



**MRSA İzolatlarının Direnç Genleri Üzerine Süstitüe  
Fenetilaminlerden Sentezlenen Yeni  $\beta$ -Laktam  
Türevlerinin Etkisinin İncelenmesi**

**Merve YILDIRIM**

**Yüksek Lisans Tezi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ  
Eş Danışman: Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ**

**2022  
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MRSA İzolatlarının Direnç Genleri Üzerine Sübstitüe Fenetilaminlerden  
Sentezlenen Yeni  $\beta$ -Laktam Türevlerinin Etkisinin İncelenmesi**

**Merve YILDIRIM**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ  
Eş Danışman: Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Erzurum**

**2022**

**Her hakkı saklıdır.**

## **ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

06 / 01 / 2022

Merve YILDIRIM

# ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

## MRSA İzolatlarının Direnç Genleri Üzerine Sübstitüe Fenetilaminlerden Sentezlenen Yeni $\beta$ -Laktam Türevlerinin Etkisinin İncelenmesi

Merve YILDIRIM

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Eş Danışman: Doç Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ

Modern tıbbın en önemli tedavi araçlarından biri olan antibiyotiklerin tüm dünyada bilinçsizce kullanımı ve bunun sonucunda bakteriyel izolatlarda oluşan direnç ciddi bir sorundur. Bu nedenle uygun ve doğru antibiyotik tedavisi birçok enfeksiyon hastalığında klinik seyir ve prognozu etkilemektedir. Enfeksiyonel hastalıkların tedavisi için seçilecek antibiyotiklerin hedefe uygun ve etkili olması yanında minimum toksisiteye de sahip olması gerekmektedir. Bu bağlamda,  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler de geniş etki spektrumlu ve minimum toksisiteye sahip olmaları nedeniyle en çok reçete edilen ilaçlardır. Tez çalışmasında yeni  $\beta$ -laktam türevleri %41-%91 arasında verimlerle sentezlenmiş ve nozokomiyal enfeksiyonların başlıca sebebi olan MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Bu hususta ilk olarak izolatlarda *mecA* ve *blaZ* direnç genlerinin varlığı tespit edilmiş ve bu izolatlara karşı yeni  $\beta$ -laktam türevlerinin antibakteriyel aktiviteleri tespit edilerek, bileşiklerin MIC değerleri 7,8125-15,625  $\mu$ g/ml olarak belirlenmiştir. Yapılan antibakteriyel testler sonucunda MSSA ve MRSA izolatlarına karşı en etkili bileşikler olan (25) ve (27) türevleri seçilerek *in vitro* ortamda direnç oluşturulmuş ve izolatların bu bileşiklere karşı direnç geliştirmediği tespit edilmiştir. Daha sonra MRSA izolatlarına karşı (25) ve (27) bileşiklerinin direnç mekanizmasındaki rolü moleküler (qRT-PCR) ve biyokimyasal (Nitrosefin) analizler ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda bileşiklerin kontrole göre direnç genlerinin ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Nitrosefin analizi ile MRSA izolatlarındaki  $\beta$ -laktamaz enzimi tespit edilerek, (25) ve (27) bileşiklerinin  $\beta$ -laktamaz enzimi üzerindeki etkisi incelenmiş ve bileşiklerin  $\beta$ -laktamaz enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca sağlıklı hücre hattı (HDF) üzerindeki sitotoksik özellikleri araştırılan (25) ve (27) bileşiklerinin doza bağımlı olarak minimum toksisiteye sahip oldukları da belirlenmiştir.

2022, 97 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Staphylococcus aureus*, MRSA,  $\beta$ -Laktam türevleri, *mecA*, *blaZ*

## ABSTRACT

MS. Thesis

### Investigation of the Effect of Novel $\beta$ -Lactam Derivatives Synthesized from Substituted Phenethylamines on Resistance Genes of MRSA Isolates

Merve YILDIRIM

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ

The unconscious use of antibiotics, which is one of the most important treatment tools of modern medicine, and the resulting resistance in bacterial isolates is a serious problem. Therefore, the appropriate and correct antibiotic treatment affects the clinical course and prognosis in many infectious diseases. Antibiotics to be selected for the treatment of infectious diseases should be targeted and effective, as well as have minimum toxicity. In this context,  $\beta$ -lactam group antibiotics are the most prescribed drugs due to their broad spectrum of action and minimal toxicity. In the thesis study, new  $\beta$ -lactam derivatives were synthesized with a yield of 41%-91%, and their antibacterial activities were investigated against MRSA isolates, which are the main cause of nosocomial infections. In this regard, firstly, the presence of *mecA* and *blaZ* resistance genes in isolates was determined and the antibacterial activities of new  $\beta$ -lactam derivatives against these isolates were determined, and the MIC values of the compounds were measured as 7,8125-15.625  $\mu$ g/ml. As a result of the antibacterial tests, the compounds numbered (25) and (27) effective against MSSA and MRSA isolates were selected and resistance was established *in vitro* and the isolates could not develop resistance against these compounds. Then, the role of compounds (25) and (27) against MRSA isolates in the mechanism of resistance were investigated by molecular (qRT-PCR) and biochemical (Nitrocefin) analyses and their effects on resistance genes. As a result of the study, it was observed that the compounds decreased the expression of resistance genes compared to the control. The  $\beta$ -lactamase enzyme in MRSA isolates was determined by nitrocefin analysis, the effects of compounds (25) and (27) on  $\beta$ -lactamase enzyme were investigated, and it was observed that the compounds inhibited the  $\beta$ -lactamase enzyme. In addition, it was observed that the synthesized compounds (25) and (27) had dose-dependent minimum toxicity in two compounds whose cytotoxic properties were investigated on healthy skin cell lines.

2022, 97 page

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, MRSA,  $\beta$ -Lactam derivatives, *mecA*, *blaZ*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve lisans eğitimim boyunca bana ufuk olan, tecrübesini, ilgisini, hoşgörüsünü ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, daima iyi niyetli olmayı öğreten ve bizi bu vizyonla yetiştiren, birlikte çalışmaktan gurur duyduğum, kıymetli Danışman Hocam Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ'e,

Yüksek lisans ve lisans eğitimim boyunca her daim yanımda olup en büyük destekçim olan, "samimi niyetin, başarının anahtarı olduğunu" öğreten ve beni bu şuurda yetiştiren, birlikte çalışmaktan onur duyduğum hocam aynı zamanda her sıkıntıda çözüm üreten değerli Eş Danışman Hocam Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ'e, maddi ve manevi her zaman yanımda olan, her türlü desteği sağlayan kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatma Betül ÖZGERİŞ'e,

Üniversite eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Emre İLHAN'a, aynı laboratuvarında çalışma imkânı bulduğum, bilgilerinden faydalandığım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Yusuf AKBABA'ya, kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI'ya, maddi ve manevi desteğini, ilgisini her daim hissettiğim, bilgisinden ve tecrübesinden yararlandığım değerli hocam Arş. Gör. Damla RÜZGAR'a, her daim maddi ve manevi desteği için kıymetli hocam Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI'ya ve her sorunun en iyi çözümünü bilgisinde bulduğum sevgili Neslişah BARLAK'a, yol göstericim sevgili Çiğdem AKTAŞ'a ve birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım başta mikro laboratuvarı olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Hayatımın her gününde yanımda olan, ilk arkadaşım, biricik kız kardeşim Kübra YILDIRIM'a, hayatımda varlığıyla büyük onur duyduğum, can yoldaşım Elif AKSAKAL'a, birlikte vakit geçirmekten mutluluk duyduğum biricikim Funda DORU'ya, her daim, her koşulda yanımda olan canım ekip arkadaşlarım Elif ŞAHİN'e, Sedanur KÖKSAL'a, Zeynep SELVİTOPI'ye, Feyzanur CAN'a ve tez çalışmam boyunca birlikte çalıştığım stajyer arkadaşlarıma,

Finansal olarak tez çalışmamı destekleyen ETÜ BAP Koordinasyon Birimi'ne, teknik ve idari desteklerinden dolayı Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) birimine ve eğitim hayatım boyunca öğrendiğim tüm hocalarıma,

Son olarak da dünyadaki en büyük şansım, beni büyük fedakarlıklarla ve emeklerle bugünlere getiren, maddi manevi destekçim sevgili Babam Cevat YILDIRIM'a, canım Annem Nebahat YILDIRIM'a ve ablaları olmaktan gurur duyduğum, canım kardeşlerim Hilal, Nisa Nur ve Yunus Emre YILDIRIM'a sonsuz teşekkür ederim. İYİ Kİ VARSINIZ...

**Merve YILDIRIM**  
**Ocak 2022**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Antibiyotik.....	1
1.1.1 Antibiyotiklerin genel sınıflandırılması.....	2
1.2. $\beta$ -laktam.....	5
1.2.1. $\beta$ -laktamın etki mekanizması.....	6
1.2.2. $\beta$ -laktam türevi antibiyotikleri.....	7
1.3. Antibiyotik Direnci.....	10
1.3.1. Antibiyotiklerin direnç mekanizmaları.....	10
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> ).....	15
1.4.1. <i>S. aureus</i> 'un tarihçesi ve sınıflandırılması.....	15
1.4.2. <i>S. aureus</i> 'un özellikleri.....	16
1.4.2.1. <i>S. aureus</i> 'un hücre duvar yapısı.....	17
1.4.2.2. <i>S. aureus</i> 'un virülans özellikleri.....	18
1.4.2.3. <i>S. aureus</i> enfeksiyonları.....	19
1.4.3. <i>S. aureus</i> 'un antibiyotik direnci.....	20
1.4.3.1. <i>S. aureus</i> 'ta metisilin direnci.....	20
1.4.3.2. <i>S. aureus</i> 'un metisilin direnç mekanizmaları.....	20
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	23
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Kullanılan izolatlar.....	29
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	29
3.1.3. Kullanılan kimyasallar, kitler ve çözeltiler.....	30

3.1.4. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler .....	31
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Sentez Dizayını.....	33
3.2.1.1. (E)-N-benziliden-2-(4-florofenetil) etanamin (19)'un sentezi .....	33
3.2.1.2. 2-okso-1-fenetil-4-fenilazetid-3-il asetat (22) ( $\beta$ -laktamların Sentezi için Genel Yöntem) .....	34
3.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları .....	37
3.2.2.1. Genomik DNA izolasyonu ve PCR reaksiyon koşulları .....	40
3.2.2.2. Plazmid DNA izolasyonu ve PCR reaksiyon koşulları.....	40
3.2.3. Antibakteriyel Testler.....	40
3.2.3.1. Disk difüzyon testi .....	41
3.2.3.2. Mikrodilüsyon yöntemi.....	42
3.2.4. Direnç Modellemesi .....	42
3.2.4.1. Tek aşamalı direnç modellemesi .....	43
3.2.4.2. Çok aşamalı direnç modellemesi .....	43
3.2.5. Moleküler Analizler .....	44
3.2.5.1. Gen ekspresyon çalışmaları.....	44
3.2.6. Biyokimyasal Analiz.....	47
3.2.6.1. Nitrosefin testi .....	47
3.2.7. Toksikite Çalışmaları.....	48
3.2.7.1. Hücre kültürünün hazırlanması .....	48
3.2.7.2. Hücre sayımı ve ekimi.....	48
3.2.7.3. Bileşiklerin hazırlanması ve uygulanması.....	49
3.2.7.4. Hücre canlılığının WST-8 testi ile analizi.....	49
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	50
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>51</b>
4.1. Sentez Dizayını .....	51
4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları .....	54
4.2.1. Direnç genlerinin spesifik PCR ile amplifikasyonu .....	54
4.2.2. Antibakteriyel aktivite sonuçları .....	56
4.3. Direnç Modellemesi .....	59
4.3.1. Tek aşamalı direnç modellemesi .....	59
4.3.2. Çok aşamalı direnç modellemesi .....	61
4.4. Gen Ekspresyon Çalışmaları .....	62

4.4.1. Total RNA izolasyonu.....	62
4.4.2. cDNA sentezi ve Q-PCR çalışması.....	63
4.5. Biyokimyasal Analiz.....	66
4.6. Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-8 Testi ile Analizi.....	67
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>69</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>71</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>88</b>
EK 1.....	88
EK 2.....	95



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
Å	Angstrom
CFU	Koloni oluşturan birim
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
d	Dublet
dd	Dubletin dubleti
ddd	Dubletin dubletinin dubleti
dk	Dakika
ekv	Eş değer
Hz	Hertz
kDa	Kilo dalton
L	Litre
M	Molar
m	Multiplet
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
N	Normalite
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
ppm	Milyonda bir ölçü birimi
β	Beta
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
s	Singlet
t	Triplet

## Kısaltmalar

<sup>13</sup> C-NMR	Karbon Nükleer Manyetik rezonans
<sup>1</sup> H-NMR	Proton Nükleer Manyetik rezonans
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CT	Döngü Eşiği
CVDK	Hücre Canlılığı Tespit Kiti
DHPS	Dihidropteroat Sentetaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
HCl	Hidroklorik Asit
HDF	İnsan Deri Fibroblastı
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MRSA	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Metisiline Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
NEt <sub>3</sub>	Trietilamin
PABA	Paraaminobenzoik Asit
PAS	<i>p</i> -amino Salisilik Asit
PBP	Penisilin Bağlanma Proteinleri
PBP2a	Penisilssin Bağlanma Proteinleri 2a
PBS	Fosfat Buffer Salin
PCR	Polimer Zincir Reaksiyonu
Q-PCR	Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Reverse Transkriptaz Polimer Zincir Reaksiyonu
SCC	Staphylo Kaset kromozomu
UV	Ultraviyole
VRSA	Vankomisine Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Antibiyotiklerin etki mekanizması .....	5
Şekil 1.2. $\beta$ -laktam halkası.....	5
Şekil 1.3. $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin etki mekanizması .....	6
Şekil 1.4. Penisilinin yapısı.....	7
Şekil 1.5. Sefalosporinin yapısı .....	7
Şekil 1.6. Karbapenemin yapısı .....	9
Şekil 1.7. Monobaktamın yapısı .....	9
Şekil 1.8. $\beta$ -laktamaz inhibitörleri .....	10
Şekil 1.9. <i>S. aureus</i> 'un mikroskop görüntüsü .....	17
Şekil 1.10. <i>S. aureus</i> 'un petri görüntüsü.....	17
Şekil 1.11. <i>S. aureus</i> 'un hücre duvar yapısı .....	18
Şekil 1.12. <i>S. aureus</i> 'un enfeksiyonu .....	19
Şekil 1.13. <i>mecA</i> ve <i>blaZ</i> operon sistemi.....	21
Şekil 3.1. Disk difüzyon testi.....	42
Şekil 3.2. Tek aşamalı direnç çalışması.....	43
Şekil 3.3. Çok aşamalı direnç çalışması.....	44
Şekil 3.4. Nitrosefin testi .....	48
Şekil 4.1. Sentez dizaynı.....	52
Şekil 4.2. Sentezlenen imin bileşikleri.....	52
Şekil 4.3. Sentezlenen $\beta$ -laktam Türevleri.....	53
Şekil 4.4. MRSA izolatlarının genomik DNA'sındaki direnç genlerinin elektroforez görüntüsü .....	55
Şekil 4.5. MRSA izolatlarının plazmid DNA'sındaki direnç genlerinin elektroforez görüntüsü .....	55
Şekil 4.6. Disk difüzyon test sonuçları .....	58
Şekil 4.7. MRSA ATCC 43300 ve MSSA ATCC 25923 tek aşamalı direnç çalışması .	60
Şekil 4.8. Klinik izolatların tek aşamalı direnç çalışması .....	61
Şekil 4.9. MRSA ATCC 43300 izolatında mRNA ekspresyon seviyelerine ait Q-PCR sonuçları .....	64
Şekil 4.10. Klinik İzolat 1'in mRNA ekspresyon seviyelerine ait Q-PCR sonuçları .....	65
Şekil 4.11. Klinik İzolat 2'nin mRNA ekspresyon seviyelerine ait Q-PCR sonuçları ..	65

<b>Şekil 4.12.</b> Klinik İzolat 3'ün mRNA ekspresyon seviyelerine ait Q-PCR sonuçları ....	65
<b>Şekil 4.13.</b> Nitrosefin analiz sonuçları .....	67
<b>Şekil 4.14.</b> Bileşiklerin hücre canlılığı üzerine etkilerinin WST-8 testi ile analizi .....	68



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar .....	29
Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler .....	30
Çizelge 3.3. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.....	39
Çizelge 3.4. PCR reaksiyon karışımı .....	39
Çizelge 3.5. PCR reaksiyon koşulları .....	40
Çizelge 3.6. cDNA sentezi için RT-PCR reaksiyonu karışımı .....	45
Çizelge 3.7. RT-PCR reaksiyon koşulları .....	46
Çizelge 3.8. Q-PCR reaksiyon karışımı .....	46
Çizelge 3.9. Q-PCR reaksiyon koşulları .....	47
Çizelge 4.1. DNA konsantrasyonları .....	54
Çizelge 4.2. $\beta$ -laktam türevlerinin MRSA izolatlarının disk difüzyon analiz sonucu ....	57
Çizelge 4.3. $\beta$ -laktam türevlerinin MRSA izolatlarına karşı MIC değerleri.....	57
Çizelge 4.4. Çok aşamalı direnç çalışması için MIC değerleri .....	62
edilen RNA konsantrasyonu .....	63

### 1. GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları, geçmişten günümüze toplum sağlığını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Tüberküloz, veba, çiçek, kolera vb. gibi pek çok mikrobiyal hastalık, dünyada büyük salgınlara ve can kayıplarına neden olarak insanlık tarihi boyunca varlığını sürdürmüştür. Bu nedenle yüzyıllardır enfeksiyon hastalıklarına karşı büyük mücadele verilmiş ve tedavi yöntemleri aranmıştır. Bu süreçte enfeksiyon hastalıklarına karşı etkili doğal ve sentetik birçok bileşik keşfedilmiş ve tedavi amacıyla kullanılmıştır. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde keşfedilen yeni bileşikler ile "antibiyotik altın çağı" başlamıştır (Gould 2016).

#### 1.1. Antibiyotik

Antibiyotik terimi, Yunanca anti (karşı) ve bios (yaşam) kelimelerinden türetilen "yaşama karşı" anlamına gelmektedir ve ilk kez 1889 yılında Fransız Bilim İnsanı Paul Vuillemin tarafından *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen "piyosiyenin" isimli toksin maddesi için kullanılmıştır (Türkoğlu 2008, Özyürek vd 2022). Antibiyotik, organizmaların üremesini durduran, gelişmesine engel olan doğal ve sentetik bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Antibiyotikler, mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere modern tıpta en çok reçete edilen ilaçlar arasında yer almaktadır (Bentley et al. 2003, Guimaraes et al. 2010).

Antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılması 2000 yıl öncesine dayanmaktadır. Eski Mısırlılar ve eski Yunanlılar, enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için özel kalıplar ve bitki özleri kullanmışlardır (Berdy 2013, Mohr 2016). 19. yüzyılda ise, Louis Pasteur ve Jules Francois Joubert gibi mikrobiyologlar bazı bakterilerin antibiyotik özellikleri olduğunu gözlemlemişlerdir. 1928 yılında Alexander Fleming, doğal ve güçlü antibiyotik üreten *Penicilium notatum* fungusunu keşfetmiştir. *P. notatum*'dan izole edilen antibiyotik bileşiği *Staphylococcus* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır (Rodriguez-Saiz et al. 2005, Asif 2017).

### 1.1.1. Antibiyotiklerin genel sınıflandırılması

Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmakokinetik özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır (Etebu et al. 2020).

**Etki gösterdiği mikroorganizmalara göre:** Antibiyotikler, etki gösterdiği enfeksiyon hastalıklarının kaynağı olan organizmaya göre sınıflandırılmaktadır. Bakteri, fungus, virüs ve protozoan kaynaklı bir enfeksiyonun tedavisi için antibakteriyel, antifungal, antiviral ve anti protozoan gibi antibiyotikler kullanılmaktadır (Asif 2017).

**Etki spektrumuna göre:** Antibiyotikler, etki spektrumlarına göre dar ve geniş spektrumlu antibiyotikler olarak 2 şekilde sınıflandırılmaktadır (Grada et al. 2021). Geniş spektrumlu antibiyotikler Gram (+) ve Gram (-) bakterilere etki etmektedir. Penisilin, tetrasiklin ve sülfonamidler geniş spektrumlu antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Koyasseril-Yehiya et al. 2020).

**Hedef hücreye etkilerine göre:** Antibiyotikler hedef hücre etkilerine göre statik ve sidal etki olmak üzere 2 şekilde sınıflandırılmaktadır (Steigbigel et al. 2019). Statik etki, enfeksiyon kaynağı organizmanın gelişmesini veya üremesini önleyerek enfeksiyonun ilerlemesini durdurmaktadır. Tetrasiklin, makrolid, sülfonamid, amfenikol, linkozamid, metronidazol ve mikonazol gibi antibiyotikler statik etkiye sahiptir. Sidal etki ise, enfeksiyon kaynağı organizmanın işlevsel mekanizmalarını bozarak organizmayı öldürmektedir (Cui et al. 2018). Polipeptid, florokinolon, vankomisin, rifampisin,  $\beta$ -laktam, (penisilin, sefalosporin, monobaktam, karbapenem),  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri (sulbaktam, tazobaktam) ve teikoplanin gibi antibiyotikler sidal etkiye sahiptir (Kohanski et al. 2010).

**Kimyasal yapılarına göre:** Kimyasal yapısı benzer olan bileşiklerin genel olarak aktivitelerinin de benzer olduğu bilinmektedir. Bu nedenle antibiyotikler iskelet yapılarına göre  $\beta$ -laktam, fenikol, sülfonamid, tetrasiklin, aminoglikozid, makrolid, linkozamid, polipeptid, kinolon, nitrofuran, imidazol ve rifampisin şeklinde sınıflandırılmaktadır (Küçükbay vd 2017).

**Kullanım alanlarına göre:** Antibiyotikler, sağlık alanı dışında tarım (bitkilerde hastalık kontrolü, hayvan çiftliklerinde yem katkısı, büyüme geliştirici ve enfeksiyonların tedavisi), gıda (besinlerin korunması), su ürünleri (sucul canlıların sağlığı ve gelişimi) alanları ile bilimsel çalışmalarda da yoğun bir şekilde kullanılmakta ve buna dayalı olarak sınıflandırılmaktadır (Rizzo et al. 2013, Olesen et al. 2018).

**İmmünomodülatör etkilerine göre:** Antibiyotikler bağışıklık sistemi tepkilerine göre 4 sınıfa ayrılmaktadır (Labro 2012, Zapater et al. 2015).

*i. Konak organizmanın immün sistemi ile sinerjik etki sağlayan antibiyotikler;* mikroorganizmaların immün hücreleri tarafından kolaylıkla tanınıp fagositoz yoluyla parçalanmaktadır. Örneğin kinolonlar immün sistemi ile sinerjik etkisi olan antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Dalhoff et al. 2003, Pang et al. 2018).

*ii. Konak organizmanın immün sistemine belirgin bir etkisi olmayan antibiyotikler;* konağın immün sistemini uyarmayan antibiyotiklerdir.  $\beta$ -laktam türevleri ve vankomisin, konak hücrenin immün sistemine belirgin bir etkisi olmayan antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Kong et al. 2010, Rodilla et al. 2010).

*iii. Konak organizmanın immün sistemini deprese eden antibiyotikler;* konak organizmada hücrel ve humoral bağışıklığı uyaran ve olumsuz olarak etkileyen antibiyotiklerdir. Tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotikleri immün sistemini deprese eden antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Soory 2008, Golub et al. 2011, Benford et al. 2014).

*iv. Konak organizmanın immün fonksiyonlarını şiddetlendiren antibiyotikler;* konak organizmaya karşı toksik etki gösteren antibiyotiklerdir. Sefodizim antibiyotiği bu grupta bulunan antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Hamilton-Miller 2001, Meyer et al. 2006).

**Etki mekanizmalarına göre:** Antibiyotikler hedef organizmanın etki gösterdiği hücrel yapılarına göre sınıflandırılmaktadır (Ali et al. 2018). Bunlar;

*i. Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler:* Hücre duvarı bulunan bakteri ve fungus gibi birçok organizmada hücre duvarının hasar görmesi veya uzaklaştırılması durumunda hücre bütünlüğü bozularak lizis olmaktadır (Dickerhof et al. 2011). Bu

## 1. GİRİŞ

---

nedenle hücre duvarına sahip organizmaların sebep olduğu enfeksiyonları tedavi etmede hücre duvarının sentezini hedef alan antibiyotik grupları tercih edilmekte ve buna göre antibiyotikler sınıflandırılmaktadır.  $\beta$ -laktam, Glikopeptid, sikloserin ve basitrasinerler hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Vranakis et al. 2011).

**ii. Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler:** Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler, ribozomun alt birimlerine bağlanarak etki göstermektedir (Bhattacharjee 2016). Aminoglikozit, tetrasiklin, makrolid, linkozamin ve kloramfenikoller protein sentezini inhibe eden antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Nguyen et al. 2019).

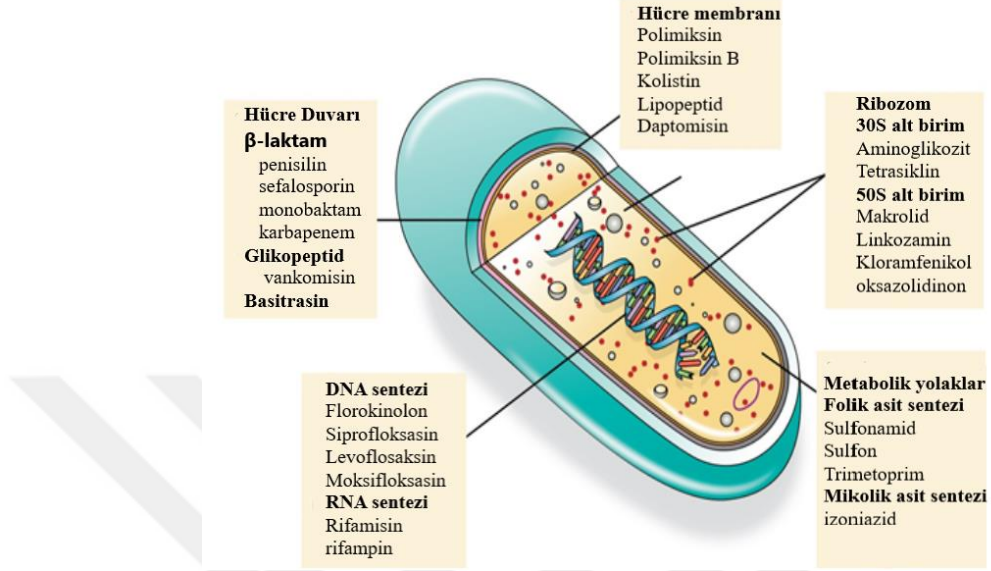
**iii. Hücre membran geçirgenliğini inhibe eden antibiyotikler:** Hücre yapı ve bütünlüğünün korunmasında önemli role sahip olan hücre membranının seçici geçirgen yapısının bozulması durumunda hücreye madde giriş çıkışı kontrol edilememekte ve hücre lizis olmaktadır. Bu bağlamda, hücre geçirgenliğinin artırılması ve ozmotik basıncın bozulmasında hücre membranında yer alan fosfolipidleri hedef alan antibiyotikler kullanılmaktadır. Polimiksin, nistatin, Amfotrisin B ve azol türevleri hücre membran geçirgenliğini inhibe eden antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Epanand et al. 2016).

**iv. Nükleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler:** Nükleik asitler, hücrelerde kodlama işlevlerinden sorumlu genetik elemanlardır. Nükleik asit sentezini inhibe eden antibiyotiklerin varlığında örneğin DNA topoizomeraz enziminin inhibisyonu sonucunda replikasyon, RNA topoizomeraz enziminin inhibisyonu sonucunda da mRNA sentezi gerçekleşmemekte ve genetik bilgi aktarımı olamayacağından hücreler hayati fonksiyonlarını yerine getirememektedirler Aktinomisin, rifampisin, kinolon ve mitomisin gibi antibiyotikler nükleik asit sentezini inhibe eden antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Bhattacharjee 2016).

**v. Metabolizmaya etki eden antibiyotikler (Antimetabolitler):** Hücre metabolizmasında etkili olan metabolitlerin aktif olabilmesi için substrata ihtiyaç duyulmaktadır. Substratlar ile yapısal benzerlik gösteren antimetabolitler ise metabolitlerin yapısını bozarak hücresel faaliyetleri engellemektedir (Sanseverino et al.

## 1. GİRİŞ

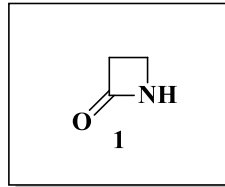
2018). Sülfonamid, PAS (*para*-aminosalisilik asit) izoniazid, etambutol, dihidrofolat ve reduktaz inhibitörleri (trimetoprim, primetamin) antimetabolitleri, metabolizmaya etki eden antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Gonzalez et al. 2019).



Şekil 1.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları

### 1.2. $\beta$ -laktam

$\beta$ -laktam türevi antibiyotikler, 1928 yılında Alexander Fleming tarafından *P. notatum* fungusundan izole edilen penisilin bileşiğinin keşfi ile ortaya çıkmıştır,  $\beta$ -laktam halkasında bir azot ve üç karbon atomundan oluşan 4 üyeli doymuş siklik amid ya da diğer bir ifade ile laktam halkası bulunmaktadır (Şekil 1.2.) (Noel et al. 2010). Laktam halkasındaki azot atomunun  $\beta$  pozisyonunda olması halinde dörtlü siklik amid yapısı oluşmakta ve bu yapı  $\beta$ -laktam halkası olarak adlandırılmaktadır (Çakır 2018).

