakteri karbapenemlere dirençli hale gelmektedir (54).

Aktif dışa atım pompalarının ekspresyonuna verilebilecek en bilindik örnek tetrasiklin direncidir. Bu direnç, enerji kaynağı olarak proton değişimini kullanan dışa akış pompalarının tetrasiklinleri hücre dışına atmasıyla meydana gelmektedir (55). Böylelikle tetrasiklinlerin etkili olduğu hücre içi konsantrasyona erişimi engellenmektedir (55, 56).

Bakterilerin göstermiş olduğu bir diğer direnç mekanizması ise biyofilm oluşumudur (51). Biyofilm, genellikle katı bir yüzeye tutunmuş birbirine yakın bakteri hücrelerinin oluşturduğu topluluklara denilmektedir. Biyofilmlerin ana yapısını ekzopolisakkarit denilen polimerimsi bir yapı meydana getirmektedir. Bu yapı biyofilmlere antibiyotiklerin ve antimikrobiyal ajanların penetrasyonunu kısıtlayan bir bariyer sağlamaktadır (57). Sürekli tekrarlayan enfeksiyonların kaynağının biyofilmler olduğu düşünülmektedir. Biyofilmler aynı zamanda implantlar, stentler ve kateterler gibi çeşitli tıbbi aletler için de büyük bir sorun teşkil etmektedir (58).

Direnç mekanizmaları, bakterilerin yüksek ilaç konsantrasyonlarında dahi hayatta kalmalarına izin vermektedir. Dolayısıyla antibiyotikle tedavideki başarısızlığının ana nedeni bu mekanizmalardır (59). Antibiyotik direnci hem klinikte hem de toplumda hızla yayılmaktadır. Konunun acilen ele alınmaması durumunda, 2050 yılına kadar yılda yaklaşık 10 milyon insanın ölümüne yol açabileceği düşünülmektedir (60).

2.1.4. Antibakteriyel Direncin Nedenleri ve Sonuçları

Antibakteriyel direncin birden fazla nedeni bulunmaktadır. Hatalı antibiyotik kullanımı, toplumun antibiyotik kullanımındaki farkındalık eksikliği, antibiyotiklerin hayvancılıktaki yanlış kullanımları ve kolay erişilebilir olmaları bunlar arasında yer almaktadır (29). Antibiyotiklerin aşırı kullanımları direnç nedenlerinin en başında gelmektedir (61). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, antibiyotik tüketimi ile dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkışı arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermiştir (30). 1945 yılında Alexander Fleming antibiyotiklerin aşırı kullanımlarının dirençli bakteri suşlarının oluşumuna yol açabileceği konusunda uyarılarda bulunmuştur (62).

Tüm bu uyarılara rağmen antibakteriyeller hala en yaygın kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır (63). Aşırı kullanımlarının yanı sıra yeterli olmayan tedavi süresi ve düşük dozda kullanımları da bakteriyel direncin ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır (64). Yanlış reçete edilen antibiyotikler direnç gelişimine yol açan bir diğer etkindir. Yapılan çalışmalar, antibiyotikle tedavi vakalarının %30 ile %50'sinde tedavi süresi ve antibiyotik seçiminin yanlış olduğunu göstermiştir (29). Yanlış reçete edilen antibiyotikler hastaları beklenmedik komplikasyonlarla karşı karşıya bırakmaktadır. Ayrıca terapötik dozun altında kullanılan antibiyotik tedavileri gen ekspresyonu, horizontal gen transferi (HGT) ve mutajenezis gibi genetik değişikliklerle antibiyotik direncinin gelişimine katkı sağlamaktadır (30).

Dirence katkı sağlayan bir diğer faktör ise yatan hasta servislerindeki uzun süreli çoklu antibiyotik tedavilerinin kullanımlarıdır. İmmün sistemi baskılanmış hastalardan diğer hastalara geçen yüksek dirençli bakteriler, tedavi edilmesi zor nozokomiyal enfeksiyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (64).

Antibakteriyeller hem insan hem de hayvan sağlığı için büyük bir öneme sahiptir. Antibiyotikler hayvancılıkta bulaşıcı hastalıkların tedavisi ve gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (43). Fakat son zamanlarda tedaviden çok profilaktik amaçlarla ve büyümeyi destekleyici olarak kullanıldıkları gözlenmektedir (65). ABD'de satılan antibiyotiklerin %80'inin bu amaçla kullanıldığı bilinmektedir (30, 44).

Gelişmekte olan ülkelerde artan satın alma gücüyle birlikte üreticiler, büyümekte olan popülasyonun hayvansal gıda ihtiyacını karşılamak ve kısa sürede kazanç sağlamak için üretim esnasında antibiyotikleri kullanmaya başlamıştır. Aynı anda birden fazla hayvana antibiyotik uygulayabilmek için genellikle oral uygulama kullanılmaktadır. Bunun sonucunda belirli bir kısmı absorbe olmayan antibiyotikler dışkı ile çevreye yayılmaktadır. Bu tür hatalı yetiştiricilik uygulamaları, zamanla antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına, ekonomik kayıplara ve en önemlisi antibiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki tedavi edici etkilerinin azalmasına neden olmaktadır (43, 66).

Avrupa Birliği (AB), 1999 yılında antimikrobiyallerin büyüme teşviki amacıyla kullanımlarını kısıtlamış, 2006 yılında ise tamamen yasaklamıştır (43). 2012 yılında ABD tarafından veterinerlik hizmetlerinde reçetesiz antibiyotik kullanımına kısıtlama getirilmiştir (64).

Tarımda kullanılan azotlu gübreler, bakterisit olarak uygulanan bakır gibi metaller, kısmen metabolize olmuş ilaçlar ve metabolitlerini içeren belediye atık suları ve ilaç endüstrisi atıkları da antibakteriyel direnç gelişimine katkı sağlamaktadır (63, 64).

Antibiyotik direnci hem sağlık hem de ekonomik açıdan çok ciddi sorunlara yol açmaktadır (42). Gelişen direnç sonucu meydana gelen başarısız tedaviler hastanede yatış süresinin uzamasına ve tedavi masraflarının artmasına neden olmaktadır (5). Ayrıca hayati öneme sahip ölümcül enfeksiyonlara neden olan dirençli patojenlerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (67). ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), insan sağlığı için tehlike arz eden bakterileri ESKAPE adı altında tanımlamıştır. Söz konusu bakteriler arasında *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri bulunmaktadır. Bunların dışında *Clostridium difficile*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Mycobacterium tuberculosis* de dirençli patojenler arasında yer almaktadır (68).

Çok ilaca dirençli patojenlerin yol açtığı enfeksiyonlar günümüzde sağlık hizmetleri için büyük bir sorun teşkil etmektedir. Özellikle metisiline dirençli *S. aureus* patojeninin neden olduğu enfeksiyonlar diğer çok ilaca dirençli bakterilere kıyasla daha büyük kayıplara yol açmaktadır (69). MRSA'nın AB ülkelerinde yılda 150 000'den fazla hastayı etkilediği bilinmektedir (70). Bunun dışında hastanelerde ve uzun süreli bakım tesislerinde büyük bir sorun haline gelen *C. difficile*, ABD'de her yıl yaklaşık 336 000 kişide hastalığa neden olmakta ve 14 000 kişinin hayatını kaybetmesine yol açmaktadır (22). 2018 yılında yayınlanan bir başka çalışmaya göre sadece 2016 yılında *M. tuberculosis*'e bağlı 1.7 milyon kişinin hayatını kaybettiği bildirilmiştir (14). Gerekli önlemlerin alınmaması halinde 2050 yılına kadar dirençli bakteriler yüzünden hayatını kaybedeceklerin sayısının yılda 10 milyonu bulabileceği öngörülmektedir (71).

2.1.5. Direnç Gelişimini Azaltmak İçin Alınabilecek Önlemler

Direnç oluşumunu önlemek için çeşitli eylem ve politikalara ihtiyaç vardır (37). Direnç gelişiminin önüne geçilmesindeki en önemli ve etkili yol antibiyotiklerin yanlış ve aşırı kullanımının önlenmesidir (44, 52). Bir diğer önemli nokta reçete yazan sağlık personellerinin direnç konusundaki eğitimidir. Toplumun kitle iletişim araçları ile farkındalığının artırılması direnç gelişimini azaltmak adına alınabilecek önlemlerden bir diğeridir (52, 63).

Antibiyotik seçimi ve tedavi süresinde yapılacak birtakım düzenlemeler dirençle mücadelede önem arz etmektedir. Bu hususta, tedavi için antibiyotik seçiminde patojen bakterilerin duyarlı olduğu ve normal bağırsak florasına mümkün olduğunca az zarar veren dar spektrumlu ilaçlar seçilmelidir. Tedavi süresi belirlenirken hastanın durumu ve enfeksiyonun boyutu dikkate alınmalıdır. Tedavi mümkün olduğunca yüksek dozda başlatılıp süresi kısa tutulmalıdır (72). Alınması gereken ilk önlemlerden bir diğeri ise hayvanlarda büyümeyi desteklemek amacıyla antibakteriyel kullanımının kısıtlandırılmasıdır (52, 63). Hayvan yemlerine antibiyotik katılmasını önlemek için çiftçilerin ilaçsız yemlere erişimi iyileştirilmelidir (63). Bu amaçla ülkemizde de bir takım düzenlemeler yapılmıştır. 2006 yılında Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, antibiyotiklerin hayvancılıktaki kullanımına sınırlandırma getirmiştir (73).

Direnç gelişimini önlemenin bir diğeri yolu enfeksiyonların görülme sıklığını azaltmaktır. Enfeksiyonların önlenmesiyle birlikte daha az kişiye antibiyotik reçete edilecektir. Bu sayede antibiyotik kullanımı dolaylı olarak azalacaktır (64). Enfeksiyonlar ayrıca sanitasyon ve hijyen koşullarının iyileştirilmesi, aşılama gibi çeşitli yöntemlerle de azaltılabilir (72, 74). Antibiyotik direnci ile savaşmak için yeni ilaçlara ve hedeflere ihtiyaç vardır (14). Bu durum potansiyel bir çözüm olarak görülse de aslında maliyetli ve zorlu bir süreci kapsamaktadır (44).

2.2. Dezenfeksiyon ve Dezenfektanlar

2.2.1. Dezenfeksiyon Tarihi ve Önemi

İnsanlık tarihi çok eski çağlardan beri çürüme, kokuşma gibi durumlarla baş edebilmek için çeşitli dezenfeksiyon yöntemlerinden faydalanmıştır (75). Patojenik mikroorganizmaların yol açtığı hastalıkları önlemek amacıyla fiziksel, kimyasal ve biyolojik bazı dezenfeksiyon yöntemlerinin kullanıldığı kayıtlara geçmiştir (76).

Eski İran döneminde su ile bulaşabilen hastalıkların önlenmesi için içme suları bakır kaplarda saklanmıştır. Hipokrat yara temizliğinde dezenfektan olarak şarap ve sirkeden faydalanmıştır (77). Orta Çağ'da Avrupa'daki veba salgını sırasında bulaş binaların ve nesnelerin dezenfekte edilmesi için kükürt bileşiklerinden yararlanılmıştır. 1429'da İtalya'da sifilisle mücadelede cıva bileşikleri kullanılmıştır (76). Büyük İskender döneminde, Aristoteles içme suyunun kaynatılması gerektiği konusunda tavsiyelerde bulunmuştur. Hipokrat, sokaklarda aromatik odun ateşleri yakarak vebayı Atina'dan

sürmeye çalışmıştır (78). Tüm bu örneklerin yanında gerçek anlamda dezenfeksiyon işlemi ilk olarak 1904 yılında uygulanmıştır. Sodyum hipoklorit ile klorlama yapılarak tifo salgını önlenince dezenfeksiyon uygulamaları hızla yaygınlaşmaya başlamıştır (79).

Günümüzde dezenfektanlar sağlık kuruluşları, gıda sektörü, kozmetik gibi oldukça geniş bir yelpazede kullanılmaktadır (80). Özellikle hastane ortamındaki enfeksiyonlarla mücadelede sıklıkla bu kimyasallardan faydalanılmaktadır. Hastanede kalış süresince veya taburcu olduktan belirli bir süre sonra meydana gelen enfeksiyonlar hastane enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır (81). 19. yüzyıl itibarıyla büyük bir sağlık problemi haline gelen hastane enfeksiyonları, ABD’de her yıl yaklaşık 90 000 kişinin hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Buna ek olarak hastanede kalış süresinin uzamasına ve ilave masrafların doğmasına yol açmaktadır (82).

Özellikle hastane gibi sağlık tesislerinde hem hastaların hem de çalışan personelin hastane enfeksiyonlarından korunabilmesi için tüm hastanelerde uygulanabilir bir dezenfeksiyon ve sterilizasyon politikası oluşturulmalıdır (83, 84). Mikroorganizmaları etkisiz hale getiren, genellikle geniş spektrumlu kimyasal maddelere biyosit denmektedir (85). Aslında biyosit genel bir terimdir. Antiseptik ve dezenfektanlar da biyosidal ürünler arasında yer almaktadır (86). Kimyasal maddeler kullanılarak patojen mikroorganizmaların yok edilmesi işlemi, kimyasalın uygulandığı yere göre farklı şekillerde isimlendirilmektedir. Eğer cansız bir yüzey veya madde üzerindeki patojen mikroorganizmalar yok edilirse bu işlem dezenfeksiyon olarak adlandırılmaktadır. Canlı doku üzerindeki veya içindeki -özellikle deri ve mukoza gibi dokulardaki- patojen mikroorganizmalar öldürülürse bu işleme antisepsi denmektedir (81).

Dezenfeksiyonda kullanılan kimyasal maddeler dezenfektan olarak adlandırılmaktadır (87). Antisepsi işleminde kullanılan biyositlere ise antiseptik denmektedir (85). Dezenfektanlar genellikle bakterilerin vejetatif formlarını öldürmektedir. Daha dayanıklı olan spor formlar dezenfeksiyon işlemi sonrasında canlı kalabilmektedir. Dezenfeksiyonda amaç mikroorganizmaların tamamını yok etmek değildir. Asıl amaç mikroorganizma sayısını en aza indirebilmektir (88). Sterilizasyon, bakteri sporları dahil tüm mikroorganizmaların yok edilmesi işlemidir. Dezenfeksiyon işlemine oranla daha spesifik ve mutlak bir işlemdir (89).

2.2.2. Dezenfeksiyon Yöntemleri

Sterilizasyonun aksine mutlak bir işlem olmayan dezenfeksiyon işlemi, çeşitli düzeylerde uygulanabilmektedir (89). Spaulding, dezenfeksiyon ve sterilizasyon yöntemlerinin belirlenebilmesi amacıyla hasta bakımında kullanılan araç ve gereçleri enfeksiyon risk derecelerine göre sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırmaya göre hasta bakım ürünleri ve ekipmanları kritik, yarı-kritik ve kritik olmayan malzemeler olmak üzere üçe ayrılmıştır (90, 91).

Kritik malzemeler, damar yolu ve vücut boşlukları gibi yüksek enfeksiyon riski taşıyan steril bölgelerde kullanılan tıbbi malzemelerdir. Cerrahi aletler, damar içi kateterler, direnler, üriner sonda gibi malzemeler bu gruba örnektir. Bu malzemelerin büyük bir çoğunluğu piyasaya tek kullanımlık olarak sürülmektedir (92). Bu kategorideki ürünler, steril olarak satın alınmalı veya mümkünse buhar sterilizasyonu ile sterilize edilmelidir. Malzeme eğer ısıya duyarlıysa ve diğer yöntemler ile sterilize edilemiyorsa, etilen oksit, hidrojen peroksit buharı ve ozon veya sıvı kimyasal sterilantlar ile sterilizasyon işlemi uygulanmalıdır (90). Bu malzemelerin dezenfeksiyonu için yüksek düzey dezenfeksiyon uygulanmaktadır (89).

Yarı-kritik malzemeler, mukozalar ve bütünlüğü bozulmuş ciltle temas eden ancak vücuda penetre olmayan alet ve malzemelerdir (82, 89). Bu malzemelerde az sayıda bakteri sporu kalsa dahi hasta açısından ciddi bir risk oluşmamaktadır (82). Solunum tedavisi ve anestezi cihazları, bazı endoskoplar, laringoskop bıçakları ve kolları, özofagus manometri problemleri, endokaviter problemler, nazofaringoskoplar, prostat biyopsi problemleri, sistoskoplar ve diyafram bağlantı halkaları yarı-kritik malzemelere örnektir (90). Yarı kritik malzemelerin dezenfeksiyonu için orta düzey dezenfeksiyon uygulanmaktadır (89).

Kritik olmayan malzemeler, sağlam cilt ile temas eden ancak mukoza zarlarıyla temas etmeyen malzemelerdir. Bozulmamış cilt çoğu mikroorganizmaya karşı etkili bir bariyer görevi görür; bu nedenle, sağlam cilt ile temas eden maddelerin sterilitesi kritik değildir. Kritik olmayan öğelere örnek olarak yatak örtüleri, kan basıncı manşetleri, koltuk değnekleri, portatif ekipmanlar (örn. tekerlekli sandalyeler, infüzyon) ve zeminler verilebilir. (90). Kritik olmayan malzemelerin dezenfeksiyonu için düşük seviye dezenfeksiyon uygulanmaktadır. Burada amaç bakterilerin vejetatif şekillerinin ve lipid kaplı virüslerin öldürülmesidir (89).

2.2.3. Dezenfektanların Sınıflandırılması

Dezenfektanlar etki dereceleri, etki mekanizmaları ve kimyasal yapılarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır (93). Etki seviyelerine göre dezenfektanlar yüksek, orta ve düşük seviyeli dezenfektanlar olmak üzere üçe ayrılmaktadır (94).

Yüksek seviyeli dezenfektanlar, bakteri endosporları dışındaki mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğunu yok edebilen dezenfektanlardır. Etkileri genellikle 12 ile 20 dakikadan daha uzun sürelerde başlamaktadır. Gluteraldehit ve hidrojen peroksit gibi maddeler bu gruba örnektir (81, 82).

Orta seviyeli dezenfektanlar, tüberküloz etkeni olan *M. tuberculosis*, bazı zarfsız virüsler ve diğer mikroorganizmalara karşı etkili olan fakat bakteri endosporları üzerinde etkinlikleri bulunmayan etil alkol, izopropil alkol, glikoprotamin ve fenol bileşikleri gibi dezenfektanlardır. Bu grup dezenfektanlar mantarlara karşı da etkinlik göstermektedir (88). Etkileri genellikle 10 dakikadan daha kısa süre içinde başlamaktadır (81, 82). Bu grup dezenfektanlar daha çok laboratuvar gibi ortamlarda yüzey dekontaminasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (79).

Düşük seviyeli dezenfektanlar *M. tuberculosis* ve bakteri endosporlarına karşı etkileri olmayan fakat uygun bir doz aralığı seçildiğinde bakterilerin birçoğunun vejetatif formlarını ve bazı virüs ve mantarları yok etmeye yarayan dezenfektanlardır. Bu gruptaki dezenfektanlar etkilerini genellikle 10 dakika içinde gösterebilmektedir. Kuarterner amonyum bileşikleri (KAB), bu gruba verilebilecek en önemli örneklerdendir (82, 88).

Dezenfektanlar, etki dereceleri dışında kimyasal yapılarına göre de sınıflandırılabilir. Buna göre dezenfektanlar genel olarak fenoller, alkoller, alkilleyici maddeler, asitler, alkaliler, ağır metaller, halojenler ve oksitleyici maddeler olmak üzere çeşitli gruplardan oluşmaktadır (77). Tablo 1'de kimyasal yapılarına göre dezenfektanlar gösterilmektedir (94).

Tablo 1. Kimyasal yapılarına göre dezenfektanlar (Eryılmaz ve Akın'dan, 94)

Kimyasal Yapı	Örnek
Asitler	Asetik asit, sitrik asit, benzoik asit, sorbik asit
Alkaliler	Sodyum hidroksit, amonyum hidroksit, sodyum karbonat
Alkoller	Etanol, izopropanol
Aldehidler	Gluteraldehit, formaldehit
Biguanidler	Klorheksidin
Halojenler ve halojen içerikliler	İyot, klor, kloroform
Peroksitler ve peroksijen componentleri	Hidrojen peroksit, perasetik asit,
Fenoller	Krezoller, ksilenoller, ortofenilfenol
Kuarterner amonyum bileşikler	Benzalkonyum klorit (zefiran), benzotonyum klorit, setilpridinyum klorit
Ağır metaller	Cıva, gümüş, arsenik, çinko, bakır
Diğer dezenfektanlar	Akridin boyaları, akriflavin, aminakrin

2.2.4. Dezenfektanların Etki Mekanizmaları

Dezenfektanlar, antibiyotiklerden farklı olarak birden fazla bölgeye hedeflemektedir. Bakterileri yok etmek için kullanılan dezenfektanlar çok sayıda hücre bileşenini etkilemektedir. Bunun yanında belirli bir bakteri türüyle mücadele etmek için antibiyotikler seçilirken, dezenfektanların etki spektrumları çok daha geniştir. Bu bileşikler bakteriler dışında sporları, virüsleri ve fungusları da etkilemektedir (95).

Dezenfektanlar, antibiyotiklerde olduğu gibi çeşitli mekanizmalar sayesinde mikroorganizma üremesini durdurabilme veya bu mikroorganizmaları tamamen ortadan kaldırabilme yeteneğine sahiptir. Çeşitli mikroorganizmalara karşı etki tarzları aydınlatılmış olmakla birlikte bakteriler üzerindeki etkinlikleri daha iyi belirlenmiştir. Bir dezenfektan madde, tek bir mekanizma ile etki gösterebilmesinin yanında birden fazla

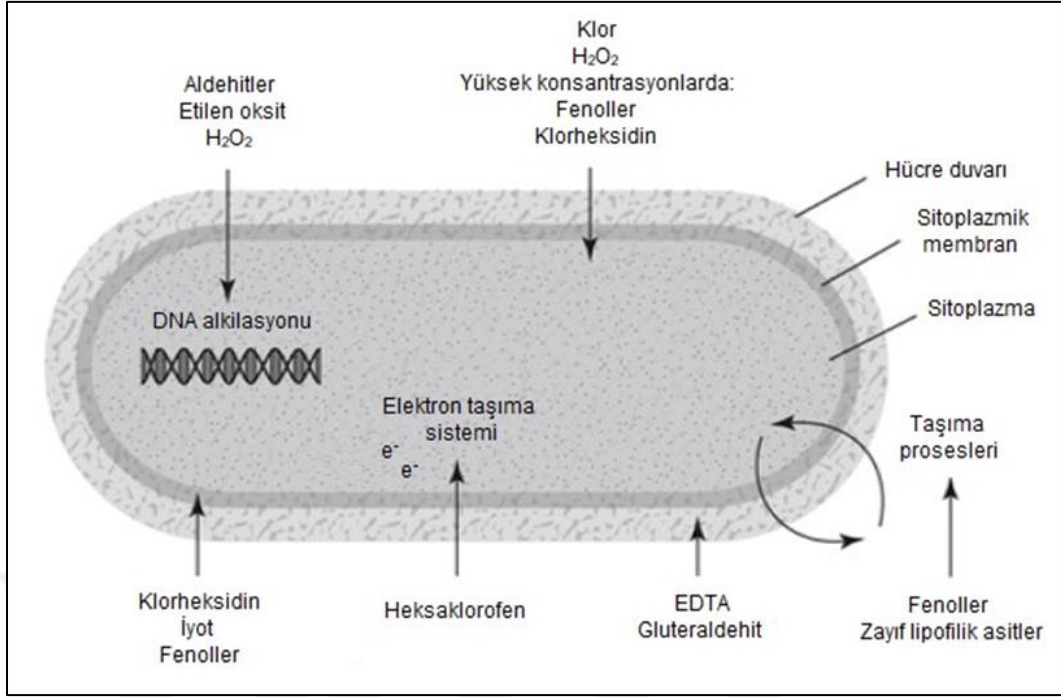
mekanizma ile de etki edebilmektedir (87). Dezenfektanların fonksiyonları arasında genel olarak hücre zarlarının tahrip edilmesi, önemli biyokimyasal fonksiyonların ve hücre içine besin alımının engellenmesi yer almaktadır (96). Şekil 5'te dezenfektanların etki mekanizmaları gösterilmektedir (97).