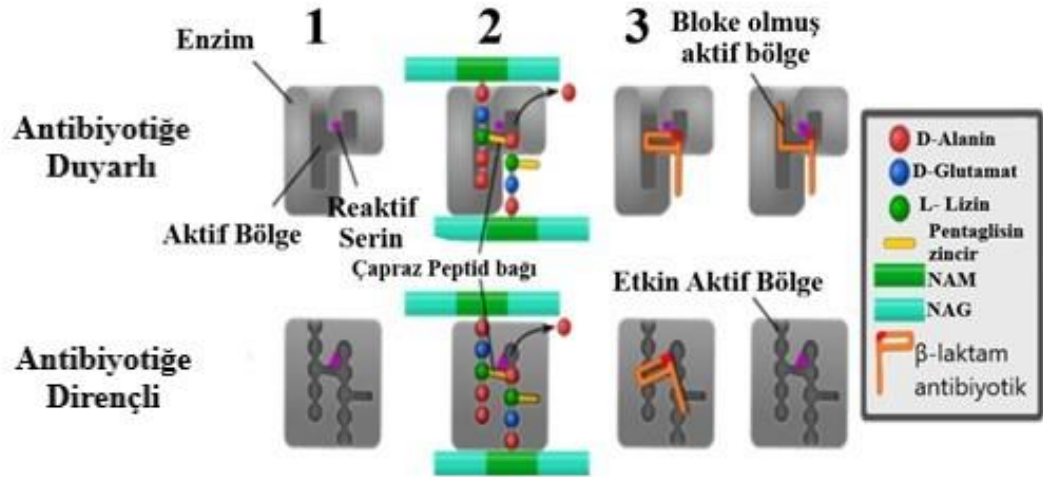


Şekil 1.2.  $\beta$ -laktam halkası (1)

## 1. GİRİŞ

### 1.2.1. $\beta$ -laktamın etki mekanizması

Bakterilerde hücre duvarı, bakterinin büyüyüp gelişmesini sağlayan ve sitoplazmik zarı koruyan sert bir yapıdır. Hücre duvarı yapısında peptidoglikan, teikoik asit ve amino proteinler bulunmaktadır. Peptidoglikan yapısı (mürein ya da mukopeptit) N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramikasit (NAM) olmak üzere iki farklı karbohidrat türevlerinin birbirlerine  $\beta$ -1,4 glikozidik bağı ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. NAM, yapısında tetrapeptid, L-alanin, D-glutamik asit, diaminopimelik asit (DAP), L-lizin ve D-alanin gibi özgül aminoasitler içermektedir. Peptidoglikan yapının oluşması için karşılıklı NAM'lardaki amino asitler arasında pentaglisin köprüsünün kurulması gerekmektedir. Pentaglisin köprüsü, peptid bağlarının transpeptidaz enzimi diğer bir ifadeyle PBP tarafından bir aminoasitin çıkarılması ile oluşmaktadır. Bu aşama transpeptidasyon olayı olarak adlandırılmaktadır.  $\beta$ -laktam türevi antibiyotikler ise bu transpeptidasyon aşamasına etki etmektedir.  $\beta$ -laktam halkası PBP'ler ile yapısal analog olmakta ve birbirlerine kovalent bağlarla bağlanmaktadır. Böylelikle PBP'yi inhibe edip peptidoglikan yapısının oluşumunu engelleyerek bakteri hücrelerini lizise uğratmaktadır (Şekil 1.3.) (Van Bambeke et al. 2017, Lima et al. 2020).

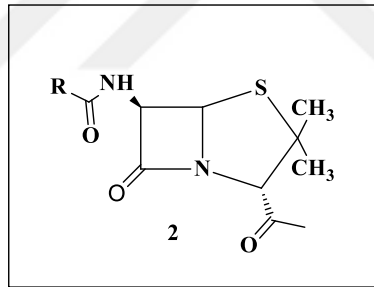


Şekil 1.3.  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin etki mekanizması

### 1.2.2. $\beta$ -laktam türevi antibiyotikler

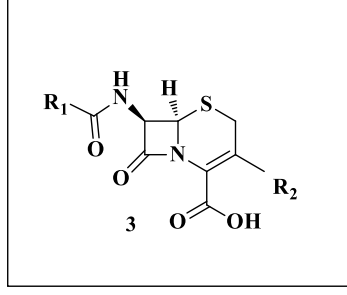
Biyolojik olarak oldukça aktif moleküller olan  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler antibakteriyel, antifungal, (Jarrahpour et al. 2019) anti-inflamatuar, (Ritu et al. 2011) ve antikanser (Bandyopadhyay et al. 2010) gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olup 5 temel sınıftan oluşmaktadır. Bunlar;

**Penisilin (2)**, tıpta kullanılan en eski antibiyotik grubu olup, seçici toksisiteye sahip ilk mikrobiyal metabolittir. Penisilinin yapısında bir tetrahedral karbona bağlı tiyazolidin halkası ve bir azot atomuna sahip laktam halkası bulunmaktadır (Şekil 1.4.). Ayrıca penisilin geniş spektrumlu, bakterisidal etkili ve konak hücrede minimum toksisiteye sahip bir antibiyotiktir (Gaynes et al. 2017). Günümüzde penisilinin yarılanma ömrünün kısa ve antijenik reaksiyonlara sebep olması yanında organizmalar tarafından penisiline karşı direnç oluşması nedeniyle klinikte çok fazla tercih edilmemektedir (Shenoy et al. 2019).



Şekil 1.4. Penisilinin (2) yapısı

**Sefalosporin (3)**, *Cephalosporium acremonium* fungusundan izole edilen kimyasal iskelet yapısı penisiline benzerlik gösteren  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiktir. Sefalosporin, yapısında  $\beta$ -laktam halkasına bağlı kükürt içeren bir heterosiklik halkaya sahiptir (Şekil 1.5.). Sefalosporinler, etki mekanizmalarına göre birinci kuşaktan beşinci kuşağa kadar 5 farklı gruba ayrılmaktadır (Chaudhry et al. 2019). Bu gruplar; yan zincirlerin modifikasyonu ile çeşitli farmakokinetik özelliğe ve farklı antibakteriyel etki spektrumuna sahiptir. Birinci kuşaktan dördüncü kuşağa kadar olan tüm sefalosporinlerin arasında yapısal olarak farklılık olmasa da farmakokinetik olarak plazma proteinlerine bağlanmaları bakımından farklılıklar gözlenmektedir (Mehta 2015).



Şekil 1.5. Sefalosporinin (3) yapısı

*Birinci nesil sefalosporinler;* Solunum yolları, yumuşak doku ve idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan bazı Gram (+) ve Gram (-) organizmalara karşı etkili olan dar spektrumlu antibiyotik grubudur. Penisilinin yapısına çok benzerlik göstermekte ve bu nedenle  $\beta$ -laktamaz enzimi ile parçalanmaktadır. Sefazolin, sefaleksim ve sefadroksil bu grup antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (McNeill et al. 2021).

*İkinci nesil sefalosporinler;* *Bacteroides fragilis* gibi Gram (-) patojen organizmaların tedavisinde kullanılan antibiyotik grubudur. İkinci nesil sefalosporinler hücreye giriş potansiyellerinin yüksek ve etki spektrumlarının geniş olması nedeniyle  $\beta$ -laktamaz enzimine dayanıklıdır. Sefaklor, sefuroksim, sefotetan ve sefoksitin bu grup antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Sipos et al. 2021).

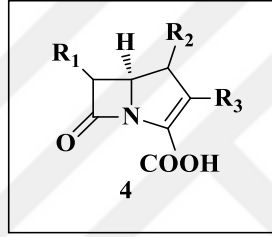
*Üçüncü kuşak sefalosporinler;* Gram (-) basillere ve Gram (+) organizmalara karşı çok etkili olan geniş spektrumlu sefalosporinlerdir. Birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlerle karşılaştırıldığında, üçüncü kuşak sefalosporinler Gram (-) basillere karşı daha yüksek aktivite ve daha geniş spektruma sahiptirler. Sefotaksim, seftazidim, seftriakson ve sefiksim bu grup antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Sunjaya et al. 2019).

*Dördüncü nesil sefalosporinler;* Üçüncü nesil sefalosporinlerle kimyasal yapısı çok benzerlik göstermektedir. Özellikle Gram (-) organizmaların dış zarlarından hücre içerisine hızlı geçişleri, dirençli organizmaların  $\beta$ -laktamaz enzimine zayıf ve PBP'lere yüksek afinitesi nedeniyle çok güçlü aktiviteye sahiptirler. Sefpirome ve sefepim bu grup antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Garau et al. 2008).

## 1. GİRİŞ

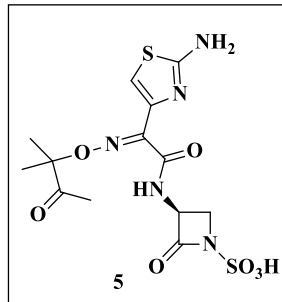
*Beşinci kuşak sefalosporinler; MRSA ve Pseudomonas auregonisa'nın sebep olduğu nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu gruptaki antibiyotiklerin çocuklarda kullanımına FDA tarafından onay verilmemiştir (Yıldız vd. 2014).*

**Karbapenem (4)**, Piyasada bulunan antibiyotik grupları arasında en geniş spektruma sahip  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiktir (Papp-Wallace et al. 2011). Yapısında  $\beta$ -laktam halkasına bağlı beş üyeli halka bulunmaktadır (Şekil 1.6.). Karbapenemin klinikte imipenem ve meropenem olmak üzere iki türevi bulunmaktadır. Meropenem Gram (-) organizmaların neden olduğu enfeksiyonların, imipenem ise Gram (+) organizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Bush 2010).



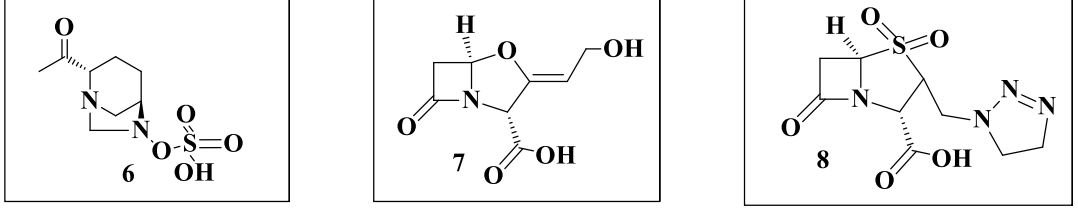
Şekil 1.6. Karbapenemin yapısı

**Monobaktam (5)**, grubu antibiyotiklerin yapısında tek  $\beta$ -laktam halkası bulunmaktadır (Şekil 1.7.). Gram (-) organizmalara karşı çok güçlü aktiviteye sahipken, Gram (+) ve anaerobik organizmalara karşı düşük aktivite göstermektedir (Sauberan et al. 2018). Aztroenam klinikte kullanılan tek monobaktam türevidir. Dar spektrumlu bir antibiyotik olması sebebiyle ciddi enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde tercih edilmemekte ve diğer antibiyotikler ile kombine edilerek kullanılmaktadır (Frumin et al. 2009).



Şekil 1.7. Monobaktamın (5) yapısı

**$\beta$ -laktamaz inhibitörleri (6)**, Dirençli organizmalar  $\beta$ -laktam halkasını parçalayan  $\beta$ -laktamaz enzimi üretmektedirler (Bush et al. 2016).  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri ise  $\beta$ -laktamaz enzimini inhibe etmektedirler. Tazobaktam, klavunat ve sulbaktam bu grup inhibitörlere örnek olarak verilebilir (Şekil 1.8.) (Bush 2010).



Şekil 1.8.  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri

### 1.3. Antibiyotik direnci

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemli keşiflerden biri olan antibiyotikler modern tıpta klinik amaçlı kullanımına ek olarak günümüzde tarımsal ve gıda sektörü gibi alanlarda da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Antibiyotiklerin endüstriyel alanlarda kullanımı her ne kadar sektöre avantaj sağlasa da bu durum patojen organizmaların zamanla direnç mekanizmaları geliştirmesine ve antibiyotiklere karşı direnç kazanmasına neden olmuştur (Ventola 2015).

Antibiyotik direnci, mikrobiyal organizmalar tarafından oluşturulmakta ve antimikrobiyal ajanın aktivitesinin azalması ya da tamamen etkisiz hale gelmesi olarak tanımlanmaktadır (Abbasoğlu vd 2011). Antibiyotiklere karşı direnç; doğal, kazanılmış ve çevre koşullarına bağlı olmak üzere üç farklı şekilde gerçekleşebilmektedir. Doğal direnç de genel olarak antimikrobiyal ajan konağın hücresel yapılarına bağlanamamaktadır. Kazanılmış direnç de mikroorganizmaların kromozom, plazmid ve transpozon elementlerinde bulunan genlerin mutasyonu veya özellikle bakterilerde konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon gibi gen aktarımları ile direnç genlerinin kazanılması söz konusu olmaktadır. Çevre şartlarına bağlı olarak gelişen direnç de ise ortamdaki oksijen basıncı, pH ve sıcaklık değişikliklerinden dolayı mikroorganizmalarda direnç oluşabilmektedir (Çiftçi vd 2011).

### 1.3.1. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları

Mikroorganizmalar yapı ve etki mekanizması farklı pek çok antimikrobiyal ilaca karşı direnç geliştirebilmektedir (Reygaert et al. 2018).

#### *Antimikrobiyal İlaçların Yapısal Özelliklerine Göre Direnç Mekanizmaları;*

- $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklere karşı direnç
- Aminoglikozit türevi antibiyotiklere karşı direnç
- Kloramfenikol türevi antibiyotiklere karşı direnç
- Glikopeptid türevi antibiyotiklere karşı direnç
- Tetrasiklin türevi antibiyotiklere karşı direnç
- Kinolon türevi antibiyotiklere karşı direnç
- Rifampisin türevi antibiyotiklere karşı direnç
- Sülfonamid ve trimetoprim antibiyotiklerine karşı direnç
- Makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLSB) antibiyotiklere karşı direnç olarak sınıflandırılmaktadır.

**$\beta$ -laktam türevi antibiyotiklere karşı direnç:** Dirençli organizmalar  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklere karşı üç farklı direnç mekanizması geliştirmektedir (Worthington et al. 2014)

**i.  $\beta$ -laktamaz enzimi ile antibiyotiğin inaktivasyonu:** Dirençli organizmalar  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin laktam halkasını parçalayan  $\beta$ -laktamaz enzimini üretmekte ve böylece bu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedirler.  $\beta$ -laktamaz enzimi moleküler yapı ve işlevlerine göre A, B, C, D şeklinde sınıflandırılmaktadır (D'Costa et al. 2009).

**ii. Penisilin bağlanma proteinlerinde (PBP) oluşan değişiklik:**  $\beta$ -laktam türevi antibiyotikler PBP'lere bağlanmak suretiyle ilgili proteini inaktif ederek etki göstermektedir (Sutaria Dhruvitkumar et al. 2018). Aynı zamanda söz konusu genlerde oluşan mutasyon nedeniyle PBP'lerde konformasyonel değişiklikler oluşmakta ve

## 1. GİRİŞ

---

böylelikle  $\beta$ -laktam türevi antibiyotikler hedefe bağlanamayıp herhangi bir aktivite gösterememektedir (Çiftçi vd 2011).

**iii. Aktif pompa sistemi:** Dirençli organizmaların düzenleyici genlerinde oluşan mutasyonlar ile aktif pompa sistemlerinin fazla çalışması ve antimikrobiyal ajanların dışarı atılması sonucu organizma direnç kazanmaktadır. Özellikle Gram (-) organizmaların dış membranında bulunan aktif pompa sistemi ile  $\beta$ -laktam türevi antibiyotikler hücre içine alınmamakta ve böylelikle direnç oluşmaktadır (Pages et al. 2009).

**Aminoglikozit türevi antibiyotiklere karşı direnç:** Dirençli organizmalar aminoglikozit türevi antibiyotiklere karşı direnç mekanizmalarını; ribozomlarda oluşan mutasyon, hücre membran zar geçirgenliğini azaltma ve enzimatik inaktivasyon ile gerçekleştirmektedir. Ribozomun 30S alt biriminde oluşan mutasyon sonucunda streptomisine karşı direnç gelişmekte, hücre membranında oluşan mutasyonlar nedeniyle zar geçirgenliği azalmakta ve pozitif yüklü bileşik olan aminoglikozit antibiyotikleri hücre içine alınamadığından direnç oluşmaktadır. Aminoglikozit antibiyotiklerine karşı bir diğer direnç mekanizması ise bileşiğin yapısını bozan ve etkisiz hale getiren enzimlerdir. Aminoglikozit antibiyotiklerin inaktivasyonundan sorumlu enzimler asetilaz, fosforilaz ve adenilazdır (Garneau-Tsodikova et al. 2015).

**Kloramfenikol türevi antibiyotiklere karşı direnç:** Dirençli organizmaların genomik ve plazmid DNA'larında bulunan genlerle kodlanan kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) enzimi bu antibiyotiklere karşı dirence neden olmaktadır. CAT enzimi kloramfenikol türevi antibiyotiklerin yapısını değiştirip ribozomun 50S alt birimine bağlanmasını ve protein sentezinin inhibe olmasını engellemektedir (Fernández et al. 2012).

**Makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLSB) antibiyotiklere karşı direnç:** MLSB grubu antibiyotikler ribozomun 23S alt birimine bağlanıp protein sentezini inhibe eden farklı kimyasal iskelet yapılarına sahip antibiyotiklerdir. MLSB grubu antibiyotikler, Gram (-) organizmaların dış membranından geçiş yapamamakta, metilaz enzimi tarafından inaktive olmakta ve aktif pompalama sistemi ile hücre dışına atıldıklarından bu antibiyotik grubuna karşı direnç oluşturmaktadırlar. Aynı etki

## 1. GİRİŞ

---

mekanizmasına sahip oldukları için birinde direnç oluşmasıyla gruptaki diğer antibiyotiklere karşı da direnç gelişmektedir (Uzun et al. 2014).

**Glikopeptid türevi antibiyotiklere karşı direnç:** Gram (-) organizmaların hücre duvarından geçiş yapamaması nedeniyle oluşan direnç türüdür. Vankomisine karşı oluşan direnç örnektir (Yushchuk et al. 2020).

**Tetrasiklin türevi antibiyotiklere karşı direnç:** Tetrasiklin antibiyotiğinin tarımda yaygın olarak kullanılması nedeniyle en fazla direnç görülen antibiyotik türüdür. Genellikle ribozomlarda oluşan mutasyonlar nedeniyle antibiyotik ribozomlara bağlanamamakta ve aktif pompalama sisteminin aktif olmasıyla tetrasiklin türevi antibiyotikler hücre içine alınamamaktadır (Grossman 2016).

**Kinolon türevi antibiyotiklere karşı direnç:** Kinolon hücre içerisine dış membranındaki porinlerden ya da fosfolipitler aracılığı ile giriş yaparak DNA replikasyonunu engellemektedir. Dirençli organizmalarda ise hücre membran geçirgenliğinin azalması ile kinolon türevi antibiyotikler hücre içerisine alınamamakta ve direnç oluşmaktadır (Khawcharoenporn et al. 2012).

**Rifampisin türevi antibiyotiklere karşı direnç:** Dirençli organizmaların genomik DNA'sında oluşabilecek mutasyon sonucunda RNA polimeraz enzimini kodlayan gendeki mutasyon ve Gram (-) organizmaların dış membranından geçememesi nedeniyle direnç oluşmaktadır (Goldstein 2014).

**Sülfonamid ve trimetoprim antibiyotiklerine karşı direnç:** Bakterilerin kromozom veya plazmid DNA'larında oluşan mutasyon sonucunda direnç oluşmaktadır. Kromozomal kaynaklı direnç mekanizmasında; PABA (*para*-aminobenzoik asit) yüksek düzeyde sentezlenip folat metabolizmasında sülfonamid türevleri inhibe edilerek direnç oluşurken; plazmid kaynaklı direnç mekanizmasında ise sülfonamidlere düşük afinite gösteren DHPS (Dihidropteroat Sentetaz) enziminin sentezlenmesi ile oluşmaktadır. Plazmid DNA veya transpozon element kaynaklı direnç mekanizması ise trimetoprime dirençli dihidrofolat reduktaz enziminin sentezlenmesi ile oluşmaktadır (Schmitz et al. 2010).

### *Antimikrobiyal İlaçların Etkisine Göre Direnç Mekanizmaları*

- İlaç hedefinde konformasyonel değişiklik,
- Alternatif farklı metabolik yolların kullanılması,
- İlacın enzimatik olarak inaktivasyonu,
- Hücre membran geçirgenliğinin azaltılması,
- Aktif pompalama sistemi ile ilacın hücre dışına atılmasından oluşmaktadır.

**İlaç hedefinde konformasyonel değişiklik:** Antimikrobiyal ajanın hedefi olan yapıda oluşabilecek mutasyon nedeniyle antimikrobiyal ajan hedef yapıya bağlanamayıp işlevsiz hale gelmektedir. Böylelikle organizmalar antimikrobiyal ajana karşı direnç geliştirmiş olmaktadır (Copeland et al. 2011). Örneğin; rifampisin antibiyotiği protein sentezinden sorumlu RNA polimeraz enzimini inhibe etmektedir. RNA polimerazı kodlayan gendeki mutasyon ile bu enzimde değişiklik meydana gelmesi durumunda rifampisin antibiyotiği RNA polimeraz enzimine bağlanamamakta ve böylelikle organizma rifampisine karşı direnç oluşturmaktadır. Bunun yanında DNA topoizomeraz II (giraz) enzimini kodlayan genin mutasyonu sonucunda da kinolon antibiyotiklerine karşı direnç oluşmaktadır (Lambert et al. 2005, Pazarlı 2010).

**Alternatif metabolik yolların kullanılması:** Bazı antibiyotikler hücre için gerekli metabolitleri inhibe ederken organizmalarda antibiyotiklerin etki ettiği metabolitleri farklı yollar üzerinden sentezleyerek direnç göstermektedir (Cloete et al. 2016). Örneğin; bakterilerde DNA ve protein sentezinden sorumlu enzimlerin çalışması için folik asit üretilmektedir. Trimetoprim/ sulfametoksazol gibi antimetabolit antibiyotikler ise organizmanın folik asit üretimini engellemektedir. Ancak dirençli organizmalar alternatif farklı yollar ile ortamda bulunan folik asiti kullanmaktadırlar (Işık 2008).

**İlacın enzimatik olarak inaktivasyonu:** Dirençli organizmaların, antimikrobiyal ajanı parçalayarak ya da modifiye edici enzimler üreterek geliştirdikleri direnç mekanizmasıdır. Örneğin;  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikleri parçalayan  $\beta$ -laktamaz enzimi, aminoglikozit grubu antibiyotikleri inaktive eden asetilaz, fosforilaz ve adenilaz enzimleri, kloramfenikol gibi protein sentezini inhibe eden antibiyotikleri parçalayan asetil transferaz enzimi ve eritromisin gibi makrolid grubu antibiyotikleri parçalayan

esteraz enzimi ile organizmalar antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedir (Oğuz 2013, Santajit et al. 2016).).

**Hücre membran geçirgenliğinin azaltılması:** Antimikrobiyal ajanın etkili olabilmesi için bakteri hücresinin hücre zarından geçiş yapması gerekmektedir. Gram (-) bakterilerin hücre duvarı bileşenlerinden biri dış zar olup, antimikrobiyal ajanların hücre içine girebilmesi için bu dış zardaki porinlerden geçmesi gerekmektedir. Gram (-) bakterilerdeki mutasyon sonucu dış membran porin yapısında değişiklik meydana gelmekte ve membran geçirgenliği azalarak direnç oluşmaktadır. Örneğin; kinolonların sitoplazmadaki DNA topoizomeraz enzimini inhibe edebilmesi için Gram (+) bakterilerde hücre duvarı ve sitoplazmik membranı; Gram (-) bakterilerde ise dış membran, hücre duvarı ve sitoplazmik membranı geçmesi gerekmektedir. Dirençli organizmalar da hücre membran geçirgenliğini azaltarak kinolonların hücre içerisine alımını engellemektedir (May et al. 2018).

**Aktif pompalama sistemi ile ilacın hücre dışına atılması:** Mikroorganizmalarda aktif pompa sistemi; besin ve iyon alışverişinin sağlanması, hücresel metabolik atıklar ve toksik maddelerin hücre dışına atılması, bakterilerin birbirleri ve çevreleriyle olan ilişkilerinin düzenlenmesini sağlamaktadır. Aktif pompa sistemi antimikrobiyal ilaçlara ve çok sayıda kimyasal bileşiğe karşı etki göstererek çoklu ilaç direnci oluşumuna neden olmaktadır (Sun et al. 2014).

### 1.4. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

*S. aureus*, insan ve hayvanların normal florasında bulunan özellikle deri ve burun mukozalarında gelişen Gram (+) bir bakteridir. Deri ve mukozal yaralanmalar nedeniyle inflamasyona sebep olmakta ve patojenite özellikleri ortaya çıkmaktadır (Turner et al. 2019).

#### 1.4.1. *S. aureus*'un Tarihçesi ve Sınıflandırması

*S. aureus*, nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olan ölümcül etkiye sahip bir mikroorganizmadır. *S. aureus* ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından ışıık

## 1. GİRİŞ

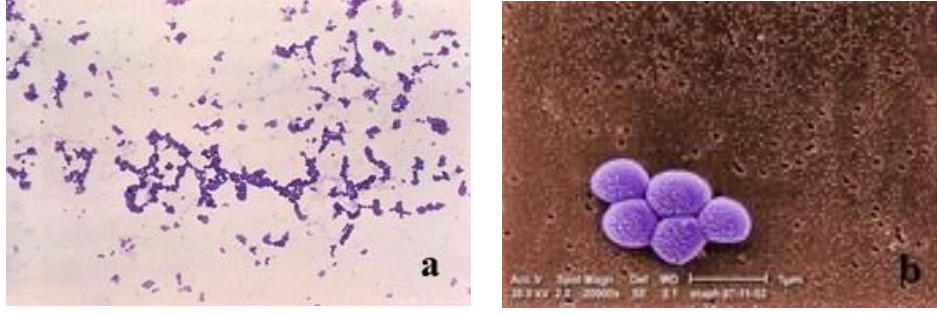
---

mikroskopunda görülmüş ve 1880 yılında Louis Pasteur tarafından sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. 1881 yılında Alexander Ogston *S. aureus*'un hayvanlarda patojen olduğunu kanıtlamış ve mikroskopik morfolojilerini inceleyerek üzüm salkımına benzediğini bildirmiştir. Bu morfolojisinden dolayı da Yunanca üzüm salkımı anlamına gelen “staphyle” ve tane anlamına gelen “coccus” olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bakteri kolonilerinin altın sarısı rengini almasından dolayı altın sarısı anlamına gelen “aureus” ismi eklenmiştir. 1884 yılında Bergey tarafından *S. aureus*, *Micrococcaceae* ailesine ait Gram (+) bakteri olarak sınıflandırılmış ve aynı yıl Rosenbach tarafından ilk kez *S. aureus*' un insanlarda patojen olduğu bildirilmiştir (Andrade et al. 2020). Günümüzde *Staphylococcus* cinsi, *Staphylococcaceae* familyasına ait olan türün Firmicutes şubesi içinde sınıflandırıldığı bilinmektedir.

1936 yılında *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde sülfonamidler ve 1940 yılında ise penisilinler klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Ancak 1944 yılından itibaren *S. aureus*, penisilin antibiyotiğine karşı  $\beta$ -laktamaz enzimi üreterek direnç geliştirmiştir. Bu direnç nedeniyle hastane kaynaklı değil toplum kaynaklı *S. aureus* enfeksiyonlarında da dirençli izolatlar oluşmaya başlamıştır. 1961 yılında ise *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi için penisilin türevi olan metisilin klinikte yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve kısa sürede metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları gelişmiştir. MRSA izolatları için vankomisin antibiyotiği kullanılmaya başlandıktan sonra da bu antibiyotiğe karşı direnç gelişmiştir. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü MRSA izolatlarını küresel halk sağlığı sorunu olarak ilan etmiştir. Hastane ve toplum kaynaklı MRSA enfeksiyonları 1970 yılından itibaren sıkça görülmektedir (Kuehl et al. 2020).

### 1.4.2. *S. aureus*'un özellikleri

*S. aureus*, tekli, ikili, dörtlü taneler ile kısa zincirler oluşturarak üzüm salkımına benzer morfoloji sergilemektedir (Şekil 1.9.) (Tong et al. 2015). *S. aureus* Gram, katalaz ve oksidaz pozitif, spor oluşturmeyen, kapsülü olmayan, hareketsiz ve fakültatif aerob bakteridir. *S. aureus* 7.0-7.5 optimum pH ortamında, 30-37°C sıcaklıkta ve %10-15 tuz konsantrasyonunda gelişmektedir (Sato et al. 2019).



**Şekil 1.9.** *S. aureus*'un ışık mikroskobu görüntüsü (a) ile taramalı elektron mikroskop görüntüsü (b).

*S. aureus* karbohidrat fermantasyonu ile laktik asit oluşturmakta ve mannitol şekerini parçalayarak mannitol fermantasyonu yapması ile diğer organizmalardan ayırt edilmektedir. Ayrıca optimum kültür şartlarına sahip basit besi ortamında gelişirken, kanlı besi ortamında daha iyi çoğalmaktadır. *S. aureus* organizmasının koloni yapısı düzgün, yuvarlak ve petri yüzeyinde damla şeklinde, 0.5-1.5 µm çapında yarı mat görünümüne sahiptir (Şekil 1.10.) (Kaito et al.2007).



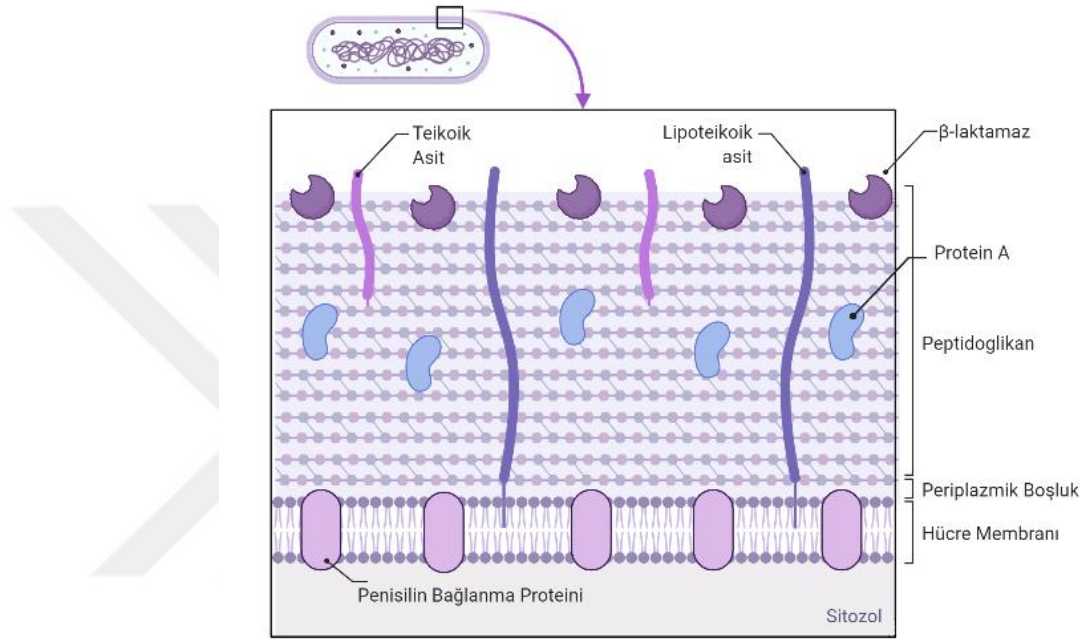
**Şekil 1.10.** *S. aureus* 'un petri görüntüsü

### 1.4.2.1 *S. aureus* hücre duvar yapısı

*S. aureus*'da hücre duvarı; peptidoglikan tabaka, teikoik asit ve protein A yapılarından oluşmaktadır (Şekil 1.11.). Peptidoglikan; yapısında çapraz peptit bağları bulunan heteropolimer bir bileşendir ve hücre duvarında kafes benzeri bir yapı oluşturmaktadır. Bu yapı sayesinde hücre duvarı mekanik stabilite ve sertlik kazanmaktadır. Sadece Gram (+) organizmaların hücre duvarında bulunan ve polimer lipofilik zincirlerden oluşan teikoik asit, peptidoglikan ve hücre membranına kovalent

## 1. GİRİŞ

bağ ile bağlanmış fosfat grubuna sahiptir. Bu yapı hücre yüzeyinin negatif yüke sahip olmasını sağlayarak otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol almaktadır. Teikoik asit *S. aureus*'un konak hücreye yapışmasını sağlamaktadır. Hücre duvarında bulunan protein A ise sadece *S. aureus*'ta bulunmakta ve konak hücrenin immünoglobülinlerine bağlanarak hücreyi fagositozdan korumaktadır. *S. aureus* protein A yapısı ile virülans faktörleri daha etkin olmaktadır (Dmitriev et al. 2004).



Şekil 1.11. *S. aureus*'un hücre duvar yapısı

### 1.4.2.2. *S. aureus*'un virülans özellikleri

Farklı ortamlardan izole edilen ve tanılanan *S. aureus*, fırsatçı bir patojen olup insanlarda en yüksek virülans prevalansına sahip bir organizmadır. *S. aureus*'un virülans etkisi ortama salgıladığı hücre dışı (toksin ve enzimler) ve hücre içi maddeler (peptidoglikan, kapsüller ve protein A) ile oluşmaktadır. *S. aureus* enfeksiyonunun patogenezi; organizmanın konak hücreye yapışması, konağın anatomik bariyerlerinden giriş yapması, konağın fagositik hücrelerinin inaktivasyonu, konağın humoral savunmasının baskılanması ve toksinlerin salgılanması şeklinde sıralanan mekanizmalarla gerçekleşmektedir. *S. aureus* solunum ve temas yoluyla bulaşmakta aynı zamanda enfeksiyon etmeni burunda ve derideki çatlaklarda hızla kolonize olmaktadır. *S. aureus* enfeksiyonu biyokimyasal mekanizmalar içermesi ve hızla kolonize olmasından

## 1. GİRİŞ

---

dolayı kan yoluyla dolaşım sistemine girmektedir. Bu nedenle de bakteriyel endokardite ve yaygın metastatik yaralara sebep olmaktadır (Cheung et al. 2021).

### 1.4.2.3. *S. aureus* enfeksiyonları

*S. aureus*, ciddi enfeksiyonlara sebep olan bakteriyel bir organizmadır. Özellikle MRSA izolatları çoklu antibiyotik direncine sahip olmaları nedeniyle ağır enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Toplum kaynaklı *S. aureus* enfeksiyonu sepsislerin en büyük etkeni olarak görülmektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların başında ise MRSA izolatları gelmektedir (Vysakh et al. 2013).

*S. aureus*'un sporsuz üremesi ekstrem ortam şartlarına (kuruluk, yüksek sıcaklık ve aşırı tuz) dayanıklı olmasını sağlarken enfeksiyonların bulaşma riskini artırmakta ve tedavi seçeneklerini azaltmaktadır. *S. aureus* genellikle besin zehirlenmesi, haşlanmış deri sendromu, toksik şok sendromu, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları (Şekil 1.12.), fronkül, selülit, impetigo gibi derin enfeksiyonlar, kemik, eklem, kalp kapağı, dalak, akciğer ve üriner sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır. *S. aureus*, konak organizmada bir veya daha fazla sisteme yayılarak bakteriyemiye yol açabilmektedir. *S. aureus*'un hastane kaynaklı enfeksiyonları; cerrahi yara enfeksiyonu, ventilatör ile ilişkili pnömoni, intravenöz katater nedenli bakteriyemi, serebrospinal sıvı şantları, prosterik eklemler ve vasküler greftler gibi protezlere bağlı enfeksiyonlarda görülmektedir. Yaşlılar, immün yetmezliği olanlar, yoğun bakım ve yanık ünitelerinde bulunanlar, intravenöz kateteri olanlar ve cerrahi yaralara sahip hastalar MRSA enfeksiyonu açısından en yüksek riske sahip olan gruplardır (Oliveria et al. 2018).



Şekil 1.12. MRSA'nın neden olduğu cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu

### 1.4.3. *S. aureus* antibiyotik direnci

*S. aureus*'un genomu, 2800 kb uzunluğunda olup 2500'e yakın gen bulunduran halkasal DNA'dan oluşmaktadır. Antibiyotik direnci ve virülans faktörlerine ait genler kromozom dışında plazmid gibi ekstrakromozomal yapılarda da bulunmaktadır. Ekstrakromozomal DNA'larda bulunan direnç genleri diğer *Staphylococcus* izolatlarına ve Gram (+) bakterilere konjugasyon yoluyla aktarılmaktadır. *S. aureus* antibiyotik direnci ilk olarak 1930 yıllarında sülfonamidlere karşı başlamış ve dünya çapında giderek artan nozokomiyal enfeksiyonların arasında yer almıştır (Parastan et al. 2020).

#### 1.4.3.1. *S. aureus* metisilin direnci

*S. aureus*'un  $\beta$ -laktamaz enzimini inhibe eden antistafilokokal penisilin türevi olan metisiline karşı oluşan dirençtir. *S. aureus*'un genomunda SCC (stafilokokal kaset kromozomu) bulunması ile metisilin direnci ortaya çıkmıştır. SCC, *mec* ve *ccr* genlerinden oluşan ve replikasyon çatalının yakınında bulunan bir direnç adası olarak tanımlanmaktadır. *mec* gen kompleksi metisilin direncinden sorumluyken, *ccr* gen kompleksi ise SCC'nin bakteriyel genomuna integrasyonu ve eksizyonunu sağlamaktadır (Aguayo-Reyes et al. 2018).

#### 1.4.3.2. *S. aureus*'un Metisilin Direnç Mekanizmaları

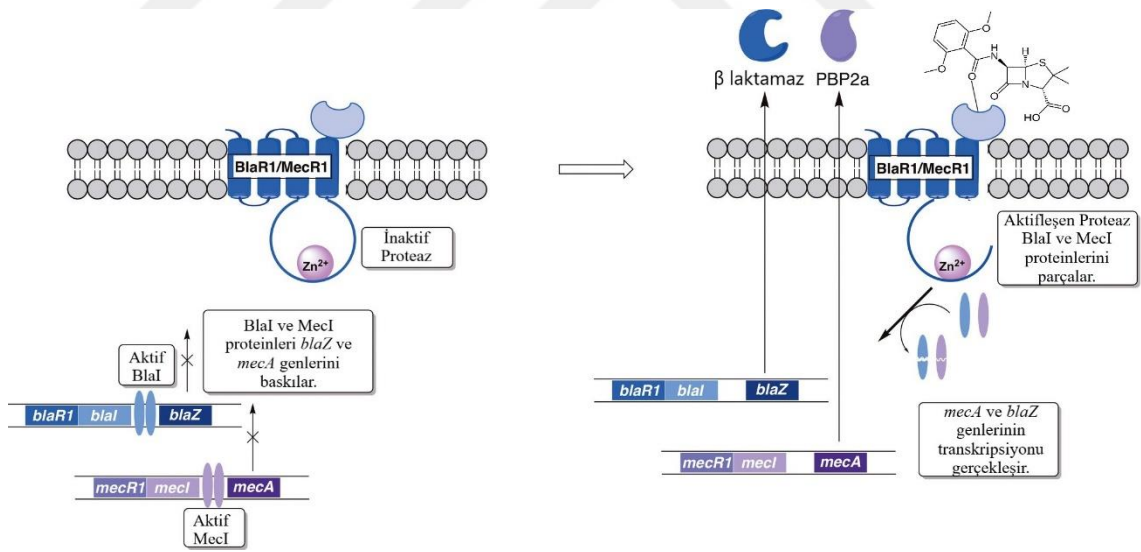
MRSA izolatları  $\beta$ -laktamaz enzimine dirençli olan metisilin antibiyotiğine karşı birçok direnç mekanizması geliştirmiştir. Bunlar;

**PBP2a ile oluşan direnç:** MRSA'da  $\beta$ -laktam antibiyotiğine karşı düşük afinite gösteren 78 kDa ağırlığındaki penisilin bağlanma proteini 2a (PBP2a)'nın üretilmesi ile oluşan metisilin direncidir. Bu direnç MRSA'larda en fazla görülen direnç mekanizmasıdır. PBP2a, ortamda  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin varlığında hücre duvarı bileşeni peptidoglikan sentezine devam ederek antibiyotiğin bakteriyosidal etkisini inhibe etmektedir. PBP2a, SCC üzerinde bulunan *mecA* direnç geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* geni bir operon sistemine sahip olup gen regülasyonunda *mecR1* ve *mecI* düzenleyici iki geni bulunmaktadır. *mecR1* geni membrana bağlı sinyal taşıyıcı MecR1

## 1. GİRİŞ

proteinini kodlarken, *mecI* geni ise transkripsiyonel düzenleyici MecI proteinini kodlamaktadır. Normalde MecR1 ve MecI proteinleri, *mecA* genini baskılamakta ve PBP2a üretimini engellemektedirler. Ortamda metisilin antibiyotiği bulunması halinde *mecA* geni üzerindeki baskılayıcı sistem ortadan kalkmakta ve PBP2a üretilerek direnç oluşmaktadır. MSSA izolatlarında *mecA* geni bulunmayıp PBP2a üretilmezken, tüm MRSA izolatlarında *mecA* geni bulunmaktadır (Shalaby et al. 2020).

**$\beta$ -laktamaz ile oluşan direnç:** MRSA izolatlarında  $\beta$ -laktamaz enziminin aşırı üretimi ile metisiline karşı direnç oluşmaktadır.  $\beta$ -laktamaz enzimi plazmid ve genomik DNA'da bulunan *blaZ* geni ile kodlanmaktadır. *blaZ* genine sahip olan izolatlarda  $\beta$ -laktamaz aşırı miktarda üretilmekte ve metisilin antibiyotiğinin parçalanması ile metisilin direnci oluşmaktadır.  $\beta$ -laktamaz enziminin üretimi *mecA* operon sistemine yüksek oranda benzerlik gösteren *blaZ* operon sistemi ile kontrol edilmektedir. *blaZ* operon sisteminde, *blaR1* ve *blaI* düzenleyici genleri bulunmakta ve bu genler BlaR1 ve BlaI proteinlerini kodlamaktadırlar. (Şekil 1.13.) (Guignard et al. 2005).



Şekil 1.13. *mecA* ve *blaZ* operon sistemi ve direnç mekanizması (Gillard et al. 2018)

**PBP ile oluşan direnç:** MRSA izolatlarında PBP'lerin  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklere karşı afinitesinin azalmasıyla oluşan direnç mekanizmasıdır. *S. aureus* izolatlarında *mecA* geni bulunmayan PBP'lerde oluşan nokta mutasyonu ya da PBP'nin aşırı ekspresyonu sonucunda  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklere düşük afinite göstermektedir. Bu durum nadir

## 1. GİRİŞ

---

görülse de oksasiline karşı oluşan direnç PBP2 ve PBP4'te nokta mutasyonun varlığından ve PBP4'ün aşırı üretilmesinden kaynaklanmaktadır (Zapun et al. 2008).

**Fem faktörleri ile oluşan direnç:** *S. aureus* izolatları *mecA* geni taşımalarına rağmen antibiyotiğe karşı farklı bir mekanizma ile direnç göstermektedirler. Bu direnç mekanizmasının ise *mecA* geni ile kontrol edilen fem faktörlerinden kaynaklandığı bilinmektedir. Fem faktörleri (*fem A* ve *fem X* kontrol genleri) *mecA* genini inhibe ederek direnç mekanizması geliştirmektedir. MRSA suşlarında olduğu gibi MSSA suşlarında da fem faktörleri bulunmaktadır (Brahma et al. 2019).

### Tezin Amacı

Günümüzde enfeksiyonel hastalıkların tedavisi özellikle de bakteriyel izolatların pek çok antibiyotiğe karşı direnç kazanmış olması nedeniyle oldukça sıkıntılıdır. Bu nedenle yeni ve etkili bileşiklerin tespit edilmesi veya etkili olduğu tespit edilen bileşiklerin modifiye edilerek yeni ilaçların piyasaya sürülmesi oldukça önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü raporlarında en acil ilaç geliştirilmesi gereken hastalık olarak antibiyotiklere dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyon hastalıkları gelmektedir. Bu nedenle halk sağlığında sorun oluşturan patojen organizmalarla etkili ve zamanında mücadele edebilmek için yeni bileşiklerin taranarak, içlerinde öncü olabilecek moleküllerin seçilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Bu amaçla, geniş spektrumlu, biyolojik olarak aktif, minimum toksisiteye sahip yeni  $\beta$ -laktam türevi bileşiklerin sentezlenmesi ve sentezlenen bileşiklerin özellikle ciddi enfeksiyonlara sebep olan, antibiyotiklere karşı oldukça direnç kazanmış patojenler üzerinde incelenerek, direnç mekanizması üzerindeki rollerinin aydınlatılması büyük önem arz etmektedir.

Yukarıda vurgulanan sebeplerden dolayı bu tez kapsamında; süstitüe fenetilaminlerden yeni  $\beta$ -laktam türevlerinin sentezleri amaçlanmış ve sentezlenen bileşiklerin özellikle antibiyotiklere karşı oldukça dirençli ve ciddi enfeksiyonlara sebep oldukları bilinen *S. aureus* ve MRSA izolatları üzerinde antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Daha sonra sentezlenen bileşiklerin direnç mekanizmasındaki rolleri, sitotoksiteleri ve ileride kullanım açısından güvenilirlikleri araştırılmıştır.

### 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tez çalışmasında sentezlenen bileşikler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamasıyla birlikte  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin MRSA izolatlarına karşı etkileri ile ilgili günümüze kadar yapılan çalışmaların kısa bir özeti aşağıda sunulmuştur.

Fasola et al. (1995) tarafından yapılan *in vitro* ve *in vivo* direnç mekanizması çalışmalarında; MRSA izolatlarında antibiyotik direncinin,  $\beta$ -laktamaz üretimi, PBP2a proteinin varlığı ve PBP proteinin modifikasyonu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmanın sonucunda,  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin kombinasyonları ile  $\beta$ -laktamaz enzim üretiminin azaldığı, PBP2a proteinin inhibe edilebildiği ve PBP4 proteini ile  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklere karşı afinitenin arttığı bildirilmiştir.

Arnould et al. (1996) tarafından yapılan çalışmada, ilaç etken maddesi olarak yeni karbapenem türevleri sentezlenmiş ve sentezlenen bileşiklerin MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin MRSA izolatlarında PBP2a'ya karşı güçlü bir afinitesinin olduğu ve düşük MIC değerleri ile güçlü antibakteriyel aktivite sergilediği rapor edilmiştir.

Yamase et al. (1996) tarafından yapılan çalışmada, polioksometalatların  $\beta$ -laktam türevi antibiyotikler ile kombinasyonunun MRSA izolatlarında *in vitro* etkileri araştırılmış ve çalışma sonucunda yapılan kombinasyonun PBP2a proteinini inhibe ederek MRSA'daki antibiyotik direncini engellediği bildirilmiştir.

Ishiguro et al. (1997) tarafından yapılan çalışmada, 5,6-cis-Penem türevleri sentezlenerek sentezlenen bileşiklerin, MRSA izolatları üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda sentezlenen bileşiklerin, MRSA izolatları ile  $\beta$ -laktamaz enzimi üreten pek çok izolat da etkili olduğu tespit edilmiştir.

Wilkening et al. (1999) tarafından yapılan çalışmada, lipofilik, asiklik ve siklik sülfonamid metil gruplarına sahip sübstitüe  $\beta$ -metil karbapenem türevleri sentezlenmiş ve antibiyotiğe dirençli Gram (+) bakterilere karşı antibakteriyel aktivite açısından değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda; 1,8-naftosultamil türevi bileşiklerin MRSA

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

izolatlarına karşı etkili olduğu ve PBP2a'yı inhibe ederek anti-MRSA ajanı olarak kullanılabilceği bildirilmiştir.

Ratcliffe et al. (1999) tarafından yapılan çalışmada, yeni 1- $\beta$ -metil-2-(naftosultamil) metil-karbapenem türevleri sentezlenmiş ve dirençli Gram (+) bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda sentezlenen bileşiklerin güçlü antibakteriyel aktivitelerinin olduğu ve farede geçici toksisiteye sebep olduğu rapor edilmiştir.

Higashi et al. (1999) tarafından yapılan çalışmada, MRSA izolatlarına karşı sekiz  $\beta$ -laktam türevi antibiyotığın etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, düşük ve yüksek MIC değerine sahip antibiyotiklerin PBP bağlanma afinitelerinin farklı olduğu, PBP4 ifadesinde ve bağlanma afinitesinde bir değişikliğe sebep olmadığı ve yüksek MIC değerine sahip antibiyotığın PBP2a'ya karşı da afinite gösterdiği tespit edilmiştir.

Kinopristin/dalfopristin (Q/D), MRSA gibi dirençli Gram (+) bakterilere karşı oldukça etkili streptogramin türevi antibiyotiktir. Vouillamoz et al. (2000) tarafından yapılan çalışmada,  $\beta$ -laktam türevi antibiyotikler ile Q/D kombinasyonunun etkileri *in vitro*'da çoklu ilaç dirençli MRSA'ya karşı, *in vivo*'da ise endokardite sahip sıçanlar üzerinde test edilmiştir. Çalışma sonucunda yapılan kombinasyonun hem *in vitro* hemde *in vivo* çalışmalarda etkili olduğu ve terapötik özelliği olduğu bildirilmiştir.

Fung Tomc et al. (2002) tarafından yapılan çalışmada yeni sefolasporin türevi BMS-247243 bileşiğinin vankomisin ve metisilin dirençli *S. aureus* izolatlarında (VRSA, MRSA) *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda etkinliği araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, BMS-247243 bileşiğinin MRSA ve VRSA izolatlarına karşı ticari olarak kullanılan çoğu antibiyotikten daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda ise, bileşiğin endokardit olan tavşanlardaki MRSA enfeksiyonlarında etkili olduğu ve terapötik olarak kullanılabilceği önerilmiştir.

Fujimura et al. (2003) tarafından yapılan çalışmada, yeni sefalosporin türevi olan S-3578 bileşiğinin Gram (-) ve Gram (+) klinik izolatlarına karşı *in vitro* ve *in vivo* antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre S-3578 bileşiğinin

geniş spektrumda yaygın olarak kullanılan ticari antibiyotiklere göre daha etkili olduğu ve farelerdeki farmakokinetik profilin diğer antibiyotiklerle benzer olduğu görülmüştür.

Coates et al. (2003) tarafından yapılan çalışmada, sentezlenen *N*-Metil tiyo  $\beta$ -laktam türevlerinin MRSA izolatları için yeni bir antibakteriyel ajan olabileceği öngörülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda yeni sentezlenen *N*-Metil tiyo  $\beta$ -laktam türevlerinin antibakteriyel aktivitesinin olduğu ve bu aktivitenin bileşikteki karbon atomunun doymamış olmasından kaynaklandığı ve bu durumun antibakteriyel aktiviteler için gerekli olduğu belirtilmiştir.

Kurazono et al. (2004) tarafından yapılan çalışmada, ME1036 Karbapenemin 2 pozisyonunun karbon atomuna bağlı 7-asillenmiş bir imidazo [5,1-b] tiazol-2-il değişken grubuna sahip yeni karbapenem türevi sentezlenmiş ve Gram (+) ve Gram (-) patojen organizmalara karşı antibakteriyel etkinliği incelenmiştir. Çalışma sonucunda karbapenem türevi bileşiğin geniş spektrumlu yüksek düzeyde antibakteriyel etkisinin olduğu bildirilmiş ve güçlü bir antibiyotik olacağı öngörülmüştür.

Turos et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada, *N*-Tiyol  $\beta$ -laktam grubu bileşiklerin MRSA izolatları üzerine antibakteriyel aktiviteleri araştırılmış ve sentezlenen bileşiklerde *N*- sübstitüe grubunun antimikrobiyal aktivite için gerekli olduğu,  $\beta$ -laktam halkasındaki karbon atomuna bağlı sübstitüentlerin polarite, sterik etkisi ile lipofilik karakterin olduğu ve bunun sonucunda da hücre zarına spesifik bağlanamayan bileşiklerin sitoplazmada etki göstererek antimikrobiyal aktivite sergilediği tespit edilmiştir.

Obiang-Obounou et al. (2011) tarafından yapılan çalışmada sanguinarin (SN) türevi bileşikler ile farklı antibiyotiklerin (ampisilin [AC], oksasilin [OX], norfloksasin [NR], siprofloksasin [CP] ve vankomisin [VC]) kombinasyonlarının MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel potansiyeli ve sinerjik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda SN bileşiğinin tüm kombinasyonlarda sinerjik ve kısmi sinerjik etki gösterdiği, antogonistik etki göstermediği ve en iyi antibakteriyel aktivitenin CP-SN ve VC-SN olduğu bildirilmiştir. SN bileşiğinin seçilen antibiyotiklerin aktivitesini artırdığı ve yapılacak *in*

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

*vivo* deneylerle MRSA enfeksiyonuna karşı alternatif bir tedavi seçeneği olacağı önerilmiştir.

Mikolasch et al. (2012) tarafından yapılan çalışmada yeni bir yöntem ile yedi yeni  $\beta$ -laktam türevi bileşik sentezlenmiş ve MRSA ile vankomisine dirençli enterekoklara karşı *in vitro* ve *in vivo* ortamda test edilmiştir. Çalışma sonucunda bileşiklerin güçlü antibakteriyel aktivite sergilediği ve fareleri öldürücü enfeksiyonlara karşı koruduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda sentezlenen orto pozisyonundaki  $\beta$ -laktam türevlerinin yapılarından dolayı aktivitelerinin daha iyi olduğu değerlendirilmiştir.

Diarra et al. (2013) tarafından yapılan çalışmada kıvılcık meyveleri ile  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin kombinasyonları yapılarak MRSA enfeksiyonlarına karşı etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda yapılan kombinasyonun MRSA izolatlarında özellikle hücre duvarı biyosentezinde etkili olduğu ve potansiyel terapötik özelliğe sahip olduğu öngörülmüştür.

Guignard et al. (2013) tarafından yapılan çalışmada, farklı etki mekanizmasına sahip antibiyotik kombinasyonlarının MRSA ve MSSA izolatlarına karşı etkileri araştırılmıştır. Araştırmada,  $\beta$ -laktam türevi antibiyotik olan sefepimle protein sentez inhibitörü olan Q/D'nin sinerjik etkisinin diğer kombinasyonlara göre oldukça etkili olduğu gözlemlenmiş ve gen ifadesindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda dirençten sorumlu *fem* geninin mutasyonu ile PBP2a'nın doğrudan ve dolaylı olarak etkilendiği bildirilmiştir.

Gonzales et al. (2015) tarafından yapılan çalışmada, çoklu ilaç dirençli patojenlerden biri olarak kabul edilen MRSA izolatlarına karşı üç farklı  $\beta$ -laktam grubu antibiyotik kombinasyonları *in vitro* ve *in vivo* ortamda test edilmiştir. Çalışma sonucunda uygulanan antibiyotik kombinasyonlarının *bla* ve *mec* gen kompleksleri ile PBP2a proteinin yapısını bozarak bakterisidal etki gösterdiği ve bu nedenle  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin MRSA enfeksiyonlarında etkili olduğu rapor edilmiştir.

Hu et al. (2015) tarafından yapılan çalışmada, yeni triazol türevi olan trizolil glikolipid sentezlenmiş ve  $\beta$ -laktam türevi antibiyotikler ile MRSA izolatlarına karşı

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

sinerjik etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda triazol türevi ve  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin sinerjik etkisi olduğu ve MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca triazol halkasının MRSA için kullanılan antibiyotik ilaçlarının duyarlılığını artırmada çok önemli olduğu bildirilmiştir.

Chan et al. (2016) tarafından yapılan çalışmada, MRSA izolatların da antibiyotik direncinin oluşumu ile ilgili mekanizmalar araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda *mecA* geni ile kodlanan PBP2a'ya ilaveten PBP4 proteininde MRSA izolatlarındaki antibiyotik direncinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Giacomini et al. (2017) tarafından yapılan çalışmada MRSA izolatlarına karşı aril, benzil ve fenetil karbamat gruplarından yeni  $\beta$ -laktam türevi bileşikler sentezlenmiş ve bileşiklerin anti-MRSA aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda aril karbamatın alkil yan zincirinden oluşan bileşiklerin düşük MIC değeri ile antibakteriyel aktivitelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda antibakteriyel aktivitede karbamatta bulunan azota bağlı grupların da etkili olduğu öngörülmüştür.

Cherian et al. (2018) tarafından yapılan çalışmada doğal antibiyotiklerde en sık bulunan tetramik asit ile  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin (ampisilin–tetramik asit, sefalosporin–tetramik asit ve sefamisin–tetramik asit) analogları sentezlenmiş ve MRSA üzerine etkileri değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda sentezlenen analoglar arasında 7-aminosefalosporanik asit ve 7-amino-3-vinil sefalosporanik asit'in MRSA izolatlarına karşı güçlü aktivite gösterdiği ve sefalosporin grubu antibiyotiklerden 16 kat daha etkili olduğu bildirilmiştir.

MRSA izolatlarının önemli morbidite/mortalite gösterdiği, tedavide vankomisin ve daptomisin gibi birinci basamak antimikrobiyallerle monoterapik yaklaşımlarda antibiyotik duyarlılığının azalması nedeniyle başarısız olduğu bilinmektedir. Molina et al. (2020) tarafından yapılan çalışmada,  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin, MRSA'nın özellikle kan/dolaşım enfeksiyonlarında terapötik özellikte olduğu görülmüştür.

Kwiatkowski et al. (2020) tarafından yapılan çalışmada esansiyel uçucu yağlar ile  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin kombinasyonunun sinerjik etkileri ve MRSA izolatlarına

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

karşı antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda 10 esansiyel uçucu yağdan 8 tanesinin antibakteriyel aktivite gösterdiği,  $\beta$ -laktam türevi antibiyotik ile en iyi sinerjik etkiyi metisilin-linalil asetat (Met-LinAc) kombinasyonunun gösterdiği ve Met-LinAc kombinasyonun MRSA enfeksiyonu için alternatif tedavi olarak kullanılabilceği tespit edilmiştir.