Etki mekanizmaları genel olarak beşe ayrılmaktadır. Bunlar:

1. Hücre zarına etki,
2. Hücresel proteinlere etki,
3. Mikroorganizma enzimlerinin işlevlerini bozarak etki,
4. Nükleik asitlere etki,
5. Bakteri sporlarına etkidir (79, 93).

Bakteriler, hücre bütünlüklerini koruyarak hayatta kalmalarını sağlayan bir zar ile çevrilidir. Bu zar fosfolipid ve lipopolisakkaritler gibi bazik bileşiklerden meydana gelmektedir. Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi katyonlar ile zarın stabilizasyonu sağlanmaktadır. Dolayısıyla, iyonize edici dezenfektan molekülleri hücre zarını etkileyerek zarın yarı geçirgenliğini değiştirip, spesifik taşıma sistemleri ve enerji metabolizmasını inaktif hâle getirerek bakterilere zarar vermektedir (98). Bu grup dezenfektanlara kloroform, alkoller, toluen gibi organik çözücüler; krezol, lizol, heksaklorofen gibi fenol türevi bileşikler ve sodyum dodesil benzen sülfonat gibi yüzey aktif deterjanlar örnek gösterilebilir (93).

Hücrelerin büyük bir kısmı proteinlerden oluşmaktadır. Bunun yanında enzimlerin çoğu protein yapısındadır (87). Mikroorganizmalarda bulunan proteinlerin, işlevlerini doğru bir şekilde yerine getirebilmeleri için uygun moleküler yapıda bulunmaları gerekmektedir (77). Bazı dezenfektanlar, proteinlerin moleküler yapısında değişiklikler meydana getirerek halkalaşma ve helezonik yapılaşmaya yol açabilmektedir. Bunun sonucunda bakterisidal etki gözlenmektedir (79). Asitler (hidroklorik asit, sülfirik asit, fosforik asit, nitrik asit, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit), alkaliler (sodyum hidroksit ve potasyum hidroksit, kalsiyum dioksit), alkoller, halojenler ve boyalar bu grupta yer alan dezenfektanlara örnektir (77, 88).



Şekil 5. Dezenfektanların etki mekanizmaları (Boothe'den, 97)

Bazı dezenfektanlar mikroorganizmalarda bulunan enzimlerin katalitik bölgelerine ya da substratlar ile birleşen fonksiyonel gruplarına (-SH gruplarına) bağlanarak etki göstermektedir (88). Bunun sonucunda enzimin işlevi bozulmakta ve görevini yerine getirememektedir. Bu gruba örnek olarak mertiolat, gümüş nitrat gibi ağır metaller; klor, klorit, iyot gibi halojenler; hidrojen peroksit gibi oksidanlar gösterilebilir (79).

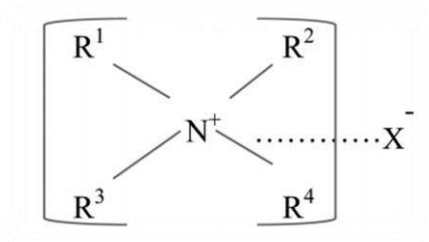
Bunların dışında nükleik asitlere etki eden dezenfektanlar da bulunmaktadır (81). Bu bileşikler hücrelerde bulunan nükleik asitlerle birleşip aktivitelerini bozarak etki göstermektedir (79). Bu şekilde etki gösteren dezenfektanların büyük bir çoğunluğunu mikrobiyolojide boyama yöntemleri için kullanılan boyalar oluşturmaktadır (99). Kristal viyole, malaşit yeşili, metilen mavisi ve akridin boyalar bu gruba örnektir (79).

Bakteriyel sporlar, dezenfektanlara vejetatif formlara oranla çok daha dayanıklıdır (98). Kuarterner amonyum bileşikleri ve fenoller gibi dezenfektanlar spor oluşumunun farklı evrelerini etkileyerek dezenfektan aktivite göstermektedir (88). Kuarterner amonyum bileşikleri germinasyon aşamasında etkili iken fenoller spor oluşum aşamasını etkilemektedir (81). Gluteraldehid formaldehid, hipoklorit, iyot, hidrojen peroksit ve etilen oksit gibi dezenfektanlar ise olgun spor oluşumu evresinde etkili olmaktadır (93).

2.3. Kuarterner Amonyum Bileşikleri

Kuarterner amonyum bileşikleri (KAB) en yaygın kullanılan dezenfektanlar arasında yer almaktadır (17, 18). 1930'ların başlarında bu bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri olduğu tespit edilmiştir (100). 1930 ile 1940'lı yıllarda ise benzalkonyum klorürün antimikrobiyal ajan olarak dezenfektan pazarında onay alması ile yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmışlardır (101). KAB'ler renksiz, kokusuz ve nonkorozif olmaları; nispeten düşük toksisiteleri, geniş antimikrobiyal spektrumları, uçuculuk ve kimyasal stabiliteleri nedeniyle su ve yüzeylerin yanı sıra tekstil, sağlık tesisleri ve gıda endüstrisi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (102, 103). Bunların dışında cilt, tırnak, dudak ve saç üzerindeki etkileri nedeniyle yapay gözyaşı, burun dekonjestanları, yüz temizleyicileri, güneş koruma kremleri ve losyonları, bebek losyonları, nemlendiriciler, saç kremleri ve makyaj temizleme ürünleri gibi ürünlerde koruyucu olarak görev yapmaktadır (104). En çok kullanılan KAB'ler benzalkonyum klorür, dodesil dimetil amonyum klorür, alkil benzil dimetil amonyum klorür, dodesil benzil dimetil amonyum bromür ve dodesil dimetil amonyum dimetil amonyum bromürdür (103).

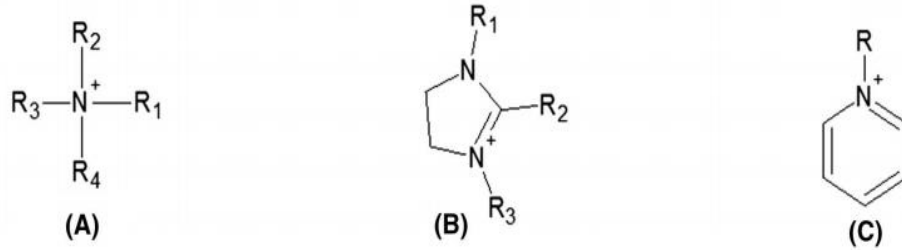
KAB'lerin genel kimyasal yapıları $N^+R_1R_2R_3R_4X^-$ şeklindedir. Buradaki R grupları, bir hidrojen atomunu, düz bir alkil grubunu veya diğer fonksiyonel gruplarla ikame edilmiş doymuş, doymamış, dallı, düz, siklik veya asiklik alkil gruplarını; X ise bir anyonu temsil etmektedir (103, 104). Şekil 6'da kuarterner amonyum bileşiklerinin genel yapısı gösterilmektedir (17). Yapılarında bulunan dört organik grup, azot atomunda kalıcı bir pozitif yükün oluşmasına neden olmaktadır. Pozitif yüklü azot atomuna, klorür veya bromür gibi negatif bir iyonun bağlanmasıyla kuarterner amonyum tuzları meydana gelmektedir (17, 18).



Şekil 6. Kuarterner amonyum bileşiklerinin genel yapısı (Mulder'den, 17)

Kuarterner amonyum tuzları hidrofilik ve hidrofobik özelliklere sahip iki kısım içermektedir (105). Alkil zinciri bileşiklerin hidrofobik kısmını oluştururken alkil gruplarına sahip azot ise hidrofilik kısmı meydana getirmektedir (103). Bu yapı, KAB'ler gibi katyonik yüzey aktif bileşiklerinin mikroorganizmaların hücresel membranı ile etkileşimini mümkün kılmaktadır (105). Alifatik zincirde 12-14 karbon atomuna sahip bileşikler en yüksek yüzey aktif aktivite göstermektedir (103). Dezenfektan olarak kullanılan KAB'ler genellikle 12-18 karbon atomu içerenlerdir (106).

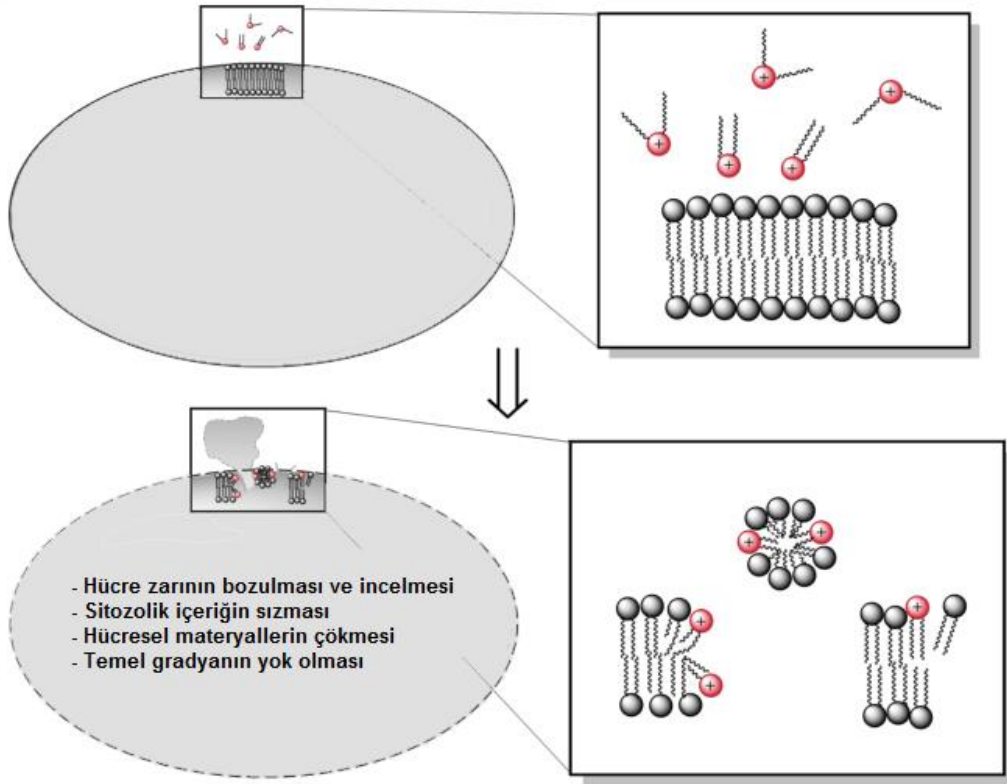
KAB'ler, azot atomlarının sayısı, karbon zincirinin dallanması ve aromatik grupları içerebilen R gruplarının doğasına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (18). KAB'ler alkilasyon sentezi sırasında kullanılan amine bağlı olarak her biri çok sayıda bileşik ve alt gruptan oluşan piridinyum bileşikleri, doğrusal alkilamonyumlar ve imidazol bileşikleri olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Şekil 7'de bu bileşiklerin temel yapıları gösterilmektedir (17).



Şekil 7. KAB'lerin kimyasal yapıları (Mulder'den, 17)

Bu sınıflandırmanın dışında doğal ortamlarda tespit edilen üç ana yapısal sınıf bulunmaktadır. Bunlar, alkil zincirinde 8 ile 18 arasında değişen sayıda karbon atomuna sahip çift n-alkil zincirleri olan dialkildimetilamonyum klorür bileşikleri (DADMACs), karbon atomu sayısı 12 ile 22 arasında değişen tek bir n-alkil zincirine sahip olan alkiltrimetilamonyum (ATMACs) bileşikleri ve alkil zinciri uzunluğu 12 ile 18 arasında değişen karbon atomuna sahip benzilalkildimetilamonyum (BACs) bileşikleridir (107). KAB'ler katyonik deterjanlar olarak da bilinen yüzey aktif maddelerdir. Bu özellikleriyle yüzey gerilimini azaltarak miseller oluşturup sıvı içinde dağılmaya izin vermektedir (18). KAB'ler gibi birçok yüzey aktif bileşik bakterisittir ve bu eylemleri için bazı açıklamalar mevcuttur (100).

KAB'lerin bakterisit etkisi, enerji üreten enzimlerin etkisizleştirilmesi, esansiyel hücre proteinlerinin denatürasyonu ve hücre zarının bozulması ile ilişkilendirilmektedir (108). Bu moleküllerin pozitif yüklü kuarterner azot kısmı, bakteriyel hücre zarları üzerindeki negatif yüklü fosfolipidlerin kafalarıyla etkileşime girmelerini sağlamaktadır. Daha sonra, molekülün hidrofobik kısmı membrana interkalasyon yapmakta ve membran yayılma kuvvetlerini ve iyon gradyanlarını bozarak hücre ölümüne yol açmaktadır (104, 109). KAB'lerin antibakteriyel aktivitesi temel olarak hücre zarları ile bir etkileşimi, membran bütünlüğünün bozulmasını ve hücresel içeriğin sızmasını şeklindedir (104). Şekil 8'de KAB'lerin antibakteriyel etki mekanizması gösterilmektedir (110).



Şekil 8. KAB'lerin antibakteriyel etki mekanizmaları (Jennings'den, 110)

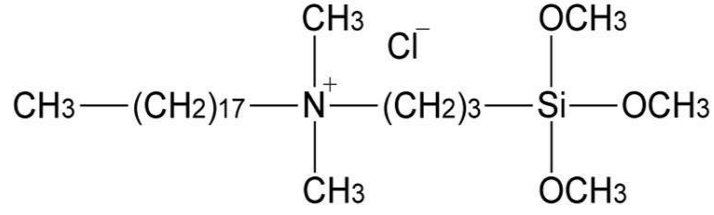
KAB'ler bakteri hücre zarını hedeflediğinden dolayı, gram-pozitif bakterilere (özellikle stafilokoklara) karşı önemli ölçüde aktivite sergilemektedir (102, 110). Gram-pozitif bakteriler tek bir fosfolipid hücresel zarına ve peptidoglikandan oluşan daha kalın bir hücre duvarına sahipken, gram-negatif bakteriler iki hücresel zar ve oldukça ince bir

peptidoglikan tabakası ile çevrilidir (110). Bu ikinci membranın varlığından dolayı, KAB'ler ve diğer membran hedefli antiseptikler, gram-negatif türlere karşı daha az aktivite sergileme eğilimindedir (102, 110). KAB'ler aynı zamanda güçlü antifungal ajanlardır (110). Hidrofobik aktiviteleri, lipit içeren virüslere karşı etkili olmalarını sağlamaktadır. Ürün formülasyonuna bağlı olarak lipit içermeyen virüslere ve sporlara karşı da etkilidirler (18).

KAB'ler çeşitli mikroorganizmalar üzerinde güçlü bakterisidal etkilere sahip olmasına rağmen insan hücreleri üzerinde bazı sitotoksik etkilere yol açabilmektedir. Bu etkiler, özellikle sağlık çalışanlarının sıklıkla antiseptik kullanımlarına bağlı olarak gelişen ellerde tahriş ve kontakt dermatit şeklinde ortaya çıkmaktadır (111). Bunların dışında KAB'ler astım, alerjik reaksiyon ve gözde iritasyon gibi yan etkilere de neden olabilmektedir (102).

Evsel ve endüstriyel ürünlerde kullanılan önemli miktardaki KAB nedeniyle bu bileşikler tesadüfen veya bilinçli bir şekilde çevreye salınmaktadır. Bu durum yüzey suları, atık suları, kanalizasyon çamurları, toprak ve nehir ağzı tortuları gibi alanlarda KAB birikimine yol açmaktadır. KAB'lerin bu gibi alanlardaki varlığı, çevrede yaşayan organizmalar için potansiyel risk oluşturmaktadır. Bu olası olumsuz etkileri araştırmak için büyük bir çaba gösterilmesi gerekmektedir (112). KAB'lerin yaygın kullanımlarının bir diğer sonucu bu bileşiklere karşı zamanla mikroorganizmalar arasında direnç gelişmesidir (105). Çoğu KAB formülasyonu, uygulamadan sonra su ile durulama gerektirmediği için bakteriler ve KAB'ler arasındaki temas uzayabilmektedir. Hızla nötralize etmeyen düşük kimyasal reaktiviteye sahip bir KAB'ye uzun süre maruz kalmak, mikrobiyal toplulukları alt inhibitör konsantrasyonlara maruz bırakabilmektedir. Bu da çeşitli antimikrobiyal ajanların daha yüksek minimum inhibitör konsantrasyonlarına (MİK) duyarlı klonların hayatta kalmasına neden olmaktadır (104).

KAB'lere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasıyla birlikte konakçının direnç mekanizmasından kaçabilecek yeterli antimikrobiyal aktiviteye sahip yeni bileşiklerin tasarlanması acil bir ihtiyaç haline gelmiştir (112). Bu tez çalışmasında, bu amaçla geliştirilen Antimic® adlı dezenfektanın (19) etken maddesi olan 3-(trimetoksisilil) propil dimetil oktadesil amonyum klorür (TPOAC) bileşiği kullanılmıştır. Şekil 9'da bu bileşiğin kimyasal yapısı gösterilmiştir (113).



Şekil 9. TPOAC'ın kimyasal yapısı (Censi'den, 113)

TPOAC, alkoksisilan kuarterner amonyum yapısına sahip bir bileşiktir (19). Alkoksisilanlar, silisyumun oksijen köprüsü ile organik bir gruba bağlanması sonucu meydana gelen silikon bileşikleridir (114). Alkoksisilanlar yapılarında en az bir adet alkoksi grubu taşımaktadır (115). Genel formülleri $(\text{R}_1\text{O})_3\text{-Si-R}_2$ şeklinde olup R_1 genellikle metil veya etil, R_2 ise fonksiyonel bir gruptan meydana gelmektedir (116). Fonksiyonel alkoksisilanlar, organik-silika hibrit malzemeleri, HPLC malzemeleri gibi birçok önemli malzeme ve cihazın imalatında ve ayrıca yüzey modifikasyonu, dolgu macunu, yapıştırıcı ve kaplama gibi endüstriyel proseslerde ümit vaat eden bileşiklerdir (117).

Antibakteriyel etkisi kanıtlanmış olan bu bileşiğin antibakteriyel etki mekanizmasına dair literatürde daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla bileşiğin DNA nükleaz aktivitesi ve topoizomeraz inhibisyon etkisi incelenmiştir.

2.4. DNA ve Yapısı

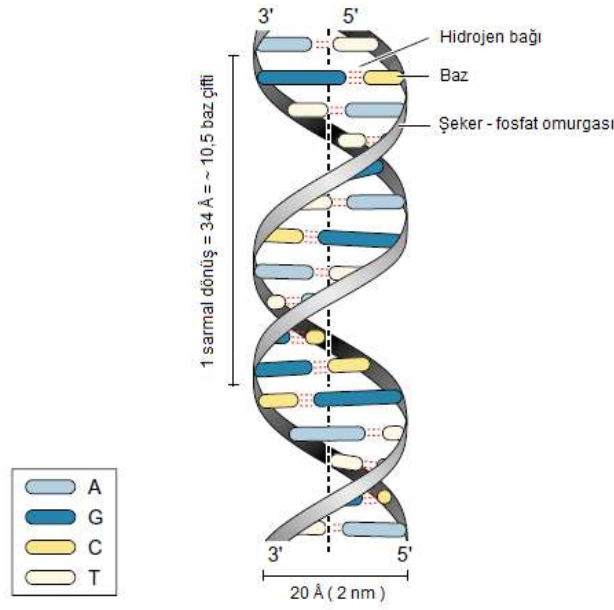
Deoksiribonükleik asit (DNA), ilk olarak 1869 yılında İsviçreli kimyager Friedrich Miescher'in insan alyuvar hücrelerinin çekirdeklerinde "nüklein" adını verdiği kimyasal molekülü keşfetmesiyle tanımlanmıştır. İlerleyen dönemlerde molekülün asidik özelliğe sahip olduğu tespit edilince adı nükleik asit olarak değiştirilmiştir.

Miescher'in nükleik asit keşfinin ardından Rus biyokimyacı Phoebus Levene, molekülün kimyasal yapısını araştırmaya devam etmiş ve DNA'nın bileşenlerini tanımlayan ilk araştırmacı olmuştur. Öne sürdüğü polinükleotit modeli ile nükleik asitlerin bir dizi nükleotitten oluştuğunu ve her bir nükleotidin sırasıyla azotlu organik baz, bir şeker molekülü ve bir fosfat grubundan oluştuğunu belirtmiştir (118, 119).

Avusturyalı biyokimyacı Erwin Chargaff yaptığı çalışmalar sonucunda bazların nispi oranlarının türler arasında değiştiği ancak tek bir türün üyelerinde korunduğuna dair bir gözlem elde etmiştir. Herhangi bir türde, adenin (A) miktarının her zaman timin (T) miktarına ve sitozin (C) miktarının ise her zaman guanin (G) miktarına eşit olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca herhangi bir tür için A/T oranının sabit ve C/G oranına eşit olduğunu bulmuştur (118, 119).

Chargaff'ın daha sonra İngiliz araştırmacı Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins'in X-ışını kristalografisi çalışmaları ile birleştirilen gözlemleri, Watson ve Crick'in üç boyutlu çift sarmal DNA modelini türetmesine büyük katkı sağlamıştır (118). Tüm bunların sonucunda 1953 yılında James Watson ve Francis Crick, Maurice Wilkins ile birlikte DNA çift sarmalının yapısını keşfederek 1962'de Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür (119).

DNA, canlı hücrelerdeki en önemli moleküllerden biridir (120). Sahip olduğu benzersiz yapı, genetik bilgiyi depolama ve nesilden nesile aktarma işlevinden sorumludur (121). DNA'nın en önemli özelliği, birbiri etrafında bükülmüş çift sarmal şeklindeki iki polinükleotit zincirinden oluşmasıdır. Bu iki zincir birbirine zıt yönlerde uzanmaktadır. Zincirlerden biri 5' → 3' yönünde ilerlerken, diğer zincir 3' → 5' yönünde ilerlemektedir. İki zincir, baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları yoluyla eşleşmektedir. Sarmal, sağ el yapısındadır (121, 122). Çapı 2 nm'dir. Aynı zincir üzerindeki bitişik bazlar arasında 0.34 nm (0.34×10^{-9} m) uzunluğunda mesafe bulunmaktadır. Sarmal, her bir dönüşte 10 baz çiftine sahiptir. Şekil 10'da DNA molekülünün çift sarmal yapısı gösterilmektedir (121).