Sakoulas et al. (2021) tarafından yapılan çalışmada, MRSA enfeksiyonları için imipenem/silastatin ve fosfomisin kombinasyonlarının etkileri araştırılmış ve bu kombinasyonların terapötik özelliğinin belirlenmesiyle klinik olarak kullanıma alınabileceği bildirilmiştir.

Zhang et al. (2021) tarafından yapılan çalışmada, perioperatif enfeksiyonlara neden olan MRSA izolatlarına karşı nonsteroid antiinflamatuar ilaç olan diklofenak ile  $\beta$ -laktam türevi antibiyotik kombinasyonlarının *in vivo* etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda diklofenak ve oksasilin kombinasyonunun MRSA enfeksiyonunu önemli ölçüde azalttığı ve bu bağlamda, diklofenak ve oksasilin kombinatoryal terapinin, perioperatif enfeksiyonların önlenmesi için umut verici olabileceği öngörülmüştür.

Literatür araştırmalarından da gözlendiği üzere piyasada mevcut pek çok antibiyotik türevine karşı izolatlarda direnç oluştuğu ve bu nedenle tedavi de farklı yaklaşımların özellikle de ticari ilaç kombinasyonları ile yeni etkili antimikrobiyal bileşiklerin çalışılması gerektiği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır. Bu bağlamda tez çalışmasında; direnç mekanizması oldukça gelişmiş olan MRSA izolatlarına karşı yeni ve etkili bileşiklerin sentezlenerek biyolojik aktivitelerinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Kullanılan izolatlar

Çalışmada kullanılan MRSA ATCC 43300 ve MSSA ATCC 25923 izolatları Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan, MRSA klinik izolatları ise Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model
+4°C Soğutucu	J.P. Selecta
-20°C Soğutucu	J.P. Selecta
-80°C Derin dondurucu	Thermo Scientific FDE
CO <sub>2</sub> inkübatör	ESCO Cell Culture
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2102C
Çeker Ocak	TuraLab
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™ ve Mini
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™ ve Mini
Evaporatör	Scilogex RE-100 Pro
FT-IR	LabSolutions IR Pollutant Analysis Macro
Hassas Terazı	Shimadzu ATX 224
Homojenizatör	Qiagen TissueLyser LT
Floresan İnvirt Mikroskop	Leica DFC 450C
Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad ChemiDoc™ MP
Magnetik Isıtıcı	Daihan, shr
Class II Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
Class II Biyogüvenlik Kabini	ESCO Airstream
Mini Santrifüj	WiseSpin CF10

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

Nanodrop	Biotek EPOCH
NMR	Oxford Pulsar Instrumans
Otoklav	JSR, JSAC-60
PCR Cihazı	SensoQuest Thermocycler
Rotor-Gene Q,	Qiagen
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Statik İnkübatör	Memmert IN110
Su Banyosu	Daihan
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Ultrasonik su banyosu	Çalışkan Ultrasonic Cleaner
UV Görüntüleyici	Analytikjena
Vorteks	WisdWisemix VM-10

---

#### 3.1.3. Kullanılan kimyasallar, kitler ve çözeltiler

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

---

<b>Kit ve Kimyasallar</b>	<b>Marka</b>
3-metoksi Fenetilamin	Alfa Aesar
4-Flor Fenetilamin	J&K Sciencific
4-Metil Fenetilamin	Acros Organics
4-metoksi Fenetilamin	J&K Sciencific
50X TAE	Ecotech
Agaroz	BIOMAX
Asetoksi asetilklorür	Acros Organics
Benzaldehit	Sigma Aldrich
cDNA sentez kiti	BIO-RAD
CVDK -8	Ecotech
DMEM	Biowest
DMSO	EMPLURA® MERCK
EDTA	Sigma Aldrich
Etanol	ISOLAB
Etilasetat	TEKKİM
FBS	Gibco
Fenetilamin	Acros Organics

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

Fenol:Kloroform:İzoamialkol	Sigma Aldrich
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich
İzopropanol	MERCK
Kloroform	Sigma Aldrich
Kloroform D1	Sigma aldrich
L-Glutamin	WISENT INC
Metilen klorür	Sigma aldrich
Moleküler sieve 4(A°)	Sigma aldrich
n-Hekzan	TEKKİM
Nitrosefin	Cayman
PBS	Gibco
PenStrep	Gibco
Plazmit İzolasyon Kiti	GeneJET Plasmid Minirep Kit
Sodyum Hidroksit	MERCK
Sodyum Sülfat	MERCK
SYBR Green kiti	Bio-RAD
TRIZol	Invitrogen
Trietilamin	Sigma Aldrich
Tripan Blue	Gibco
Tripsin	Sigma Aldrich
Tris	Sigma Aldrich

---

#### 3.1.4. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

**Luria Bertani Agar (LBA):** (Bileşeni-g/L; Tripton: 10,0, Maya Ekstrakt: 5,0, Sodyum klorit: 10,0, Agar: 15,0) LBA besiyerinden 40 g tartılarak 1 L dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmüş ve otoklav cihazında 121°C’de 15 dk steril edilmiştir. Hazırlanan karışım 50°C’ye kadar soğutulup petrilere dökülerek hazırlanmıştır.

**Luria Bertani Broth (LB):** (Bileşeni-g/L; Tripton: 10,0, Maya Ekstrakt: 5,0, Sodyum klorit: 10,0) LB besiyerinden 25 g alınıp 1 L dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülerek otoklav cihazında 121°C’de 15 dk steril edilmiştir.

**Mueller Hinton Agar (MHA):** (Bileşeni-g/L; Kazein:17,5 g, Et Ekstrakt: 2,0 g, Nişasta: 1,5, Agar :15 g) MHA besiyerinden 36 g tartılıp 1L dH<sub>2</sub>O içerisine ilave edilerek otoklav cihazında 121°C’de 15 dk steril edilmiştir. Hazırlanan karışım 50°C’ye kadar soğutulup petrilere dökülmüştür.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

**Mueller Hinton Broth (MHB):** (Bileşeni-g/L; Kazein:17,5 g, Et Ekstrakt: 2,0 g, Nişasta: 1,5) MHB besiyerinden 26,5 g alınıp 1 L dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülerek otoklav cihazında 121°C’de 15 dk steril edilmiştir.

**Plate Count Agar (PCA):** (Bileşeni (g/L); Tripton: 5,0, Maya Ekstrakt: 2,5, Glukoz:1,0, Agar: 12,0) PCA besiyeri 20,5 g tartılıp 1L dH<sub>2</sub>O içerisine ilave edilerek otoklav cihazında 121°C’de 15 dk steril edilmiştir. Hazırlanan karışım 50°C’ye kadar soğutulularak petrilere dökülmüştür.

**Plate Count Broth (PCB):** (Bileşeni (g/L); Tripton: 10,0, Maya Ekstrakt: 5,0, Dekstroz: 2,0) PCB besiyerinden 17 g alınıp 1 L dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülerek otoklav cihazında 121°C’de 15 dk steril edilmiştir.

#### **DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler**

**Tris-HCl Tamponu (1 M, pH 8,0):** 12,14 g Tris (MA: 121,14 g/mol) tartılıp 100 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmüştür. Tampon pH’sı 8,0 olana kadar 1 N HCl ilave edilerek hazırlanmıştır.

**EDTA Tamponu (0.5 M pH 8,0):** 18,6 g EDTA (MA: 372,2 g/mol) tartılıp 100 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmüştür. Tampon pH’sı 8,0 olana kadar 5 M NaOH ilave edilerek hazırlanmıştır.

**TE Tamponu:** 1 ml Tris-HCl (1 M, pH 8,0) tamponu ile 200 µl EDTA (0,5 M pH 8,0) solüsyonuna dH<sub>2</sub>O ilave edilerek son hacim 100 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

**%70’lik Etanol:** 35 ml etil alkol üzerine 15 ml dH<sub>2</sub>O eklenerek hazırlanmıştır.

**%75’lik Etanol:** 37,5 ml etil alkol üzerine 12,5 ml dH<sub>2</sub>O eklenerek hazırlanmıştır.

**1X TAE tamponu:** 20 ml 50X TAE tampon üzerine 980 ml dH<sub>2</sub>O eklenerek hazırlanmıştır.

#### **Biyokimyasal analizlerde kullanılan çözeltiler**

**Nitrosefin stok solüsyonu:** Ticari olarak satın alınan Nitrosefin'den 5 mg alınarak 500 µl DMSO içerisinde çözdürülmüş ve hazırlanan stok solüsyonu -20°C'de ışıktan korunacak şekilde muhafaza edilmiştir.

**Nitrosefin çalışma solüsyonu:** Stok solüsyonundan 1 ml alınıp üzerine 4,5 ml PBS eklenerek hazırlanmıştır (Ghavami et al. 2015).

### **3.2. YÖNTEM**

#### **3.2.1. Sentez Dizayını**

Ticari olarak satın alınan benzaldehit (**9**), fenetilamin (**10**), 3-metoksi fenetilamin (**11**), 4-metoksi fenetilamin (**12**), 4-flor fenetilamin (**13**), 4-metil fenetilamin (**14**) ve 3,4-dimetoksi fenetilamin (**15**) bileşiklerinden iminler sentezlenmiştir. İminlerden 16, 17, 18, 20 ve 21 bileşikleri literatürde bilinirken (Sidhu et al. 2010), 19 bileşiği literatürde bilinmemektedir. Bu tez kapsamında hedef ürün β-laktamları sentezlemek için ara ürün olan bu iminler aşağıdaki prodesedüre göre sentezlenmiştir. Bilinen iminlerin tüm spektral verileri literatür ile uyum içerisinde.

##### **3.2.1.1. (E)-N-benziliden-2-(4-florfenetil) etanamin (19)'un (İmin) sentezi**

100 ml'lik bir beher içerisine benzaldehit (**9**) (0,5 g, 1 ekv) ve 4-flor fenetilamin (**13**) (1,06 g, 1 ekv) alınarak üzerine etüv'de kurutulmuş moleküler sieve (4A°) (1,0 g) eklenmiştir. Hazırlanan karışım 5-10 dakika boyunca cam çubuk ile karıştırılmış ve üzerine metilen klorür (20 ml) ilave edilerek filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Metilen klorür evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hekzan-metilen klorür ile kristallendirilerek imin (**19**) %64 (0,68 g) verimle sarı renkli viskoz madde olarak elde edilmiştir (EK 1.1.) (EK1.2.) (Genç et al. 2016).

**IR (ν, cm<sup>-1</sup>):** 2837, 1645, 1508, 1219, 823, 752.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.15 (s, 1H, CH=N), 7.82 – 7.64 (m, 2H, ArH), 7.48 – 7.35 (m, 3H, ArH), 7.24 – 7.12 (m, 2H, ArH), 7.06 – 6.88 (m, 2H, ArH), 3.96 – 3.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.11 – 2.92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 162.9 (CH=N), 160.5 (C-F), 136.4 (C), 135.8 (C), 130.9 (2CH), 130.7 (CH), 128.9 (2CH), 128.3 (2CH), 115.4 (2CH), 63.4 (CH<sub>2</sub>), 36.9 (CH<sub>2</sub>).

#### 3.2.1.2. 2-okso-1-fenetil-4-fenilazetid-3-il asetat (22) ( $\beta$ -laktamların Sentezi için Genel Yöntem)

100 ml'lik dibi yuvarlak bir balona 3(E)-N-benziliden-2-fenetiletanamin (15) (0,5 g, 0,53 1 ekv) alınarak metilen klorür (20 ml) içerisinde çözülmüştür. Üzerine 3 ekv. trietilamin (0,72 ml) eklenmiştir. Daha sonra bir kapta asetoksi asetil klorür (1,27 g 2 ekv) alınarak metilen klorür (20 ml) içerisinde çözdürülmüş ve damlatma hunisi yardımıyla reaksiyona eklenmiştir. Kurulan reaksiyon TLC ile takip edilerek hedef ürün oluşumu gözlenene kadar oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım önce saf su (3x10 ml) ile ekstrakte edilmiş ve organik fazlar birleştirilerek sodyum sülfat üzerinden kurutulmuştur. Çözücü evaporatörde uçurularak uzaklaştırılmış ve kalıntı %5 etilasetat ve hekzan çözücü sistemi ile TLC yapılmıştır. Reaksiyon sonucunda oluşan safsızlıklar kolon kromatografisinde %50 etilasetat ve hekzan karışımı ile giderilerek 2-okso-1-fenetil-4-fenilazetid-3-il asetat (22), %91 verimle (0,670 g,) beyaz renkli kristal olarak sentezlenmiştir (EK 1.3.) (EK 1.4.) (Genç et al. 2016).

**2-okso-1-fenetil-4-fenilazetid-3-il asetat (22):** Beyaz renkli kristal madde. Verim (0,670 g, %91); Erime noktası: 53-55°C; **IR (v, cm<sup>-1</sup>):** 1747, 1359, 1222, 929, 744, 698.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.36 – 7.20 (m, 6H, ArH), 7.18 – 7.10 (m, 4H, ArH), 5.68 (d, J = 4.5 Hz, 1H, CH-O), 4.63 (d, J = 10.3 Hz, 1H, CH-N), 3.85 (ddd, J = 14.2, 7.8, 6.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.21 – 3.13 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.94 – 2.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 169.3 (O-CO), 165.1 (CO-N), 138.2 (C), 132.9 (C), 129.0 (2CH), 128.9 (2CH), 128.7 (CH), 128.55 (2CH), 128.51 (2CH), 127.0 (CH), 77.3 (CH-O), 62.2 (CH-N), 42.0 (CH<sub>2</sub>), 34.0 (CH<sub>2</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>).

***1-(3-metoksifenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (23):***

Yukarıda 3.2.1.2.'de  $\beta$ -laktamların sentezi için verilen genel yönteme göre 1-(3-metoksifenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (**23**) %76 verimle (0,54 g) beyaz renkli katı ürün olarak elde edilmiştir (EK 1.5.) (EK 1.6.).

**Erime noktası:** 64-66°C; **IR** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1741, 1435, 12226, 1039, 700, 597.

**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7.33 (m, 3H, ArH), 7.17 (m, 3H, ArH), 6.78 (dd,  $J = 8.0$ , 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.73 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, ArH), 6.66 (s, 1H, ArH), 5.69 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, O-CH), 4.66 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, N-CH), 3.84 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.76 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.22 – 3.12 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.91 – 2.77 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.64 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  169.4 (O-CO), 165.2 (N-CO), 160.1 (C), 147.3 (C), 139.7 (C), 132.9 (CH), 130.0 (CH), 129.0 (2CH), 128.5 (2CH), 121.0 (CH), 114.3 (CH), 112.5 (CH), 77.4 (O-CH), 62.3 (N-CH), 55.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 41.8 ( $\text{CH}_2$ ), 34.0 ( $\text{CH}_2$ ), 20.1 ( $\text{CH}_3$ ).

***1-(4-metoksifenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (24):***

Yukarıda 3.2.1.2.'de  $\beta$ -laktamların sentezi için verilen genel yönteme göre 1-(4-metoksifenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (**24**) %76 verimle (0,54 g) beyaz renkli katı ürün olarak elde edilmiştir (EK 1.7.) (EK 1.8.).

**Erime noktası:** 126-128°C; **IR** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1741, 1510, 1228, 1033, 808, 702.

**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7.35 – 7.31 (m, 3H, ArH), 7.18 – 7.14 (m, 2H, ArH), 7.07 – 7.03 (m, 2H, ArH), 6.84 – 6.80 (m, 2H, ArH), 5.68 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, O-CH), 4.66 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, N-CH), 3.86 – 3.81 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.79 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.17 – 3.08 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.88 – 2.73 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.63 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  169.4 (O-CO), 165.1 (N-CO), 158.6 (C), 132.9 (C), 130.1 (C), 129.7 (2CH) 129.0 (CH), 128.54 (2CH), 128.5 (2CH), 114.3 (2CH), 77.3 (O-CH), 62.2 (N-CH), 55.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 42.2 ( $\text{CH}_2$ ), 33.1 ( $\text{CH}_2$ ), 20.1 ( $\text{CH}_3$ )

***1-(4-florofenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (25):***

Yukarıda 3.2.1.2.'de  $\beta$ -laktamların sentezi için verilen genel yönteme göre 1-(4-florofenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (25) %60 verimle (0,43 g) beyaz renkli katı ürün olarak elde edilmiştir (EK 1.9.) (EK 1.10).

**Erime noktası:** 86-89°C; **IR (v, cm<sup>-1</sup>):** 1747, 1508, 1219, 1039, 929, 700.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.38 – 7.29 (m, 3H, ArH), 7.18 – 7.13 (m, 2H, ArH), 7.12 – 7.07 (m, 2H, ArH), 7.01 – 6.94 (m, 2H, ArH), 5.69 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, CH-O), 4.68 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, CH-N), 3.86 – 3.71 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.24 – 3.09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.91 – 2.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  169.3 (CO), 165.2 (CO), 160.8 (C-F), 133.8 (C), 132.8 (C), 130.1 (2CH), 129.1 (CH), 128.6 (2CH), 128.5 (2CH), 115.9 (2CH), 77.4 (C-O), 62.3 (C-N), 42.1 (CH<sub>2</sub>), 33.2 (CH<sub>2</sub>), 20.0 (CH<sub>3</sub>).

***1-(4-metilfenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (26):***

Yukarıda 3.2.1.2.'de  $\beta$ -laktamların sentezi için verilen genel yönteme göre 1-(4-metilfenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (26) %62 verimle (0,45 g) beyaz renkli katı ürün olarak elde edilmiştir (EK 1.11.) (EK 1.12).

**Erime noktası:** 128-130°C; **IR (v, cm<sup>-1</sup>):** 1739, 1409, 1226, 1039, 798, 702.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.35 – 7.31 (m, 3H, ArH), 7.17 – 7.14 (m, 2H, ArH), 7.09 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, ArH), 7.02 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, ArH), 5.68 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, O-CH), 4.66 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, N-CH), 3.87 – 3.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.19 – 3.10 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.87 – 2.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  169.4 (O-CO), 165.1 (N-CO), 136.6 (C), 135.0 (C), 132.9 (C), 129.6 (2CH), 129.0 (CH), 128.6 (2CH), 128.53 (2CH), 128.50 (2CH), 77.3 (O-CH), 62.2 (N-CH), 42.1 (CH<sub>2</sub>), 33.5 (CH<sub>2</sub>), 21.3 (CH<sub>3</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>).

**1-(3,4-dimetoksifenetil)-2-okso-4-fenetilazetid-3-il asetat (27):**

**Erime noktası:** 129-131°C; **IR (v, cm<sup>-1</sup>):** 1745, 1228, 1157, 1026, 800, 700.

Yukarıda 3.2.1.2.'de β-laktamların sentezi için verilen genel yönteme göre 1-(3,4-dimetoksifenetil)-2-okso-4-fenetilazetid-3-il asetat (**27**) %80 verimle (0,55 g) beyaz renkli katı ürün olarak elde edilmiştir (EK 1.13.) (EK 1.14).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.35 – 7.30 (m, 3H, ArH), 7.17 – 7.11 (m, 2H, ArH), 6.79 (d, J = 8.2 Hz, 1H, ArH), 6.68 (dd, J = 8.1, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.62 (d, J = 1.9 Hz, 1H, ArH), 5.68 (d, J = 4.5 Hz, 1H, CH-O), 4.64 (d, J = 4.5 Hz, 1H, CH-N), 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.85 – 3.81 (m, 1H, CH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.23 – 3.11 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.86 – 2.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 169.3 (CO), 165.2 (CO), 149.3 (C), 148.1 (C), 132.9 (C), 130.6 (C), 129.0 (CH), 128.53 (2CH), 128.50 (2CH), 120.7 (CH), 111.64 (CH), 111.56 (CH), 77.4 (C-O), 62.3 (C-N), 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 42.0 (CH<sub>2</sub>), 33.6 (CH<sub>2</sub>), 20.0 (CH<sub>3</sub>).

### 3.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Biyolojik aktivite testlerinde MRSA izolatlarının direnç genlerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.2.1. Genomik DNA izolasyonu ve PCR reaksiyon koşulları

Çalışmada, *S. aureus* ve MRSA izolatlarının genomik DNA izolasyonu manuel olarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. MRSA izolatları 5 ml LB besi ortamında 24 saat inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonucunda sıvı kültürler 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Süpernatant atılarak pellet üzerine 1 ml lysis buffer eklenmiş ve pipetaj yapılarak pellet çözdürülmüştür.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

4. Steril 2 ml'lik eppendorf tüplerine alınan pellet üzerine moleküler boncuk eklenerek homojenizatör cihazına yerleştirilmiş (50 vuruş/dk) ve 30 dk homojenize edilmiştir.
5. Eppendorf tüpler içerisinden moleküler boncuklar çıkarılarak 12000 rpm'de spin santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır.
6. Süpernatant üzerine 2 µl RNaz eklenerek 37°C'de 15 dk inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon sonunda 1 V Fenol: Kloroform: İzoamilalkol (25:24:1) eklenerek 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
8. Üst faz yeni tüpe alınarak 1:1 eşit hacimde %100 EtOH eklenmiş ve -20°C'de en az 30-60 dk inkübasyona bırakılmıştır.
9. -20°C'den alınan DNA örnekleri 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve üzerine 1ml %70'lik EtOH eklenerek yıkanmıştır.
10. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanarak eppendorfların kapağı açılmış ve pellet kurutulmuştur.
11. Kuruyan pellet üzerine 50 µl 1X TE Buffer eklenerek pipetaj yapılmış ve izole edilen DNA'lar -20°C'de stoklanmıştır (Görmez 2011).

**DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi:** DNA konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 2 µl TE buffer içerisindeki DNA'nın 260 nm'de absorbansı ölçülmüş ve saflık analizi için, 280 nm'de absorbansı alınarak, A260/A280 değeri belirlenmiştir (Rüzgâr 2019).

**Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi:** 100 ml 1X TAE tamponu içerisine eklenen agaroz (1,2 g), 2-3 dk mikrodalga fırında ısıtılarak çözdürülmüştür. Sıcaklığı düşünce çözelti içerisine konsantrasyonu 0,5 µg/ml olan etidyum bromürden 4 µl eklenerek hazırlanan jel karışımı elektroforez küvetine dökülmüştür. Elektroforez tankına yerleştirilen jel üzerine taraklar takılarak 30 dk boyunca jelin donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra 1X TAE tamponu ilave edilmiş ve taraklar çıkarılarak ilk kuyucuğa 50 bp DNA marker (GeneDirex DNA Ladder RTU 50 bp, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp), diğer kuyucuklara da 5 µl DNA örneği, 2,0 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir. 90 voltta

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

50 dk yürütülen jelde oluşan DNA bantları UV ışık altında görüntülenmiştir (Görmez 2011).

**Direnç genlerinin PCR ile amplifikasyonu:** Çalışmada kullanılan klinik MRSA izolatlarında *mecA* ve *blaZ* direnç genlerinin varlığını belirlemek ve amplifiye etmek amacıyla 30 µl'lik PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Çalışmada kontrol olarak *ftsZ* geni kullanılmıştır. PCR çalışmalarında kullanılan primerler Çizelge 3.3.'de, PCR reaksiyon karışımı ise Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Referanslar
<i>ftsZ</i>	AGCTGCAGAGGAAT CTCGTGAACA	TCCGCCACCCATAC CAGAAGTA	(Chung <i>et al.</i> 2013)
<i>mecA</i>	GTTAGATTGGGATCA TAGCGTCATT	GCCTAATCTCATAT GTGTTCCTGTAT	(Liu <i>et al.</i> 2015)
<i>blaZ</i>	CGTCTAAAAGAAGT AGGAG	GCTTAATTTTCCAT TTGCGATAAG	(Liu <i>et al.</i> 2015)

**Çizelge 3.4.** PCR reaksiyon karışımı

REAKTİF	MİKTAR (µl)
10X PCR tamponu	3
dNTP mix(dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM)	0,6
Forward primer	3
Reverse primer	3
DMSO	1,2
MgCl <sub>2</sub>	1,8
Taq DNA polimeraz (5 unit/µl)	0,3
Ultra Pure dH <sub>2</sub> O	12,1
Template DNA	5

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Hedeflenen gen bölgeleri PCR cihazı yardımıyla Çizelge 3.5.'de verilen reaksiyon koşullarına göre *in vitro* ortamda çoğaltılmıştır (Görmez 2011).

**Çizelge 3.5.** PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	50	1	
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	5	1

**PCR ürünlerinin elektroforezi:** PCR reaksiyonu sonucunda amplifiye edilen gen bölgeleri jele yüklenerek elektroforez de (90 volt 50 dk) yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

#### 3.2.2.2. Plazmid DNA izolasyonu ve PCR reaksiyon koşulları

Plazmid üzerinde kodlanan direnç genlerini tespit etmek amacıyla plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla sentezlenen bileşiğin uygulandığı *S. aureus* ve MRSA izolatlarından plazmid DNA izolasyonları aşağıda verilen protokole uygun olarak (GeneJET Plazmid Minirep Kit Protokolü) gerçekleştirilmiştir.

1. MRSA izolatları 5 ml LB besi ortamında 24 saat inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonucunda sıvı kültürler 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Süpernatant atılarak pellet üzerine 250 µl Resuspension Solution eklenmiş ve pipetaj yapılarak pellet çözdürülmüştür.
4. Karışım üzerine 250 µl Lysis Solution eklenerek 4-6 kez alt üst edilmiştir.
5. Daha sonra 350 µl Neutralization Solution eklenerek 4-6 kez alt üst edilmiş ve maksimum hızda 5 dakika santrifüj yapılmıştır.

6. Süpernatant atılarak pellet GeneJET Spin kolonuna yüklenmiş ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilerek alt kısmı atılmıştır.
7. Kolon üzerine 500 µl Wash Solution eklenerek 30-60 saniye santrifüj edilmiştir.
8. Kolon yeni bir tüp içerisine alınarak 50 µl Elution Buffer ile çözdürülmüş ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
9. İnkübasyon sonunda maksimum hızda 2 dk santrifüj edilmiş ve izole edilen plazmid DNA'lar -20°C'de stoklanmıştır (Aktaş 2021).

**Plazmid DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi:** Plazmid DNA konsantrasyonlarının tespiti için 2 µl elution buffer içerisindeki plazmid DNA'nın 260 nm'de absorbansı ölçülmüş ve saflık analizi için, 280 nm'de absorbansı alınarak A260/A280 değeri belirlenmiştir.

**Plazmid DNA'nın agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi:** İzole edilen plazmid DNA'ları jele yüklenerek elektroforez de (90 volt 50 dk) yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

**Direnç genlerinin PCR ile amplifikasyonu:** İzolatların plazmid DNA'larında *mecA* ve *blaZ* direnç genlerinin varlığını belirlemek ve amplifiye etmek amacıyla 30 µl'lik PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. PCR amplifikasyonları Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5.'de verilen koşullara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

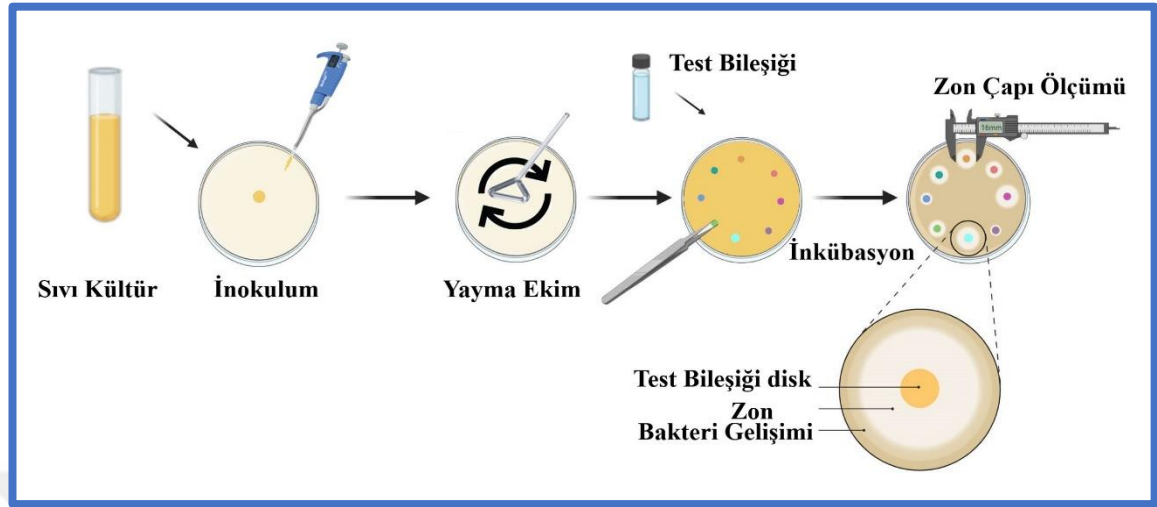
#### 3.2.3. Antibakteriyel Testler

##### 3.2.3.1. Disk difüzyon testi

Antibakteriyel testler içerisinde en fazla tercih edilen yöntemlerden biri olan Disk difüzyon testinde, bakteri inokulumu 0.5 McFarland'a göre hazırlanarak petrilere yayma ekim yapılmıştır. 10 µg/ml olacak şekilde sentezlenen bileşikler (5 µg etken madde +250 µl DMSO+4750 µl dH<sub>2</sub>O) disklere emdirilerek petrilere yerleştirilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda oluşan zon çapları ölçülerek izolatların antibakteriyel duyarlılıkları tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak ampisilin, negatif kontrol olarak da

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

DMSO kullanılmış olup tüm testler üç tekrür olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.) (Özgeriş et al. 2021).



Şekil 3.1. Disk difüzyon testi

#### 3.2.3.2. Mikrodilüsyon yöntemi

Antibakteriyel maddelerin *in vitro* etkinliğinin belirlenmesinde MIC değerlerinden faydalanılmaktadır. MIC değeri; mikroorganizmaların gelişimini engelleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla uygulanan yöntemde; 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğuna 100 µl MHB eklenerek üzerine 100 µl sentezlenen bileşik ilave edilmiştir. İlk kuyucuktan başlanarak seri dilüsyon yöntemiyle bileşiğin konsantrasyonu ayarlanmış ve her bir kuyucuğa 100 µl 0,5 McFarland'a göre ayarlanmış bakteriyel kültür inokulumu ilave edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda oluşan bulanıklık spektrofometrede (600 nm dalga boyunda) değerlendirilerek MIC değerleri belirlenmiştir (Ozgeris 2021).

#### 3.2.4. Direnç Modellemesi

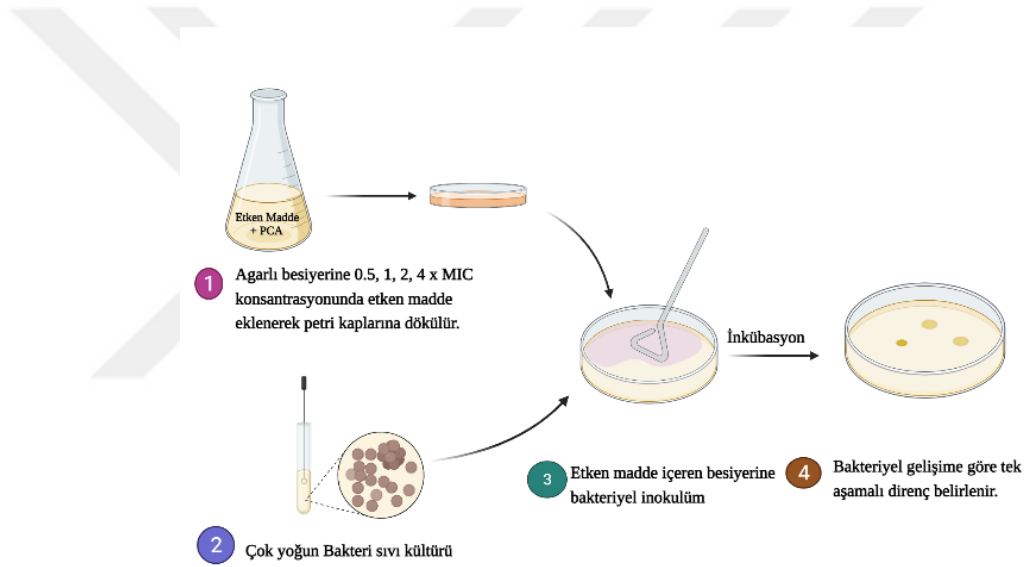
Direnç modellemeleri, antimikrobiyal bir maddeye maruz bırakılan izolatlarda gelişebilecek olası direnç durumunun belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bakterilerde *in vitro* ortamda antibiyotik direnç geliştirme yöntemleri tek veya çok aşamalı olmak üzere iki şekilde yürütülmektedir. Tek aşamalı direnç yönteminde, antimikrobiyal maddeye maruz kalan izolatlar da tek uygulamada direnç oluşturma durumu, çok aşamalı direnç yöntemlerinde ise, izolatların seri pasajlara alınarak (alt

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

kültürler) antimikrobiyal maddeye maruz bırakılması sonucunda zamanla direnç oluşturma durumu gözlenmektedir.

#### 3.2.4.1. Tek aşamalı direnç modellemesi

Antimikrobiyal ajanın inhibe edici konsantrasyonlarına maruz bırakılan izolatların direnç oluşturma durumunu belirleyen bir yöntemdir. Bu amaçla, sentezlenen (25) ve (27) bileşikleri (0.5, 1, 2 ve 4 x MIC konsantrasyonlarında) içeren PCA besi ortamına, 100 µl yüksek yoğunluklu bakteriyel kültür inokulumları ( $\sim 10^9$ - $10^{10}$  CFU/ml) swab ile yayma ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi (96 saat) sonunda koloni oluşturan izolatlar dirençli olarak değerlendirilmiştir (Ruzin et al. 2010) (Şekil 3.2.).

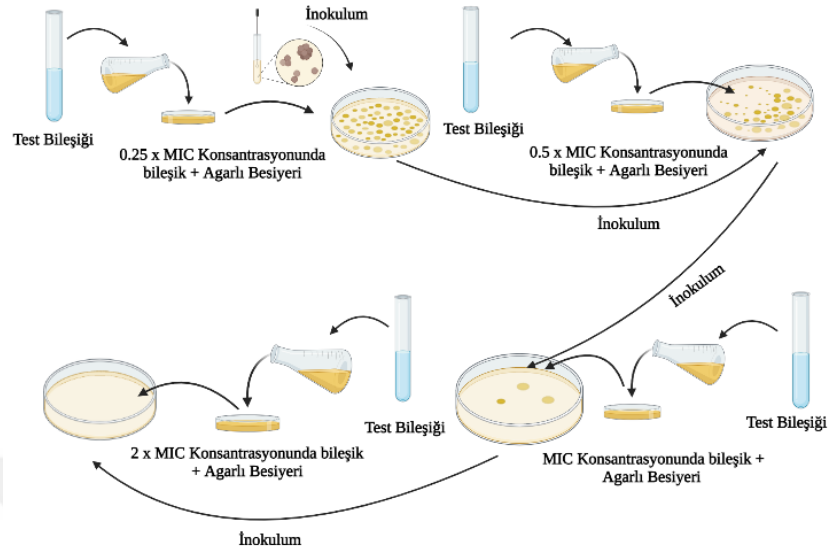


Şekil 3.2. Tek aşamalı direnç çalışması

#### 3.2.4.2. Çok aşamalı direnç modellemesi

Çok aşamalı direnç modellemesinde standart bir yöntem olan seri pasajlama tekniği kullanılmıştır. Antimikrobiyal ajana maruz bırakılan izolatların sürekli alt kültüre alınarak direnç oluşturma durumlarının çalışıldığı bu yöntemde; ilk olarak, (25) ve (27) bileşiklerinin 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 x MIC konsantrasyonlarını içeren PCA besi ortamına 0,5 McFarland'a göre ayarlanan bakteriyel kültür inokulumları ilave edilmiştir. Besi ortamında gelişen koloniler alınarak izolatların yeniden MIC değerleri belirlenmiş ve MIC değerlerinde değişiklik olan izolatlara göre direnç oluşumu değerlendirilmiştir.

Besi ortamlarında kolonilerin gözlenmediği pasajda test sonlandırılmıştır (Haste et al. 2011) (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Çok aşamalı direnç çalışması

#### 3.2.5. Moleküler Analizler

##### 3.2.5.1. Gen ekspresyon çalışmaları

Sentezlenen (25) ve (27) bileşiklerinin, izolatların direnç genleri üzerine olası etkilerini tespit etmek amacıyla gen ekspresyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle RNA izolasyonu yapılmıştır.

**RNA izolasyonu:** Sentezlenen (25) ve (27) bileşikler ile muamele edilen MRSA izolatlarından RNA izolasyonu, TRIzol metodu ile aşağıda verilen işlem sırasına göre gerçekleştirilmiştir.

1. MRSA izolatları 5 ml LB besi ortamında 24 saat inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonunda sıvı kültürler 9000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
3. Süpernatant atılarak pellet üzerine 400 µl TRIzol eklenip üzerine moleküler boncuk atılarak homojenizatör cihazına yerleştirilmiş (50 vuruş/dk) ve 15 dk homojenize edilmiştir.
4. Homojenizatörden alınan hücre lizatları 13000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

5. Yeni tüplere alınan süpernatantların üzerine 200 µl kloroform eklenerek 3 dk vortekslenmiş ve 13000 rpm +4°C’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonunda yeni tüplere alınan süpernatantların üzerine 500 µl izopropanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmış ve 13000 rpm +4°C’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
7. Süpernatantlar atılarak pellet üzerine %75’lik EtOH eklenmiş ve 13000 rpm +4°C’de 5 dk santrifügasyon sonrasında yeniden süpernatant atılarak pellet, 25-30 dk kurutulmuştur.
8. 50 µl nükleaz içermeyen su ile çözdürülen RNA’lar ileri çalışmalar için -20°C’de saklanmıştır.

İzole edilen RNA örnekleri nanodrop cihazı ile ölçülerek RNA konsantrasyonları tespit edilmiştir. cDNA sentezi için, RNA konsantrasyonlarının eşitlenmesi amacıyla, nanodropta ölçülen en düşük RNA değeri standart olarak alınmıştır (Atshan et al. 2012).

**cDNA sentezi ve RT-PCR reaksiyonu:** İzole edilen RNA örneklerinden (600 ng) cDNA sentezi “iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD)” ticari kiti kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için oluşturulan RT-PCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.6.’da, reaksiyon koşulları ise Çizelge 3.7.’de verilmiştir.

**Çizelge 3.6.** RT-PCR reaksiyon karışımı

REAKTİF	MİKTAR (µl)
5X iScript reaksiyon mix	4
iScript Reverse Transkriptaz	1
Nükleaz İçermeyen dH <sub>2</sub> O	5
RNA örneği	10
Total Reaksiyon Hacmi	20

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

**Çizelge 3.7.** RT-PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
Priming	25	5	1
Reverse Transcriptaz	46	20	1
RT inaktivasyonu	95	1	1
Opsiyonel adım	4	∞	1

Reaksiyonlar sonucunda oluşturulan cDNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

#### Real Time-PCR (Q-PCR)

Sentezlenen bileşiklerin MRSA ve klinik izolatlardaki direnç genleri üzerine etkisini moleküler olarak analiz etmek amacıyla tercih edilen qRT-PCR reaksiyonları oluşturulurken “SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD)” kiti kullanılmıştır. Bu amaçla; PCR tüplerine alınan cDNA örnekleri qPCR master mixi ile karıştırılarak üretici firmanın belirlediği koşullarda amplifiye edilmiştir. Her bir numune 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Q-PCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.8.’de, reaksiyon koşulları ise Çizelge 3.9.’de verilmiştir.

**Çizelge 3.8.** Q-PCR reaksiyon karışımı

REAKTİF	MİKTAR (µl)
SYBR Green Supermix	5
Reverse Primer	0,4
Forwad Primer	0,4
Nükleaz İçermeyen Su	2,2
cDNA örneği	2
Total Reaksiyon Hacmi	10

**Çizelge 3.9.** Q-PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95	30 sn	1
Denatürasyon	95	5 sn	40
Bağlanma	57	30 sn	
Uzama	72	30 sn	

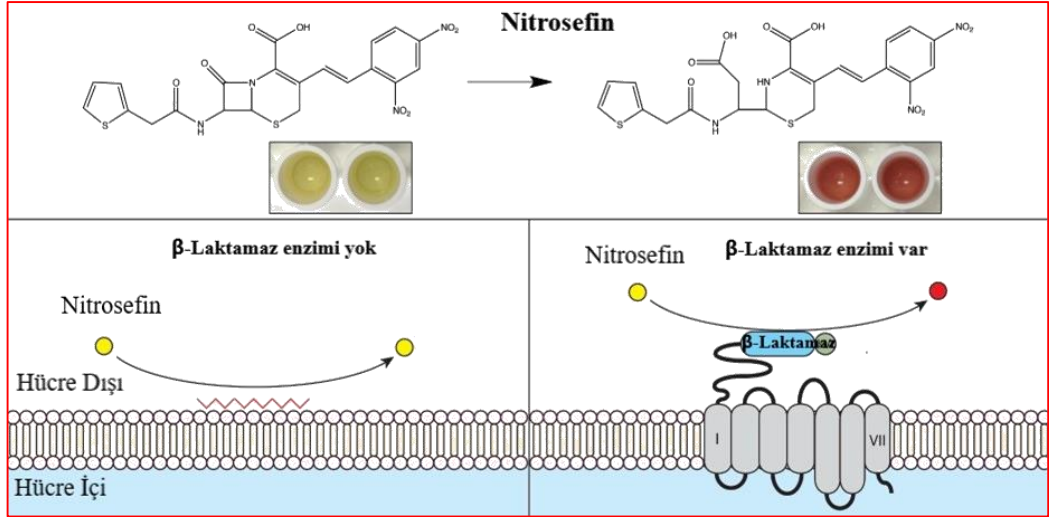
Q-PCR sırasında oluşan CT değerleri housekeeping gen (*ftsZ*) ile Livak -Schmittgen metoduna göre normalize edilerek hedef genlerin mRNA düzeylerindeki değişiklikleri belirlenmiştir (Narrantes et al. 2018).

#### 3.2.6. Biyokimyasal Analiz

Çalışmada kullanılan izolatlarda  $\beta$ -laktamaz enziminin varlığını belirlemek ve sentezlenen bileşiklerin  $\beta$ -laktamaz enzimini inhibe edip etmediğini ortaya koymak amacıyla iyodometrik bir yöntem olan nitrosefin testi yapılmıştır.

##### 3.2.6.1. Nitrosefin testi

Nitrosefin,  $\beta$ -laktam halkasına sahip bir bileşiktir. Nitrosefin'in sahip olduğu  $\beta$ -laktam halkasının,  $\beta$ -laktamaz enzimi tarafından parçalanması halinde bileşik sarı renkten kırmızı renge dönüşmektedir (Şekil 3.4.). Bu amaçla uygulanan yöntemde, ilk olarak izolatlar üzerine nitrosefin çalışma solüsyonundan 3-5 damla damlatılmış ve 30-60 dk içerisinde renk değişimi gözlenmiştir. Renk değişimi oluşturan izolatlar,  $\beta$ -laktamaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin  $\beta$ -laktamaz enzimini inhibe edip etmediğini belirlemek amacıyla da, (25) ve (27) bileşiklerine maruz bırakılarak sıvı kültürde gelişen MRSA izolatları aynı yöntemle test edilip sonuçları değerlendirilmiştir. Bu amaçla pozitif kontrol olarak ampisilin kullanılmıştır (Ghavami et al. 2015).



Şekil 3.4. Nitrocefim analizi (Lam et al. 2013).

#### 3.2.7. Toksikite Çalışmaları

##### 3.2.7.1. Hücre kültürünün hazırlanması

HDF hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri içerisinde 37°C'de pH dengesinin korunması için %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Hücre yoğunluğuna ve deneysel amaca bağlı olarak birkaç gün aralıklarla hücreler pasajlanmış ve flasttaki kirli besiyeri uzaklaştırılarak Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanmıştır. Trypsin/EDTA eklenerek 5 dk boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler flast tabanından tamamen ayrılınca, tripsini inhibe etmek için DMEM besiyeri eklenerek 15 ml'lik falkon tüpler içerisinde 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak DMEM besiyeri ile yeni flaska ekimleri yapılmıştır.

##### 3.2.7.2. Hücre sayımı ve ekimi

Hücreler T75 flastlarda %70-80 yoğunluğa ulaştığında Tripsin ile kaldırılarak 5 ml taze DMEM besiyeri içerisinde çözülüp homojen bir karışım elde edilmiştir. Hücre sayımı için 10 µl Trypan Blue ile 10 µl hücre solüsyonu karıştırılmış ve hazırlanan karışımdan 10 µl alınıp thoma lamı ile lamel arasındaki boşluğa yüklenerek invert

mikroskofta hücre sayımı yapılmıştır. 1 ml besiyerinde bulunan canlı hücre sayısı (3.1) numaralı formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 10.000 \quad (3.1)$$

Hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucukta 100 µl besiyeri ve 20.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere hücre ekimleri yapılmıştır. Hücre ekimi yapıldıktan sonra hücrelerin plate yapışması 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde plateler 24 saat inkübe edilmiştir (Barlak 2018).

#### 3.2.7.3. Bileşiklerin hazırlanması ve uygulanması

Sentezlenen (25) ve (27) numaralı bileşiklerden 10,5 mg tartılarak 400 µl DMSO'da vorteks yardımıyla çözdürülmüş ve 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine 20 µl hacimlerde alikotlanarak -80°C'de muhafaza edilmiştir. Plate yapışan hücrelerin üzerine belirlenen doz konsantrasyonlarında (100, 50, 25, 12,5, 6,25 3,12, 1,56 0,78, 0,39 µg/ml) (25) ve (27) numaralı bileşikler eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tüm deneyler 3 tekrarlı çalışılmış ve madde uygulanmamış kuyucuklardaki hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

#### 3.2.7.4. Hücre canlılığının WST-8 testi ile analizi

WST-8, sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için yapılan (2- (2-metoksi-4-nitrofenil)-3(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu), canlı hücrelerden tetrazolyum tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik bir testtir. Bu yöntem de tetrazolyum tuzları hücresel dehidrojenazlar tarafından formazan tuzlarına dönüştürülmekte ve oluşan turuncu renkli formazan, canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılı olduğundan hücre proliferasyonunun direkt bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Tominaga *et al.* 1998). Bu amaçla çalışmada, sağlıklı hücre hatlarına uygulanacak bileşiklerin olası toksisiteleri ile optimum kullanım dozlarını belirlemek amacıyla WST-8 hücre proliferasyon testi yapılmıştır.

Çalışmada sentezlenen (25) ve (27) bileşiklerin doza bağlı sitotoksik etkilerini araştırmak amacıyla, “Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8)” kiti kullanılarak protokole uygun olarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bileşiklerin uygulandığı hücreler 24 saat inkübe edilmiş ve her kuyucuğa steril ve karanlık ortamda kuyucuk hacminin %10’u kadar WST-8 solüsyonu eklenmiştir. Hazırlanan kültürler 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> ortamında 1-4 saat inkübe edildikten sonra, oluşan formazan kristallerinin absorbansı 450 nm’de spektrofotometre cihazında ölçülmüş ve uygulanan her doz için yüzde canlılık ve sitotoksosite değerleri hesaplanmıştır (Kacı 2018)

#### 3.2.8. İstatistiksel Analiz

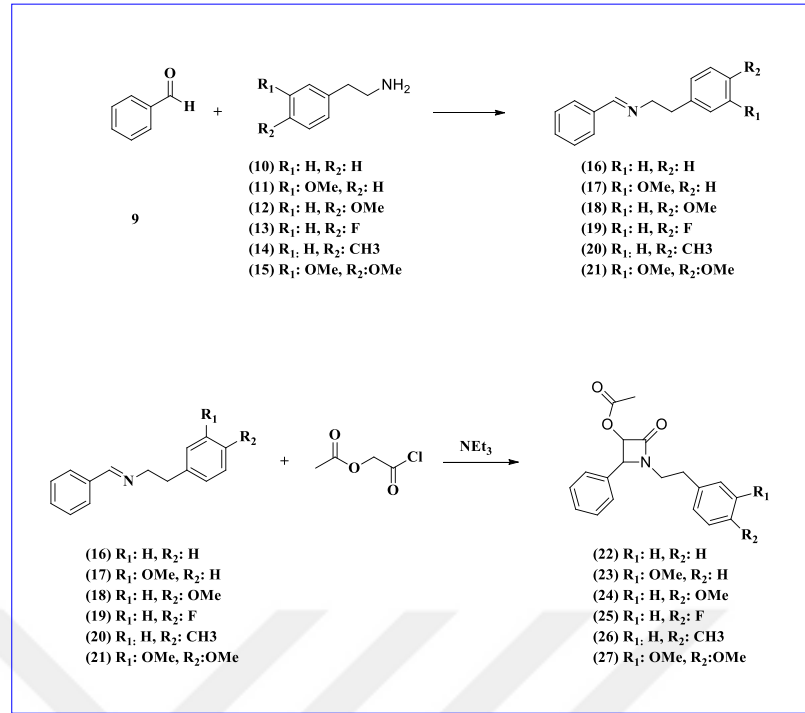
Tez kapsamında elde edilen verilerin istatistiksel analizleri, GraphPad Prism 9.3.0 (463) software programı ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılıklar Unpaired t test kullanılarak  $p < 0,05$  değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir (ns=  $p > 0,05$  önemsiz, \*=  $p < 0,05$  önemli, \*\*=  $p < 0,01$  çok önemli, \*\*\*=  $p < 0,0005$  yüksek derecede önemli, \*\*\*\*=  $p < 0,0001$  yüksek derecede çok önemli).

### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

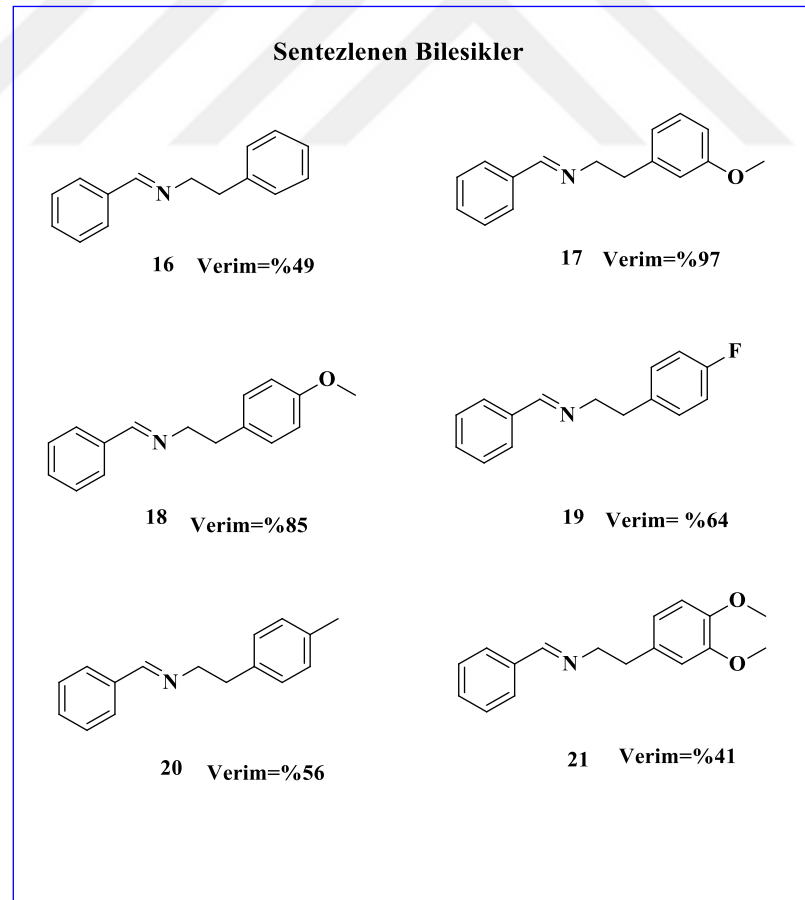
#### 4.1. Sentez Dizaynı

Biyolojik olarak oldukça aktif bileşikler olan  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler antibakteriyel, antifungal, (Jarrahpour et al. 2019) anti-inflamatuvar, (Ritu et al. 2011) ve antikanser (Bandyopadhyay et al. 2010) gibi biyolojik aktivitelere sahip olup, biyorganik kimya alanında büyük bir ilgi görmektedir. Bu nedenle  $\beta$ -laktam türevlerinin sentezi üzerine literatürde birçok yöntem bulunmaktadır.  $\beta$ -laktam türevlerinin sentez yöntemi ilk kez Staudinger tarafından 1907 yılında bildirilmiştir (Staudinger, 1907). Sonraki çalışmalarda  $\beta$ -laktam halkasının yan gruplarının türevlendirilmesi ile yeni sentez yöntemleri keşfedilmiş ve çeşitli bileşikler sentezlenmiştir. En sık rastlanan  $\beta$ -laktam sentez yöntemi ise aromatik aldehytlerin, çeşitli türde aminler ile reaksiyonlarından iminlerin ve bu iminlerin keten ile reaksiyonundan da ilgili  $\beta$ -laktam türevlerinin sentezlenmesi yöntemidir (Walsh et al. 1996, Tripodi et al. 2012, Decuyper et al. 2018, Payili et al. 2018)

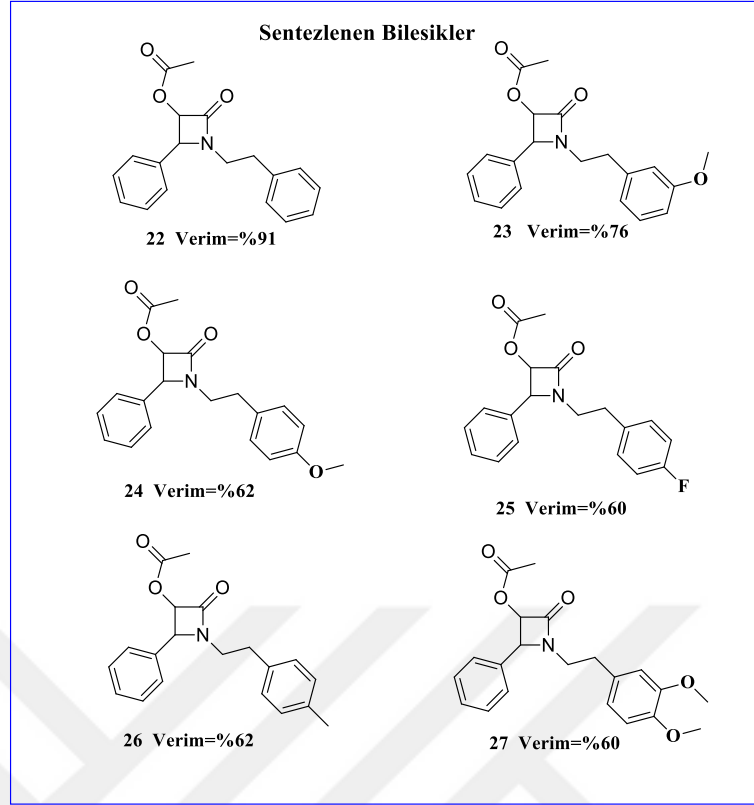
Bu tez kapsamında, yukarıda verilen sentez yöntemi ile benzaldehit ve süstitüe fenetilaminlerden imin ara ürünleri (**16-21**), akabinde iminlerin asetoksiasetil klorür ile reaksiyonundan ilgili  $\beta$ -laktam türevleri (**22-27**) %48-%91 arası verimlerle tarafımızca ilk kez sentezlenmiştir. Hedef bileşikler için sentez dizaynı Şekil 4.1.'de, sentezi gerçekleştirilen ürünlerin yapıları ise Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'de verilmiştir. Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin kazanılmış ve doğal direnç genlerine sahip MRSA izolatları üzerine antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir. En iyi antibakteriyel aktivitelere sahip olan  $\beta$ -laktam (**25**) ve (**27**) bileşiklerinin MRSA izolatlarına karşı tek aşamalı ve çok aşamalı direnç modellemeleri çalışılmış, bu bileşiklerin direnç mekanizmasındaki rolünü araştırmak için nitrosefin analiz yöntemi ve direnç genlerinin (*mecA*, *blaZ*) gen ekspresyon seviyesindeki değişimlerini göstermek amacıyla Q-PCR çalışmaları yapılmıştır. Aynı zamanda bu bileşiklerin sağlıklı hücre hattı (HDF) üzerindeki doza bağımlı sitotoksik etkileri *in vitro*'da WST-8 testiyle araştırılmıştır.



Şekil 4.1. Sentez dizaynı



Şekil 4.2. Sentezlenen imin bileşikleri



**Şekil 4.3.** Sentezlenen  $\beta$ -laktam türevleri

Sentezlenen iminlerden sadece **19** numaralı bileşik literatürde bilinmemektedir ve bu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR verileri incelendiğinde karakteristik  $\text{CH}=\text{N}$  sinyali 8.15 ppm de singlet olarak görülmektedir. İmin (**19**) bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR verileri incelendiğinde karakteristik  $\text{CH}=\text{N}$  sinyali yaklaşık 162.9 ppm de gözlemlenmiştir. Tüm bu spektral veriler sentezlenen ürünlerin yapılarını doğrulamaktadır.

Literatürde  $\beta$ -laktam türevlerinin sentezleri, *cis/trans* ürün karışımı veya izomerlerden sadece birinin (*cis* veya *trans*) eldesi şeklinde sonuçlanabilmektedir.  $\beta$ -laktam halka sisteminin C3 ve C4 protonları arasındaki etkileşme sabitlerinin ( $J_{\text{H3-H4}}$ ) *cis*-izomerler için tipik değer olan 4.5 Hz'e karşılık geldiği literatürden bilinmektedir (Jiao et al. 2006, Decuyper et al. 2018). Sentezlenen hedef  $\beta$ -laktam (**22-27**) türevlerinin  $^1\text{H}$  NMR verileri incelendiğinde karakteristik  $\text{CH}-\text{N}$  sinyali 4.5–4.9 ppm aralığında dublet olarak görülürken,  $\text{CH}-\text{O}$  sinyali ise 5.7-5.9 ppm civarında dublet olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca literatürdeki gibi  $\beta$ -laktam halkasının C3 ve C4 protonları arasındaki etkileşme sabitleri 4.5 Hz olarak tespit edilmiştir. Bu da sentezlenen hedef ürünlerin *cis* izomerler olarak elde edildiğini göstermektedir. Bununla birlikte,  $\beta$ -laktam halkasına bağlı asetat grubundaki  $-\text{CH}_3$  sinyalleri 1.63 ppm de singlet olarak görülmektedir.