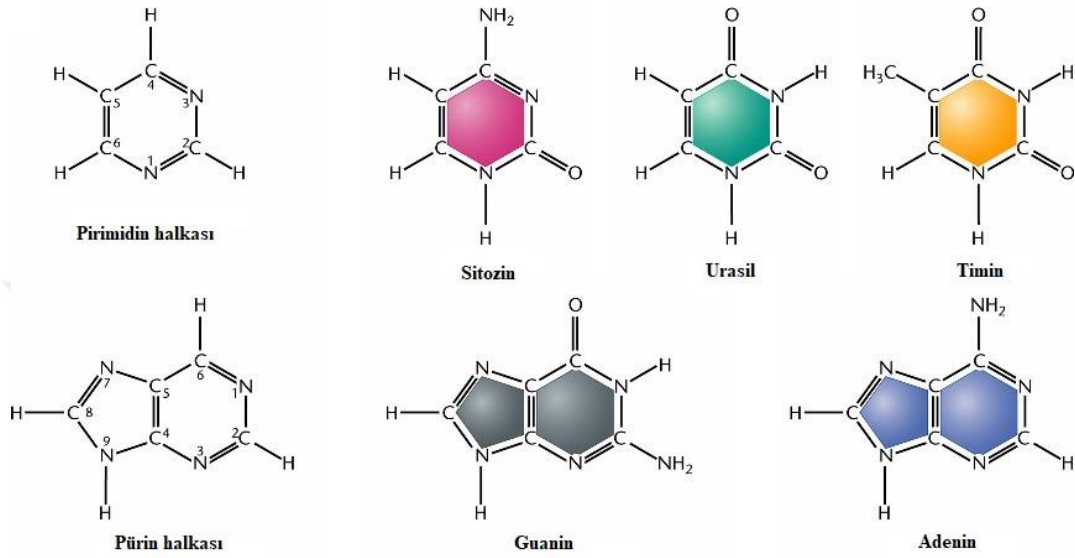


Şekil 10. DNA molekülünün çift sarmal yapısı (Ateto'dan, 122)

Nükleotitler, tüm nükleik asit moleküllerinin yapı taşlarıdır. DNA'nın da yapı taşı olan bu yapısal birimler üç temel bileşenden meydana gelmektedir. Bunlar azotlu organik bazlar, pentoz şekeri (5 karbonlu şeker) ve fosfat grubudur. Yalnızca şeker ve bazdan oluşan yapı nükleosit olarak adlandırılmaktadır. İki tür azotlu baz grubu bulunmaktadır. İlki dokuz üyeli ve çift halkalı pürinler diğeri ise altı üyeli tek halkalı pirimidinlerdir. Adenin (A) ve guanin (G) pürinleri oluşturmaktadır. Sitozin (C), timin (T) ve urasil (U) ise pirimidinleri meydana getirmektedir. Hem DNA hem de RNA A, C ve G bazlarını içerirken, T bazını yalnızca DNA, U bazını ise yalnızca RNA içermektedir. A, G, C, T ve U'nun kimyasal yapıları Şekil 11'de gösterilmektedir (122, 123).

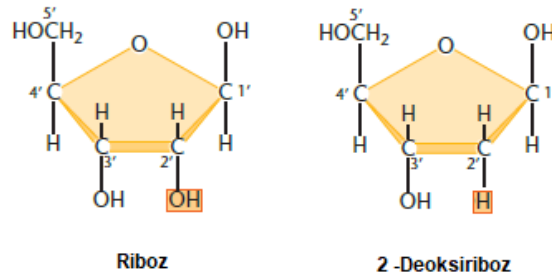
Nükleotitler, polinükleotit zincirinde birbirlerine fosfodiester bağıyla bağlanmaktadır. Ardışık iki nükleotit şekerinden birinin 3'-hidroksil grubunun sonraki nükleotit şekerinin 5'-hidroksil grubuna fosfat grubu aracılığı ile yapmış olduğu bu bağ fosfodiester bağı olarak adlandırılmaktadır (122, 123). Bazlar, N-glikozidik bağ ile deoksiriboza bağlanmaktadır. Bu bağlanma sırasıyla pirimidin ve pürin bazlarının 1 ve 9 numaralı azot atomu üzerindeki H ile deoksiribozun 1 numaralı karbon atomunda bulunan hidroksil grubunun birleşerek bir molekül su açığa çıkarmasıyla meydana gelmektedir (121-123).

Bir A-T baz çifti arasında iki hidrojen bağı bulunurken G-C baz çifti arasında üç hidrojen bağı bulunmaktadır (Şekil 10). Tamamlayıcı bazlar arasındaki hidrojen bağları çift sarmallı DNA'nın temel bir özelliğidir. Bu bağlar zayıf olmasına rağmen sarmalın termodinamik stabilitesine katkı sağlamaktadır (122, 124).



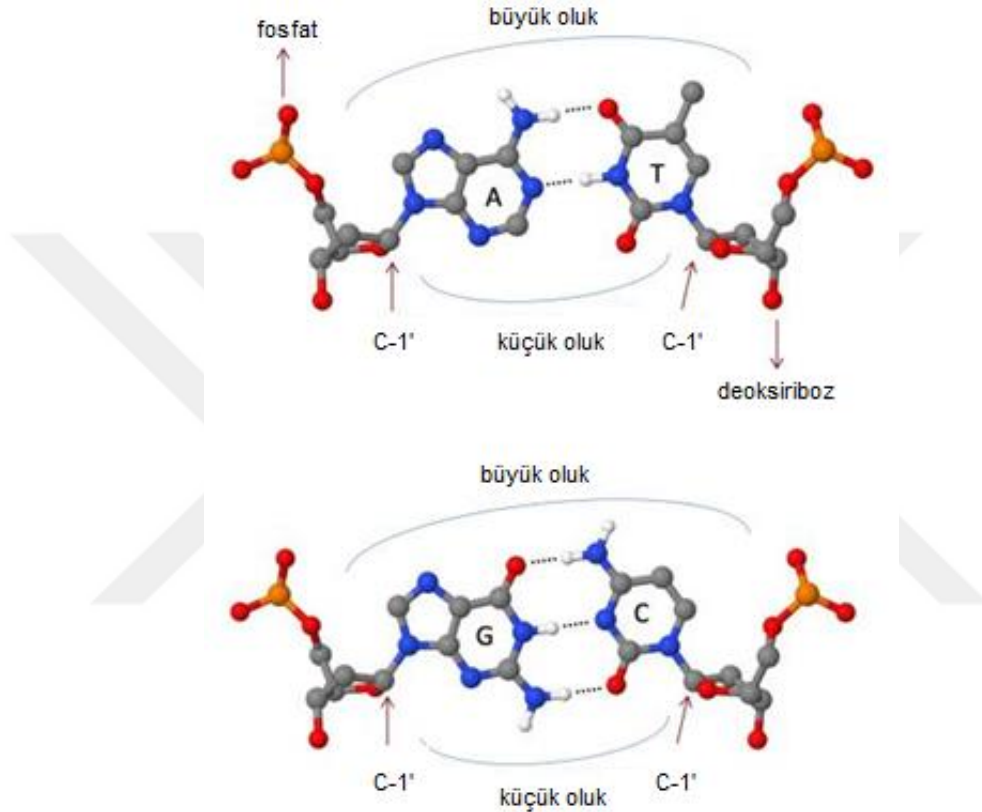
Şekil 11. Pürin ve pirimidin bazlarının kimyasal yapıları (Klug'dan, 123)

Pentoz şekerleri bulundukları nükleik aside göre isimlendirilmektedir. Ribonükleik asitler (RNA) riboz içerirken, deoksiribonükleik asitler (DNA) deoksiriboz içermektedir. Riboz ile karşılaştırıldığında, deoksiriboz, C-2' konumunda bir hidroksil grubu yerine bir hidrojen atomuna sahiptir. Şekil 12'de pentoz şekerlerinin halka yapıları gösterilmektedir (123).



Şekil 12. Pentoz şekerlerinin kimyasal yapıları (Klug'dan, 123)

DNA molekülü, çift sarmal yapısından dolayı şeker-fosfat omurgasında yer alan, boyut olarak birbirinden farklı iki oluğa sahiptir (122, 125). Küçük oluk, antiparalel DNA zincirlerinin birbirine en yakın oldukları yerdeki boşluğu temsil ederken büyük oluk, birbirinden en uzak oldukları alanı tanımlamaktadır (121). Şekil 13'te DNA'daki küçük ve büyük oluklar gösterilmektedir (120).

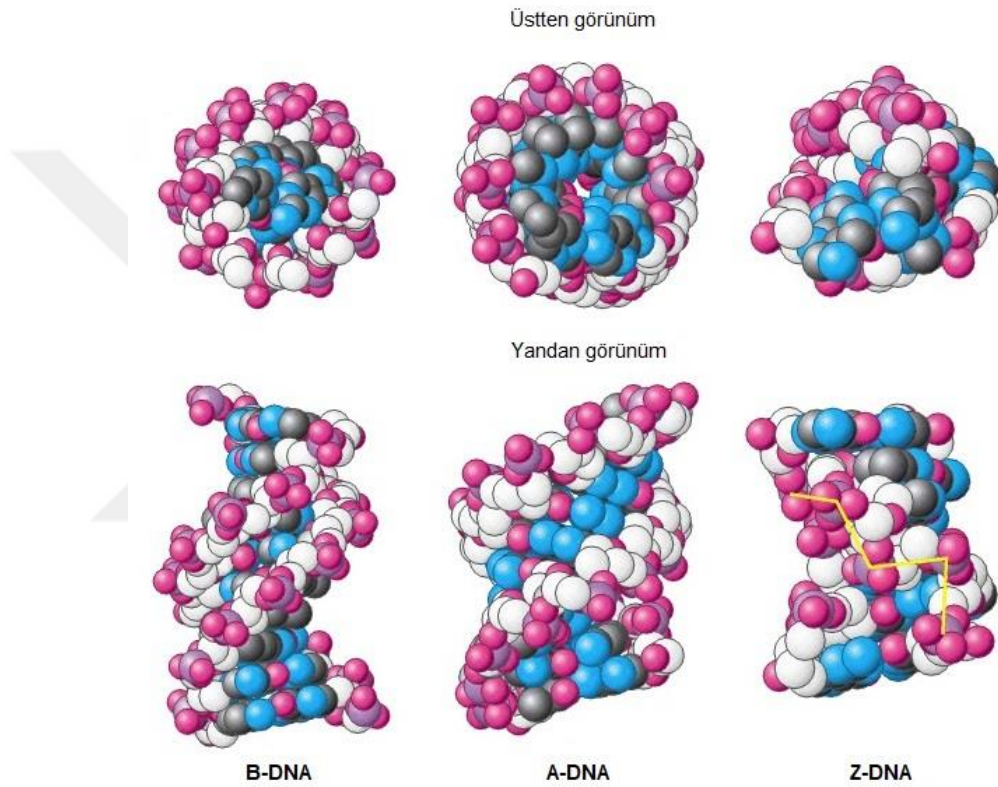


Şekil 13. DNA'daki küçük ve büyük oluklar (Minchin'den, 120)

DNA, değişik izolasyon koşullarına bağlı olarak farklı formlar alabilmektedir (123). Üç farklı DNA sarmalı formu bulunmaktadır: A-DNA, B-DNA, Z-DNA. Şekil 14'te DNA'nın A-, B- ve Z- formları gösterilmektedir (126).

Genel şekli ve yapısı bakımından aşina olduğumuz B-DNA formu, çift sarmalın Watson-Crick formudur. Aynı zamanda üç DNA sarmal ailesinden en yaygın olanı ve yapı bakımından en değişken olanıdır (124). Yüksek nemde gözlenen B formu, her turda 10 baz çifti, geniş bir ana oluk ve dar bir küçük oluğa sahiptir (122). Su aktivitesi düştükçe B-DNA A-formuna dönüşmektedir (9).

Düşük nem koşullarında gözlenen A formu, her bir tam turda 11 baz çifti içermektedir. Büyük oluğu daha dar ve B formundan çok daha derindir. Küçük oluğu daha geniş ve sığdır. Hücredeki DNA'nın büyük çoğunluğu B formuna sahip olsa da DNA, belirli DNA-protein komplekslerinde A formunu benimsemektedir. A-DNA aynı zamanda B-DNA'dan daha katıdır, çünkü bazlar merkezden daha farklı bir şekilde istiflenmiştir. Bu durum bazıları daha az esnek hale getirmektedir (122, 124).



Şekil 14. DNA'nın A-, B- ve Z- formları (Berg'den, 126)

Z-DNA, A ve B konformasyonlarından daha dardır ve dönüş başına 12 baz çifti içermektedir. A- ve B-DNA formları sağ-el dönüşlü sarmallar iken, Z-DNA formu sol-el dönüşe sahiptir. A-DNA, düşük hidrasyon ortamlarında tercih edilirken, Z-DNA yüksek tuz konsantrasyonlarında tercih edilmektedir (124). Bunların dışında farklı laboratuvar koşullarında keşfedilen DNA formları da bulunmaktadır: C-DNA, D-DNA, E-DNA, P-DNA (123). DNA'nın çoğu, Z-DNA oluşturabilen birkaç küçük bölge ile A- ve B-DNA konformasyonlarının bir karışımı halinde bulunmaktadır (124).

DNA dinamik bir moleküldür (127). Çift sarmal yapısındaki DNA, üç boyutlu uzayda kendi eksenini etrafında büküldüğünde süper sarmal denilen forma dönüşmektedir (128). Süper sarmal yapısı, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve rekombinasyonu gibi temel birçok metabolik yolda önemli rol oynamaktadır (129). Replikasyon aşaması DNA'da bir takım topolojik problemlere yol açmaktadır (130). Topoizomerazlar, bu problemlerin çözümü için gerekli olan enzimlerden biridir (131).

2.4.1. DNA Nükleaz Aktivitesi

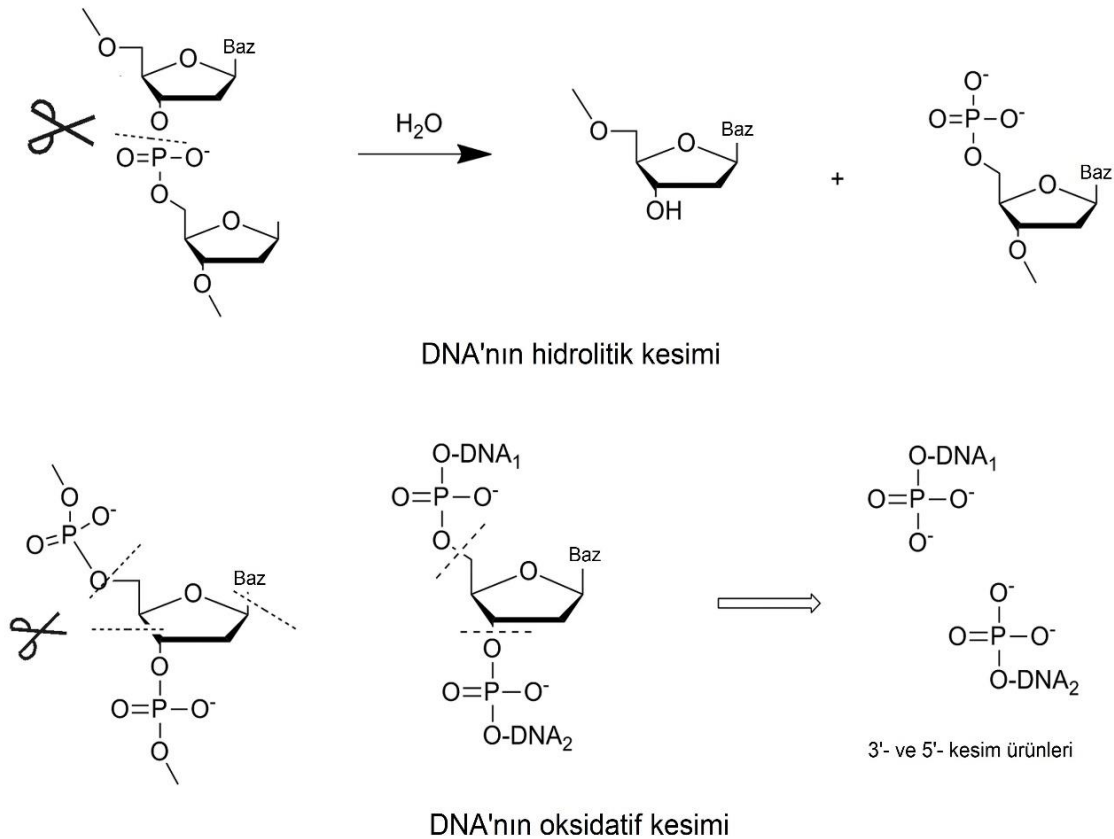
Son yıllarda DNA kesim ajanlarının izolasyonu, DNA'yı spesifik olarak tanıyabilen ve kesebilen model bileşiklerin tasarımı ve sentezine yönelik araştırmalarda çarpıcı bir artış meydana gelmiştir. Moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve tıp gibi birçok uygulama alanına sahip olan DNA restriksiyon ajanlarının çeşitli hastalıklara karşı etkili olabilecek kemoterapötik bileşiklerin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (132, 133).

DNA'daki fosfodiester bağları, fizyolojik koşullar altında bölünmeye karşı dikkate değer bir stabiliteye sahiptir. Bu istikrar, canlılığın sürdürülmesi için temel gerekliliklerden biri olarak kabul edilmektedir (134). Bununla birlikte, DNA kesimi tüm canlı sistemler için hayati bir süreçtir. Örneğin, topoizomeraz enzimleri, DNA'nın bir veya iki ipliğini keserek replikasyon, transkripsiyon ve diğer hücrel işlemlerde DNA'nın topolojik problemlerini çözebilmektedir. Bir başka örnek, hücreyi yabancı DNA'nın bölünmesiyle veya etkilenen hücrenin apoptozu sırasında hücrel DNA'yı parçalayarak virüs enfeksiyonuna karşı koruyan restriksiyon enzimleridir (veya endonükleazları). Birçok antikanser ilacının (örn. bleomisin) aktivitesi, DNA kesim aktivitesi ile hasta hücrelerde apoptozu tetikleyerek hücre ölümüne yol açmaktadır (135).

DNA kesim, genel olarak oksidatif kesim, hidrolitik kesim ve fotokimyasal kesim olmak üzere üçe ayrılmaktadır (134, 135). Oksidatif kesim deoksiribozun hidrojeninin ayrılması veya nükleobazların oksidasyonu ile gerçekleşmektedir (135, 136). Bu işlem sırasında oluşan reaktif oksijen türleri, ROS (Singlet moleküler oksijen, $^1\text{O}_2$, hidroksil radikali, $\text{HO}\cdot$, süperoksit radikali $\text{O}_2^{\cdot-}$) deoksiribozun ve nükleobazların zarar görmesine neden olabilmektedir (134, 135). Oksidatif kesime genellikle katkı maddeleri ve ışıkla indüklenen DNA kesim ajanlarının varlığı aracılık etmektedir. Yani bölünmeyi başlatmak için ışık veya H_2O_2 gibi harici bir ajan gerekmektedir (135).

Uygun çevre koşullarında (25°C) nötr pH'a sahip sudaki tipik bir DNA fosfodiester bağının yarı ömrünün on milyar ile yüz milyar yıl arasında değişebileceği tahmin edilmektedir. Hidrolitik kesim, DNA fragmanları oluşturmak için bu fosfodiester bağlarının su varlığında bölünmesiyle DNA'nın parçalanması olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemin genel mekanizması, Lewis asidi gibi davranan Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} ve Fe^{2+} gibi katalitik metal iyonlarının varlığı ile gerçekleşen hidroliz reaksiyonudur (135, 136).

Bu Lewis asitleri, fosfat grubunu nükleofilik saldırıya uğratarak, suyu veya hidroksiti nükleofil olarak aktive edebilmekte veya uzaklaşan alkolün ayrılma yeteneğini artırabilmektedir (135). Hidrolitik kesimde, oksidatif kesimin aksine deoksiriboz veya nükleobazlar zarar görmemektedir. Dolayısıyla tepkime ürünleri enzimatik olarak tekrar bağlanabilmektedir (134, 136). Şekil 15'te oksidatif ve hidrolitik DNA kesimin mekanizmaları gösterilmektedir (137).

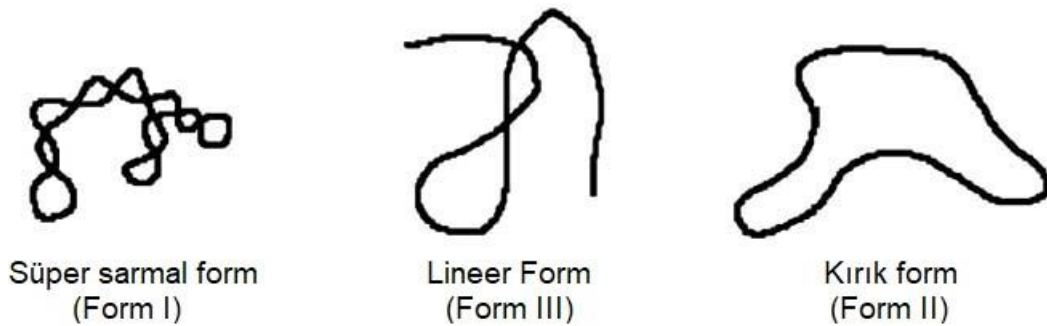


Şekil 15. Oksidatif ve hidrolitik DNA kesimin mekanizmaları (Wang'dan, 137)

Nükleik asitlerin fotokimyasal kesimi, nükleaz aktivitesini tetiklemek için ışığın kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Görünür veya UV'ye yakın ışıqla aktive edilen nükleazlar, transkripsiyon gibi işlemlerin incelenmesi ve nükleik asit yapısının araştırılması için kullanılabilir (135).

Fotonükleaz terimi, elektronik olarak uyarılmış bir durumda iken doğrudan bir nükleik asit ile reaksiyona giren ve nükleik asit zincirinin aniden kesilmesine neden olan bileşikler olarak tanımlanmaktadır (138). DNA'nın fotoksesimi, fotokimyasal olarak üretilen radikaller tarafından şeker halkasından hidrojen atomunun uzaklaştırılması, bazdan (genellikle guanin) fotoksesim ajanlarına doğrudan elektron transferi, uyarılmış fotonükleazdan enerji transferi ile singlet oksijen üretimi ve baz fragmanlarının oluşumu gibi çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkabilmektedir (135).

Geçiş metal kompleksleri gibi sentetik nükleazların nükleaz aktivitesini belirlemek için genellikle agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmaktadır (136). Bu yöntemin prensibi, moleküllerin agaroz jel içinde kütlelerinin, yüklerinin ve şekillerinin bir fonksiyonu olarak göç etmeleridir (139). Dairesel plazmit DNA elektroforeze tabi tutulduğunda bozulmamış süper sarmal DNA (form I) diğer formlara nazaran elektroforezde daha hızlı göç etmektedir. Bir DNA ipliğinde kesilme meydana gelirse, aşırı sargılı DNA gevşeyerek daha yavaş hareket eden bir kırık form (form II) oluşturmaktadır. Her iki iplikçik de kesilirse, form I ve form II arasında göç eden lineer bir form (form III) meydana gelmektedir. Şekil 16'da form I, form II ve form III'ün yapıları gösterilmektedir (140, 141).



Şekil 16. Plazmid DNA formları (Schleef'den, 141)

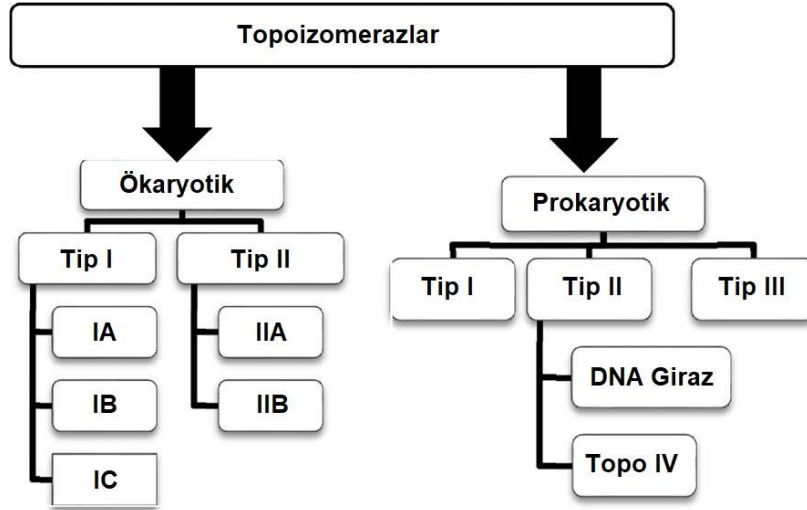
Form I, form II ve form III ile karşılaştırıldığında elektroforezde en hızlı göç eden formdur. Komplekslerin DNA kesim aktivitesi, süpersarmal formun, kırık ve lineer formlara dönüşümü ölçülerek belirlenmektedir (140).