$\beta$ -laktam türevlerinin  $^{13}\text{C}$  NMR verileri incelendiğinde, karakteristik O–CO sinyalleri 169.3-169.4 ppm aralığında gözlemlenirken, N–CO sinyalleri ise 165.1-165.2 ppm aralığında görülmektedir. Bu sinyallere ek olarak, –OCH<sub>3</sub> içeren ürünlerde metoksi karbonları 55.0 ppm civarında rezonans olurken,  $\beta$ -laktam halkasına bağlı asetat grubundaki –CH<sub>3</sub> karbonu 20.0 ppm civarında rezonans olmaktadır. Ayrıca fenetilamin halkasında –CH<sub>3</sub> içeren üründe de metil sinyali 21.3 ppm’de görülmektedir. Tüm bu spektral veriler, sentezi gerçekleştirilen ürünlerin kimyasal yapılarını doğrulamaktadır.

## 4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

### 4.2.1. Direnç genlerinin spesifik PCR ile amplifikasyonu

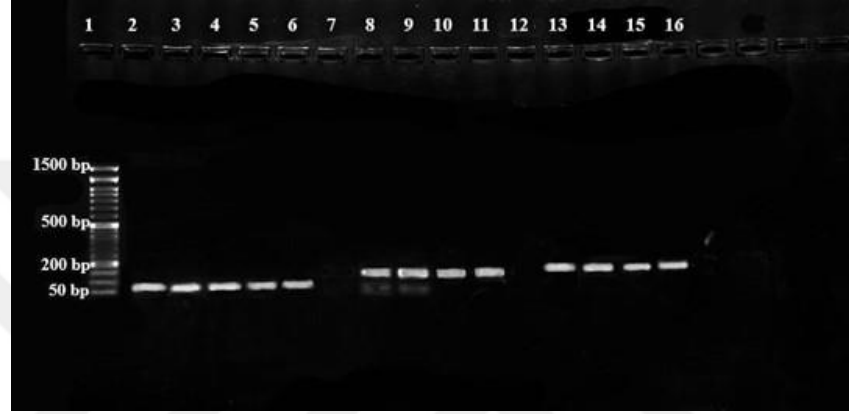
MRSA izolatların da direnç genleri genomik DNA ve plazmid DNA üzerinde kodlanmaktadır. Bu nedenle çalışmada direnç genlerinin varlığının araştırılması amacıyla hem genomik DNA hem de plazmid DNA izolasyonları yapılmıştır. Genomik DNA’lar manuel, plazmid DNA’lar ise "GeneJET Plazmid Minirep Kiti" kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen genomik ve plazmid DNA’larının konsantrasyonları Çizelge 4.1.’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** DNA konsantrasyon değerleri

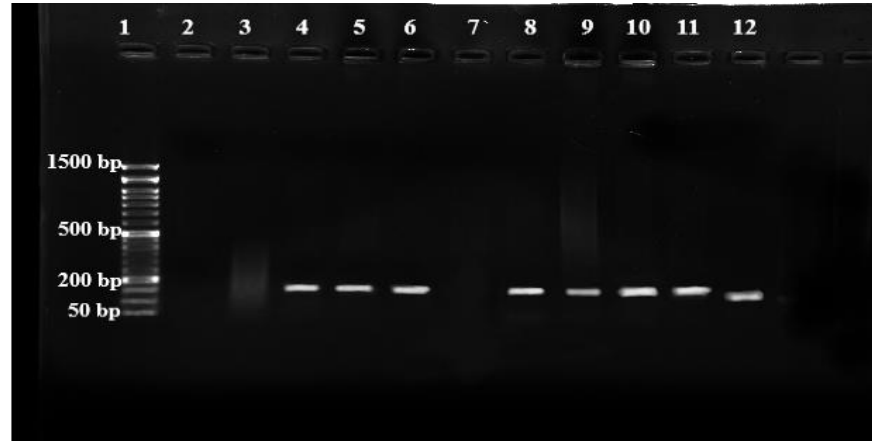
DNA	İzolatlar	DNA konsantrasyonları (ng/ $\mu$ l)
<b>Genomik DNA</b>	MSSA	81,08
	MRSA	88,92
	Klinik İzolat 1	86,57
	Klinik İzolat 2	75,98
	Klinik İzolat 3	93,14
<b>Plazmid DNA</b>	MSSA	102,59
	MRSA	115,44
	Klinik İzolat 1	91,18
	Klinik İzolat 2	123,61
	Klinik İzolat 3	98,41

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

İzole edilen genomik ve plazmid DNA'lar spesifik PCR ile çoğaltıldığında tüm izolatlarda genomik DNA'da direnç genlerinin (*mecA* ve *blaZ*) mevcut olduğu, sadece MSSA ATCC 25923 izolatında bulunmadığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda söz konusu genlerin tüm izolatlarda plazmid üzerinde yer aldığı sadece MRSA ATCC 43300 izolatında *blaZ* geninin bulunmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.). Tespit edilen bulgular hastane kaynaklı MRSA izolatlarında *mecA* ve *blaZ* direnç genlerinin varlığına yönelik literatürdeki verilerle uyumludur (Takayama et al. 2018, Dülger et al. 2020).



**Şekil 4.4.** MRSA izolatlarının genomik DNA direnç genlerinin elektroforez görüntüsü (1: 50kb Marker, 2: MSSA ATCC 25923 *ftsZ*, 3: MRSA ATCC 43300 *ftsZ*, 4: Klinik İzolat 1 *ftsZ*, 5: Klinik İzolat 2 *ftsZ*, 6: Klinik İzolat 3 *ftsZ*, 7: MSSA ATCC 25923 *mecA*, 8: MRSA ATCC 43300 *mecA*, 9: Klinik İzolat 1 *mecA*, 10: Klinik İzolat 2 *mecA*, 11: Klinik İzolat 3 *mecA*, 12: MSSA ATCC 25923 *blaZ*, 13: MRSA ATCC 43300 *blaZ*, 14: Klinik İzolat 1 *blaZ*, 15: Klinik İzolat 2 *blaZ*, 16: Klinik İzolat 3 *blaZ*)



**Şekil 4.5.** MRSA izolatlarının plazmid DNA'sındaki direnç genlerinin elektroforez görüntüsü (1: 50kb Marker, 2: MSSA ATCC 25923 *blaZ*, 3: MRSA ATCC 43300 *blaZ*, 4: Klinik İzolat 1 *blaZ*, 5: Klinik İzolat 2 *blaZ*, 6: Klinik İzolat 3 *blaZ*, 7: MSSA ATCC 25923 *mecA*, 8: MRSA ATCC *mecA*, 9: Klinik İzolat 1 *mecA*, 10: Klinik İzolat 2 *mecA*, 11: Klinik İzolat 3 *mecA*, 12: MRSA ATCC 43300 *ftsZ*)

Kromozom üzerinde yer alan *mec* gen kompleksi,  $\beta$ -laktam grubu antibiyotik olan metisiline direnci sağlayan önemli bir gen bölgesidir (Abadi et al. 2015). MRSA'da direnç genellikle stafilokokkal kaset kromozomu (Staphylococcal Casette Chromosome; SCC) üzerinde veya konjugatif plazmidlerde bulunan *mecA* geni ile oluşmaktadır (Ray et al 2016, Mobasherizadeh et al. 2019). *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2a proteini, ortamda  $\beta$ -laktam grubu antibiyotik bulunmasına rağmen peptidoglikan sentezinin devam etmesini ve patojen organizmanın gelişmesini sağlamaktadır. Bu nedenle de günümüzde metisilin direncinin tespitinde *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir (İbrahim et al. 2017).

MRSA'da  $\beta$ -laktamaz enziminin varlığı ile de  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine direnç oluşabilmektedir.  $\beta$ -laktamaz enzim genleri genellikle patojen organizmalarda genomik DNA veya plazmidler üzerinde yer almaktadır. MRSA'da  $\beta$ -laktamaz enzimi *blaZ* geni tarafından kodlanmakta ve bu gen ile izolatlar  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin siklik amid halkasını parçalayarak bu gruptaki antibiyotikleri inaktive etmektedir (Bağcigil et al. 2012). Bu iki gen kompleksi operon sistemi bakımından birbirlerine benzerlik gösterirken, literatürde *mecA* geninin doğal direnci, *blaZ* geninin ise kazanılmış direnci temsil ettiği bilinmektedir (Kriegeskorte et al. 2012, Laica et al. 2021). Tez kapsamında hastane kaynaklı MRSA izolatları kullanılmış ve bu izolatlarda doğal/kazanılmış direnç mekanizmaları *mecA* ve *blaZ* direnç genleri üzerinden çalışılmıştır. Bu bağlamda çalışmada MRSA izolatlarının direnç profillerini belirlemek için *mecA* ve *blaZ* genine sahip MRSA ATCC 43300 izolatı pozitif kontrol ile bu genlere sahip olmayan MSSA ATCC 25923 izolatı negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda klinik izolatlarda da *blaZ* ve *mecA* genlerinin genomik ve plazmid DNA'da bulunduğu bu nedenle doğal ve kazanılmış dirence sahip oldukları teyit edilmiştir.

#### 4.2.2. Antibakteriyel aktivite sonuçları

Sentezlenen bileşiklerin MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel aktivitesini belirlemek amacıyla disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri gerçekleştirilmiş ve aktivitesi olan bileşiklerin minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri ölçülerek kaydedilmiştir (Çizelge 4.2.). Çalışma sonucunda, imin bileşiklerinin antibakteriyel aktivitesinin olmadığı ancak yeni  $\beta$ -laktam türevlerinin aktivitesinin oldukça iyi olduğu

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

gözlemlenmiştir. Antibakteriyel aktivitesi olan (25) ve (27) numaralı bileşiklerin disk difüzyon görüntüleri Şekil 4.6.'da sunulmuştur.

**Çizelge 4.2.** Yeni  $\beta$ -laktam türevlerinin disk difüzyon analiz sonuçları

Bakteriyel İzolatlar	Bileşikler*						Pozitif Kontrol**
	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	
MRSA ATCC 43300	0,7***	0,9***	1,0	1,2	0,8	0,9	0,6
MSSA ATCC 29523	1,2	1,2	1,4	1,3	1,3	1,4	1,1
Klinik İzolat 1	1,0	1,0	0,9	1,6	1,2	1,6	0,6
Klinik İzolat 2	1,2	1,3	1,0	1,4	1,3	1,3	0,6
Klinik İzolat 3	1,5	1,5	1,6	1,4	1,0	1,1	0,6

\* zone çapı (cm) \*\* Pozitif kontrol: ampisilin \*\*\*Bakteriyostatik ve bakterisidal etki

**Çizelge 4.3.** Yeni  $\beta$ -laktam türevlerinin MIC değerleri

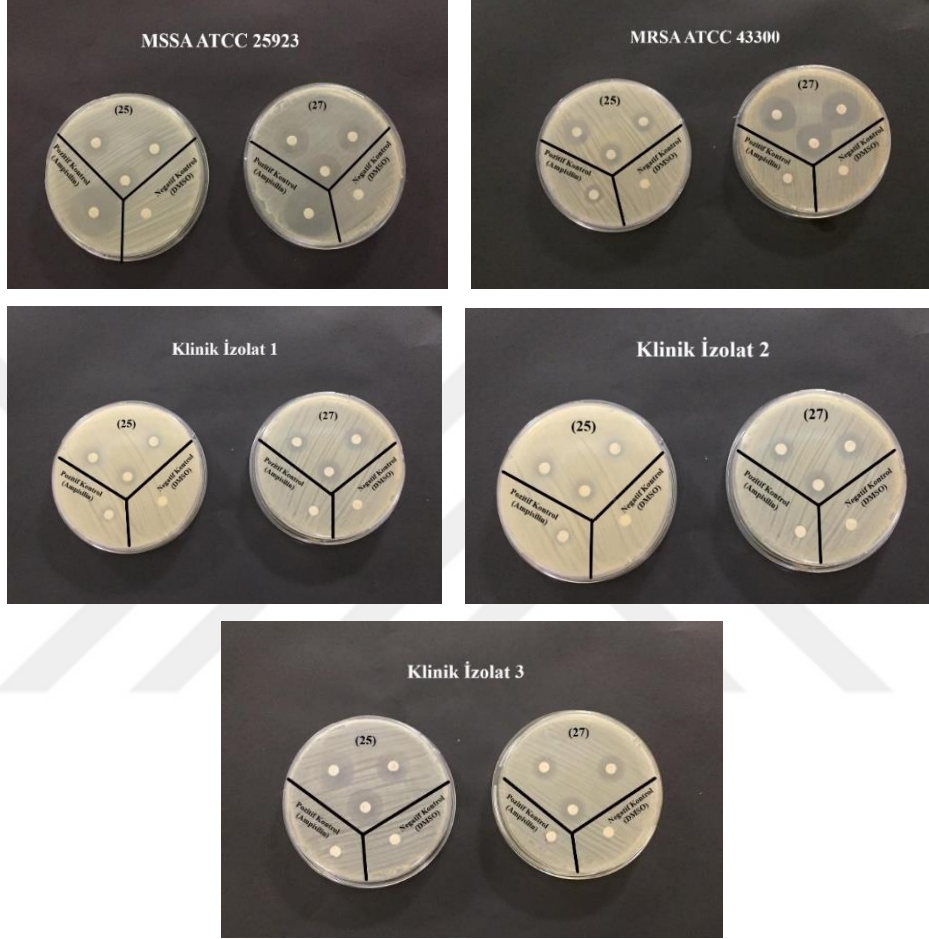
Bakteriyel İzolatlar	MIC*						Pozitif Kontrol
	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	
MRSA ATCC 43300	15,625	15,625	7,8125	7,8125	7,8125	15,625	500
MSSA ATCC 25923	7,8125	7,8125	15,625	7,8125	15,625	15,625	125
Klinik izolat 1	15,625	15,625	15,625	15,625	7,8125	15,625	500
Klinik izolat 2	15,625	15,625	15,625	15,625	7,8125	7,8125	500
Klinik izolat 3	7,8125	7,8125	15,625	15,625	3,906	7,8125	500

\* MIC konsantrasyon değeri  $\mu\text{g/ml}$  olarak hesaplanmıştır.

Disk difüzyon testi sonuçlarına göre,  $\beta$ -laktam türevi (25) ve (27) bileşiklerinin MRSA izolatları üzerinde bakteriyel gelişimi inhibe eden en yüksek zon çapına sahip bileşikler olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları ile aktiviteleri kıyaslandığında en güçlü aktiviteye sahip her iki bileşiğin de fenetilamin halkasında -F (flor) ve meta ve para pozisyonunda metoksi grupları taşıdığı dikkat çekmektedir. Öte yandan, diğer aktif çıkan bileşiklerinde fenetilamin halkasında metoksi ve metil grupları bulduklarını görmektedir. Literatürde farklı bakteriyel izolatlar karşı imin türevlerinin antibakteriyel etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, imin bileşiklerinin Gram (-) bakterilerde etkinliğinin yüksek olduğu, Gram (+) bakterilerde ise etkinliğinin olmadığı bu nedenle iminlerin aktivitesini artırmak için aktif yan gruplar ya da metal komplekslerinin eklenmesi gerektiği bildirilmiştir (Shi et al. 2009). Yapılan tez çalışmasında ara ürün olarak sentezlenen iminlerin Gram (+) bakteri grubunda olan *S.*

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

*aureus* izolatlarına karşı antibakteriyel aktiviteleri çalışılmış ve izolatlar üzerinde herhangi bir antibakteriyel aktivitesinin olmadığı ve sonuçların literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmalar son ürün olan  $\beta$ -laktam türevleri ile devam ettirilmiştir.



**Şekil 4.6.** Disk difüzyon test sonuçları

$\beta$ -laktam türevlerinin sentezi ve antibakteriyel aktivitelerinin araştırıldığı literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda sentezlenen bileşiklerde genellikle fenetilamin halkasına bağlı yan grupların (flor, metoksi ve metil) olduğu ve bu yan gruplar ile antibakteriyel aktivitelerin değişebileceği bildirilmiştir (Schroeder et al. 2018). Bu veriler doğrultusunda antibakteriyel aktivite için metoksi grubunun gerekli olduğu ve bileşiklerin *orto*, *meta*, *para* pozisyonlarında bulunan metoksi grupları sayesinde farklı organizmaların gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Gladkowski et al. 2019). Aynı araştırmacı tarafından yapılan çalışmada MRSA izolatlarında antibakteriyel aktivitenin yüksek olduğu da rapor edilmiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da

etkili olan (23), (24) ve (27) bileşiklerin yapısında metoksi grubu olduğu ve test edilen izolatlarla karşı aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda fenil halkasında metil gruplarının elektronegatif etkisi sayesinde Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı güçlü aktivite gösterdiği ve fenil halkasına bağlı flor atomunun elektron çekme kuvvetinden dolayı da antibakteriyel aktivitenin arttığı bildirilmiştir (Gopalakrishnan et al. 2009, Limban et al. 2020). Çalışmamızda (25) ve (26) bileşiklerin yapısında da metil ve flor grupları bulunduğu bu nedenle de aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ozgeris (2021) tarafından yapılan çalışmada da fenetilamin türevlerinin antibakteriyel aktivitelerinin, Gram (+) ve Gram (-) izolatlarla karşı düşük MIC değerleri sergileyerek, etkili olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde çalışmada sentezlenen fenetilamin bileşiklerinin de oldukça düşük MIC değerleri ile anti MRSA aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir.

### 4.3. Direnç Modellemesi

Sentezlenen bileşiklere karşı izolatların olası bir direnç oluşturma ihtimali üzerine *in vitro* ortamda direnç geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla yapılan tek aşamalı direnç çalışmalarında, antimikrobiyal maddeye maruz kalan dirençli izolatların tespiti, çok aşamalı direnç çalışmalarında ise, bakterilerin birçok pasajda (alt kültürler) antimikrobiyal maddeye maruz bırakılması sonucunda zamanla dirençli izolatların oluşumunun gözlenmesi amaçlanmıştır. Direnç çalışmalarından elde edilen sonuçlar, bir antimikrobiyal maddeye maruz kaldıktan sonra klinikte gelişebilecek veya ortaya çıkabilecek dirençli türlerin tahmini içinde kullanılmaktadır. Literatürde ticari olarak kullanılan antibiyotiklerin direnç profillerini belirlemek için çalışmalar bulunurken, yeni sentezlenen bileşikler için direnç modellemesi çalışmaları bulunmamaktadır.

#### 4.3.1. Tek aşamalı direnç modellemesi

Tek aşamalı direnç çalışmasında (25) ve (27) bileşiklerinin 0,5, 1, 2 ve 4 x MIC konsantrasyonlarını içeren besi ortamına MRSA izolatlarının inokülasyonu ile 96 saatlik inkübasyon sonucunda direnç oluşumu değerlendirilmiştir.

##### *MRSA ATCC 43300 ve MSSA ATCC 25923 izolatlarında tek aşamalı direnç modellemesi*

MRSA ATCC 43300 ve MSSA ATCC 25923 izolatlarına karşı antibakteriyel ajanların (ampisilin, (25) ve (27) bileşikleri) MIC altı ve üstü değerlerde uygulanması sonucunda 0,5 x MIC konsantrasyonunda tüm izolatlarda, MRSA izolatlarında sadece MIC değeri üzeri uygulamalarda gelişimin olduğu, MSSA da ise ampisiline hassas olduğu için gelişimin olmadığı tespit edilmiştir. Sentezlenen ve etkili olduğu tespit edilen (25) ve (27) bileşiklerine karşı da tüm konsantrasyonlarda bakteriyel gelişim görülmezken, DMSO içeren tüm negatif kontrol besi ortamlarında ise gelişim gözlenmiştir (Şekil 4.7.).



**Şekil 4.7.** MRSA ATCC 43300 ve MSSA ATCC 25923 izolatları için tek aşamalı direnç çalışması

##### *Klinik izolatlar için tek aşamalı direnç modellemesi*

Klinik izolat 1 ve 3 için uygulanan direnç modellemesinde, izolatların ampisilin içeren 4xMIC konsantrasyonu hariç tüm uygulamalarda geliştiği, (25) ve (27) bileşiklerini içeren 0,5xMIC konsantrasyonundaki besi ortamı hariç diğer uygulamalarda ise gelişmediği tespit edilmiştir. Klinik izolat 2 için uygulanan direnç modellemesinde ise, izolatın ampisilin içeren 0,5, 1 x MIC konsantrasyonları hariç tüm uygulamalarda bakteriyel gelişimin olmadığı belirlenmiştir. Klinik izolatların tamamında DMSO içeren negatif kontrol besi ortamlarında gelişim gözlenmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Klinik izolatların tek aşamalı direnç çalışması

#### 4.3.2. Çok Aşamalı Direnç Modellemesi

Çok aşamalı direnç modellemesinde; sentezlenen (25) ve (27) bileşiklerinin 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32xMIC konsantrasyonlarını içeren besi ortamına MRSA izolatları inoküle edilerek MIC değerleri yeniden belirlenmiştir. Uygulama sonucunda tespit edilen MIC değerinin bir alt konsantrasyonu belirlenerek pasajlama işlemi gelişimin gözlenmediği uygulamaya kadar devam ettirilmiştir. Bakteriye gelişimin gözlenmediği 4 x MIC sonucunda test sonlandırılmıştır (EK 2). Yeniden MIC değeri hesaplamalarında klinik izolat 2 için (27) bileşiğinin MIC değeri hariç diğer tüm izolatlarda herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir (Çizelge 4.4.).

**Çizelge 4.4.** Çok aşamalı direnç modellemesi MIC değerleri

Patojen İzolatlar	MIC		Pozitif Kontrol
	(25)	(27)	
MRSA ATCC 43300	7.8125	15.625	500
MSSA ATCC 25923	7.8125	15.625	125
Klinik izolat 1	15.625	15.625	1000
Klinik izolat 2	7.8125	3.90625	500
Klinik izolat 3	15.625	7.8125	500

Direnç modellemesi çalışmalarının sonuçlarından, *in vitro* ortamda izolatların ampisiline kıyasla sentezlenen  $\beta$ -laktam türevlerine karşı direnç oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç tez kapsamında istenilen bir sonuç olup bileşiklerin direnç oluşumuna sebep olmadığı görülmektedir. Literatürde bu çalışmalar genellikle ticari olarak kullanılan antibiyotiklerin direnç profillerini belirlemek amacıyla uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ticari olarak kullanılan seftarolinin MRSA üzerinde oldukça güçlü antibakteriyel aktivite sergilediği bildirilmiş ve direnç modellemesi çalışmalarında MRSA izolatlarının bu antibiyotiğe karşı *in vitro* ortamda hızlı bir şekilde direnç geliştirdiği rapor edilmiştir (Lahiri et al. 2016, Man et al. 2018). Yapılan literatür çalışmalarının aksine yapılan çalışmada izolatların *in vitro* ortamda direnç geliştirmemesi başarı kriteri olarak değerlendirilmektedir.

#### 4.4. Gen Ekspresyon Çalışmaları

##### 4.4.1. Total RNA izolasyonu

$\beta$ -laktam türevi sentezlenen (25) ve (27) bileşikleri ile ampisilin antibiyotığının 0,5 x MIC konsantrasyonlarında geliştirilen MRSA izolatlarından TRIZol metodu uygulanarak RNA izolasyonu yapılmış ve izole edilen RNA'ların konsantrasyonları Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** İzole edilen RNA konsantrasyonları

RNA İzolasyonu	RNA Konsantrasyonu (ng/µl)
MRSA ATCC 43300	965,6
MRSA ATCC 43300 + Ampisilin	414,6
MRSA ATCC 43300 + (25)	145,6
MRSA ATCC 43300 + (27)	139,5
Klinik İzolat 1	689,6
Klinik İzolat 1+ Ampisilin	434,3
Klinik İzolat 1+ (25)	277,1
Klinik İzolat 1+ (27)	141,1
Klinik İzolat 2	590,6
Klinik İzolat 2+ Ampisilin	335,2
Klinik İzolat 2+ (25)	222,6
Klinik İzolat 2+ (27)	250,0
Klinik İzolat 3	572,4
Klinik İzolat 3+ Ampisilin	328,5
Klinik İzolat 3+ (25)	165,3
Klinik İzolat 3+ (27)	139,5

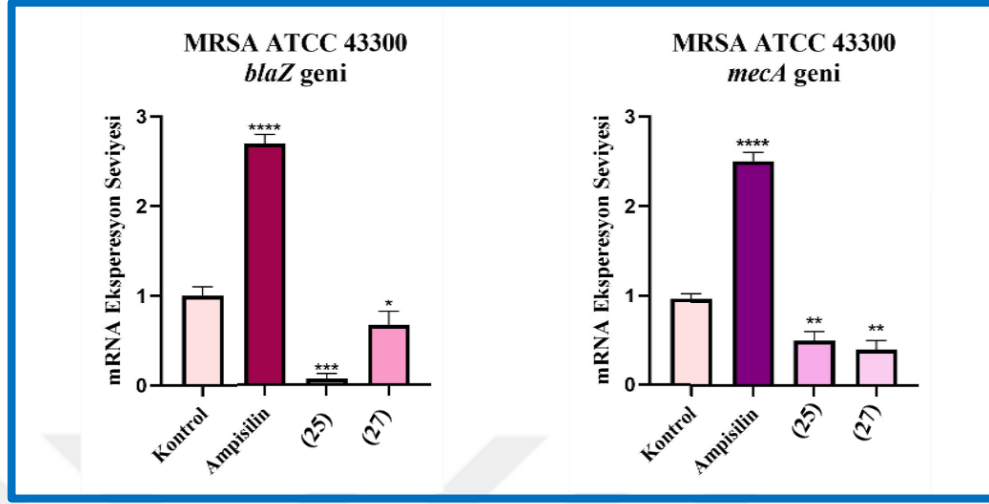
#### 4.4.2. cDNA sentezi ve Q-PCR çalışması

İzole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyonları belirlendikten sonra, Q-PCR sonuçlarının doğruluğu için RNA'lar eşitlenmiş ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar *ftsZ*, *mecA* ve *blaZ* genlerine ait spesifik primerler ile Q-PCR'da amplifiye edilmiş ve CT değerleri Livak-Schmittgen metoduna göre housekeeping gen (*ftsZ*) ile normalize edilerek hedef genlerin mRNA düzeylerindeki değişiklikleri belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda MRSA izolatlarının (25) ve (27) bileşikler ile muamelesi sonucunda gen ekspresyon seviyesindeki değişim istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

#### ***MRSA ATCC 43300 izolatının mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler***

Antibakteriyel ajanlarla (ampisilin, (25) ve (27) bileşikleri) muamele edilen MRSA ATCC 43300 izolatında *mecA* ve *blaZ* direnç genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişim, Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. Sonuçlara göre, ampisilin *mecA* ve *blaZ* gen ekspresyon seviyelerini önemli derecede artırdığı ( $p < 0,0001$ ), (25) ve (27)

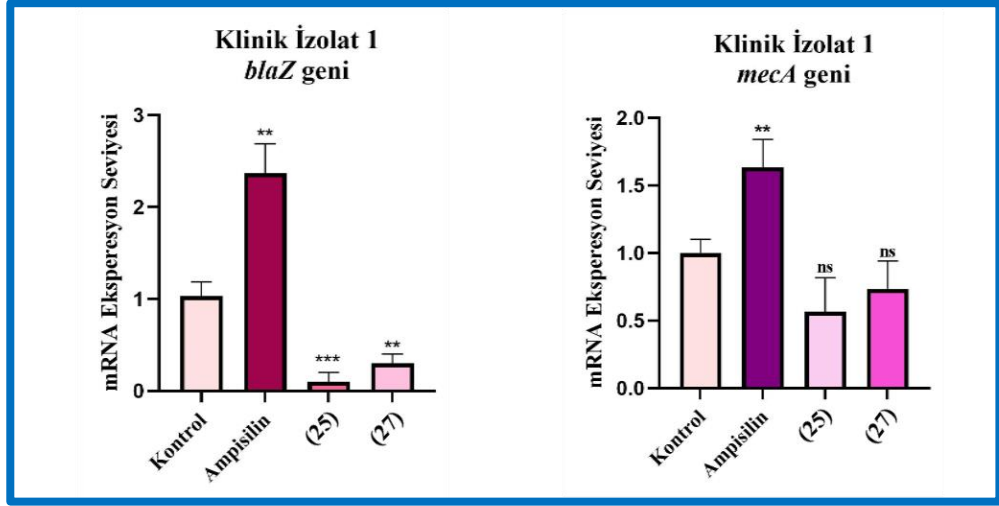
bileşiklerinin ise, her iki genin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak önemli derecede azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,01$ ).