2.5. Topoizomerazlar

Lineer yapıdaki DNA, içinde bulunduğu hücreden daha uzundur. DNA'nın hücre çekirdeğine sığabilmesi için sıkıca paketlenmesi gerekmektedir. Bu işlem aynı zamanda transkripsiyon, replikasyon ve rekombinasyon gibi yaşamsal süreçlerin devam edebilmesi için DNA molekülü üzerinde bulunan bilgilere erişime izin vermelidir. Genlerden bilgi türetilmesi için DNA iplikçiklerinin anlık olarak birbirinden ayrılması gerekmektedir (142). DNA zincirleri birbirinden ayrıldıkça sarmalın burulma stresi artmaktadır (143). Topoizomerazlar, hücre proliferasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon ve mitoz sırasında oluşan burulma stresini azaltarak DNA topolojisini düzenleyen enzimlerdir (144).

İlk DNA topoizomeraz, 1971 yılında James Wang tarafından *E. coli*'de keşfedilmiştir. Başta ω proteini olarak adlandırılan enzim günümüzde *E. coli* tip I topoizomeraz enzimi olarak bilinmektedir (145). Topoizomeraz I enziminin keşfinin ardından 1976 yılında DNA giraz, 1990 yılında topoizomeraz IV enzimleri keşfedilmiştir (146, 147).

Topoizomerazlar, tip I ve tip II olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Tip I enzimler, katalitik işlevlerini yerine getirmek için bir DNA zincirini hedef alırken tip II enzimler her iki DNA zincirini hedef almaktadır (148). Bilinen tüm DNA topoizomerazlar ortak bir özelliği paylaşmaktadır. Bu özellikleri iki ardışık transesterifikasyon reaksiyonunda DNA'nın fosfodiester omurgasını bölüp yeniden birleştirebilme yetenekleridir. Geçici DNA bölünmesi sırasında, enzimdeki tirozin hidroksil grubu ile kırılma bölgesinde yer alan 3' veya 5' fosfat grubu arasında geçici bir fosfodiester bağı oluşmaktadır. Bağ enerjisi enzim-DNA kompleksinde korunduğundan enzimin yeniden birleştirme aktivitesi için enerjiye ihtiyaç yoktur (146, 149, 150). Topoizomerazların genel sınıflandırması Şekil 17'de gösterilmiştir (151).

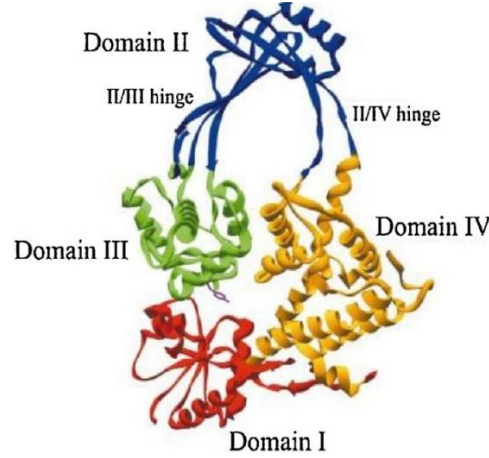


Şekil 17. Topoizomerazların sınıflandırması (Khan'dan, 151)

2.5.1. Tip I Topoizomerazlar

Tip I topoizomerazlar, herhangi bir enerji (ATP) gereksinimi olmaksızın hem negatif hem de pozitif süper sarmal DNA'yı gevşetebilme yeteneğine sahip monomerik enzimlerdir (150). Bu enzimler DNA sarmalının bir ipliğini kırıp yeniden birleştirerek veya kırık DNA ipliğinin sağlam iplik etrafında dönmesine izin vererek etki etmektedir (143). Tip I topoizomerazlar, ökaryotik ve prokaryotik tip I topoizomerazlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (13, 151).

Ökaryotik tip I topoizomerazlar yapıları ve mekanizmalarına göre iki sınıfa ayrılmaktadır: tip IA ve tip IB (151). Bunların dışında, son zamanlarda *Methanopyrus kandleri*de topoizomeraz V (Topo-V) olarak adlandırılan tip IC sınıfı bir enzim ortaya çıkmıştır (150). Ökaryotik tip IA topoizomeraz enzimi dört bölgeden oluşmaktadır. Domain I, topoizomeraz ve primazdan (TOPRIM) oluşurken, domain III ve IV katalitik tirozin rezidüsü içermektedir. Bunların dışında bir de domain III ve IV'ü, birbirine bağlayan esnek bir dumanin II köprüsü bulunmaktadır. Şekil 18'de ökaryotik tip IA topoizomeraz enzimi gösterilmektedir (151). Ökaryotik tip IA topoizomeraz enziminin çalışma mekanizması şu şekildedir: 1. İlk olarak tek sarmallı DNA molekülü, domain III ve I'e bağlanmaktadır. 2. DNA omurgası, geçici 5'-fosfotirozin ara ürününün oluşumuna yol açan katalitik tirozin rezidüsünün etkisiyle kırılmaktadır. 3. Daha sonra, domain II bir eksen veya dönüm noktası gibi kullanılarak ayrılmakta ve ikinci bir DNA dubleks veya ipliği buradan geçirilmektedir (13, 150).



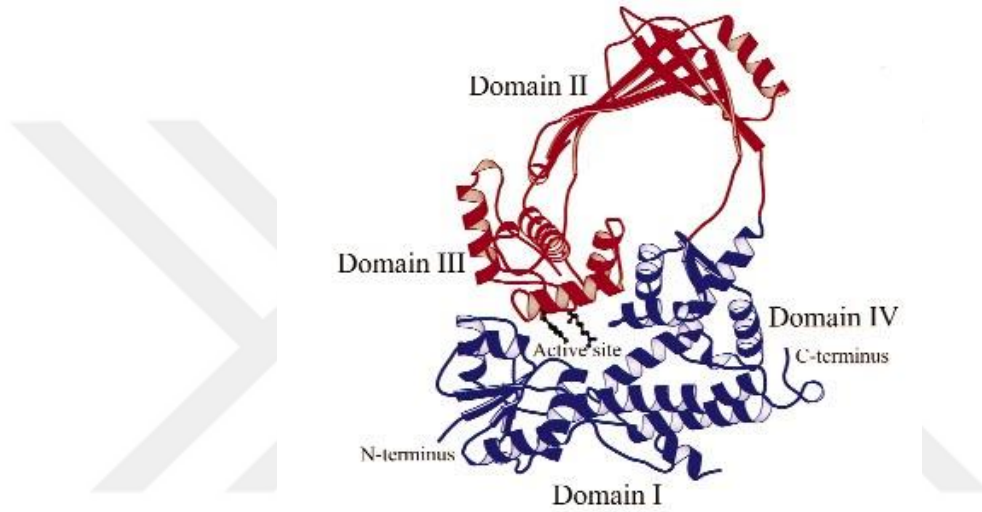
Şekil 18. Ökaryotik tip IA topoizomeraz enzimi (Khan'dan, 151)

Tip IB topoizomeraz enzimleri ökaryotlar, virüsler ve bakterilerde tanımlanmasına rağmen ökaryotik tip IB topoizomeraz enzimi boyut olarak diğerlerinden daha büyüktür. Ökaryotik tip IB topoizomerazların moleküler ağırlığı genellikle 90 kDa'nın üzerindedir. Bütün tip IB topoizomerazlar, yapıları ve fonksiyonları bakımından birtakım ortak özelliklere sahiptir. Hepsisi, aktif bölgesini Tyr, Arg, Arg, Lys ve His / Asn'nin oluşturduğu 5'li rezidü içermektedir (152). Ayrıca tip IB topoizomerazlar hem negatif hem de pozitif süpersarmal DNA molekülleri üzerinde etki edebilmektedir (153).

Tip I topoizomerazların genel kataliz mekanizması, enzimin katalitik tirozin kalıntısının DNA fosfodiester bağına nükleofilik saldırısından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, tip IA ve IB alt tipleri arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Tip IA topoizomerazlar kırık DNA'nın 5' fosfat ucuna bağlanırken, tip IB topoizomerazlar 3'-fosfat ucuna bağlanmaktadır (150). Tip IB enzimleri, bir DNA zincirinin diğerinin etrafında döndüğü "kontrollü rotasyon" olarak adlandırılan bir mekanizma ile DNA'yı gevşetmektedir (152, 153).

Prokaryotik topoizomeraz I enzimi, *E. coli*'de kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. *E. coli* dışında *Micrococcus luteus*, *Diplococcus pneumoniae* ve *Fervidobacterium islandicum* gibi birkaç bakteride de topoizomeraz I çalışılmıştır (154). Prokaryotik tip I topoizomerazlar, negatif süper sargılı DNA'nın gevşemesini enerjiden bağımsız bir şekilde katalize etmektedir. Bunun yanında prokaryotik tip I topoizomerazlar aktivite için Mg^{2+} gerektirirken, ökaryotik enzimlerin buna ihtiyacı yoktur (155).

E. coli daha önceleri ω proteini olarak bilinen bir topoizomeraz olan DNA topoizomeraz I'e sahiptir (156). Topoizomeraz I enzimi, 97 kDa ağırlığında bir monomerdur (13). TopA geni tarafından kodlanan *E. coli* topoizomeraz I enzimi, transkripsiyonla indüklenen negatif süper sargının giderilmesinde önemli bir role sahiptir (157). *E. coli* DNA topoizomeraz I'in 67 kDa N-terminal fragmanının yapısı, proteinin dört domain tarafından oluşturulan bir toroidal şekle sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 19) (158, 159).



Şekil 19. *E. coli* DNA topoizomeraz I'in 67 kDa N-terminal fragmanının yapısı (Feinberg'den, 159)

Proteinin merkezinde, DNA'yı kolayca barındırabilen yaklaşık 25 Å çapında büyük bir delik bulunmaktadır. Aktif bölge, iki alan arasındaki arayüzde yer almaktadır. Enzimin, kırık DNA zincirinde bir kapı açmak için büyük bir konformasyonel değişiklikle sinerji içinde bir DNA zincirini kırdığı öne sürülmektedir. Açıklık, diğer ipliğin proteindeki merkezi deliğe geçişine izin vermektedir. Geçişten sonra protein tekrar kapanmakta ve kopuk ipin yeniden bağlanmasına izin vermektedir. Yakalanan ipliği serbest bırakmak için proteinin açılması, reaksiyonu tamamlamaktadır. Reaksiyon için ATP gibi harici bir enerji kaynağı gerekmemektedir (158).

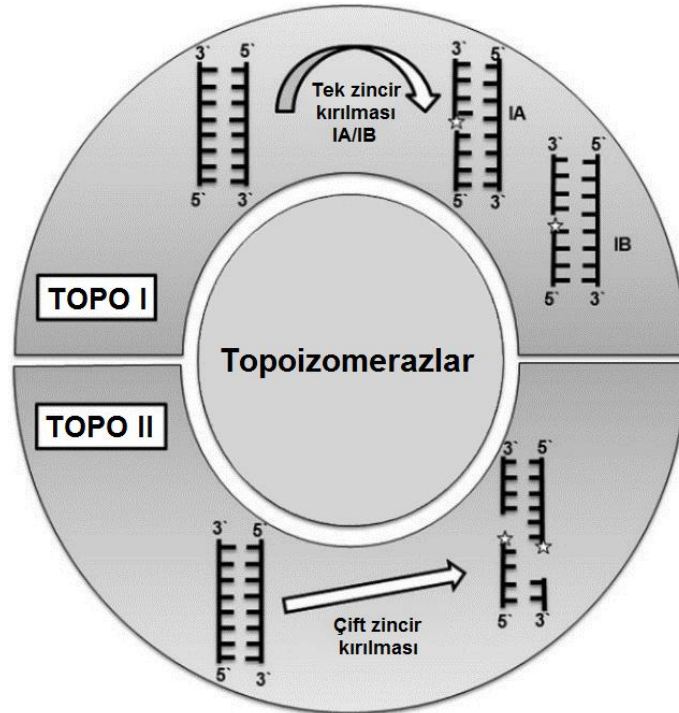
E. coli DNA topoizomeraz I ile yakından ilişkili olan bir diğer DNA topoizomeraz, *E. coli* DNA topoizomeraz III enzimidir (160). Topoizomeraz III topB geni tarafından kodlanan ve tek tip alt birimden oluşan bir enzimdir (13). *E. coli* DNA topoizomeraz III, negatif süper sargılı DNA'yı gevşetmenin yanı sıra katenasyon (iki tek dairesel DNA

ipliğinin replikasyondan sonra birbirine bağlanması) ve dekatasyon (iki bağlı, kapalı, dairesel kromozomun ayrılması) yapabilen bir topoizomerazdır. Topoizomeraz III, topoizomeraz I'den çok daha iyi bir katenasyon ve dekatasyon enzimidir (158). Yapısal olarak, iki protein arasındaki temel fark C-terminalinde bulunmaktadır. Topo I, DNA bağlanmasında rol oynayan ve aktivite için gerekli olan büyük bir çinko-şerit alanına sahiptirken, topo III çok daha küçük bir C-terminal alanına sahiptir (161).

2.5.2. Tip II Topoizomerazlar

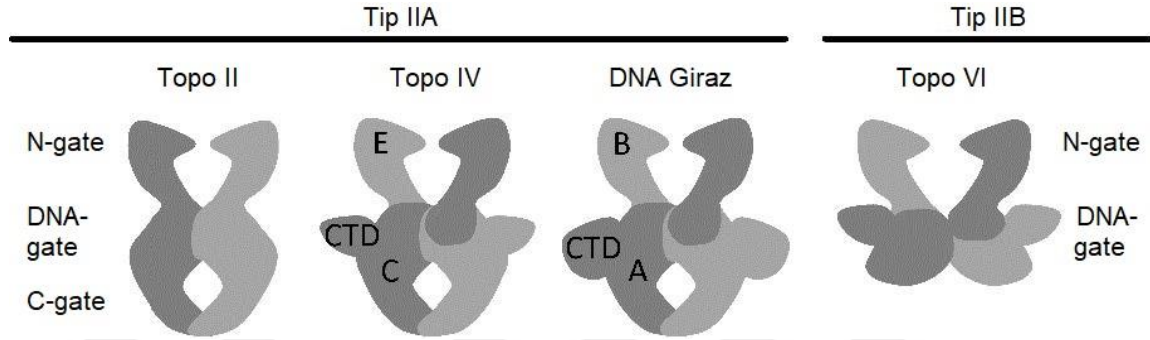
Tip II topoizomerazlar, *E. coli* hücre ekstratlarında ATP'ye bağımlı bir DNA süper sarmal aktivitesinin bulgusu ile keşfedilmiştir (162). Bu enzimler, DNA replikasyonu, kromozom ayrılması ve rekombinasyon gibi işlemlerde önemli roller üstlenmektedir (163). Ayrıca pozitif ve negatif süper sarmal DNA'nın katenasyonu/dekatasyonu ve gevşemesinde yine bu enzimler rol oynamaktadır (150).

Tip I topoizomerazların aksine, tip II enzimler dimerik bir yapıya sahiptir (150). Amino asit dizilerinin kapsamlı analizi, hepsinin evrimsel ve yapısal olarak ilişkili olduğunu göstermektedir (162). Tip II topoizomerazlar DNA'da çift sarmallı kırılmalar meydana getirerek bağlantı sayısını iki adımda değiştirmektedir (Şekil 20) (150).



Şekil 20. Tip I/tip II topoizomerazlar ve kataliz mekanizmaları (Bansal'dan, 150)

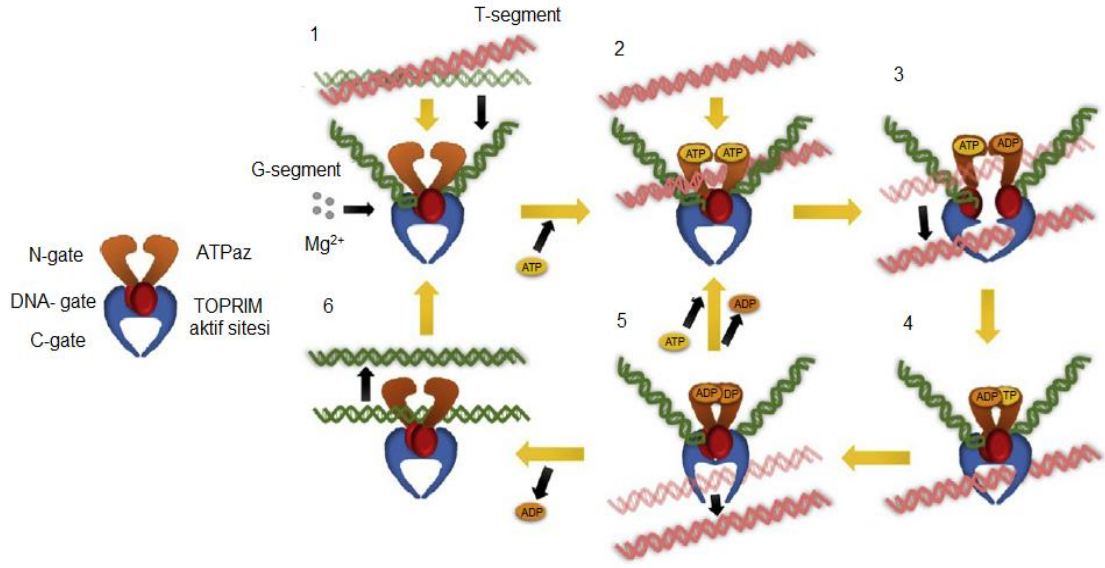
Tip II topoizomerazlar, iki katalitik tirozin rezidüsü içermektedir. Yapısal özelliklerine dayanarak, tip II topoizomerazlar tip IIA ve tip IIB enzimlerine ayrılmaktadır. Tip IIA enzimleri, N-gate, DNA-gate ve C-gate olarak adlandırılan üç protein/protein arayüzüne sahip simetrik bir yapıdan meydana gelmektedir (Şekil 21) (164).



Şekil 21. Tip II topoizomerazların yapısı. A: Girazın GyrA alt birimi, B: Girazın GyrB alt birimi, C: topo IV'ün ParC alt birimi, CTD: GyrA (giraz) ve ParC'nin (topo IV) C-terminal alanları, E: ParE alt birimi (Klostermeier'den, 164)

Topoizomeraz II enzimleri, enerji kofaktörü olarak Mg^{2+} gibi metal iyonları ve ATP gerektirmektedir (8, 150). Tip II topoizomerazlarla kataliz, birçok aşamada gerçekleşmektedir (150). İlk olarak, çift iplikli bir DNA segmenti olan G segmenti, DNA geçidine bağlanmakta ve her iki DNA ipliği de bölünmektedir. ATP'nin bağlanmasıyla tetiklenen N-kapısının kapanması, daha sonra ikinci bir çift sarmallı DNA olan T-segmentini yakalamaktadır. DNA-geçit açıklığı, T-segmentinin G-segmentindeki boşluktan geçişini sağlayarak enzimin üst boşluğundan alt boşluğuna yer değiştirmesine yol açmaktadır. G-segmenti yeniden bağlanmakta ve T-segmenti enzimi C-kapısından terk etmektedir (164). Şekil 22'de tip II topoizomerazların etki mekanizması gösterilmektedir (165).

Geçirilen segment (T segmenti) ve geçici çift iplikçik kopması aynı dairesel DNA molekülü üzerinde olduğunda, DNA'nın bağlanma sayısında bir değişiklik meydana gelmektedir. İki segment farklı DNA molekülü üzerinde olduğunda, katenasyon veya dekatasyon meydana gelmektedir (166). Bir tip IIB topoizomeraz olan topoizomeraz VI, C-kapısından yoksundur ve ATP'ye bağlı DNA gevşemesini sadece iki geçidi içeren bir mekanizma ile katalize etmektedir (164).



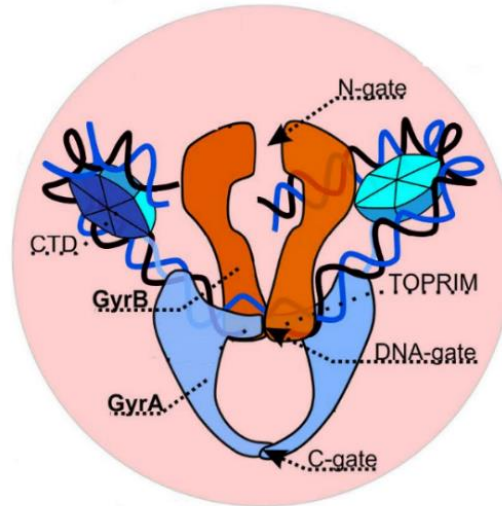
Şekil 22. Tip II topoizomerazların etki mekanizması (Murphy'den, 165)

Tip IIA topoizomerazlar, DNA giraz, bakteriyel topoizomeraz IV ve ökaryotik topoizomeraz II'yi içermektedir. Tip IIB topoizomeraz sınıfı ise sadece arkeler ve birkaç yüksek bitkide bulunan biyokimyasal ve yapısal açıdan farklı olan topoizomeraz VI'yı içermektedir. Memeli tip II topoizomerazlar, II α ve II β olmak üzere iki izoform olarak sınıflandırılmaktadır (150). Topoizomeraz II α , ağırlıklı olarak çoğalan hücrelerde ifade edilmektedir. Çoğalmayan hücrelerde saptanabilir ifadeden yoksundur. Topoizomeraz II β ekspresyonu, hücre döngüsü boyunca tüm memeli hücrelerinde gözlenebilmektedir (167).

Bakteriyel tip II topoizomerazlar, DNA giraz ve topoizomeraz IV şeklinde kategorize edilmektedir (150). Bu iki enzim, DNA'nın topolojik durumunu modüle etmek için DNA üzerinde geçici bir çift sarmal kırılması oluşturup sağlam çift sarmalın buradan geçişini kolaylaştıran enzimlerdir (1, 168). DNA giraz, DNA replikasyonunun başlaması, yeni oluşan DNA'nın uzaması ve replikasyon sırasında DNA'nın negatif süper sarılması için gereklidir; topoizomeraz IV replikasyonun sonunda DNA dekatasyonunda rol oynamaktadır. Bu enzimlerden birinin veya her ikisinin inhibisyonu, DNA sentezinin bozulmasına ve dolayısıyla hücre ölümüne yol açmaktadır (169).

E. coli tip II topoizomerazlarının her ikisi de hücrenin hayatta kalması için gereklidir. Topoizomeraz IV, en son keşfedilen *E. coli* topoizomeraz enzimidir ve yapı olarak DNA giraza benzemektedir (13, 151).

DNA giraz ve topoizomeraz IV, sırasıyla GyrA₂GyrB₂ ve ParC₂ParE₂ şeklindeki heterotetramerik yapılara sahiptir. GyrA ve ParC alt birimleri, DNA bölünmesini başlatan bir fosfotirosil bağı aracılığıyla DNA'ya kovalent olarak bağlanan katalitik tirozin içermektedir (170). DNA girazın 97 kDa moleküler ağırlığa sahip A alt birimi, 59 kDa N-terminal alanı (NTD) ve 38 kDa C-terminal alanından (CTD) oluşmaktadır. A alt birimleri DNA bağlanmasında yer alan fonksiyonel birimleri içermektedir. GyrA'nın C-terminal alanı, substrat tanıma, hücrel hedefleme ve diğer proteinlerle etkileşimler için önemlidir. B alt birimleri, 90 kDa'dır. ATPaz alanı ve TOPRIM alanı olmak üzere iki alandan oluşmaktadır. Bu alt birim, ATP bağlanmasından, hidrolizinden ve DNA bağlanmasını desteklemekten sorumludur (Şekil 23) (171). Topoizomeraz IV enziminin aktif bölge tirozini, C alt birimlerinde bulunmaktadır. E-alt birimi, enzimin ATPaz etkinliğinden sorumludur (151).