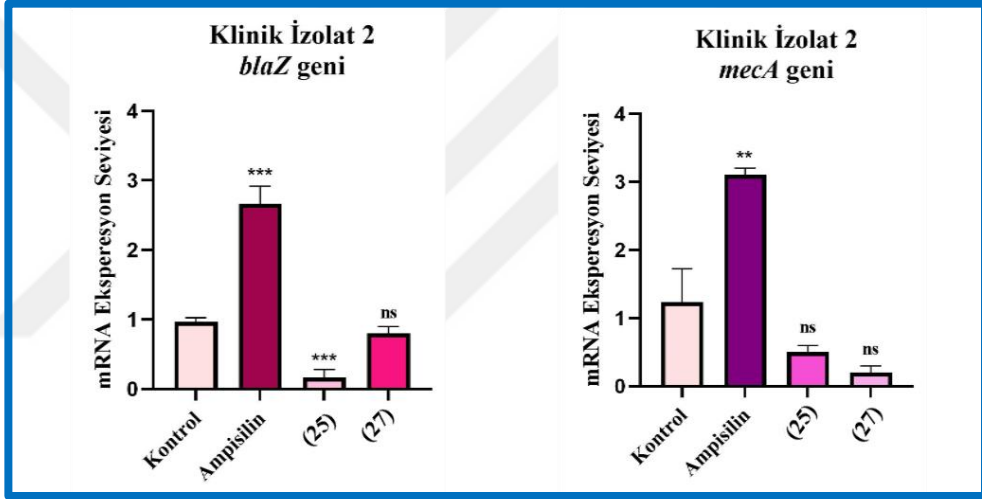
Şekil 4.9. MRSA ATCC 43300 izolatında mRNA ekspresyon seviyelerine ait Q-PCR sonuçları

#### ***Klinik İzolatların mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler***

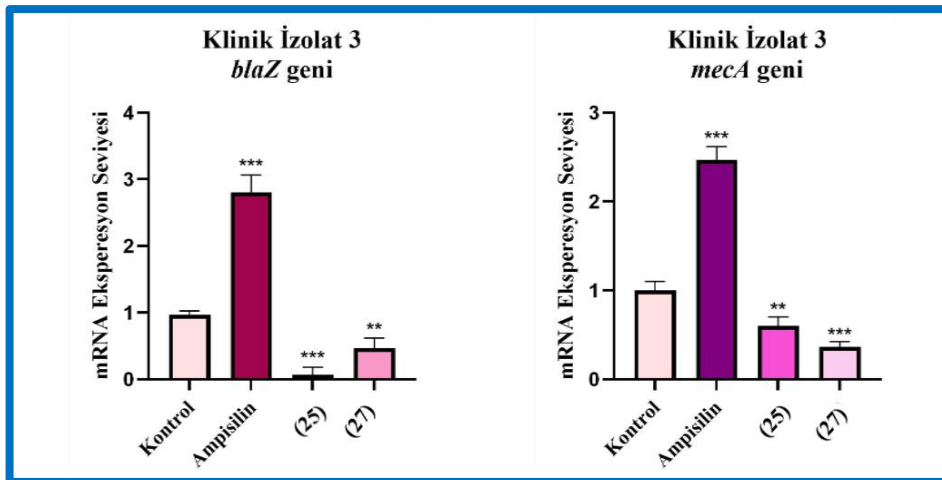
Antibakteriyel ajanlarla (ampisilin, (25) ve (27) bileşikleri) muamele edilen klinik izolatlar için *mecA* ve *blaZ* direnç genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.10, 4.11. ve 4.12.'de verilmiştir. Ampisilin uygulamasının tüm klinik izolatlarda *mecA* ve *blaZ* gen ekspresyonlarının seviyelerini istatistiki olarak önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir (Klinik izolat 1:  $p<0,01$ , klinik izolat 2:  $p<0,01$ , klinik izolat 3:  $p<0,0001$ ). Klinik 1 izolatı için (25) ve (27) bileşiklerinin, *blaZ* gen ekspresyonunu önemli derecede azalttığı ( $p<0,0005$ ), *mecA* gen ekspresyonunda ise önemli bir değişiklik oluşturmadığı ( $p>0,05$ ); Klinik 2 izolatı için bileşiklerin, *mecA* gen ekspresyon seviyelerinde değişikliğe neden olmadığı sadece (25) bileşiğinin *blaZ* gen ekspresyon seviyesinde istatistiki olarak önemli derecede azalmaya sebep olduğu ( $p<0,01$ ); Klinik 3 izolatı için de (25) ve (27) bileşiklerinin, her iki genin ekspresyon seviyelerinde istatistiki olarak önemli derecede azalmaya neden olduğu ( $p<0,01$ ) tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. Klinik izolat 1'in mRNA ekspresyon seviyelerine ait Q-PCR sonuçları



Şekil 4.11. Klinik izolat 2'nin mRNA ekspresyon seviyelerine ait Q-PCR sonuçları



Şekil 4.12. Klinik izolat 3'ün mRNA ekspresyon seviyelerine ait Q-PCR sonuçları

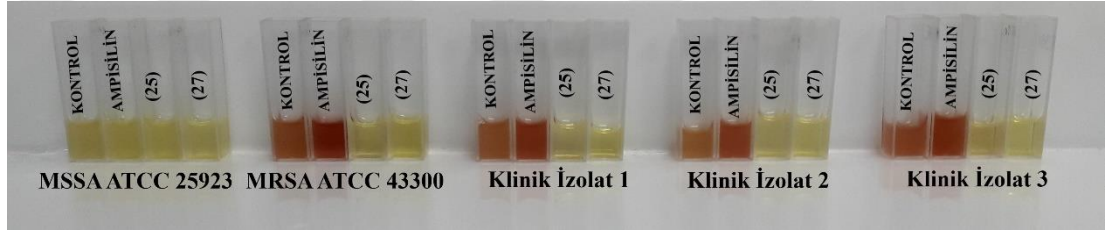
MRSA izolatlarında bulunan ve metisilin direncini kodlayan *mecA* ve *blaZ* genleri önemlerinden dolayı son yıllarda çoğu araştırmanın odak noktası haline gelmiştir. Özellikle araştırmalarda yeni ilaç etken maddeleri ve farklı ilaç kombinasyon çalışmaları yapılarak antibiyotik direncinin kırılması hedeflenmiş ve moleküler analizlerle direnç genlerinin mRNA ekspresyon seviyesindeki değişimleri incelenmiştir. Bu bağlamda MRSA izolatları için ticari olarak kullanılan antibiyotiklerin *mecA* ve *blaZ* genlerinin ekspresyon seviyesini artırdığı ve izolatlarda direnç geliştirdiği bildirilmiştir (Magdy et al. 2016). Farklı antibiyotik grupları ya da farklı bileşikler ile ilaç kombinasyon uygulamaları sonucunda da ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinde azalmaların olduğu rapor edilmiştir (Gillard et al. 2018, Liu et al. 2018). Tez kapsamında yapılan çalışmada MRSA izolatlarının (25) ve (27) bileşikleri ile muamelesi sonucunda *mecA* ve *blaZ* direnç genlerinin mRNA ekspresyon seviyesindeki değişimleri incelenmiş ve çalışma sonucunda bileşiklerin uygulandığı ilgili genlerin ekspresyon seviyesindeki değişimler kontrole (antibakteriyel ajan kullanılmayan izolatlar) göre karşılaştırılmıştır. Bu doğrultuda ampicilin, tüm izolatlarda *mecA* ve *blaZ* gen ekspresyonlarını önemli ölçüde artırdığı, (25) ve (27) bileşiklerinin ise tüm izolatlarda ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla yeni sentezlenen bileşiklerin literatürde yapılan çalışmalara benzer olarak antibiyotiklere alternatif veya onlarla kombin halinde kullanılabilmesi belirlenmiştir.

#### 4.5. Biyokimyasal Analiz

Çalışmada nitrosefin analizi,  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu olan  $\beta$ -laktamaz enziminin varlığını tespit etmek ve bunun yanında etkili bileşiklerin uygulandığı izolatlarda  $\beta$ -laktamaz enzim aktivitesine bağlı olarak direnç durumunun belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda; antibakteriyel ajan uygulanmayan ve ampicilin uygulanan gruplarda  $\beta$ -laktamaz enzim aktivitesinin görüldüğü, (25) ve (27) bileşiklerin uygulandığı gruplarda ise enzim aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir. Böylelikle ilgili bileşiklerin  $\beta$ -laktamaz enzimini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.13.).

Nitrosefin analizi,  $\beta$ -laktamaz enziminin nitrosefin bileşiğini parçalaması sonucunda oluşacak renk değişimi ile  $\beta$ -laktamaz enzim aktivitesini belirlemede en sık

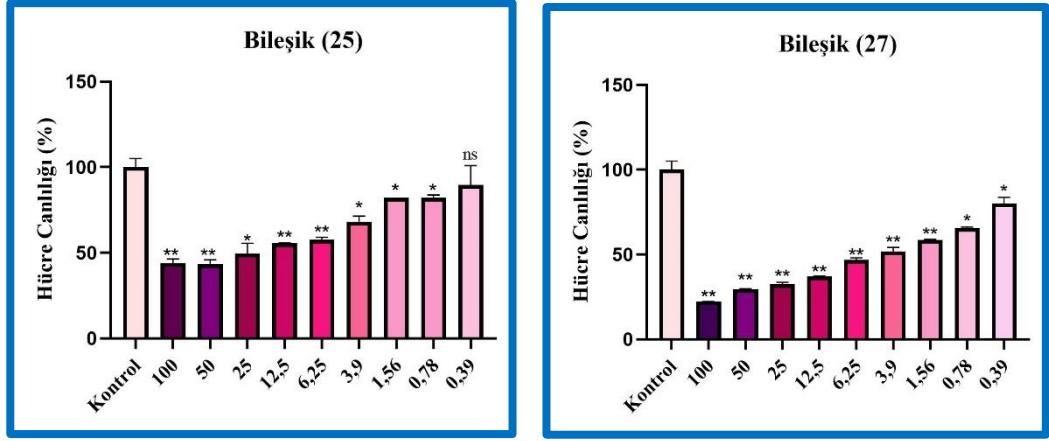
kullanılan yöntemlerden biridir. Bu nedenle, izolatlarda  $\beta$ -laktamaz enzim varlığını belirlemesi yanında ilaçlara karşı oluşabilecek direnç mekanizması hakkında da bilgi verdiği için literatürde sıklıkla çalışılmaktadır (Ozkan 2015, Gillard et al. 2018, Liu et al. 2019). Hirao et al. (2012) tarafından yapılan çalışmada, ortamda indikatör olmadan sadece nitrosefin varlığında dahi kontrol gruplarında kırmızı renk oluşumunun gözlemlendiği dolayısıyla *blaZ* genine sahip organizmalar tarafından kısa sürede  $\beta$ -laktamaz enzimi üretilebildiği bildirilmiştir. Bu bağlamda yapılan tez çalışmasında da literatürle uyumlu olarak antibakteriyel ajan uygulanmayan kontrol grubu ile ampisilin uygulanan izolatlarda kırmızı renk oluşumu görülmüş, (25) ve (27) bileşiklerinin uygulandığı gruplarda ise renk değişiminin olmadığı yani  $\beta$ -laktamaz enziminin inhibe olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Nitrosefin analiz sonuçları

#### 4.6. Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-8 Testi ile Analizi

Çalışmada  $\beta$ -laktam türevi iki bileşiğin, HDF hücre hattı üzerindeki etkilerini görmek amacıyla WST-8 testi uygulanmıştır. Bileşiklerin farklı konsantrasyonları (0,39  $\mu$ M; 0,78  $\mu$ M; 1,56  $\mu$ M; 3,12  $\mu$ M; 6,25  $\mu$ M; 12,5  $\mu$ M; 25  $\mu$ M; 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M) ile 24 saat inkübe edilen hücrelerin yüzde canlılık oranları kontrole göre ayrı ayrı hesaplanmıştır (Şekil 4.14.). Yapılan hesaplamalar sonucunda;  $\beta$ -laktam türevi (25) ve (27) bileşiklerinin, HDF hücre canlılığını istatistik olarak önemli ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir ((25); 100-50  $\mu$ M:  $p < 0,01$ , 25  $\mu$ M:  $p < 0,05$ , 12,5-6,25  $\mu$ M:  $p < 0,01$ , 3,9-0,78  $\mu$ M:  $p < 0,05$ , 0,39  $\mu$ M:  $p > 0,05$ . (27); 100-1,56  $\mu$ M:  $p < 0,01$ , 0,78-0,39  $\mu$ M:  $p < 0,05$ ).



Şekil 4.14. Bileşiklerin hücre canlılığı üzerine etkilerinin WST-8 Testi ile Analizi

$\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin hücre hatları üzerinde ki toksisitelerinin oldukça düşük olduğu literatür verileri ile bilinmektedir (Herrera et al. 2017). Ancak,  $\beta$ -laktam türevi antibiyotiklerin sitotoksik etkilerinin olduğuna dair de literatürde çalışmalar bulunmaktadır. (Aygün 2019). Benzer türevdeki antibiyotiklerin; nörotoksisite (Appa et al. 2017), nefrotoksisite (Raghavan et al. 2015), hepatoksisite (Stine et al. 2013) ve stopeniye (Vardakas et al. 2018) neden olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bu durumun özellikle çoklu ilaç kullanımından kaynaklandığı ve immün sistemi baskılanmış ağır hastalarda ve organ yetmezliği olan kişilerde toksik etki oluşturduğu, sağlıklı bireylerde ise uygun dozda toksik etkisinin olmadığı ya da tolere edilebilir düzeyde oldukça az olduğu belirtilmiştir (Barreto et al. 2021). Yapılan tez çalışmasında da sentezlenen bileşiklerin HDF hücrelerinde minimum toksisiteye sebep olduğu tespit edilmiştir. Literatürde fenetilamin halkasına bağlı flor atomu, *meta* ve *para* pozisyonunda metoksi grubu bulunan ilgili bileşikler ile fenil halkasına bağlı flor atomunun bulunduğu bazı benzer yapıya sahip bileşikler de minimum toksisite gözlendiği rapor edilmiştir (Desai et al. 2018). Özellikle *meta*-*para* pozisyonunda metoksi grubuna sahip bileşiklerin, flor atomuna sahip bileşiklere göre daha düşük toksisiteye sahip olduğu bildirilmiş (Ozgeris et al. 2021) olup yapılan tez çalışmasında da doza bağlı toksisitenin; (25) bileşiğin de (27) bileşiğine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun bileşiklerin yapısal farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında benzaldehit ile sübtitüe fenetilamin temelli  $\beta$ -laktam türevleri (22-27) başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve literatüre kazandırılmıştır. Ayrıca elde edilen etkili  $\beta$ -laktam türevlerinin MRSA izolatları üzerinde antibakteriyel aktivite çalışmaları ile direnç mekanizmasındaki rolleri incelenmiş ve önemli direnç genlerinin ekspresyon seviyelerindeki etkileri araştırılmıştır. Bununla birlikte etkili bileşiklerin HDF hücre hattı üzerinde *in vitro* sitotoksik analizleri gerçekleştirilmiştir.

### SONUÇ;

1. Hastane kaynaklı MRSA izolatlarının kromozomal ve plazmit DNA'larında antibiyotik direncinden sorumlu *mecA* ve *blaZ* genlerinin varlığı tespit edilmiştir.
2. Antibakteriyel aktivite çalışmalarında; (25) ve (27) bileşiklerinin düşük MIC değerleri ile güçlü antibakteriyel aktivite sergiledikleri belirlenmiştir.
3. Direnç modelleme çalışmalarında; (25) ve (27) bileşiklerine karşı MRSA izolatlarının *in vitro* ortamda direnç oluşturmadığı tespit edilmiştir.
4. Gen ekspresyon çalışmalarında; (25) ve (27) bileşiklerinin MRSA izolatlarında antibiyotiğe dirençten sorumlu *mecA* ve *blaZ* genlerinin ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.
5. Biyokimyasal analizlerde; (25) ve (27) bileşiklerinin önemli  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri olduğu gözlenmiştir.
6. Toksikite çalışmalarında; (25) ve (27) bileşiklerinin HDF hücre hattında minimum toksisite sergilediği belirlenmiştir.

### **ÖNERİLER;**

Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında; sentezi gerçekleştirilen ürünlerin yüksek antibakteriyel aktivite ve minimum toksisiteye sahip olmaları, *in vitro* ortamda direnç oluşturmamaları ve direnç genlerinin ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde azaltmaları nedeniyle nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde olası ajanlar olarak değerlendirilebileceği ve söz konusu bileşiklerin yapılan *in vitro* testlere ilaveten yeni farmakolojik ve klinik araştırmalar ile ilaç sektörüne kazandırılmaları ön görülmektedir. Aynı zamanda sübstitüe fenetilamin temelli yeni  $\beta$ -laktam türevlerinin ilk kez sentezlenmiş olması ve bu nedenle çalışmanın farklı sübstitüe gruplarına sahip farklı potansiyel biyolojik aktif  $\beta$ -laktam türevlerinin sentezine öncülük edeceği de ümit edilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abadi, M., Moniri, R., Khorshidi, A., Piroozmand, A., Mousavi, S. G. A. and Dastehgoli, K. 2015. Molecular Characteristics of Nasal Carriage Methicillin-Resistant Coagulase Negative *Staphylococci* in School Students. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(6), e18591.
- Abbasoğlu, U. ve evikbař, A. 2011. *Farmasötik Mikrobiyoloji*. 1. Baskı, 527, Ankara.
- Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A. and Bello-Toledo, H. 2018. [Molecular basis of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*]. *Revista chilena de infectologia: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, 35(1), 7-14.
- Aktaş, . 2021. *Stenotrophomonas maltophilia*'dan kitinaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamaları. Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 85, Erzurum.
- Ali, A.S., Al-Qahtani, A., Nabi, S., Altaf, K., Sonekhi, G.B. and Ahmed, J. 2018. A short review on antibiotics and ever-changing microbial resistance mechanisms. *British Journal of Pharmacy*, 3(1), 1-7.
- Andrade, M. M., Luiz, W. B., Silva Oliveira Souza, R. and Amorim, J. H. 2020. The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 1721936 (1), 1-18.
- Appa, A. A., Jain, R., Rakita, R. M., Hakimian, S. and Pottinger, P. S. 2017. Characterizing Cefepime Neurotoxicity: A Systematic Review. *Open Forum Infect Dis*, 4(4), 170.
- Arnould, J. C., Illingworth, R. N., Nichols, W. W. and Wilson, R. G. 1996. Synthesis and antibacterial activity of lipophilic carbapenems with anti-MRSA activity. *Bioorganic ve Medicinal Chemistry Letters*, 6(20), 2449-2454.
- Asif, M. 2017. Antimicrobial Agents. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 4(3), 00104.
- Atshan, S. S., Shamsudin, M. N., Lung, L. T. T., Ling, K. H., Sekawi, Z. and Pei, C. P. 2012. An improved method for the isolation of RNA from bacteria refractory to disruption, including *S. aureus* producing biofilm. *Gene*, 494(2), 219-224.

- Aygün, B. 2019. Yeni sentezlenmiş  $\beta$ -laktam türevlerinin genotoksik profillerinin belirlenmesi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, 60, Sakarya.
- Bagcigil, A. F., Taponen, S., Koort, J., Bengtsson, B., Myllyniemi, A. L. and Pyörala, S. 2012. Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in bovine mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(69), 2-7.
- Bandyopadhyay, D., Rivera, G., Salinas, I., Aguilar, H. and Banik, BK. 2010. Remarkable Iodine-Catalyzed Synthesis of Novel Pyrrole-Bearing N-Polyaromatic beta-Lactams. *Molecules*, 15(2), 1082-1090.
- Barlak, N. 2018. Metforminin larenks kanseri hücre hattı hep-2 hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve 5-florourasil ile sinerjistik etkilerinin araştırılması. Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 68, Erzurum.
- Barreto, E. F., Webb, A. J., Pais, G. M., Rule, A. D., Jannetto, P. J. and Scheetz, M. H. 2021. Setting the Beta-Lactam Therapeutic Range for Critically Ill Patients: Is There a Floor or Even a Ceiling Critical care explorations, 3(6), e0446-e0446.
- Benford, D., Ceccatelli, S., Cottrill, B., DiNovi, M., Dogliotti, E. and Edler, L. 2014. Scientific Opinion on Chloramphenicol in food and feed. *Efsa Journal*, 13(6), 4140.
- Bentley, R. and Bennett, J. W. 2003. What Is an Antibiotic Revisited. *Advances in Applied Microbiology*, 52(1), 303-31.
- Berdy, J. 2013. Antibiotics: present and future. *Orvosi Hetilap*, 154(15), 563-73.
- Bhattacharjee, M. K. 2016. Antibiotics That Inhibit Protein Synthesis. *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*, 4(2), 129-151.
- Brahma, U., Sharma, P., Murthy, S., Sharma, S., Chakraborty, S. and Appalaraju, S. N. 2019. Decreased expression of femXAB genes and fnbp mediated biofilm pathways in OS-MRSA clinical isolates. *Scientific Reports*, 9(1), 16028.
- Bush, K. and Macielag, M. J. 2010. New  $\beta$ -lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(10), 1277-1293.

- Bush, K. and Bradford, P. A. 2016.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 6(8), a025247.
- Chan, L. C., Gilbert, A., Basuino, L., da Costa, T. M., Hamilton, S. M. and dos Santos, K. R. 2016. PBP 4 Mediates High-Level Resistance to New-Generation Cephalosporins in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60(7), 3934-3941.
- Chaudhry S. B., Veve, M. P. and Wagner J. L. 2019. Cephalosporins: A Focus on Side Chains and  $\beta$ -Lactam Cross-Reactivity. Pharmacy, 7(3), 103.
- Cherian, P. T., Cheramie, M. N., Marreddy, R. K. R., Fernando, D. M., Hurdle, J. G. and Lee, R. E. 2018. New beta-lactam Tetramic acid hybrids show promising antibacterial activities. Bioorganic ve Medicinal Chemistry Letters, 28(18), 3105-3112.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S. and Otto, M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. Virulence, 12(1), 547-569.
- Cloete, R., Oppon, E., Murungi, E., Schubert, W. D. and Christoffels A. 2016. Resistance-related metabolic pathways for drug target identification in *Mycobacterium tuberculosis*. BMC bioinformatics, 17(75), 2-10.
- Coates, C., Long, T. E., Turos, E., Dickey, S. and Lim, D. V. 2003. N-thiolated beta-lactam antibacterials: Defining the role of unsaturation in the C-4 side chain. Bioorganic ve Medicinal Chemistry, 11(2), 193-196.
- Copeland, R. A. 2011. Conformational adaptation in drug-target interactions and residence time. Future Medicine Chemistry, 3(12), 1491-1501.
- Cui, P., Niu, H., Shi, W., Zhang, S., Zhang, W. and Zhang, Y. 2018. Identification of Genes Involved in Bacteriostatic Antibiotic-Induced Persister Formation. Frontiers in Microbiology, 9, 413.
- Çakır, D. 2018. Beta-laktam antibiyotiklerle sinerjik etkiye sahip bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, 131, Ankara.
- Çiftci, H. İ. and Aşık, G. 2011. *Acinetobacter baumannii*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları, ANKEM Dergisi, 25(3), 196-207.

- Dalhoff, A. and Shalit, L. 2003. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet Infectious Diseases*, 3(6), 359-371.
- D'Costa, V. and Wright G. 2009. *Biochemical Logic of Antibiotic Inactivation and Modification*. Antimicrobial Drug Resistance, Humana Press, New York, 81-95.
- Decuyper, L., Franceus, J., Dhaene, S., Debruyne, M., Vandoorne, K. and Piens, N. 2018. Chemoenzymatic Approach toward the Synthesis of 3-O-( $\alpha/\beta$ )-Glucosylated 3-Hydroxy- $\beta$ -lactams. *ACS Omega*, 3(11), 15235-15245.
- Desai, N. C., Vaghani, H. V., Patel, B. Y. and Karkar, T. J. 2018. Synthesis and Antimicrobial Activity of Fluorine Containing Pyrazole-clubbed Dihydropyrimidinones. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(2), 242-252.
- Diarra, M. S., Block, G., Rempel, H., Oomah, B. D., Harrison, J. and McCallum, J. 2013. In vitro and in vivo antibacterial activities of cranberry press cake extracts alone or in combination with beta-lactams against *Staphylococcus aureus*. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 90.
- Dickerhof, N., Kleffmann, T., Jack, R. and McCormick, S. 2011. Bacitracin inhibits the reductive activity of protein disulfide isomerase by disulfide bond formation with free cysteines in the substrate-binding domain. *Febs Journal*, 278(12), 2034-2043.
- Dmitriev, B. A., Toukach, F. V., Holst, O., Rietschel, E. T. and Ehlers, S. 2004. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein. *Journal of bacteriology*, 186(21), 7141-7148.
- Dülger, D., Ekici, S., Albuz, Ö. ve Pakdemirli, A. 2022. Investigation of Nasal *Staphylococcus aureus* carriage in hospital employees and rapid detection of PVL and *mecA* genes by RT-PCR. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 31(1), 47-51.
- Eband, R. M., Walker, C., Eband, R. F. and Magarvey, N. A. 2016. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1858(5), 980-987.
- Etebu, E., Ariekpar, I. and Al-Kaisy, N. 2020. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4(6), 90-101.

- Fasola, E. L., Fasching, C. E. and Peterson, L. R. 1995. Molecular Correlation Between *In-Vitro* and *In-Vivo* Activity Of Beta-Lactam And Beta-Lactamase Inhibitor Combinations Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 125(2), 200-211.
- Fernandez, M., Conde, S., Torre, J., Molina, C., Ramos, J. L. and Duque, E. 2012. Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(2), 1001-1009.
- Frumin, J. and Gallagher, J. C. 2009. Allergic Cross-Sensitivity Between Penicillin, Carbapenem, and Monobactam Antibiotics: What are the Chances *Annals of Pharmacotherapy*, 43(2), 304-315.
- Fujimura, T., Yamano, Y., Yoshida, I., Shimada, J. and Kuwahara, S. 2003. In vitro activity of S-3578, a new broad-spectrum cephalosporin active against methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 923-931.
- Fung-Tomc, J. C., Clark, J., Minassian, B., Pucci, M., Tsai, Y. H. and Gradelski, E. (2002). In vitro and in vivo activities of a novel cephalosporin, BMS-247243, against methicillin-resistant and -susceptible staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(4), 971-976.
- Garau, J., Wilson, W., Wood, M. and Carlet, J. 2008. Fourth-generation cephalosporins: A review of in vitro activity, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical utility. *Clinical Microbiology and Infection*, 3(1), 87-101.
- Garneau-Tsodikova, S. and Labby, K. J. 2016. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Medical Chemistry Common*, 7(1), 11-27.
- Gaynes, R. 2017. The Discovery of Penicillin New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849-53.
- Genc, H., Kalin, R., Koksall, Z., Sadeghian, N., Kocyigit, U. M. and Zengin, M. 2016. Discovery of Potent Carbonic Anhydrase and Acetylcholinesterase Inhibitors: 2-Aminoindan beta-Lactam Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 13.
- Ghavami, A., Labbé, G., Brem, J., Goodfellow, V. J., Marrone, L. and Tanner, C. A. 2015. Assay for drug discovery: Synthesis and testing of nitrocefin analogues for use as  $\beta$ -lactamase substrates. *Analytical Biochemistry*, 486(1), 75-77.

- Giacomini, D., Martelli, G., Picciche, M., Calaresu, E., Cocuzza, C. E. and Musumeci, R. 2017. Design and Synthesis of 4-Alkylidene-beta-lactams: Benzy-land Phenethyl-carbamates as Key Fragments to Switch on Antibacterial Activity. *Chemmedchem*, 12(18), 1525-1533.
- Gillard, K., Miller, H. B. and Blackledge, M. S. 2018. Tricyclic amine antidepressants suppress beta-lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by repressing mRNA levels of key resistance genes. *Chemical Biology ve Drug Design*, 92(5), 1822-1829.
- Gladkowski, W., Siepka, M., Janeczko, T., Kostrzewa-Suslow, E., Poplonski, J. and Mazur, M. 2019. Synthesis and Antimicrobial Activity of Methoxy- Substituted gamma-Oxa-epsilon-lactones Derived from Flavanones. *Molecules*, 24(22), 4151.
- Goldstein, B. P. 2014. Resistance to rifampicin: a review. *Journal Antibiotics*, 67(9), 625-630.
- Golub, L. M. and Greenwald, R. A. 2011. Clinical applications of non-antibacterial tetracyclines. Part II. *Pharmacological research*, 64(6), 549-550.
- Gonzales, P. R., Pesesky, M. W., Bouley, R., Ballard, A., Bidy, B. A. and Suckow, M. A. 2015. Synergistic, collaterally sensitive  $\beta$ -lactam combinations suppress resistance in MRSA. *Nature Chemistry Biology*. 11(11), 855-861.
- Gonzalez, B., Trujillano, R., Vicente, M. A., Rives, V. and Korili, S. A. 2019. Photocatalytic Degradation of Trimethoprim on Doped Ti-Pillared Montmorillonite. *Applied Clay Science*, 167, 43-49.
- Gopalakrishnan, M., Thanusu, J. and Kanagarajan, V. 2009. Design, synthesis, spectral analysis, and in vitro microbiological evaluation of 2-phenyl-3-(4,6-diarylpyrimidin-2-yl) thiazolidin-4-ones. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(5), 1088-1094.
- Gould, K. 2016. Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 572-575.
- Görmez, A. 2011. Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit reaksiyonları Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, 197, Erzurum.