Şekil 23. *E. coli* DNA giraz enziminin yapısı (Sutormin'den, 171)

2.6. Topoizomerazların İnhibisyonu

Hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunan topoizomeraz enzimleri, replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon, genom stabilitesinin korunması, kromozom yoğunlaşması ve ayrılması gibi işlemler için zorunlu olan enzimlerdir (172, 173). Hücrelerin hayatta kalabilmesi için büyük öneme sahip olan bu enzimler aynı zamanda DNA zincir kırıklarına neden olan kısa ömürlü katalitik ara ürünlerin birikmesine de yol açabilmektedir (174). Canlı organizmalardaki bu ikili rolleri topoizomerazları birçok

antikanser ve antibakteriyel bileşimin hedefi haline getirmiştir (174, 175). DNA topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonu çeşitli moleküler mekanizmalarla meydana gelmektedir (176). Normalde, topoizomerazlar zincir kırılma bölgesindeki DNA omurgasında aktif bölge tirozini ile fosfat grubu arasında bir fosfotirozin bağı oluşturarak katalitik bir ara ürün olan kovalent topoizomeraz-DNA kompleksini oluşturmaktadır (7). Topoizomeraz zehirleri olarak bilinen bileşikler, enzim aktivitesi sırasında kısa süreli olarak meydana gelen bu kovalent DNA-enzim kompleksine (cleavage complex) bağlanarak bu kompleksi kararlı kılmaktadır. Böylece DNA'da geçici olarak meydana gelen tek veya çift sarmallı kırıkların tekrar birleşmesine mani olmaktadır (174, 177-179). Bunun yanında hücre içinde tek ya da çift sarmallı kırıklara sahip DNA fragmanlarının birikip hücre ölümünün (apoptozis) meydana gelmesine yol açmaktadır (172, 177, 178). Topoizomeraz zehirleri, klinik olarak başarılı antibakteriyel ilaçları (örn. kinolonlar) ve antikanser ilaçları (örn. etoposid) içermektedir (7).

İkinci bileşik grubu katalitik inhibitörlerdir. Bu bileşikler etkilerini topoizomerazların katalitik işlevine müdahale ederek göstermektedir. Enzim-DNA etkileşimini DNA'ya veya enzime bağlanıp engelleyerek enzimin aktif bölgesini bloke etmektedir (7, 172). Bunun sonucunda kovalent ara ürün oluşumu engellenmektedir (7). Ayrıca enzimin katalitik döngüsündeki basamaklardan herhangi birini durdurup DNA'da meydana gelen süper kıvrımların ve düğümlerin çözülmesini önleyerek mitotik ve mayotik hatalara neden olmaktadır (180). Topoizomeraz-DNA etkileşiminin inhibisyonu, nükleik asit metabolizmasında kusurlara neden olup organizma için ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir (174). Bir diğer katalitik enzim inhibisyonu ATP hidrolizinin küçük moleküller tarafından rekabetçi inhibisyonu ile meydana gelmektedir.

Bu mekanizma ile DNA T-segmentinin G-geçidi boyunca C-terminal alanına ilerlemesi engellenerek DNA transkripsiyonunun ve replikasyonun durması sonucu hücre ölümü gerçekleşmektedir (176). Topoizomeraz zehirleri, katalitik inhibitörlerin aksine topoizomerazların normal katalitik aktivitesini engellememektedir (181). Ayrıca topoizomeraz zehirleri için sitotoksiste, hedef enzimin hücresel seviyesi ile doğru orantılı iken katalitik inhibitörlerde enzim miktarı ile ters orantılıdır. Bu nedenle, topoizomerazların artan seviyeleri, hücreleri topoizomeraz zehirlerine aşırı duyarlı hale getirirken katalitik inhibitörlere dirençli hale getirmektedir (174).

DNA giraz ve topoizomeraz IV insanlarda bulunmadığından dolayı önemli antibakteriyel ilaç hedefleridir (182, 183). Bakteriyel topoizomerazlar halihazırda geniş çapta araştırılmış olsalar da antibakteriyel ilaç keşfi için hala değerli moleküler hedeflerdir (170). Özellikle bakteriyel topoizomeraz IA, ilgi çekici ve yeterince araştırılmamış bir ilaç hedefidir. Dolayısıyla son dönemlerde antibakteriyel tedavi için seçici ve güçlü topoizomeraz I inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik artan yoğun bir ilgi bulunmaktadır (11). Florokinolonlar, prokaryotik tip II topoizomerazların güçlü inhibitörleridir ve yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir (184).

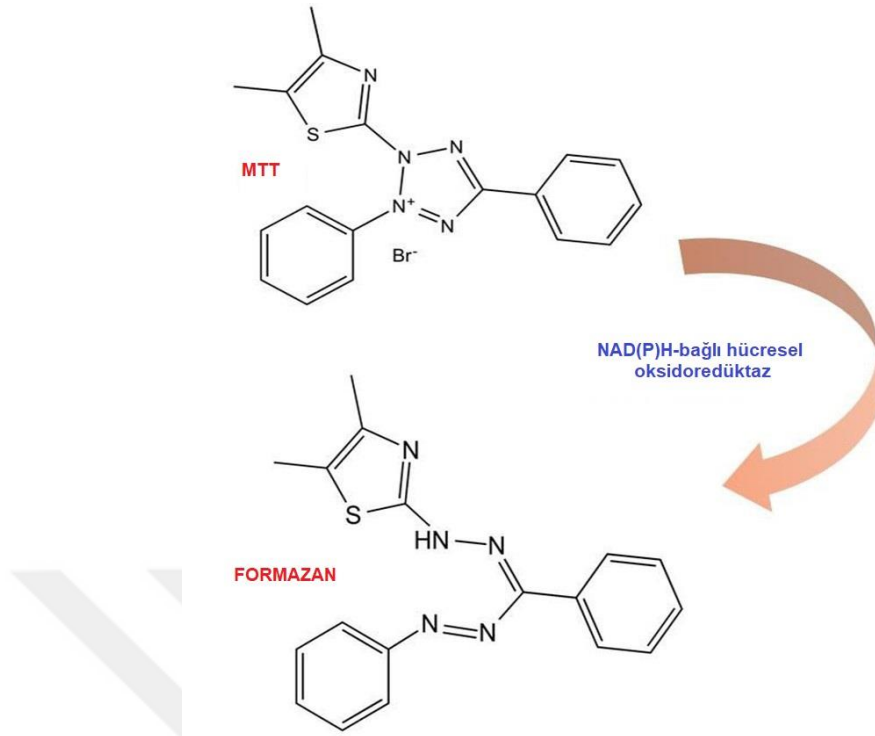
Kemoterapötik ilaçlar genellikle hızlı bölünen hücreleri hedef alacak şekilde tasarlanmaktadır, çünkü sürekli proliferasyon kanserin ortak bir özelliğidir. Hızlı DNA replikasyonu, yüksek oranda proliferatif hücreler için gerekli bir prostestir. Bu nedenle DNA replikasyonunun bloke edilmesi, çok sayıda mutasyon ve kromozom düzenlemeleri yaratarak hücre ölümünü tetikleyecektir (185). İnsan topoizomeraz I ve topoizomeraz II enzimlerinin her ikisi bu amaçla incelenen antikanser ilaç hedefleridir (186). Ökaryotik DNA topoizomeraz I inhibitörleri arasında kamptotesin, irinotekan ve topotekan bulunurken topoizomeraz II inhibitörleri arasında doksorubisin, epirubisin ve etoposid gibi bileşikler bulunmaktadır (184, 187).

2.7. MTT Sitotoksosite Testi

Sitotoksosite, bir veya daha fazla hücre bileşeninin yapısal veya işlevsel özellikleri üzerindeki olumsuz etkilerin ifadesidir. Birçok kimyasalın toksik etkilerini tüm dokularda ortak olan hücresel yapılara veya işlevlere müdahale ederek ve dokuya özgü hücre yapıları veya işlevlerini etkileyerek gösterdiği öne sürülmektedir (188). Doğal kaynaklı veya sentezlenmiş yeni bir ilaç molekülü bulunduğu zaman, bunun konakçı hücreye karşı güvenilirliği veya kanser hücresindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi gerekmektedir (189). Bu amaçlarla hücre kültüründe gerçekleştirilen ölçüm metotlarına *in vitro* sitotoksosite testleri denilmektedir (190). Yeni ürün veya bileşenlerin tahriş edici potansiyelini değerlendirilirken genellikle insan testlerinden önce hayvanlar üzerinde *in vivo* testler gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte bu yöntemlere dair etik ve finansal itirazların yanı sıra, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası değişkenlik ve cildin morfolojik açıdan hayvan ve insan arasındaki temel farklılıkları gibi bazı bilimsel dezavantajlar bulunmaktadır.

Bu nedenle çok sayıda bileşiğin toksisitesini tahmin edebilmek için basit ve tekrarlanabilir *in vitro* testlere ihtiyaç vardır (191). *In vitro* sitotoksosite yöntemleri umut verici görünse de kullanımlarında bazı sınırlamaların olduğu unutulmamalıdır. Örneğin *in vitro* deri kültürü sistemleri tipik olarak sadece bir veya iki ana deri hücresi tipinden oluşmaktadır. *In vitro* deri yapılarında pek çok önemli hücre tipi (örn. ter bezleri, rete sırtları) bulunmamaktadır (191). Ayrıca deneyin sonunda kaç tane canlı hücre kaldığını veya kaç hücrenin öldüğünü bilmek önemlidir (192). *In vitro* sitotoksosite testleri genel olarak boya dışlama testleri (tripan mavisi, eozin, kongo kırmızısı, eritrosin B testleri), florometrik testler (alar blue testi), luminometrik testler (ATP testi), enzimatik testler ve kolorimetrik testler (MTT testi, MTS testi, XTT testi, WST-1 testi, WST-8 testi, LDH testi, SRB testi, NRU testi ve kristal mor testi) şeklinde sınıflandırılmaktadır (190, 192). Kolorimetrik testlerin prensibi, hücrelerin metabolik aktivitesini değerlendirmek için bir biyokimyasal markörün ölçülmesidir. Kolorimetrik testlerde kullanılan reaktifler, hücrelerin canlılığına yanıt olarak bir renk geliştirerek, spektrofotometre ile hücre canlılığının kolorimetrik ölçümüne izin vermektedir (192).

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi, sitotoksositeyi veya hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan en yaygın kolorimetrik testlerden biridir (192). 1983 yılında Mosmann tarafından geliştirilen MTT testi daha sonra birçok bilim adamı tarafından değiştirilmiştir (193). MTT, çözünür sarı renkteki pozitif yüklü bir tetrazolyum tuzudur (190, 194). MTT testinin arkasındaki biyokimyasal mekanizma, sarı renkteki MTT bileşiğinin, NAD(P)H'ye bağlı mitokondriyal süksinik dehidrojenaz (oksidoredüktaz) enziminin aktivitesiyle çözünmeyen formazana ((E, Z) -5-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-1,3-difenilformazan) dönüştürülmesidir (189, 194) (Şekil 24).



Şekil 24. MTT'nin formazana dönüşümü (Bahuguna'dan, 189)

Sağlıklı ve hızlı büyüyen hücreler bu dönüşümü kolayca gerçekleştirebilirken ölü veya inaktif hücreler bunu yapamamaktadır (189). Oluşan formazan, 540/720 nm'de absorpsiyona bağlı olarak karakteristik mor bir renk vermektedir (189, 195). Mor rengin yoğunluğu hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Dolayısıyla hücre canlılığını göstermektedir. Mor renk yoğunluğundaki azalma, azalan hücre sayısını ve verilen maddenin sitotoksitesini göstermektedir (189). Formazan suda çözünmediği için hücrelerde mor iğne şeklinde kristaller oluşturmaktadır. Absorbansın ölçülmesinden önce, kristalleri çözündürmek için dimetil sülfoksit (DMSO) veya izopropanol gibi organik bir çözücü gerekmektedir (192).

MTT testi klinikte genellikle yeni ilaçların veya ilaç kombinasyonlarının potansiyel antitümör aktivitesini belirlemek için kullanılmaktadır. Bunun dışında, ilaç direnci ve antibakteriyel bileşiklerin çeşitli hücre hatlarındaki etkisini incelemek için uygun bir araçtır (195, 196).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Marka / Model
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
CO ₂ inkübatörü	Nüve EC160
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	Thermo Scientific 88400V
Elektroforez güç kaynağı	BioRad Power Pac™ Basic
Faz kontrast mikroskop	Leica DM1
Hassas analitik terazi	Ohaus PA 2140
Isıtıcı	Wisd Hotplate MSH-20A
Jel görüntüleme sistemi	Bio Rad Universal Hood imager gel
Laminar akış kabini	Mikrotest Class II A2
Magnetik karıştırıcı	Dragon MS-H-Pro
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific Multiskan Go
Otomatik pipetler	Socorex
pH metre	Ohaus Starter 300
Santrifüj	Nüve MF800R
Su banyolu çalkalayıcı	Memmert WNB 7-45
Vorteks	Visemix WM-10 Wisd
Yatay DNA elektroforezi	Biorad Wide Mini-Sub Cell GT System

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Adı	Marka, Kodu
Trisma Baz	Sigma, 93362
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma, S7653
Etidyum bromür (EB)	Sigma, E7637
Agaroz	Sigma, A9539
Asetik Asit	Sigma, A6283
Etilendiamin tetraasetik asit disodyum (EDTA-Na ₂)	Sigma, E5134
β-merkaptotanol (ME)	Sigma, M3148
Bromofenol mavisi	Sigma, B0126
Ksilen siyanol	Sigma, X4126
Metanol	Isolab, 947.043
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, L3771
Gliserol	Sigma, G5516
pBR322 plazmid DNA	Thermo Scientific, SD0041
<i>E. coli</i> Topoizomeraz I Enzimi	New England BioLabs, M0301S
<i>E. coli</i> DNA Giraz Enzimi	TopoGEN, TG2000G-1
<i>E. coli</i> Topoizomeraz IV Enzimi	TopoGEN, TG2000EC-1
Potasyum klorür (KCl)	Sigma, P9333
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	Sigma, M8266
Ditiyoeritol (DTT)	Sigma, 43815
Spermidin	Sigma, S0266
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma, A2153
Adenozin trifosfat (ATP)	Sigma, A2383
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, 472301
Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma, D6421
Fetal Bovine Serum (FBS)	ATCC 30-2020
Tripsin/EDTA	Multicell, 3R5-542-EL
Streptomisin/Penisilin	Multicell, 420-201-EL
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Serva, 2039502

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

1 000 ppm TPOAC bileşiğinin hazırlanması: 1 000 000 ppm TPOAC stok çözeltisinden saf su kullanılarak, 1 000 ppm TPOAC çözeltisi hazırlanmıştır.

50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu: 605.70 mg Trisma baz tartılmıştır. Saf su ile çözülüp hacmi 75 mL'ye tamamlandıktan sonra seyreltik HCl ile pH 7'ye ayarlanıp, saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Yürütme Tamponu (10X TAE) (pH 8): 24.20 g Trisma baz, 5.60 mL asetik asit, 10 mL 0.5 M EDTA son hacim 500 mL olacak şekilde saf su içerisinde çözülüp 4 °C'de saklanmıştır.

%0.8'lik Agaroz Jel: 800 mg agaroz tartılıp, 100 mL TAE (1X) çözeltisi ilave edildikten sonra, ısıtıcı yardımıyla kaynatılarak çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra soğutulan çözeltiliye 7 µL EB (5 mg/mL) ilave edilerek agaroz jel tankına dökülüp soğuması beklenmiştir.

Agaroz Jel Yükleme Boyası: 1 g SDS (%10), 20 mg bromofenol mavisi (%0.2), 20 mg ksilen siyanol (%0.2) ve 3 mL gliserol (%30) içerecek şekilde saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

0.01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (10X): 10 adet PBS tableti balon jolenin içerisine konuldu, saf su ile hacmi 900 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 7.4'e ayarlanıp saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Otoklavlanan çözelti, +4 °C'de saklanmıştır.

PBS (1X): 10 mL fosfat tampon çözeltisi (10X) alınıp, saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Tripsin-EDTA çözeltisi: 200 mg tripsin ve 40 mg EDTA tartılıp, PBS ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 0.22 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Antibiyotik çözeltisi: 1 mL streptomisin (10 mg/mL)/penisilin (10 000 U) alınıp saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 0.22 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Hücre stoklama besiyeri: Besiyeri içeriği 400 µL FBS, 100 µL gliserin ve 5 µL antibiyotik çözeltisi olacak şekilde oluşturulmuştur.

HaCaT hücreleri için besiyeri: Besiyeri içeriği 10 mL FBS, 1 mL antibiyotik çözeltisi ve 89 mL DMEM çözeltisi olacak şekilde oluşturulmuştur.

MTT çözeltisi: 500 mg MTT tartılıp, üzerine 100 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ilave edilmiştir. Çözelti +4 °C’de karanlıkta saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA Nükleaz Çalışması

TPOAC bileşiğinin DNA nükleaz aktivitesi süpersarmal pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemiyle belirlenmiştir. pBR322 plazmid DNA’nın moleküllerin nükleaz aktivitesinin belirlenmesinde oldukça yaygın kullanılan bir DNA türü olduğu bilinmektedir. Süpersarmal plazmid DNA elektroforeze maruz bırakıldığında, süpersarmal formun (Sc) en hızlı göç ettiği bilinmektedir. Maddelerle veya ışıkla etkileşim sonrası tek bir zincirde kırılma meydana geldiğinde kırık form (Nc) oluşmaktadır. Bu formun göç etmesi diğerlerine nazaran daha uzun sürmektedir. Çift zincirde kırılma meydana gelirse lineer form (Lc) oluşmaktadır. Oluşan form, süpersarmal ve kırık formun arasında olacak şekilde göç etmektedir (197).

Bu çalışma kapsamında TPOAC bileşiğinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA nükleaz aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmada agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plazmid DNA, 7 µL tampon çözeltisi (50 mM Tris-HCl (pH 7)) ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 ppm) ilave edilip, 37 °C’de 15, 30 ve 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında, oluşturulan bu karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak SDS kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR System cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (197).

3.2.2. Topoizomeraz Enzim İnhibisyonları

TPOAC bileşiğinin DNA giraz, topoizomeraz I ve IV enzimlerinin inhibisyonuna etkisi, süpersarmal pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemiyle ölçülmüştür.

3.2.2.1. *E. coli* Topoizomeraz I İnhibisyonu

TPOAC bileşiğinin topoizomeraz I enzimi inhibisyon etkisi New England BioLabs (M0301S) firmasından temin edilen kit kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada kuyu içeriği 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine tampon çözelti (CutSmart® Buffer), 1 Ünite topoizomeraz I enzimi ve bileşiğin artan konsantrasyonları (12.5, 25, 50 ve 100 ppm) ilave edilip, 37 °C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda pBR322 plazmid DNA ilave edilip, oluşturulan bu karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 45 V, 400 mA akım uygulanarak 180 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak SDS kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (198).

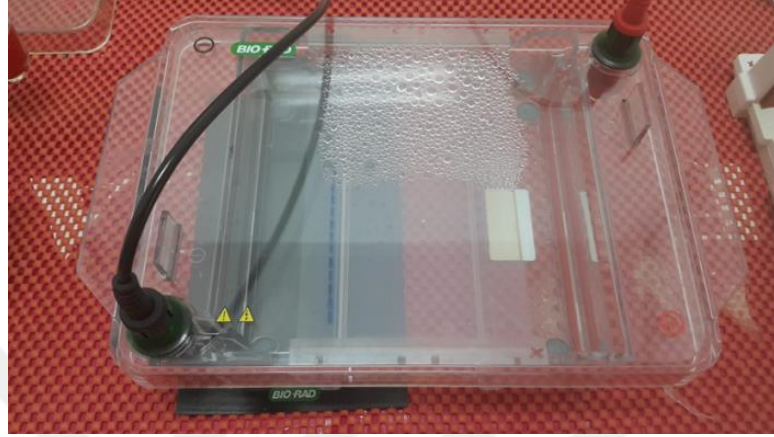
3.2.2.2. *E. coli* DNA Giraz İnhibisyonu

TPOAC bileşiğinin DNA giraz enzimi inhibisyon etkisi TopoGEN (TG2000G-1) firmasından temin edilen kit kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada kuyu içeriği 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine tampon çözelti (Gyrase Assay Buffer), 1 Ünite DNA giraz enzimi ve bileşiğin artan konsantrasyonları (12.5, 25, 50 ve 100 ppm) ilave edilip, 37 °C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda pBR322 plazmid DNA ilave edilip, oluşturulan bu karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 45 V, 400 mA akım uygulanarak 180 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak SDS kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR System cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (199).

3.2.2.3. *E. coli* Topoizomeraz IV İnhibisyonu

TPOAC bileşiğinin *E. coli* Topoizomeraz IV enzimi inhibisyon etkisi TopoGEN (TG2000EC-1) firmasından temin edilen kit kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada kuyu içeriği 10 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Kuyu içeriğine tampon çözelti (Topoisomerase IV Assay Buffer), 1 Ünite Topoizomeraz IV enzimi ve bileşiğin artan konsantrasyonları (12.5, 25, 50 ve 100 ppm) ilave edilip, 37 °C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda pBR322 plazmid DNA ilave edilip, oluşturulan bu karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 45 V, 400 mA akım uygulanarak 180 dakika jelde yürütülmüştür.

Bu çalışmada pozitif kontrol olarak SDS kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR System cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (200).



Resim 1. Agaroz jel elektroforezi

3.2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışma kapsamında kullanılan keratinosit (HaCaT) hücre hattı Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Hücreler -196 °C'de sıvı azot tankı içerisinde saklanmıştır. Hücre kültürü çalışmaları Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Hücre Dizisinin Açılması, Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması

-196 °C'de kriyovial içerisinde saklanan hücrelerin 37 °C'lik su banyosunda hızlıca çözünmeleri sağlanmıştır. 1 mL hücre 15 mL'lik falkona alınıp, besiyeri ilave edilerek hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hücre süspansiyonları 100 rcf'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelletine 1 mL taze besiyeri eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı ve hücre çökeleklerinin süspanse olması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonu T-25 flasklarda 10 mL besiyer içerisinde ekilerek 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübatörde çoğaltılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler faz kontrast mikroskop ile kontrol edilerek flask yüzeyinin %70-80'lik kısmının kaplandığı tespit edilince pasajlama yapılmıştır.

Hücre pasajlama işleminde öncelikle flasklardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tripsin aktivitesini ve hücrel atıkları azaltan serum artığının uzaklaştırılması için flasklar PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra flasklara tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilip, inkübatörde 5 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında flasklara besiyere ilave edilip, hücre süspansiyonu 100 rcf 'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant kısımları 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırılmıştır. Bu hücre süspansiyonundan 10 μL alınıp, steril ependorf içerisinde 10 μL tripan blue ile karıştırılmıştır. Karışım lam üzerine Neubauer hematositometre lamına aktarılıp mikroskop yardımıyla canlı hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayımı yapılan hücreler flasklara tekrar ekilip, inkübe edilerek kültüre edilmiştir.

Hücre kültüründe meydana gelebilecek kontaminasyonlardan sakınmak amacıyla hücreler, belli aralıklarla dondurularak saklanmıştır. Sayımı yapılan yaklaşık 10^6 hücre/mL olan hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri ilave edilmiştir. Hazırlanan hücre stokları kriovial içerisine ilave edilerek önce $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat, daha sonra $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılmıştır.

3.2.4. MTT Hücre Canlılık Testi

Bileşiğin 20 000 ppm stok çözeltisi saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra altı farklı konsantrasyona (0.09-200 ppm) seyreltme gerçekleştirilmiştir. Maruziyet besiyerleri çözücü oranı %0.01'i geçmeyecek şekilde oluşturulmuştur. Çalışmada negatif kontrol grubu için sadece besiyeri içeren hücreler, çözücü kontrol grubu için %0.01 oranında çözücü ve pozitif kontrol grubu için de SDS kullanılmıştır.

Hücre kültürü pasajının ardından sayımı gerçekleştirilerek 96 kuyucuklu mikrolaka içerisine her kuyucuk için 1×10^5 hücre/100 μL olacak şekilde ilave edilmiştir. Mikrolaka 24 saat $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ve %5 CO_2 inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlanmıştır. Böylece pasaj sırasında tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zararlar ortadan kaldırılmıştır. Bu süre sonrasında önce kuyu içerikleri vakum yardımıyla çekilerek atılıp, sonra bileşiklerin farklı konsantrasyonları içeren maruziyet besiyerleri ilave edilmiş ve 24 saat $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Bu süreler sonunda besiyerleri tekrar atılmıştır. 0.5 mg/mL MTT olacak şekilde hazırlanan besiyerinden her kuyucuk başına 100 μL konulmuştur.

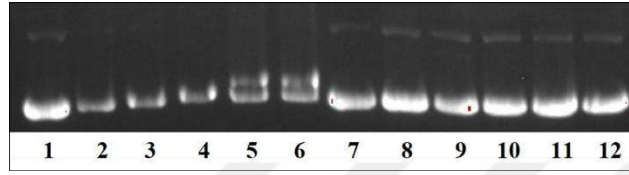
Plaka inkübatöre alınarak 2 saat beklenmiştir. Bu süre sonrasında hücrelerin yüzeyinde bulunan besiyeri atılıp, 100 µL DMSO ilave edilmiştir. Plaka 10 dakika çalkalayıcıda bekletilip, MTT'nin indirgenmesi sonucu oluşan mor renkli formazan mikropłaka okuyucu spektrofotometre ile 570/690 nm'de ölçölmüştür. Deneyler her konsantrasyon için altı tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (201).



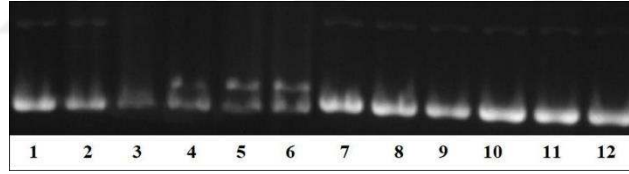
4. BULGULAR

4.1. DNA Nükleaz Etkinliği

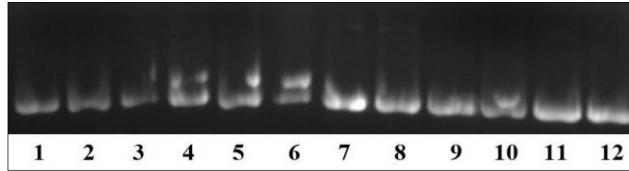
TPOAC bileşiğinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA'nın fosfodiester bağlarını hidroliz yoluyla kesebilme etkinliğini değerlendirmek için hidrolitik nükleaz denemesi yapılmıştır. Bileşiklerin zamana ve konsantrasyona bağlı hidrolitik nükleaz aktivitesinin sonuçları Resim 2-4'te verilmiştir.



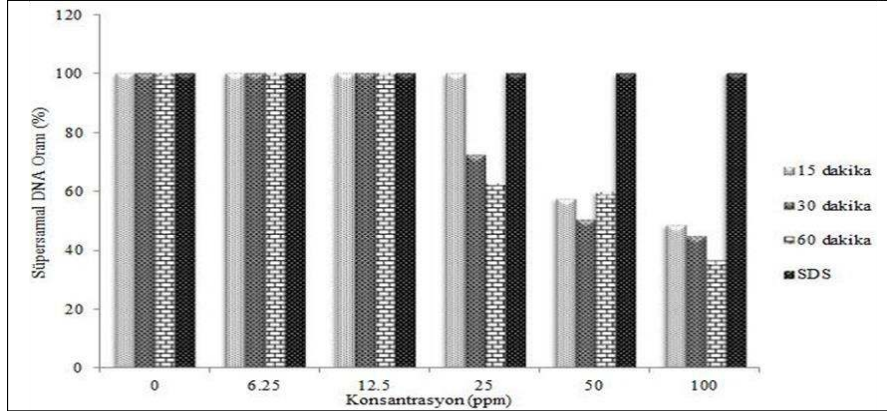
Resim 2. TPOAC bileşiğinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (15 dakika 37 °C). Bant 1: DNA kontrol (1 μ L DNA + 9 μ L Tampon); bant 2-6: DNA+ Etken madde (6.25 ppm - 12.5 ppm - 25 ppm - 50 ppm - 100 ppm) + Tampon; bant 7: DNA kontrol (1 μ L DNA + 9 μ L Tampon); bant 8-12: DNA + SDS (6.25 ppm – 12.5 ppm – 25 ppm - 50 ppm - 100 ppm) + Tampon.



Resim 3. TPOAC bileşiğinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (30 dakika 37 °C). Bant 1: DNA kontrol (1 μ L DNA + 9 μ L Tampon); bant 2-6: DNA+ Etken madde (6.25 ppm - 12.5 ppm - 25 ppm - 50 ppm - 100 ppm) + Tampon; bant 7: DNA kontrol (1 μ L DNA + 9 μ L Tampon); bant 8-12: DNA + SDS (6.25 ppm – 12.5 ppm – 25 ppm - 50 ppm - 100 ppm) + Tampon.



Resim 4. TPOAC bileşiğinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (60 dakika 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 μ L DNA + 9 μ L Tampon); bant 2-6: DNA+ Etken madde (6.25 ppm - 12.5 ppm - 25 ppm - 50 ppm - 100 ppm) + Tampon; bant 7: DNA kontrol (1 μ L DNA + 9 μ L Tampon); bant 8-12: DNA + SDS (6.25 ppm - 12.5 ppm - 25 ppm - 50 ppm - 100 ppm) + Tampon.



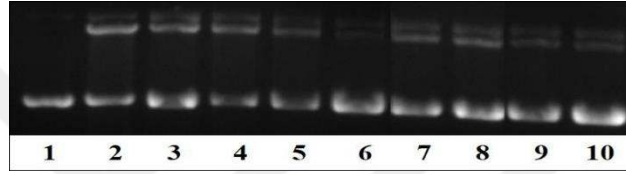
Şekil 25. TPOAC bileşiğinin süpersarmal plazmid DNA ile 15, 30 ve 60 dakikalık inkübasyonu sonrasında süpersarmal DNA oranı

DNA, elektrik alanı etkisi altında agaroz jelde hareket etmektedir, fakat DNA'nın bu hareketi diğer moleküllerin bağlanması durumunda yavaşlamaktadır. Böylece DNA nükleaz aktivitesi, süpersarmal DNA'nın süpersarmal yapısının bozulması ile değerlendirilmektedir. Süpersarmal plazmid DNA elektroforezle yürütülürse en hızlı süpersarmal form göç etmektedir. Eğer DNA zincirinde hasar meydana gelirse başka formlar oluşmaktadır. Resim 2'de de görüldüğü üzere, etken madde ilavesiyle DNA'nın süpersarmal yapısının bozulduğu tespit edilmiştir (Bant 5-6). Bu çalışmada kontrol olarak kullanılan SDS ilavesinde ise SDS'in negatif yüklü gruplar içermesinden dolayı beklenildiği gibi DNA üzerinde herhangi bir hasar görülmemektedir. TPOAC bileşiği süpersarmal plazmid DNA ile 15 dakika inkübe edildikten sonra; 6.25, 12.5 ve 25 ppm TPOAC varlığında süpersarmal DNA oranı yaklaşık olarak %100 iken, 50 ppm'de %57.60, 100 ppm'de ise %48.60 olarak belirlenmiştir. 30 dakika inkübe edildikten sonra; 6.25 ve 12.5 ppm TPOAC varlığında süpersarmal DNA'da üzerinde herhangi bir değişiklik olmazken, 25, 50 ve 100 ppm'de %72.40, %50.40 ve %44.60 oranlarında süpersarmal DNA bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı konsantrasyonlarda %27.60, %49.60 ve %55.40 oranlarında süpersarmal DNA üzerinde hasar tespit edilmiştir. 60 dakika inkübe edildiğinde ise 100 ppm'de %36.70 oranında süpersarmal DNA olduğu tespit edilirken, %63.30 oranında süpersarmal DNA'da hasar olduğu tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan SDS ise benzer konsantrasyonlarla yapılan çalışmalarda süpersarmal DNA yüzdesinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Bu sonuçlara göre, etken maddenin konsantrasyona bağlı olarak *E. coli* plazmid DNA'sı üzerinde etki ettiği ve DNA hasarı yaratarak antibakteriyal etki gösterdiği düşünülmektedir.

4.2. Topoizomeraz Enzim İnhibisyonları

4.2.1. *E. coli* Topoizomeraz I İnhibisyonu

TPOAC bileşiğinin *E.coli* topoizomeraz I enzimine karşı etkileri pBR322 plazmid DNA'nın relaksasyon yöntemine göre belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları Resim 5'te verilmiştir. Bilindiği üzere süpersarmal DNA ve topoizomeraz enzimleri inkübe edildiğinde süpersarmal DNA yüzdesi azalırken, kırık ve lineer formun yüzdesi artmaktadır. Madde ilavesiyle süpersarmal DNA yüzdesinin artması, kullanılan bileşiğin topoizomeraz inhibisyonu gerçekleştirdiğinin işareti olarak kabul edilmektedir.

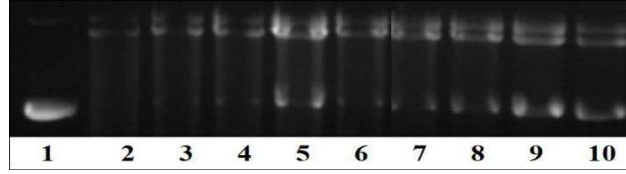


Resim 5. TPOAC bileşiğinin *E.coli* topoizomeraz I inhibisyonu. Bant 1: DNA kontrol; Bant 2: DNA + 1 U *E.coli* topoizomeraz I + Tampon; Bant 3-6: DNA + *E.coli* Topoizomeraz I + Tampon + TPOAC (12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm); Bant 7-10: DNA + *E.coli* topoizomeraz I + Tampon + SDS (12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm).

1 Ünite *E. coli* topoizomeraz I enzimi ve pBR322 plazmid DNA'nın inkübasyonu sonucu süpersarmal DNA'nın bant yoğunluğu %49.30'e azalırken, kırık ve lineer DNA'nın bant yoğunluğunun %50.70 olduğu belirlenmiştir (Resim 5, Bant 2). 12.5 ve 25 ppm etken maddenin ilave sonrasında süpersarmal formun bant yoğunluğunda artış gözlenmiştir. 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda süpersarmal formun bant yoğunluğunun sırasıyla %65.50, ve %91.40 olarak tespit edildiği belirlenmiştir (Resim 5, Bant 5,6). Pozitif kontrol olarak kullanılan SDS ise 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda %81.20 ve %86.10 oranlarında süpersarmal DNA tespit edilmiştir (Resim5, Bant 9,10). Bu durum etken maddenin *E. coli* topoizomeraz I inhibisyon etkisine sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.2. *E. coli* DNA Giraz İnhibisyonu

TPOAC bileşiğinin DNA giraz enzimine karşı etkileri pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları Resim 6'da verilmiştir.

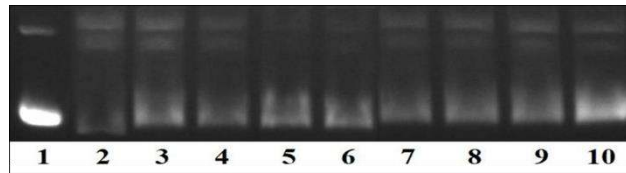


Resim 6. TPOAC bileşiğinin *E. coli* DNA Giraz inhibisyonu. Bant 1: DNA kontrol; bant 2: DNA + 1 U *E. coli* DNA Giraz + Tampon; bant 3-6: DNA + *E. coli* DNA Giraz + Tampon + TPOAC (12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm) bant 7-10: DNA + *E. coli* DNA Giraz+ Tampon + SDS (12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm).

1 Ünite *E. coli* DNA Giraz enzimi ve pBR322 plazmid DNA'nın inkübasyonu sonucu süpersarmal DNA'nın bant yoğunluğu azalırken, kırık ve lineer DNA'nın bant yoğunluğunun sırasıyla %25.20 ve %74.80 olduğu belirlenmiştir (Resim 6, Bant 2). 12.5 ve 25 ppm etken maddenin ilave sonrasında lineer bant yoğunluğunda azalma gözlenirken, süpersarmal DNA'da dikkate değer artış tespit edilememiştir. Bu durum TPOAC bileşiğinin orta derecede *E. coli* DNA Giraz inhibisyonu gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 25, 50 ve 100 ppm SDS varlığında süpersarmal DNA oranı sırasıyla %24.70, %45.30 ve %46.80 olarak tespit edilmiştir.

4.2.3. *E. coli* Topoizomeraz IV İnhibisyonu

Etken maddenin *E. coli* topoizomeraz IV enzimine karşı etkileri pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemiyle incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları Resim 7'de verilmiştir.



Resim 7. TPOAC bileşiğinin *E. coli* topoizomeraz IV inhibisyonu. Bant 1: DNA kontrol; bant 2: DNA + 1 U *E. coli* topoizomeraz IV+ Tampon; bant 3-6: DNA + *E. coli* topoizomeraz IV + Tampon + TPOAC (12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm) bant 7-10: DNA + *E. coli* topoizomeraz IV+ Tampon + SDS (12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm).

1 Ünite *E. coli* topoizomeraz IV enzimi ve pBR322 plazmid DNA'nın inkübasyonu sonucu süpersarmal DNA'nın bant yoğunluğu %64.00'e azalırken, kırık ve lineer DNA'nın bant yoğunluğunun sırasıyla %24.90 ve %11.00 olduğu belirlenmiştir (Resim 7, Bant 2).

Etken maddenin ilavesinden sonra tüm konsantrasyonlarda süpersarmal formun bant yoğunluğunun oldukça arttığı tespit edilmiştir. Süpersarmal formun bant yoğunluğu 12.5 ppm’de %80.80, 25 ppm’de %83.00, 50 ppm’de %94.00 ve 100 ppm’de %95.60 olarak tespit edilirken, kırık ve lineer formların bant yoğunluğu da azalmaktadır. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak SDS kullanılmıştır. 12.5, 25, 50 ve 100 ppm SDS varlığında süpersarmal DNA bant yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar incelendiğinde etken maddenin kullanılan konsantrasyonlarında oldukça yüksek *E. coli* topoizomerez IV inhibisyon etkisine sahip olduğu görülmektedir.

4.3. MTT Hücre Canlılık Testi

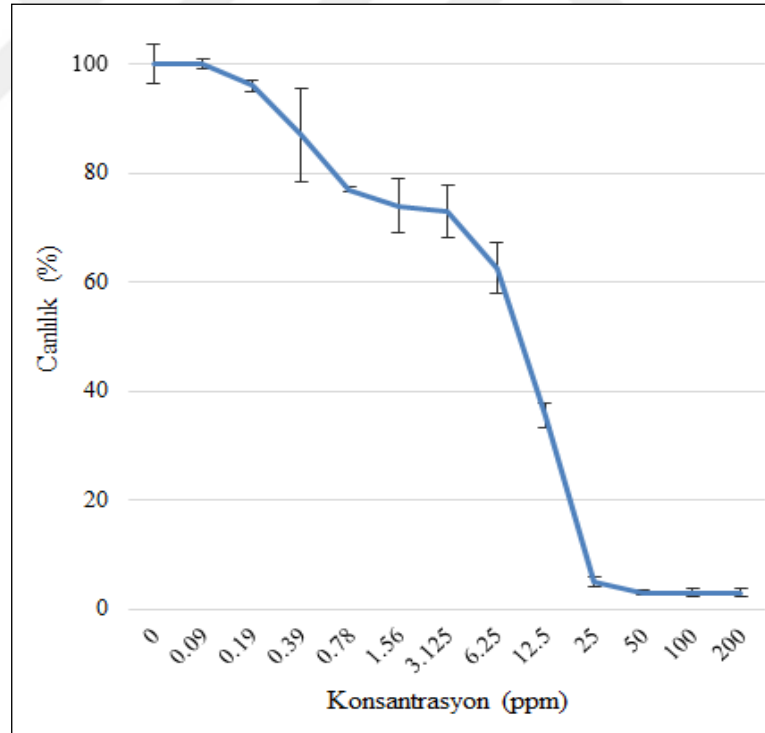
TPOAC bileşiğinin HaCaT hücre hattına karşı sitotoksikite etkileri MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları Tablo 4-5 ve Şekil 26-27’de verilmiştir. Tablo 4’de de görüldüğü gibi 0.09 ve 0.19 ppm konsantrasyonlarda hücre canlılığında dikkate değer azalma görülmezken, 12.5 ppm’de hücre canlılığı 35.5 ± 2.3 olarak tespit edilmiştir. 25, 50, 100 ve 200 ppm’de ise hücre canlılığı tamamen kaybolmuştur. Sonuçlar TPOAC bileşiğinin konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümüne yol açtığını ortaya koymuştur.

Tablo 4. Etken maddenin HaCaT hücre hattına karşı sitotoksikite sonuçları

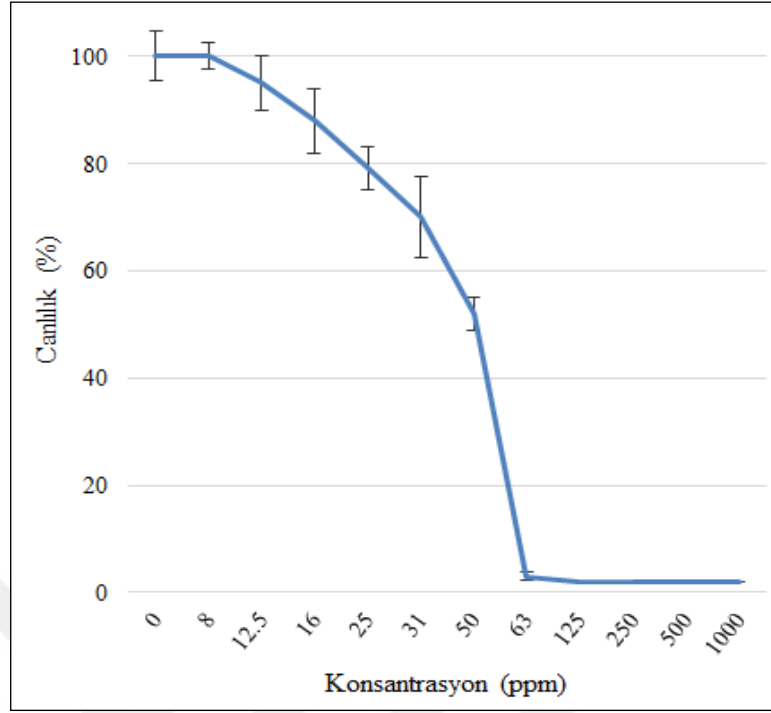
Konsantrasyon (ppm)	Hücre Canlılığı (%)
0	100 $\pm$ 3.60
0.09	100 $\pm$ 1.0
0.19	96 $\pm$ 1.0
0.39	87 $\pm$ 8.5
0.78	77 $\pm$ 0.5
1.56	74 $\pm$ 5.0
3.125	73 $\pm$ 4.8
6.25	62.5 $\pm$ 4.6
12.5	35.5 $\pm$ 2.3
25	5 $\pm$ 0.9
50	3 $\pm$ 0.4
100	3 $\pm$ 0.4
200	3 $\pm$ 0.4

Tablo 5. SDS'nin HaCaT hücre hattına karşı sitotoksisite sonuçları

Konsantrasyon (ppm)	Hücre Canlılığı (%)
0	100 ± 4.70
8	100 ± 2.4
12.5	95 ± 5.0
25	79 ± 4.0
50	52 ± 3.0
62.5	3 ± 0.8
125	2 ± 0.1
250	2 ± 0.1
500	2 ± 0.1
1000	2 ± 0.1



Şekil 26. Etken maddenin HaCaT hücre hattına karşı sitotoksisite sonuçları



Şekil 27. SDS'nin HaCaT hücre hattına karşı sitotoksosite sonuçları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antibakteriyel direnç günümüzün en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Dirençle mücadele etmek için acilen yeni moleküllerin keşfine ve geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bakteriyel topoizomerazlar, antibakteriyel ilaç keşfi için değerli moleküler hedeflerdir. Topoizomerazların inhibisyonuyla, hücre döngüsünün ligasyon aşaması bloke olup, genomun bütünlüğü zarar görmekte ve hücrede apoptozise yol açan tek ve çift sarmallı kopmalar meydana gelmektedir. Bu enzimlerin inhibisyonları antibakteriyel etkinin incelenmesi bakımından oldukça önemlidir.

DNA, genetik bilgiyi depolama ve nesilden nesile aktarabilme yeteneğine sahiptir. DNA'nın bu rolü kararlı olmasına bağlıdır. Genomik bilginin değişmeden uzun süre boyunca korunması hücreler için oldukça önemlidir. DNA yapısındaki değişimler yavaş bile olsa fizyolojik açıdan büyük önem taşımaktadır (202). Son yıllarda DNA kesim ajanlarının izolasyonu, DNA'yı spesifik olarak tanıyabilen ve kesebilen model bileşiklerin tasarımı ve sentezine yönelik araştırmalarda çarpıcı bir artış meydana gelmiştir. DNA kesim ajanlarının çeşitli hastalıklara karşı etkili olabilecek kemoterapötik bileşiklerin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Dezenfektanlar, patojenleri yok ederek mikrobiyal yükün azalmasını ve sağlık standartlarının korunmasını sağlayan ürünlerdir. En yaygın kullanılan dezenfektanlar arasında yer alan kuarterner amonyum bileşikleri, antimikrobiyal aktiviteye sahip katyonik yüzey aktif maddelerdir (203). Antimikrobiyal mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olan bu bileşiklerin, genel etki mekanizmalarının hücre zarını bozmaları olduğu düşünülmektedir (204).

Tüm bu bilgiler ışığında kuarterner amonyum klorür yapısına sahip TPOAC bileşiğinin antibakteriyel etki mekanizmasını aydınlatabilmek için DNA ile bir etkileşiminin olup olmadığı ve bakteriyel topoizomeraz enzimleri üzerinde inhibisyon etki gösterip göstermediği incelenmek istenmiştir. Ayrıca etken maddenin topikal olarak kullanıma uygun beşeri ve/veya veteriner bir ilaç olarak geliştirilebilme potansiyelinin ölçülmesi adına insan keratinosit HaCaT hücreleri üzerinde sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır.

TPOAC bileşiminin DNA kesim aktivitesini değerlendirmek için süpersarmal pBR322 plazmid DNA'da hidrolitik nükleaz denemesi yapılmıştır. Bileşiklerin zamana ve konsantrasyona bağlı hidrolitik nükleaz aktivitesinin sonuçları Resim 2-4'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre bileşik, süpersarmal plazmid DNA ile 15, 30 ve 60 dakika inkübe edildiğinde, 6.25 ve 12.5 ppm TPOAC varlığında süpersarmal DNA oranı değişmezken, 25, 50 ve 100 ppm'de süpersarmal formun yüzdesinin azaldığı tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan SDS ile benzer konsantrasyonlarla yapılan çalışmalarda süpersarmal DNA yüzdesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuçlar etken maddenin konsantrasyona bağlı olarak *E. coli* plazmid DNA'sı üzerinde etki ettiğini ve plazmid DNA hasarı yaratarak antibakteriyal etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde TPOAC bileşiminin DNA kesim aktivitesine dair yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yerine farklı moleküllerin kuarterner amonyum bileşikleriyle hibridizasyonu sonucu elde edilen kompleksler ile yapılmış bazı çalışmalara rastlanmıştır. Elif Eda ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları buna benzer bir çalışmada kuarterner alkil amonyum tuzları ve bunların Cu (II) komplekslerini içeren aroilhidrazon ligandlarının hidrolitik kesim aktiviteleri incelenmiştir (205). Çalışma sonucunda ligandların konsantrasyona bağlı olarak güçlü hidrolitik kesim aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir (206). Literatürde DNA'da yer alan fosfodiester bağlarını hidrolitik yolla kesen enzimlerin çoğunun aktif bölgesinde metal iyonlarının yer aldığını belirten çalışmalara rastlanmıştır (207, 208). Bu bağlamda daha ileri düzeydeki çalışmalar için bileşimin metal komplekslerinin sentezlenerek DNA nükleaz aktivitesi çalışmalarının yapılması önerilmektedir. Bunun yanında çeşitli ajanlar varlığındaki oksidatif kesim çalışmalarının yapılmasının bileşimin etki mekanizmasını aydınlatmak adına faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Topoizomerase enzimlerini hedefleyen bileşikler, "topoizomerase zehirleri" ve "katalitik inhibitörler" olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Topoizomerase zehirleri, DNA-enzim kovalent ara maddesini stabilize edip, ara maddenin yarı ömrünü uzatarak hücreler için ölümcül hale getirmektedir. Katalitik inhibitörler ise topoizomeraseların katalitik işlevine müdahale ederek etki göstermektedir. Bu grup bileşikler enzim-DNA etkileşimini engelleyerek enzimin aktif bölgesini bloke etmektedir. Bu nedenle, kovalent ara ürün oluşumu meydana gelmemektedir. Topoizomerase-DNA etkileşiminin inhibisyonu, nükleik asit metabolizmalarında doğrudan kusurlara neden olmaktadır (174).

TPOAC bileşiminin *E. coli* topoizomeraz I enzimine karşı etkileri pBR322 plazmid DNA'nın relaksasyon yöntemine göre belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları Resim 5'de verilmiştir. Süpersarmal DNA ve topoizomeraz enzimleri inkübe edildiğinde süpersarmal DNA yoğunluğu azalırken, kırık ve lineer formun yüzdesi artmaktadır. İnhibitör ilavesiyle süpersarmal DNA yüzdesinin artması, kullanılan bileşimin topoizomeraz inhibisyonu gerçekleştirdiğinin işareti olarak kabul edilmektedir. *E. coli* topoizomeraz I enzimi ve pBR322 plazmid DNA'nın inkübasyonu sonucu süpersarmal DNA'nın bant yoğunluğu %49.30'a azalırken, kırık ve lineer DNA'nın bant yoğunluğunun %50.70 olduğu belirlenmiştir (Resim 5, Bant 2). 12.5 ve 25 ppm etken maddenin ilavesi sonrasında süpersarmal formun bant yoğunluğunda artış gözlenmiştir. 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda süpersarmal formun bant yoğunluğunun sırasıyla %65.50 ve %91.40 olarak tespit edilmiştir (Resim 5, Bant 5-6). Bu durum etken maddenin topoizomeraz I enzimini denatüre ederek konsantrasyona bağımlı olarak *E. coli* topoizomeraz I inhibisyon etkisine sahip olduğunu göstermektedir.

TPOAC bileşiminin DNA giraz enzimine karşı etkileri pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları Resim 6'da verilmiştir. Bu çalışmada *E. coli* DNA giraz enzimi ve pBR322 plazmid DNA'nın inkübasyonu sonucu süpersarmal DNA'nın bant yoğunluğu azalırken, kırık ve lineer DNA'nın bant yoğunluğunun sırasıyla %25.20 ve %74.80 olduğu belirlenmiştir (Resim 6, Bant 2). 12.5 ve 25 ppm etken maddenin ilave sonrasında lineer bant yoğunluğunda azalma gözlenirken, süpersarmal DNA'da dikkate değer artış tespit edilememiştir. Bu durum TPOAC bileşiminin orta derecede *E. coli* DNA giraz inhibisyonu gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Etken maddenin *E. coli* topoizomeraz IV enzimine karşı etkileri pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemiyle incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları Resim 7'de verilmiştir. Bu çalışma kapsamında *E. coli* topoizomeraz IV enzimi ve pBR322 plazmid DNA'nın inkübasyonu sonucu süpersarmal DNA'nın bant yoğunluğu %64.00'e azalırken, kırık ve lineer DNA'nın bant yoğunluğunun sırasıyla %24.90 ve %11.00 olduğu belirlenmiştir (Resim 7, Bant 2). Etken maddenin ilavesinden sonra tüm konsantrasyonlarda süpersarmal formun bant yoğunluğunun oldukça arttığı tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar incelendiğinde etken maddenin kullanılan konsantrasyonlarında oldukça yüksek *E. coli* topoizomeraz IV inhibisyon etkisine sahip olduğunu

göstermektedir. Bu bilgiler ışığında, çalışmada kullanılan bileşiğin topoizomera inhibitör etkisini, DNA-enzim kovalent ara maddesini stabilize ederek veya enzim-DNA etkileşimini engelleyip enzimin aktif bölgesini bloke ederek göstermiş olabileceği tahmin edilmektedir. Topoizomera inhibitör etkisi belirlenmiş olan bu bileşiğin daha ileri deneysel çalışmalarla bu etkisini nasıl gösterdiğinin belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

MTT testi, yaygın olarak kullanılan hücre canlılığı sitotoksikite testlerinden birisidir (209). Bunun yanında immortalize insan keratinosit hücre hattındaki (HaCaT) toksikolojik ve koruyucu testler, cilt uygulamasına yönelik bileşikler için mantıklı bir yaklaşımdır (210). HaCaT hücre hattı, kullanım kolaylığı ve normale yakın fenotipi nedeniyle biyolojik ve tıbbi araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir keratinosit modeli olmuştur (211).

Bu bilgilere dayarak bu çalışmada etken maddenin insan HaCaT keratinosit hücreleri üzerinde *in vitro* MTT sitotoksikite çalışması yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda hücre ile 24 saat inkübe edilen TPOAC bileşiğinin 0.09 ppm ve 0.19 ppm'lik konsantrasyonlarında hücre canlılığında dikkate değer bir azalma görülmezken, 12.5 ppm'de hücre canlılığının 35.5 ± 2.3 olduğu tespit edilmiştir. 25, 50, 100 ve 200 ppm'de ise hücre canlılığı tamamen kaybolmuştur. Ayrıca TPOAC bileşiğinin çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan SDS'den çok daha yüksek oranda toksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bulgularımıza göre TPOAC bileşiğinin konsantrasyona bağlı olarak HaCaT hücre hattının proliferasyonunu önemli ölçüde baskılayıp hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. Bu veri ışığında etken maddenin düşük inkübasyon süreleri kullanılarak detaylı analizlerinin yapılması önerilmektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında, TPOAC bileşiğinin HaCaT keratinosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ile ilgili daha önce hiçbir bilimsel çalışmanın yapılmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte, EPA (Environmental Protection Agency) tarafından 2007 yılında yayınlanan "Trimetoksisilil Kuarterner Amonyum Klorür Bileşikleri için Yeniden Kayıt Uygunluk Kararı"nda bu bileşikler için *in vivo* hayvan çalışmaları sonucu ciltte ciddi toksikite yaptığının bildirilmesi bu açıdan çalışmamızı destekler nitelikte gözükmektedir (212). Bunun dışında ECHA (European Chemicals Agency)'nin resmi sitesinde yer alan 2017 tarihli bir çalışmada, dönüştürülmemiş keratinosit hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* deri iritasyon testinde çalışma sonucunda TPOAC etken maddesinin insan cildi için tahriş edici olmadığı (negatif kontrole oranla hücre

canlılığının %94.6 olduğu) sonucuna varılmıştır (213). Yine aynı sitede yer alan 1992 tarihli başka bir çalışmada yapılan İnsan Yineleyici Yama Testi (HRIPT) sonucu etken maddenin ciltte hassasiyete yol açmadığı rapor edilmiştir (214).

Sonuç olarak, etken maddenin katyonik yapısından dolayı anyonik yapıdaki süpersarmal plazmid DNA ile etkileşerek DNA'ya hasar verdiği düşünülmüştür. Bunun yanında yapılan topoizomeras inhibisyon çalışmaları sonucu bakteriyel topoizomeras enzimlerini inhibe ederek antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür. Sitotoksosite çalışması sonucunda ise hücre ile 24 saat inkübe edilen TPOAC bileşiminin konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümüne yol açtığı gözlenmiştir.



6. KAYNAKLAR

1. Germe T, Vörös J, Jeannot F, Taillier T, Stavenger RA, Bacqué E, Maxwell A, Bax BD (2018). A new class of antibacterials, the imidazopyrazinones, reveal structural transitions involved in DNA gyrase poisoning and mechanisms of resistance. *Nucleic Acids Research* 46(8): 4114–4128.
2. Chan PF, Germe T, Bax BD, Huang J, Thalji RK, Bacqué E, Checchia A, Chen D, Cui H, Ding X, Ingraham K, McCloskey L, Raha K, Srikannathasan V, Maxwell A, Stavenger RA (2017). Thiophene antibacterials that allosterically stabilize DNA-cleavage complexes with DNA gyrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(22): E4492–E4500.
3. Jensen CS, Nielsen SB, Fynbo L (2019). Concluding Remarks on ‘Risking Antimicrobial Resistance’. In *Risking Antimicrobial Resistance* (pp. 199-208). Palgrave Macmillan, Cham.
4. Belete TM (2019). Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. *Human Microbiome Journal* 11: 100052.
5. Aldžić A, Jukić H, Dedić K, Dubinović-Rekić A (2019). Research of antimicrobial resistance of clinical important multi-resistant gram negative bacterial isolates in the Una-Sana Canton area. In: Karabegović I (eds) *New Technologies, Development and Application*. NT 2018. *Lecture Notes in Networks and Systems*, vol 42. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-90893-9_67.
6. Akbal AU, Çoban AY, Durupınar B (2018). Yeni antibakteriyeller. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 48(2): 87-99.
7. Hiasa H (2018). DNA Topoisomerases as Targets for Antibacterial Agents. In: Drolet M. (eds) *DNA Topoisomerases. Methods in Molecular Biology*, vol 1703. Humana Press, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-4939-7459-7_3.
8. Nastasă C, Vodnar DC, Ionuț I, Stana A, Benedec D, Tamaian R, Tiperciuc B (2018). Antibacterial evaluation and virtual screening of new thiazolyl-triazole Schiff bases as potential DNA-gyrase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 19(1): 222.
9. Travers A, Muskhelishvili G (2015). DNA structure and function. *The FEBS Journal* 282(12): 2279–2295.

10. Badshah SL, Ullah A (2018). New developments in non-quinolone-based antibiotics for the inhibition of bacterial gyrase and topoisomerase IV. *European Journal of Medicinal Chemistry* 152: 393–400.
11. Yu X, Zhang M, Annamalai T, Bansod P, Narula G, Tse-Dinh YC, Sun D (2017). Synthesis, evaluation, and CoMFA study of fluoroquinophenoxazine derivatives as bacterial topoisomerase IA inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 125: 515–527.
12. Li L, Okumu A, Dellos-Nolan S, Li Z, Karmahapatra S, English A, Yalowich JC, Wozniak DJ, Mitton-Fry MJ (2018). Synthesis and anti-staphylococcal activity of novel bacterial topoisomerase inhibitors with a 5-amino-1,3-dioxane linker moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28(14): 2477–2480.
13. Kathiravan MK, Khilare MM, Nikoomanesh K, Chothe AS, Jain KS (2013). Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 28(3): 419–435.
14. Sandhaus S, Chapagain PP, Tse-Dinh YC (2018). Discovery of novel bacterial topoisomerase I inhibitors by use of *in silico* docking and *in vitro* assays. *Scientific Reports* 8(1): 1437.
15. Tezel U, Pavlostathis SG (2015). Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology* 33: 296–304.
16. Ioannou CJ, Hanlon GW, Denyer SP (2007). Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(1): 296–306.
17. Mulder I, Siemens J, Sentek V (2018). Quaternary ammonium compounds in soil: implications for antibiotic resistance development. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 17: 159–185.
18. Gerba CP (2015). Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Applied and Environmental Microbiology* 81(2): 464–469.
19. Sanli NO, Menciloglu Y, Bal S (2017). The effectiveness of the Antimic[®] biocide against nosocomial bacteria specified by different standard methods. *European Journal of Biology* 76(2): 51-56.

20. Menciloğlu Y, Okan BS (2014). Fonksiyonel tekstil fiberlerinin geliştirilmesi için nano boyutta antimikrobiyal kaplamalar. XIII. Uluslararası İzmir Tekstil ve Hazır Giyim Sempozyumu, İzmir, 2-5 Nisan 2014, 395-396.
21. Elaldı N (2015). Ufuktaki yeni antibiyotikler. *Flora* 20(1): 1-9.
22. Martens E, Demain AL (2017). The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of Antibiotics* 70(5): 520–526.
23. Erdoğan AE, Everest A (2013). Antimikrobiyal ajan olarak bitki bileşenleri. *Turkish Journal of Scientific Reviews* 6(2): 27-32.
24. CDC (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta.
25. TİTCK (2013). Ulusal antibakteriyel ilaç tüketim surveyansı. Sağlık Bakanlığı, 1074, Ankara.
26. Saygı Ş, Battal D, Şahin N (2012). Çevre ve insan sağlığı yönünden ilaç atıklarının önemi. *Marmara Pharmaceutical Journal* 16(2): 82-90.
27. Topal M, Şenel GU, Topal IA, Öbek E (2015). Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 31(3): 121-127.
28. Aktuğlu Y (1997). Giriş ve genel bilgiler. *Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, İstanbul, 2 - 3 Mayıs 1997, 11-53.
29. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA, Qamar MU, Salamat M, Baloch Z (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance* 11: 1645–1658.
30. Ventola CL (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics* 40(4): 277–283.
31. Gould K (2016). Antibiotics: from prehistory to the present day. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71(3): 572–575.
32. Saga T, Yamaguchi K (2009). History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan Medical Association Journal* 52(2): 103-108.
33. Lloyd NC, Morgan HW, Nicholson BK, Ronimus RS, Riethmiller S (2005). Salvarsan the first chemotherapeutic compound. *Chemistry in New Zealand* 69(1): 24-27.

34. Fernandes P (2006). Antibacterial discovery and development--the failure of success?. *Nature Biotechnology* 24(12): 1497–1503.
35. MacDougall C (2017). Sulfonamides, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Quinolones, and Agents for Urinary Tract Infections. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC (Eds.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill Education, Pages: 1011- 1022.
36. Ünsalan S (2011). Synthesis and characterization of triazenes derived from sulfonamides. *Marmara Pharmaceutical Journal* 15: 11-17.
37. Luepke KH, Suda KJ, Boucher H, Russo RL, Bonney MW, Hunt TD, Mohr JF (2017). Past, present, and future of antibacterial economics: Increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. *Pharmacotherapy* 37(1): 71–84.
38. Nicolaou KC, Rigol S (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics* 71(2): 153–184.
39. Wright GD (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* 5(3): 175–186.
40. Mobarki NS, Almerabi BA, Hattan AH. (2019). Antibiotic resistance crisis. *International Journal of Medicine in Developing Countries* 40: 561-564.
41. Digital Access to Scholarship at Harvard (2020). Harvard Library Office for Scholarly Communication [online]. Available from: <http://nrs.harvard.edu/urn-3:HUL.InstRepos:8889467>. [Accessed 6 April 2020].
42. Li B, Webster TJ (2018). Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. *Journal of Orthopaedic Research* 36(1): 22–32.
43. Burow E, Simoneit C, Tenhagen BA, Käsbohrer A (2014). Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli*--a systematic review. *Preventive Veterinary Medicine* 113(4): 364–375.
44. Watkins RR, Bonomo RA (2016). Overview: Global and local impact of antibiotic resistance. *Infectious Disease Clinics of North America* 30(2): 313–322.
45. Schito GC (2006). The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 12 (Suppl 1): 3–8.

46. Ruddaraju LK, Pammi S, Guntuku GS, Padavala VS, Kolapalli V (2020). A review on anti-bacterials to combat resistance: From ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1): 42–59.
47. Öztürk R (2008). Akılcı Antibiyotik Kullanımı Ve Ülkemizde Antimikrobik Maddelere Direnç Sorunu. Toplumdan edinilmiş enfeksiyonlara pratik yaklaşımlar. Sempozyum Dizisi No:61, İstanbul, 7-8 Şubat 2008, 1-16.
48. Erdoğan Ç, Korukluoğlu M (2018). Antibiyotik dirençli *Staphylococcus aureus* ve gıda güvenliği açısından önemi. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi* 0(19): 9-15.
49. Turhan EÜ, Erginkaya Z (2019). Bakteriyel biyofilmlerdeki antimikrobiyel direnç mekanizması. *Academic Food Journal* 17(1): 131-139.
50. Kayış U (2019). Antimikrobiyal direnç mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi* 5(1): 1-12.
51. Çiftçi A, Aksoy A (2015). Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Farmakoloji ve Toksikoloji-Özel Konular* 1(2): 1-10.
52. Öztürk R (1997). Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. *Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, İstanbul, 2 - 3 Mayıs 1997, 27-51.
53. Vikesland P, Garner E, Gupta S, Kang S, Maile-Moskowitz A, Zhu N (2019). Differential drivers of antimicrobial resistance across the world. *Accounts of Chemical Research* 52(4): 916–924.
54. Cesur S, Demiröz AP (2013). Antibiotics and the mechanisms of resistance to antibiotics. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences* 109(1007): 1-5.
55. Munita JM, Arias CA (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum* 4(2): VMBF-0016-2015.
56. Taşova Y (2010). Tetrasiklinden tigesikline. *ANKEM Dergisi* 24(Ek 2): 36-44.
57. Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Di Donato A, Parrilli M (2006). The biofilm matrix of *Pseudomonas sp.* OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydrate Research* 341(14): 2456–2461.

58. Lakemeyer M, Zhao W, Mandl FA, Hammann P, Sieber SA (2018). Thinking outside the box-novel antibacterials to tackle the resistance crisis. *Angewandte Chemie* 57(44): 14440–14475.
59. Windels EM, Michiels JE, Fauvart M, Wenseleers T, Van den Bergh B, Michiels J (2019). Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. *The ISME Journal* 13(5): 1239–1251.
60. McGarry DH, Cooper IR, Walker R, Warrilow CE, Pichowicz M, Ratcliffe AJ, Salisbury AM, Savage VJ, Moyo E, Maclean J, Smith A, Charrier C, Stokes NR, Lindsay DM, Kerr WJ (2018). Design, synthesis and antibacterial properties of pyrimido[4,5-b]indol-8-amine inhibitors of DNA gyrase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28(17): 2998–3003.
61. Arason V (2010). The problems of antibiotic overuse. *Scandinavian Journal of Primary Health Care* 28(2): 65-66.
62. van Hengel AJ, Marin L (2019). Research, innovation, and policy: An alliance combating antimicrobial resistance. *Trends In Microbiology* 27(4): 287–289.
63. Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJ (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 387(10014): 176–187.
64. Morehead MS, Scarbrough C (2018). Emergence of global antibiotic resistance. *Primary Care* 45(3): 467–484.
65. Van Puyvelde S, Deborggraeve S, Jacobs J (2018). Why the antibiotic resistance crisis requires a one health approach. *The Lancet Infectious Diseases* 18(2): 132–134.
66. Parkunan T, Ashutosh M, Sukumar B, Chera JS, Ramadas S, Chandrasekhar B, Kumar SA, Sharma R, Kumar MS, De S (2019). Antibiotic resistance: A cross-sectional study on knowledge, attitude, and practices among veterinarians of Haryana state in India. *Veterinary World* 12(2): 258–265.
67. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N (2017). A review on antibiotic resistance: Alarm bells are ringing. *Cureus* 9(6): e1403.

68. Charrier C, Salisbury AM, Savage VJ, Duffy T, Moyo E, Chaffer-Malam N, Ooi N, Newman R, Cheung J, Metzger R, McGarry D, Pichowicz M, Sigerson R, Cooper IR, Nelson G, Butler HS, Craighead M, Ratcliffe AJ, Best SA, Stokes NR (2017). Novel bacterial topoisomerase inhibitors with potent broad-spectrum activity against drug-resistant bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(5): e02100-16.
69. Li L, Okumu AA, Nolan S, English A, Vibhute S, Lu Y, Hervet-Thomas K, Seffernick JT, Azap L, Cole SL, Shinabarger D, Koeth LM, Lindert S, Yalowich JC, Wozniak DJ, Mitton-Fry MJ (2019). 1,3-dioxane-linked bacterial topoisomerase inhibitors with enhanced antibacterial activity and reduced hERG inhibition. *ACS Infectious Diseases* 5(7): 1115–1128.
70. Garoy EY, Gebreab YB, Achila OO, Tekeste DG, Kesete R, Ghirmay R, Kiflay R, Tesfu T (2019). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence and antimicrobial sensitivity pattern among patients-a multicenter study in asmara, eritrea. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* 2019: 8321834.
71. Mitton-Fry MJ, Brickner SJ, Hamel JC, Barham R, Brennan L, Casavant JM, Ding X, Finegan S, Hardink J, Hoang T, Huband MD, Maloney M, Marfa A, McCurdy SP, McLeod D, Subramanyam C, Plotkin M, Reilly U, Schafer J, Stone GG, Zook C (2017). Novel 3-fluoro-6-methoxyquinoline derivatives as inhibitors of bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27(15): 3353–3358.
72. Andersen BM (2019). Antibacterial agents and drug resistance. In *prevention and control of infections in hospitals*. Springer, Cham, Pages: 29-43.
73. Daş YK, Atmaca E (2015). Antibiyotik direncinin önlenmesi için yapılması gerekenler ve çözüm önerileri. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences- Pharmacology and Toxicology-Special Topics* 1(2): 69-75.
74. Smith RA, M'ikanatha NM, Read AF (2015). Antibiotic resistance: a primer and call to action. *Health Communication* 30(3): 309–314.
75. Saniç A (1994). Sterilizasyon ve dezenfeksiyon ilkeleri. *Klinik Dergisi* 7: 13-16.
76. Blancou J (1995). History of disinfection from early times until the end of the 18th century. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 14(1): 21–39.

77. Kaşgar Ataer HS (2001). Çeşitli dezenfektan maddelerin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
78. Hugo WB (1991). A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. *The Journal of Applied Bacteriology* 71(1): 9–18.
79. MEB (2016). Dezenfeksiyon. T.C. Millî Eğitim Bakanlığı Sağlık Hizmetleri. Ankara.
80. Kartal ED (2007). Bakteriler ve dezenfektanlara direnç. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Antalya, 4-8 Nisan 2007, 63-69.
81. Avcı D, Otkun M (2017). Bazı antiseptik ve dezenfektanların antibakteriyel etkinliklerinin araştırılması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 74(3): 211-220.
82. Günaydın M, Gürler B (2008). Hastane infeksiyonlarının kontrolünde dezenfeksiyon, antisepsi ve sterilizasyon “DAS” uygulamaları. *Ankem Dergisi* 22(4): 221-231.
83. Samastı M (2008). Hastanelerde dezenfeksiyon kullanım esasları, yapılan hatalar. *Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Hastane Enfeksiyonları Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi* 60: 143-168.
84. Perçin D, Esen Ş (2009). Güncel dezenfektanlar ve dezenfeksiyon uygulamalarındaki sorunlar. *ANKEM Dergisi* 23(2): 89-93.
85. McDonnell G, Russell AD (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12(1): 147–179.
86. Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE (2019). Use of germicides in health care settings-is there a relationship between germicide use and antimicrobial resistance: A concise review. *American Journal of Infection Control* 47S: A106–A109.
87. Saraç S (2009). Sanayide kullanılan dezenfektan ve antiseptik maddelerin antimikrobiyal etkinliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
88. Akyüz A (2019). Bazı mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneği üzerine dezenfektanların etkisinin araştırılması. Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ.

89. Töreci K (1990). Dezenfeksiyon yöntemleri ve seçimi. ANKEM Dergisi 4(3): 364-371.
90. Rutala WA, Weber DJ (2019). Disinfection, sterilization, and antisepsis: An overview. American Journal of Infection Control 47S: A3–A9.
91. World Health Organization (2018). Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection. Important issues in the approach to surgical site infection prevention, Second Edition, 45-57.
92. Esen Ş (2012). Dezenfeksiyon ve dezenfektan seçimi. ANKEM Dergisi 26(Ek 2): 309-313.
93. Abbasoğlu U (2009). Dezenfektanlar: sınıflama ve amaca uygun kullanım alanları. 6. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Antalya, 1-5 Nisan 2009, 109-120.
94. Eryılmaz M, Akın A (2008). Dezenfeksiyon ve antisepsi. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 37(4): 311-331.
95. Cerf O, Carpentier B, Sanders P (2010). Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "resistance" has different meanings. International Journal of Food Microbiology 136(3): 247–254.
96. Smith LS, Rastogi VK, Wallace L (2016). Adaptive mechanisms underlying microbial resistance to disinfectants. ECBC, Aberdeen Proving Ground United States.
97. Boothe HW (2011). Disinfectants, antiseptics and related biocides. Boothe DM (Ed.), Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics, 425-433. https://books.google.com.tr/books?id=yDjDr_MLGSsC&printsec=frontcover&hl=tr#v=onepage&q&f=false
98. Maris P (1995). Modes of action of disinfectants. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics) 14(1): 47–55.
99. Ay N (2001). Çeşitli dezenfektanların el yıkama sonrası antibakteriyel etkilerinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
100. Tischer M, Pradel G, Ohlsen K, Holzgrabe U (2012). Quaternary ammonium salts and their antimicrobial potential: targets or nonspecific interactions?. ChemMedChem 7(1): 22–31.

101. Minbiole KP, Jennings MC, Ator LE, Black JW, Grenier MC, LaDow JE, Wuest WM (2016). From antimicrobial activity to mechanism of resistance: the multifaceted role of simple quaternary ammonium compounds in bacterial eradication. *Tetrahedron* 72(25): 3559-3566.
102. Özyurt M (2005). Aldehid, peroksijen ve perasetik asit ile klor verici ajan içermeyen ve alet dezenfektanı olarak önerilen diğer dezenfektanlar, genel kullanım alanları ve antimikrobiyal etkinlikleri. 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Samsun, 20-24 Nisan 2005, 180-199.
103. Rajkowska K, Koziróg A, Otlewska A, Piotrowska M, Nowicka-Krawczyk P, Brycki B, Kunicka-Styczyńska A, Gutarowska B (2016). Quaternary ammonium biocides as antimicrobial agents protecting historical wood and brick. *Acta Biochimica Polonica* 63(1): 153–159.
104. Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds--a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39(5): 381–389.
105. Obłak E, Piecuch A, Rewak-Soroczyńska J, Paluch E (2019). Activity of gemini quaternary ammonium salts against microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(2): 625–632.
106. Arslan P, Tayyar AE (2016). Tekstil alanında kullanılan antimikrobiyal maddeler, çalışma mekanizmaları, uygulamaları ve antimikrobiyal etkinlik değerlendirme yöntemleri. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 4 (2016): 935-966.
107. Li X, Luo X, Mai B, Liu J, Chen L, Lin S (2014). Occurrence of quaternary ammonium compounds (QACs) and their application as a tracer for sewage derived pollution in urban estuarine sediments. *Environmental Pollution* 185: 127–133.
108. McKeen LW (2018). Introduction to food irradiation and medical sterilization. The effect of sterilization methods on plastics and elastomers, 1-40. <https://books.google.com.tr/books?id=qSk0DwAAQBAJ&lpg=PP1&dq=The%20Effect%20of%20Sterilization%20on%20Plastics%20and%20Elastomers&hl=tr&pg=PP1#v=onepage&q=The%20Effect%20of%20Sterilization%20on%20Plastics%20and%20Elastomers&f=false>.

109. Morrison KR, Allen RA, Minbiole K, Wuest WM (2019). More QACs, more questions: Recent advances in structure activity relationships and hurdles in understanding resistance mechanisms. *Tetrahedron Letters* 60(37): 150935.
110. Jennings MC, Minbiole KP, Wuest WM (2015). Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance. *ACS Infectious Diseases* 1(7): 288–303.
111. Yamamoto M, Matsumura R, Hirata Y, Nagamune H (2019). A comparative study of skin irritation caused by novel bis-quaternary ammonium compounds and commonly used antiseptics by using cell culture methods. *Toxicology In Vitro* 54: 75–81.
112. Bazina L, Maravić A, Krce L, Soldo B, Odžak R, Popović VB, Aviani I, Primožič I, Šprung M (2019). Discovery of novel quaternary ammonium compounds based on quinuclidine-3-ol as new potential antimicrobial candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry* 163: 626–635.
113. Censi R (2020). Literature review on dimethyloctadecyl (3 (trimethoxysilyl) propyl) ammoniumchloride from 2010 to 2020. School of Pharmacy, University of Camerino, Camerino.
114. Spivack JL, Pohl ER, Kochs P (1997). Organoalkoxysilanes, organosilanols and organosiloxanols. In: Chandra G (Ed.), *Organosilicon Materials*. Springer, Berlin, Pages: 105-136.
115. Tintin Z (2012). Arkeolojik alanda taş koruma: sağlamlaştırma yöntemleri. Kültür Ve Turizm Bakanlığı Ankara Anadolu Medeniyetleri Müzesi Müdürlüğü, Uzmanlık Tezi, Ankara.
116. Kazmaz ES (2015). Kolon dolgu maddesi olarak farklı gözenek yapısına sahip modifiye silika yapılarının sentezi, karakterizasyonu ve uygulamaları. Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Malatya.
117. Feng L, Zhu S, Zhang W, Mei K, Wang H, Feng S (2017). Preparation and characterization of functional alkoxysilanes via catalyst-free aza-Michael reaction. *ChemistrySelect* 2(13): 3721-3724.
118. Pray L (2008) Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education* 1(1): 100.

119. Kumar A, Faiq MA, Pareek V, Kumari C, Narayan RK, Ghosh SK (2019). Discovery of the dna double-helix vis-a-vis publication ethics in modern science: could it survive the standard editorial scrutiny and peer review?. doi: 10.13140/RG.2.2.20495.94887.
120. Minchin S, Lodge J (2019). Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry* 63(4): 433–456.
121. Ghannam JY, Wang J, Jan A (2020). Biochemistry, DNA Structure. In StatPearls. StatPearls Publishing.
122. Watson JD (2014). *Molecular Biology of the Gene*. Fifth Edition. Pearson, Pages: 1-33.
123. Palladino MA, Spencer CA, Cummings MR, Klug WS (2015). DNA structure and analysis. *Concepts of Genetics Pearson Higher (Ed)*, 231-260.
124. Ussery DW (2002). DNA structure: A-, B- and Z-DNA helix families. In eLS (Ed.). doi: 10.1038/npg.els.0003122
125. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT (2000). *Introduction to genetic analysis*. 7th edition. W. H. Freeman, New York.
126. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002). *Biochemistry*. Fifth Edition. W. H. Freeman, New York.
127. Gilbert N, Allan J (2014). Supercoiling in DNA and chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* 25: 15–21.
128. Bowater RP (2005). Supercoiled DNA: Structure. In: *Encyclopedia Of Life Sciences* (Ed: Wiley). doi: 10.1038/npg.els.0001040.
129. Liu Y, Hua ZC, Leng F (2018). DNA supercoiling measurement in bacteria. *Methods In Molecular Biology* 1703: 63–73.
130. Cantor, C.R. and Smith, C.L. (2002). DNA chemistry and biology. In *Genomics* (eds C.R. Cantor and C.L. Smith). doi:10.1002/0471220566.ch1
131. Mirkin SM (2001). DNA topology: fundamentals. e LS. Mirkin SM (2001). DNA topology: Fundamentals. Wiley Encyclopaedia of Life Sciences. doi: 10.1038/npg.els.0001038.

132. Kizil M, Yilmaz EI, Piriñçioğlu N, Aytekin C (2003). DNA cleavage activity of diazonium salts: Chemical nucleases. *Turkish Journal of Chemistry* 27(5): 539-544.
133. Chen J, Wang X, Shao Y, Zhu J, Zhu Y, Li Y, Xu Q, Guo Z (2007). A trinuclear copper(II) complex of 2,4,6-tris(di-2-pyridylamine)-1,3,5-triazine shows prominent DNA cleavage activity. *Inorganic Chemistry* 46(8): 3306–3312.
134. Massoud SS, Perkins RS, Knierim KD, Comiskey SP, Otero KH, Michel CL, Xu W (2013). Effect of the chelate ring size on the cleavage activity of DNA by copper (II) complexes containing pyridyl groups. *Inorganica Chimica Acta* 399: 177-184.
135. KR SG, Mathew BB, Sudhamani CN, Naik HB (2014). Mechanism of DNA binding and cleavage. *Biomedicine and Biotechnology* 2(1): 1-9.
136. Özel A, Serbest K. (2015). Bazı aril substitüye azin ferrosen bakır (II) komplekslerinin dna bağlanma, dna kesim, topoizomeraz I aktivitelerinin ve antioksidan kapasitelerinin incelenmesi.
137. Wang M, Zhang H, Zhang W, Zhao Y, Yasmeen A, Zhou L, Yu X, Tang Z (2014). *In vitro* selection of DNA-cleaving deoxyribozyme with site-specific thymidine excision activity. *Nucleic Acids Research* 42(14): 9262–9269.
138. Armitage B (1998). Photocleavage of nucleic acids. *Chemical Reviews* 98(3): 1171–1200.
139. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp* 62(e3923): 1-5.
140. Song YM, Wu Q, Yang PJ, Luan NN, Wang LF, Liu YM (2006). DNA binding and cleavage activity of Ni(II) complex with all-trans retinoic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100(10): 1685–1691.
141. Schleef M, Blaesen M, Schmeer M, Baier R, Marie C, Dickson G, Scherman D (2010). Production of non viral DNA vectors. *Current Gene Therapy* 10(6): 487–507.
142. Srivastava A, Ahmad R, Srivastava AN (2018). DNA topoisomerases: a review on their functional aspects in cell division. *Era's Journal of Medical Research* 7(2): 162-165.
143. Maxwell T, Bates A (2009). Topo2008: DNA topoisomerases in biology and medicine. *Nucleic Acids Research* 37(3): 659–660.

144. Shrestha A, Jo H, Kwon Y, Lee ES (2018). Design, synthesis, and structure-activity relationships of new benzofuro[3,2-b]pyridin-7-ols as DNA topoisomerase II inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28(4): 566–571.
145. Bates AD, Maxwell A (2005). DNA topology. Second Edition. Oxford University Press, USA, Pages: 125-144.
146. Roca J (1998). Topoisomerases. *Advances in Genome Biology* 5: 463-485.
147. Drlica K, Zhao X (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(3): 377–392.
148. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology* 17(5): 421–433.
149. Champoux JJ (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 70(1): 369-413.
150. Bansal S, Bajaj P, Pandey S, Tandon V (2017). Topoisomerases: resistance versus sensitivity, how far we can go?. *Medicinal Research Reviews* 37(2): 404–438.
151. Khan T, Sankhe K, Suvarna V, Sherje A, Patel K, Dravyakar B (2018). DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 103: 923–938.
152. Baker NM, Rajan R, Mondragón A (2009). Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Research* 37(3): 693–701.
153. Zechiedrich L, Osheroff N (2010). Topoisomerase IB-DNA interactions: X marks the spot. *Structure* 18(6): 661–663.
154. Bhaduri T, Bagui TK, Sikder D, Nagaraja V (1998). DNA topoisomerase I from *Mycobacterium smegmatis*. An enzyme with distinct features. *The Journal of Biological Chemistry* 273(22): 13925–13932.
155. Siedlecki J, Zimmermann W, Weissbach A (1983). Characterization of a prokaryotic topoisomerase I activity in chloroplast extracts from spinach. *Nucleic Acids Research* 11(5): 1523–1536.

156. DiNardo S, Voelkel KA, Sternglanz R, Reynolds AE, Wright A (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* 31(1): 43–51.
157. Tan K, Zhou Q, Cheng B, Zhang Z, Joachimiak A, Tse-Dinh YC (2015). Structural basis for suppression of hypernegative DNA supercoiling by *E. coli* topoisomerase I. *Nucleic Acids Research* 43(22): 11031–11046.
158. Mondragón A, DiGate R (1999). The structure of *Escherichia coli* DNA topoisomerase III. *Structure* 7(11): 1373–1383.
159. Feinberg H, Lima CD, Mondragón A (1999). Conformational changes in *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature Structural Biology* 6(10): 918–922.
160. Roca J (1995). The mechanisms of DNA topoisomerases. *Trends in Biochemical Sciences* 20(4): 156–160.
161. Terekhova K, Gunn KH, Marko JF, Mondragón A (2012). Bacterial topoisomerase I and topoisomerase III relax supercoiled DNA via distinct pathways. *Nucleic Acids Research* 40(20): 10432–10440.
162. Wang JC (1994). DNA topoisomerases as targets of therapeutics: An overview. In: Liu LF (Ed.), *DNA Topoisomerases: Biochemistry and Molecular Biology*. Academic Press, California, Pages: 1-19.
163. Sanderson MR, Laponogov I, Pan X, Veselkov DA, Crevel IM, Selvarajah J, Fisher LM (2017). Studies of prokaryotic type II topoisomerase drug inhibition. *Acta Crystallographica* 70: C633.
164. Klostermeier D (2018). Why two? On the role of (A-)symmetry in negative supercoiling of DNA by gyrase. *International Journal of Molecular Sciences* 19(5): 1489.
165. Murphy MB, Mercer SL, Deweese JE (2017). Inhibitors and poisons of mammalian type II topoisomerases. In *Advances in Molecular Toxicology* 11: 203-240.
166. Bahng S, Mossessova E, Nurse P, Mariani KJ (2000). Mutational analysis of *Escherichia coli* topoisomerase IV. III. Identification of a region of parE involved in covalent catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* 275(6): 4112–4117.
167. Bollimpelli VS, Dholaniya PS, Kondapi AK (2017). Topoisomerase II β and its role in different biological contexts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 633: 78-84.

168. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroﬀ N (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53(10): 1565–1574.
169. Jakopin Ž, Ilaš J, Barančoková M, Brvar M, Tammela P, Sollner Dolenc M, Tomašič T, Kikelj D (2017). Discovery of substituted oxadiazoles as a novel scaffold for DNA gyrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 130: 171–184.
170. Durcik M, Tomašič T, Zidar N, Zega A, Kikelj D, Mašič LP, Ilaš J (2019). ATP-competitive DNA gyrase and topoisomerase IV inhibitors as antibacterial agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 29(3): 171–180.
171. Sutormin D, Rubanova N, Logacheva M, Ghilarov D, Severinov K (2019). Single-nucleotide-resolution mapping of DNA gyrase cleavage sites across the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Research* 47(3): 1373–1388.
172. Bostanbaş D, Akçok İ, Çağır A (2013). 6-bisikloaril süstitüeli 5, 6-dihidro-2h-piran-2-on'ların hücre içi etki mekanizmasının incelenmesi. 1. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi, Standardizasyonu Kongresi, Kimyagerler Derneği, Antalya, 29-31 Mart 2013.
173. Park HJ, Lee HJ, Lee EJ, Hwang HJ, Shin SH, Suh ME, Kim C, Kim HJ, Seo EK, Lee SK (2003). Cytotoxicity and DNA topoisomerase inhibitory activity of benz[f]indole-4,9-dione analogs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67(9): 1944–1949.
174. Chowdhury SR, Majumder HK (2019). DNA topoisomerases in unicellular pathogens: structure, function, and druggability. *Trends in Biochemical Sciences* 44(5): 415–432.
175. Ertan-Bolelli T, Bolelli K (2019). Discovery of new DNA topoisomerase II inhibitors using structure based virtual screening method. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry* 6(1): 71-78.
176. Hevener K, Verstak TA, Lutat KE, Riggsbee DL, Mooney JW (2018). Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8(6): 844–861.
177. Kaplan Ç (2009). Bazı benzazol türevlerinin ökaryotik DNA topoizomeraz I ve II enzimleri üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji (Moleküler Biyoloji) Anabilim Dalı, Ankara

178. Zilifdar F (2016). Benzoksazol, benzamit ve benzenasetamit türevlerinin sitotoksik, genotoksik, epigenetik ve topoizomeraz I enzim inhibisyon etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara
179. Foto E (2007). Bazı benzoksazin türevlerinin ökaryotik DNA topoizomeraz I enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji (Moleküler Biyoloji) Anabilim Dalı, Ankara
180. Karataş E (2018). Topoizomeraz II inhibitörü bazı yeni heterosiklik bileşiklerin tasarımı, sentezi ve enzim aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Ankara
181. Pettersson S (2004). Biochemistry of topoisomerase inhibition and cellular mechanisms of anthraquinone-amino acid conjugates *in vitro*. Doctoral dissertation, Napier University, Edinburgh
182. Dai J, Dan W, Li N, Wang J (2018). Computer-aided drug discovery: Novel 3,9-disubstituted eudistomin U derivatives as potent antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 157: 333–338.
183. Li T, Guo J, Zhang H (2017). Design and examination of potent pseudosubstrate-based oligonucleotide inhibitors against bacterial topoisomerase IV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27(21): 4817–4822.
184. Nitiss JL, Soans E, Rogojina A, Seth A, Mishina M (2012). Topoisomerase assays. *Current Protocols in Pharmacology* 57(1): 1-34.
185. Xu Y, Her C (2015). Inhibition of topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA damage repair and anticancer therapy. *Biomolecules* 5(3): 1652–1670.
186. Ketron AC, Aldred KJ, Lindsey RH, Osheroff N (2014). Gyrase and topoisomerase IV as targets for antibacterial drugs. In: Wells RD, Bond JS, Klinman J, Masters BSS (Eds.), *Molecular Life Sciences*. Springer, New York, Pages: 1-5.
187. Kuroda S, Kagawa S, Fujiwara T (2014). Selectively replicating oncolytic adenoviruses combined with chemotherapy, radiotherapy, or molecular targeted therapy for treatment of human cancers. Lattime EC, Gerson SL (Eds.), *Gene Therapy of Cancer: Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*, 171-183.

<https://books.google.com.tr/books?id=iuh4jl9YRVEC&lpg=PA178&vq=doxorubicin&dq=Gene%20Therapy%20of%20Cancer&hl=tr&pg=PA178#v=onepage&q&f=false>

188. Garle MJ, Fentem JH, Fry JR (1994). *In vitro* cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity *in vivo*. *Toxicology in Vitro* 8(6): 1303-1312.

189. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 12(2): 115-118.

190. Tokur O, Aksoy A (2017). *In vitro* sitotoksiste testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 6(1): 112-118.

191. Lee JK, Kim DB, Kim JI, Kim PY (2000). *In vitro* cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicology in Vitro* 14(4): 345-349.

192. Aslantürk ÖS (2018). *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. Larramendy M, Soloneski S (Eds.), *Genotoxicity: A Predictable Risk to Our Actual World*, 1-17. <https://books.google.com.tr/books?id=ymiQDwAAQBAJ&lpg=PA1&dq=In%20vitro%20cytotoxicity%20and%20cell%20viability%20assays%3A%20principles%2C%20advantages%2C%20and%20disadvantages&lr&hl=tr&pg=PA1#v=onepage&q=In%20vitro%20cytotoxicity%20and%20cell%20viability%20assays:%20principles,%20advantages,%20and%20disadvantages&f=false>

193. Husøy T, Syversen T, Jenssen J (1993). Comparisons of four *in vitro* cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. *Toxicology in Vitro* 7(2): 149–154.

194. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N (1988). Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro* 2(1): 1–6.

195. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology* 731: 237–245.

196. López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P (2014). HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *Journal of Functional Biomaterials* 5(2): 43–57.

197. Baş H, Barut B, Biyiklioglu Z, Özel A (2019). Synthesis, dna interaction, topoisomerase I, II inhibitory and cytotoxic effects of water soluble silicon (IV) phthalocyanine and naphthalocyanines bearing 1-acetylpiperazine units. *Dyes and Pigments* 160: 136-144.
198. Keleş T, Barut B, Biyiklioglu Z, Özel A (2017). A comparative study on DNA/BSA binding, DNA photocleavage and antioxidant activities of water soluble peripherally and non-peripherally tetra-3-pyridin-3-ylpropoxy-substituted Mn (III), Cu (II) phthalocyanines. *Dyes and Pigments* 139: 575-586.
199. Werner M, Patel B, Talele T, Ashby C, Li Z, Zauhar R (2015). Dual inhibition of *Staphylococcus aureus* DNA gyrase and topoisomerase IV activity by phenylalanine-derived (Z)-5-arylmethylidene rhodanines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 23: 6125-6137.
200. Szulczyk D, Dobrowolski M, Roszkowski P, Bielenica A, Stefanska J, Kolinski M, Kmiecik S, Jozwiak M, Wrzosek M, Olejarz W, Struga M (2018). Design and synthesis of novel 1H-tetrazol-5-amine based potent antimicrobial agents: DNA topoisomerase IV and gyrase affinity evaluation supported by molecular docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 156: 631-640.
201. Barut B, Yalçın CÖ, Demirbaş Ü, Özel A (2020). Photochemical and in vitro phototoxic properties of Zn (II) phthalocyanine bearing piperidinium groups on different cell lines. *Journal of Organometallic Chemistry* 921:121358.
202. Ali A, Bhattacharya S (2014). DNA binders in clinical trials and chemotherapy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 22: 4506-4521.
203. Tsao IF, Wang HY, Shipman C Jr (1989). Interaction of infectious viral particles with a quaternary ammonium chlorid (QAC) surface. *Biotechnology and Bioengineering* 34(5): 639–646.
204. Jiao Y, Niu LN, Ma S, Li J, Tay FR, Chen JH (2017). Quaternary ammonium-based biomedical materials: State-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance. *Progress in Polymer Science* 71: 53–90.
205. Şengül EE, Göktürk T, Topkaya CG, Gup R (2020). Synthesis, characterization and dna interaction of Cu (II) complexes with hydrazone-schiff base ligands bearing alkyl quaternary ammonium salts. *Journal of the Chilean Chemical Society* 65(2): 4754-4758.

206. Raman N, Thalamuthu S, Dhaveethuraja J, Neelakandan MA, Banerjee S (2008). DNA cleavage and antimicrobial activity studies on transition metal (II) complexes of 4-aminoantipyrine derivative. *Journal of the Chilean Chemical Society* 53(1): 1439-1443.
207. Liu C, Wang L (2009). DNA hydrolytic cleavage catalyzed by synthetic multinuclear metallonucleases. *Dalton Transactions* (2): 227-239.
208. Sreedhara A, Cowan JA (2001). Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 6(4): 337-347.
209. Karakaş D, Ari F, Ulukaya E (2017). The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turkish Journal of Biology* 41(6): 919–925.
210. Correia-da-Silva M, Rocha V, Marques C, Deus CM, Marques-Carvalho A, Oliveira PJ, Palmeira A, Pinto M, Sousa E, Sousa Lobo JM, Almeida IF (2018). Sulfation Pathways: Potential benefits of a sulfated resveratrol derivative for topical application. *Journal of Molecular Endocrinology* 61(2): M27–M39.
211. Petushkova NA, Rusanov AL, Pyatnitskiy MA, Larina OV, Zgoda VG, Lisitsa AV, Luzgina NG (2020). Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomedical Dermatology* 4(1): 1-13.
212. EPA United States Environmental Protection Agency (2007). Reregistration eligibility decision for trimethoxysilyl quaternary ammonium chloride compounds [online]. Available from: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockkey=P1006LYJ.txt>. [Accessed 12 Aralık 2020].
213. European Chemicals Agency (2020). Dimethyloctadecyl [3-(trimethoxysilyl) propyl] ammonium chloride. Skin irritation/corrosion [online]. Available from: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/19279/7/4/2>. [Accessed 12 Aralık 2020].
214. European Chemicals Agency (2020). Dimethyloctadecyl [3-(trimethoxysilyl) propyl] ammonium chloride. Skin sensitisation [online]. Available from: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/19279/7/5/2>. [Accessed 12 Aralık 2020].

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : ŞİRİN, İlknur

Uyruğu :

Doğum Tarihi ve Yeri

Telefon (İş)

E-Posta

Yazışma Adresi (İş)

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı	2021
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2017
Lise	Trabzon Özel Gülbaharhatun Fen Lisesi	2012

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Mesul Müdür Eczacı	Trabzon Selçuk Ecza Deposu A.Ş.	2018-

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Eczacılıkta Biyokimya

HOBİLER

Müzik (Piyano)