- Grada, A. and Bunick, C. G. 2021. Spectrum of Antibiotic Activity and Its Relevance to the Microbiome. *JAMA Network Open*, 4(4), e215357.
- Grossman, T. H. 2016. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(4), a025387-a025387.
- Guignard, B., Vouillamoz, J., Giddey, M. and Moreillon, P. 2013. A positive interaction between inhibitors of protein synthesis and cefepime in the fight against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology ve Infectious Diseases*, 32(7), 899-907.
- Guimaraes, D. O., Momesso, L. D. and Pupo, M. T. 2010. Antibiotics: Therapeutic Importance And Perspectives For The Discovery And Development Of New Agents. *Quimica Nova*, 33(3), 667-679.
- Habulin, M. and Knez, Z. 2001. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(2), 1260-1266.
- Hamilton-Miller, J. M. T. 2001. Immunopharmacology of antibiotics: Direct and indirect immunomodulation of defense mechanisms. *Journal of Chemotherapy*, 13(2), 107-118.
- Haste, N. M., Hughes, C. C., Tran, D. N., Fenical, W., Jensen, P. R. and Nizet, V. 2011. Pharmacological Properties of the Marine Natural Product Marinopyrrole A against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3305-3312.
- Higashi, Y., Wakabayashi, A., Matsumoto, Y., Watanabe, Y. and Ohno, A. 1999. Role of inhibition of penicillin binding proteins and cell wall cross-linking by beta-lactam antibiotics in low- and high-level methicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*, 45(1), 37-47.
- Hirao, Y., Ikeda-Dantsuji, Y., Matsui, H., Yoshida, M., Hori, S. and Sunakawa, K. 2012. Low level  $\beta$ -lactamase production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with  $\beta$ -lactam antibiotics-induced vancomycin resistance. *BMC Microbiology*, 12(1), 69-72.
- Hong, S. B., Rhee, M. H., Yun, B. S., Lim, Y. H., Song, H. G. and Shin, K. S. 2016. Synergistic Anti-bacterial Effects of *Phellinus baumii* Ethyl Acetate Extracts and beta-Lactam Antimicrobial Agents Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Laboratory Medicine*, 36(2), 111-116.

- Hu, X. L., Li, D., Shao, L., Dong, X. J., He, X. P. and Chen, G. R. 2015. Triazole-Linked Glycolipids Enhance the Susceptibility of MRSA to beta-Lactam Antibiotics. *Acs Medicinal Chemistry Letters*, 6(7), 793-797.
- Ibrahim, M. N., Sharif, S. A. I., El-Tajory, A. N. and Elamari, A. A. 2011. Synthesis and Antibacterial Activities of Some Schiff Bases. *E-Journal of Chemistry*, 8(1), 212-216.
- Ishiguro, M., Tanaka, R., Namikawa, K., Nasu, T., Inoue, H. and Nakatsuka, T. 1997. 5,6-cis-penems: Broad-spectrum anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* beta-lactam antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(14), 2126-2132.
- Işık, Y. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Kinolon Direncinin Moleküler Olarak Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 112, Ankara.
- Jarrahpour, A., Rostami, M., Sinou, V., Latour, C., Djouhri-Bouktab, L. and Brunel, J. M. 2019. Diastereoselective Synthesis of Potent Antimalarial Cis-beta-lactam Agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(2), 596-606.
- Kacı, F. K. 2018. Çeşitli bakteri izolatlarının kültür filtratları ve proteinlerinin insan fibroblast hücrelerinde sitotoksik ve moleküler yanıtlarının değerlendirilmesi. Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 99, Erzurum.
- Kaito, C. and Sekimizu, K. 2007. Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 189(6), 2553-2557.
- Khawcharoenporn, T., Vasoo, S., Ward, E. and Singh, K. 2012. High rates of quinolone resistance among urinary tract infections in the ED. *American Emergency Medicine*, 30(1), 68-74.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. and Collins, J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews Microbiology*, 8(6), 423-435.
- Kong, K. F., Schneper, L. and Mathee, K. 2010. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 118(1), 1-36.

- Koyasseril-Yehiya, T. M., Garcia-Heredia, A., Anson, F., Rangadurai, P., Siegrist, M. S., and Thayumanavan, S. 2020. Supramolecular antibiotics: a strategy for conversion of broad-spectrum to narrow-spectrum antibiotics for *Staphylococcus aureus*. *Nanoscale*, 12(40), 20693-20701.
- Kriegeskorte, A., Ballhausen, B., Idelevich, E., Köck, R., Friedrich, A. and Karch, H. 2012. Human MRSA Isolates with Novel Genetic Homolog, Germany. *Emerging Infectious Disease journal*, 18(6), 1016.
- Kurazono, M., Ida, T., Yamada, K., Hirai, Y., Maruyama, T. and Shitara, E. 2004. In vitro activities of ME1036 (CP5609), a novel parenteral carbapenem, against methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), 2831-2837.
- Küçükbay, F. Z. ve Küçükbay, H. 2017. Antimikrobiyal İlaçların Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması, Anti-Enfektif İlaç Keşfindeki Sınırlar, 6(1), 214, Malatya.
- Kwiatkowski, P., Lopusiewicz, L., Pruss, A., Kostek, M., Sienkiewicz and M. Bonikowski, R. 2020. Antibacterial Activity of Selected Essential Oil Compounds Alone and in Combination with beta-Lactam Antibiotics Against MRSA Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7106.
- Labro, M. T. 2012. Immunomodulatory effects of antimicrobial agents. Part I: antibacterial and antiviral agents. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(3), 319-340.
- Lahiri, S. D. and Alm, R. A. 2016. Potential of *Staphylococcus aureus* isolates carrying different PBP2a alleles to develop resistance to ceftaroline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), 34-40.
- Laica, S. P., Andrade, C. F., Orellana, P. P. and Ramos, R. R. 2021. Resistance to beta-lactams in *Staphylococcus aureus* isolated from cell phone screens of dentistry students based on an antibiogram and detection of *blaZ* and *mecA* genes. *Genetics and Molecular Research*, 20(3), 18931.
- Lam, V. M., Beerepoot, P., Angers, S. ve Salahpour, A. 2013. A Novel Assay for Measurement of Membrane-Protein Surface Expression using a  $\beta$ -lactamase Reporter. *Traffic*, 14(7), 778-784.
- Lambert, A. P. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(2), 1471-1485.

- Lima, L. M., Silva, B., Barbosa, G. and Barreiro E. J. 2020.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208(12), 1128- 1129.
- Limban, C., Chifiriuc, M. C., Caproiu, M. T., Dumitrascu, F. Ferbinteanu, M. and Pintilie, L. 2020. New Substituted Benzoylthiourea Derivatives: From Design to Antimicrobial Applications. *Molecules*, 25(7), 1478.
- Liu, I. X., Durham, D. G. and Richards, R. M. E. 2000. Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(3), 361-366.
- Luna-Herrera, J., Lara-Ramírez, E. E., Munoz-Duarte, A. R., Olazarán, F. E., Chan-Bacab, M. J., Moo-Puc, R. E., Perez-Vazquez, A. M., Morales-Reyes, C. M. and Rivera, G. 2017. Antimikobakteriyel ajanlar olarak  $\beta$ -laktam türevlerinin *in vitro* ve *in silico* analizi. *Letters in Drug Design ve Discovery*, 14(1), 782-786.
- Magdy, K., Abozahra, R., Gaafar, A., Younes, A. and Nawal, A. 2016. Determination of *mecA* expression and other resistance mechanisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *African Journal of Microbiology Research*, 10(2), 481-485.
- Man, N. Y. T., Knight, D. R., Stewart, S. G., McKinley, A. J., Riley, T. V. and Hammer, K. A. 2018. Spectrum of antibacterial activity and mode of action of a novel tris-stilbene bacteriostatic compound. *Scientific Reports*, 8(1), 6912-6919.
- May, K. L., and Grabowicz, M. 2018. The bacterial outer membrane is an evolving antibiotic barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(36), 8852.
- McNeill, S. E., Junco, S., Smith, J., Cowart, M. C., Villegas, A. J. and Sanchez, E. 2021. Use of First-Generation Cephalosporins in Patients with Serious Penicillin Allergies. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(11), 886-891.
- Mehta, D. 2015. Cephalosporins: A Review On Imperative Class Of Antibiotics. *Molecular pharmacology*. 3(1), 1-6.
- Meyer, B., Traunmueller, F. B. A., Locker, G., Schmid, R. and Winkler, S. 2006. Single-dose pharmacokinetics of cefodizime in critically ill elderly patients. *International Journal of Antimicrobiasl Agents*, 27(4), 335-343.

- Mikolasch, A., Manda, K., Schluter, R., Lalk, M., Witt, S. and Seefeldt, S. 2012. Comparative analyses of laccase-catalyzed amination reactions for production of novel beta-lactam antibiotics. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59(4), 295-306.
- Mobasherizadeh, S., Shojaei, H., Azadi, D., Havaei, S. A. and Rostami, S. 2019. Molecular characterization and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal carriage of healthy Iranian children. *Journal Medicine Microbiology*, 68(3), 374-378.
- Mohr, K. I. 2016. History of Antibiotics Research. How to Overcome the Antibiotic Crisis: Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 398(12), 237-272.
- Molina, K. C., Morrisette, T., Miller, M. A., Huang, V. and Fish, D. N. 2020. The Emerging Role of beta-Lactams in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(7), 468-488.
- Nguyen, H. L., An, P. H., Thai, N. Q., Linh, H. Q. and Li, M. S. 2019. Erythromycin, Cethromycin and Solithromycin display similar binding affinities to the *E. coli*'s ribosome: A molecular simulation study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 91(5), 80-90.
- Noel, G. J., Kendler, J. S., Hartman, B. J., Macielag, M. and Bush, K. 2010.  $\beta$ -Lactam antibiotics. In: Cohen, J. Opal, S.M. ve Powderly, W.G. (eds). *Infectious Diseases*, 1340-1354.
- Obiang-Obounou, B. W., Kang, O. H., Choi, J. G., Keum, J. H., Kim, S. B. and Mun, S. H. 2011. In Vitro Potentiation of Ampicillin, Oxacillin, Norfloxacin, Ciprofloxacin, and Vancomycin by Sanguinarine Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(8), 869-874.
- Oğuz, K. H. 2013. Endodontide Sistemik İlaç Kullanımı. Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Olesen, S. W., Barnett, M. L., MacFadden, D. R., Brownstein, J. S. Hernández-Díaz, S. and Lipsitch, M. 2018. The distribution of antibiotic use and its association with antibiotic resistance. *eLife*, 7(12), e39435.

- Ozgeris, B. 2021a. Design, synthesis, characterization, and biological evaluation of nicotinoyl thioureas as antimicrobial and antioxidant agents. *The Journal of Antibiotics*, 74(4), 233-243.
- Ozgeris, B. 2021b. Synthesis of Substituted Phenethylamine-Based Thioureas and Their Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 57(4), 422-429.
- Ozkan, H., Gultekin, D. D., Sezen, S., Ozgeris, B., Gulluce, M. and Tumer, F. 2015. Mutagenic assessment of three synthetic pyridine-diaryl ketone derivatives. *Toxicology and Industrial Health*, 31(12), 1252-1257.
- Özgeriş, F. and Ozgeris, B. 2021. Synthesis, characterization, and biological evaluations of substituted phenethylamine-based urea as anticancer and antioxidant agents. *Monatshefte für Chemie*, 152(10), 1-10.
- Özgeriş, F., Yıldırım, M., Görmez, A. and Ozgeris, B. 2021. A Novel Nicotinoyl Thiourea Manganese Complex: Synthesis, Characterization, and Biological Activity Studies. *International Journal of Chemistry and Technology*, 5(2), 83-90.
- Özyürek, S. B., Gür, S. D. and Bilkay, I. S. 2022. Investigation of Antimicrobial Activity of Pyocyanin Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Different Clinical Specimens. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 44 (1), 1–6.
- Pages, J. M., Lavigne, J. P., Leflon-Guibout, V., Marcon, E., Bert, F. and Noussair L. Efflux Pump, the Masked Side of  $\beta$ -Lactam Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *PLOS ONE*, 4(3), e4817.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. and Cheng, Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. and Bonomo, R. A. 2011. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943-4960.
- Parastan, R., Kargar, M., Solhjoo, K. and Kafilzadeh, F. 2020. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. *Gene Reports*, 20(3), 100739.

- Pazarlı, O. 2010. Kinolon Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarında Direnç Genlerinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Karaelmas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 83, Zonguldak.
- Raghavan, R. and Shawar, S. 2017. Mechanisms of Drug-Induced Interstitial Nephritis. *Adv Chronic Kidney Dis*, 24(2), 64-71.
- Ratcliffe, R. W., Wilkening, R. R., Wildonger, K. J., Waddell, S. T., Santorelli, G. M. and Parker, D. L. 1999. Synthesis and properties of 2-(naphthosultamyl) methylcarbapenems with potent anti-MRSA activity: Discovery of L-786,392. *Bioorganic ve Medicinal Chemistry Letters*, 9(5), 679-684.
- Ray, M. D., Boundy, S. and Archer, G. L. 2016. Transfer of the methicillin resistance genomic island among staphylococci by conjugation. *Molecular Microbiology*, 100(4), 675-685.
- Reygaert W. C. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482-501.
- Ritu, S., Pushkal, S., Srivastava, S. D. and Srivastava, S. K. 2011. Synthesis and biological activity of 2-oxo-azetidine derivatives of phenothiazine. *Organic Communications*, 4(2), 42-51.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C. and Ploy, M.C. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of The Total Environment*, 447, 345-360.
- Rodilla, E. M., González, I. D., Yges, E. L., Bellido, F. J. M., Bara, M. T. G. and Toledano, F. L. 2010. Immunological aspects of nonimmediate reactions to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Expert review of clinical immunology*, 6(5), 789-800.
- Rodriguez-Saiz, M., Diez, B. and Barredo, J. L. 2005. Why did the Fleming strain fail in penicillin industry *Fungal Genetics and Biology*, 42(5), 464-70.
- Ruzin, A., Petersen, P. J. and Jones, C. H. 2010. Resistance development profiling of piperacillin in combination with the novel beta-lactamase inhibitor BLI-489. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 252-257.
- Rüzgar, D. 2019. *Bacillus licheniformis* OSBS6'dan amilaz ve proteaz enzimlerinin üçlü faz ayırma sistemi (TPP) ile saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans

Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalı, 137, Erzurum.

Sakoulas, G. 2021. Case Commentary: Imipenem/Cilastatin and Fosfomycin for Refractory Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection: a Novel Combination Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(1), 3.

Sanseverino, I., Navarro, A., Loos, R., Marinov, D. and Lettieri, T. 2018. State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance. Avrupa Birliği Yayınları Ofisi, Lüksemburg.

Santajit, S. and Indrawattana, N. 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 24(7), 5067.

Sato, A., Yamaguchi, T., Hamada, M., Ono, D., Sonoda, S. and Oshiro, T. 2019. Morphological and Biological Characteristics of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formed in the Presence of Plasma. *Microbial Drug Resistance*, 25(5), 668-676.

Sauberan, J. B. and Bradley, J. S. 2018. Antimicrobial Agents. In: Long SS, Prober CG, Fischer M, editors. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (Fifth Edition): Elsevier, 1499-1531.

Schmitz, F. J. and Fluit, A. C. 2010. Chapter 131 Mechanisms of antibacterial resistance. In J. Cohen, S. M. Opal ve W. G. Powderly (Eds.), *Infectious Diseases* (Third Edition) (1308-1322). London: Mosby.

Schroeder, M., Horne, S. M. and Pruess, B. M. 2018. Efficacy of beta-phenylethylamine as a novel anti-microbial and application as a liquid catheter flush. *Journal of Medical Microbiology*. 67(12), 1778-1788.

Shalaby, M. A.W., Dokla, E. M. E., Serya, R. A. T. and Abouzid, K. A. M. 2020. Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 199(4), 112312.

Shenoy, E. S., Macy, E., Rowe, T. and Blumenthal K. G. 2019. Evaluation and Management of Penicillin Allergy: A Review. *JAMA*, 321(2), 188-199.

Shi, L., Mao, W. J., Yang, Y. and Zhu, H. L. 2009. Synthesis, characterization, and biological activity of a Schiff-base Zn (II) complex. *Journal of Coordination Chemistry*, 62(21), 3471-3477.

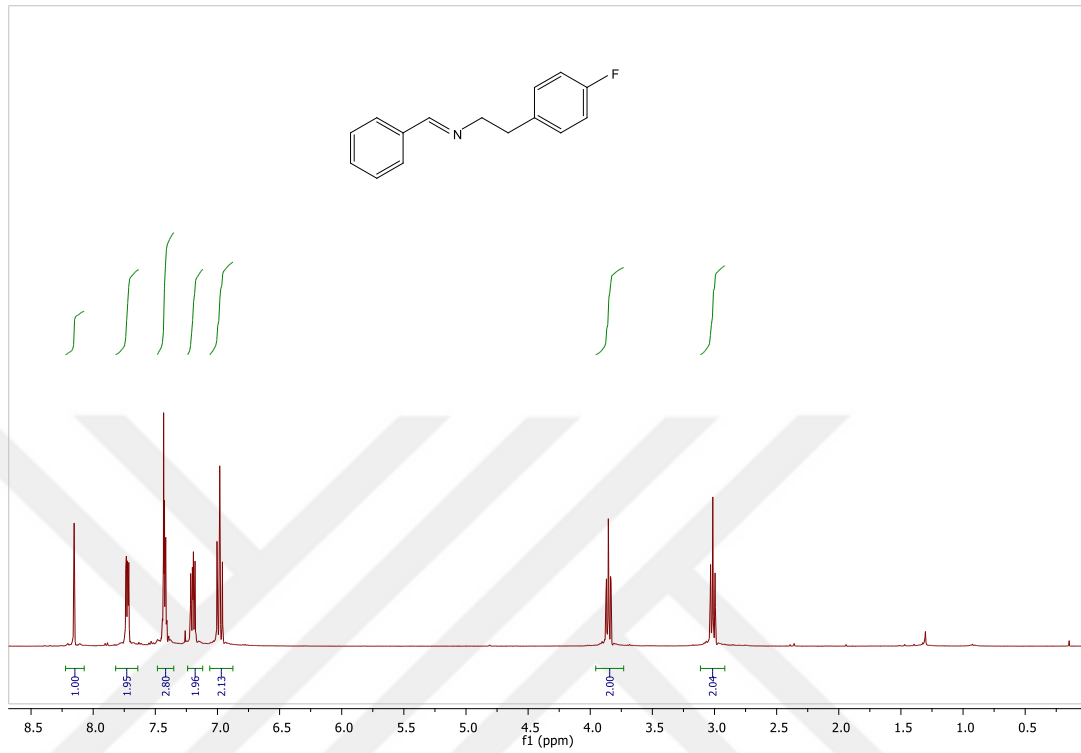
- Sidhu, A., Sharma, J. and Rai, M. 2010. ChemInform Abstract: Chemoselective Reaction of Malononitrile with Imine-ones and Antifungal Potential of Products. Cheminform, 41(24), 3-15.
- Sipos, M., Farcas, A., Leucuta, D. C., Bucsa, C., Huruba, M. and Mogosan, C. 2021. Second-Generation Cephalosporins-Associated Drug-Induced Liver Disease: A Study in VigiBase with a Focus on the Elderly. Pharmaceuticals, 14(5), 441.
- Staudinger, H. 1907. Zur Kenntniss der Ketene. Diphenylketen. Justus Liebigs Annalen der Chemie, 356(2), 51-123.
- Steigbigel, R. and Steigbigel, N. 2019. Static vs Cidal Antibiotics. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 68 (1), 351-353.
- Stine, J. G. and Lewis, J. H. 2013. Hepatotoxicity of antibiotics: a review and update for the clinician. Clin Liver Dis, 17(4), 609-642.
- Sun, J., Deng, Z. and Yan, A. 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysical Research Communications, 453(2), 254-267.
- Sunjaya, D. B., Lennon, R. J., Shah, V. H., Kamath, P. S. and Simonetto, D. A. 2019. Prevalence and Predictors of Third-Generation Cephalosporin Resistance in the Empirical Treatment of Spontaneous Bacterial Peritonitis. Mayo Clin Proc, 94(8), 1499-1508.
- Sutaria Dhruvitkumar, S., Moya, B., Green Kari, B., Kim Tae, H., Tao, X. and Jiao, Y. 2018. First Penicillin-Binding Protein Occupancy Patterns of  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 62(6), 282-310.
- Takayama, Y., Tanaka, T., Oikawa, K., Fukano, N., Goto, M. and Takahashi, T. 2018. Prevalence of *blaZ* Gene and Performance of Phenotypic Tests to Detect Penicillinase in *Staphylococcus aureus* Isolates from Japan. Annals of Laboratory Medicine, 38(2), 155-159.
- Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T. and Suzuki, K. 1999. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. Analytical Communications, 36(2), 47-50.

- Tripodi, F., Pagliarin, R., Fumagalli, G., Bigi, A., Fusi, P. and Orsini, F. 2012. Synthesis and Biological Evaluation of 1,4-Diaryl-2-azetidinones as Specific Anticancer Agents: Activation of Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase and Induction of Apoptosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(5), 2112-2124.
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P. and Carugati, M. 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 203-218.
- Turos, E., Long, T. E., Konaklieva, M. I., Coates, C., Shim, J. Y. and Dickey, S. 2002. N-thiolated beta-lactams: Novel antibacterial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic ve Medicinal Chemistry Letters*, 12(16), 2229-2231.
- Türkoğlu, F. K. 2008. Pediatri Kliniğine Başvuran Annelerin Çocuklarda Antibiyotik Kullanımı Konusundaki Bilgi ve Tutumların Araştırılması. Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği, 120, İstanbul.
- Uzun, B., Güngör, S., Pektaş, B., Aksoy, G. A., Yula, E. and Koçal, F. 2014. [Macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance phenotypes in clinical *Staphylococcus* isolates and investigation of telithromycin activity]. *Mikrobiyol Bul*, 48(3), 469-476.
- Van, Bambeke F., Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. and Tulkens P. M. 2017. 137- Mechanisms of Action. In: Cohen, J. Powderly, W. G. Opal, S. M. (eds). *Infectious Diseases (Fourth Edition)*: Elsevier 1162-1180.
- Vardakas, K. Z., Kalimeris, G. D., Triarides, N. A. and Falagas, M. E. 2018. An update on adverse drug reactions related to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Expert Opin Drug Saf*, 17(5), 499-508.
- Ventola C. L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P ve T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277-285.
- Vouillamoz, J., Entenza, J. M., Feger, C., Glauser, M. P. and Moreillon, P. 2000. Quinupristin-dalfopristin combined with beta-lactams for treatment of experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus* constitutively resistant to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1789-1795.

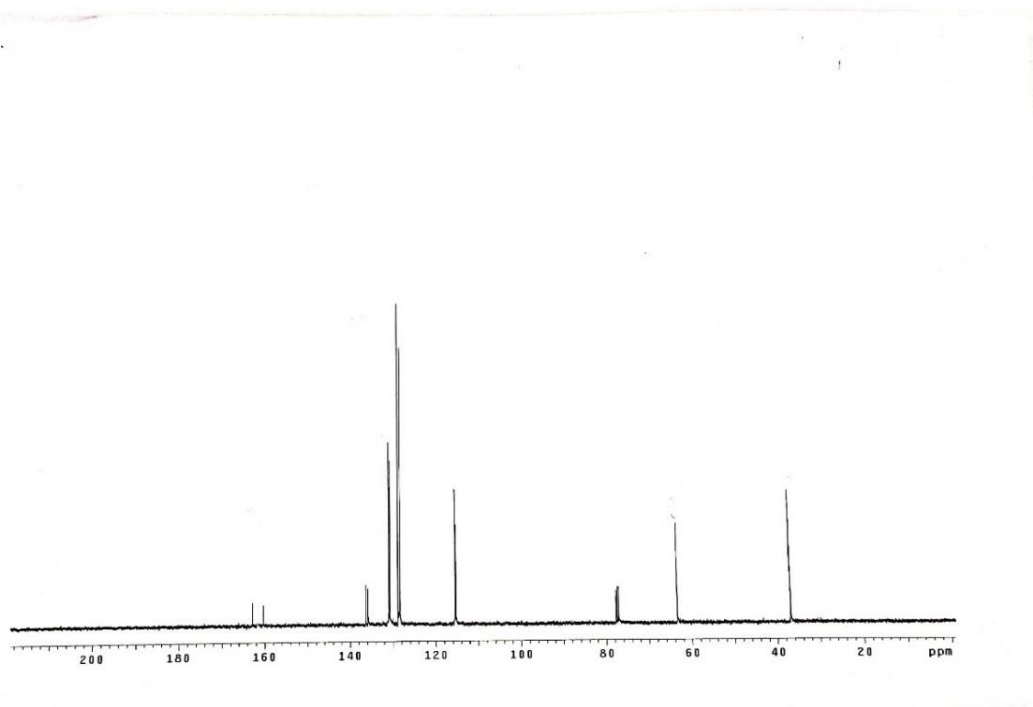
- Vranakis, I., De Bock, P. J., Papadioti, A., Tselentis, Y., Gevaert, K. and Tsiotis, G. 2011. Identification of Potentially Involved Proteins in Levofloxacin Resistance Mechanisms in *Coxiella burnetii*. *Journal of Proteome Research*, 10(2), 756-762.
- Vysakh, P. R. and Jeya, M. 2013. A comparative analysis of community acquired and hospital acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7(7), 1339-1342.
- Walsh, O. M., Meegan, M. J., Prendergast, R. M. and Al Nakib, T. 1996. Synthesis of 3-acetoxazetidin-2-ones and 3-hydroxyazetidin-2-ones with antifungal and antibacterial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 31(12), 989-1000.
- Wilkening, R. R., Ratcliffe, R. W., Wildonger, K. J., Cama, L. D., Dykstra, K. D. and DiNinno, F. P. 1999. Synthesis and activity of 2-(sulfonamido) methylcarbapenems: Discovery of a novel, anti-MRSA 1,8-naphthosultam pharmacophore. *Bioorganic ve Medicinal Chemistry Letters*, 9(5), 673-678.
- Worthington, R. J. and Melander, C. 2013. Overcoming resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *The Journal of organic chemistry*, 78(9), 4207-4213.
- Yamase, T., Fukuda, N. and Tajima, Y. 1996. Synergistic effect of polyoxotungstates in combination with beta-lactam antibiotics on antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological ve Pharmaceutical Bulletin*, 19(3), 459-465.
- Yıldız, İ., Varkal, M. ve Ünüvar, E. 2022. Günümüzde Sefalosporinler ve Antibiyotik Direnci. *Çocuk Dergisi*, 14(1), 22-27.
- Yushchuk, O., Binda, E. and Marinelli, F. 2020. Glycopeptide Antibiotic Resistance Genes: Distribution and Function in the Producer Actinomycetes. *Frontiers in microbiology*, 11(2), 1173-1178.
- Zapater, P., Gonzalez-Navajas, J. M., Such, J. and Francés, R. 2015. Immunomodulating effects of antibiotics used in the prophylaxis of bacterial infections in advanced cirrhosis. *World journal of gastroenterology*, 21(41), 11493-11501.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C. and Vernet, T. 2008. Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 361-385.

# EKLER

## EK-1

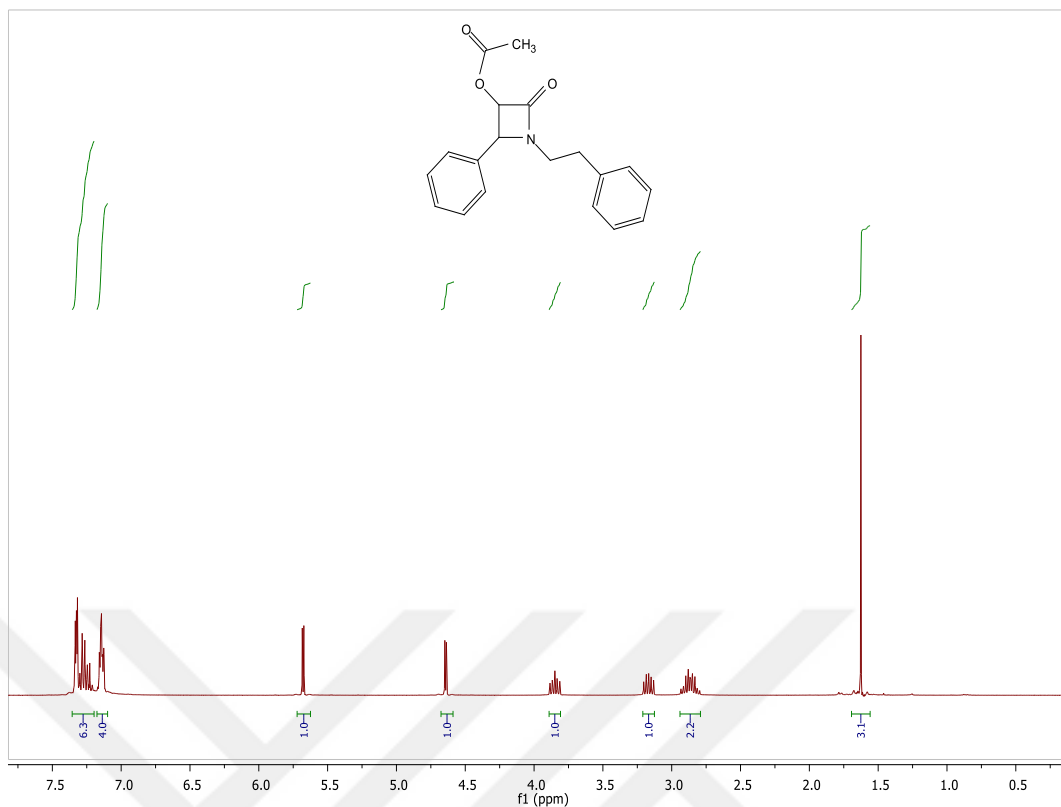


**EK 1.1.** (*E*)-*N*-benziliden-2-(4-florofenil) etanamin (**19**) <sup>1</sup>H NMR spektrum

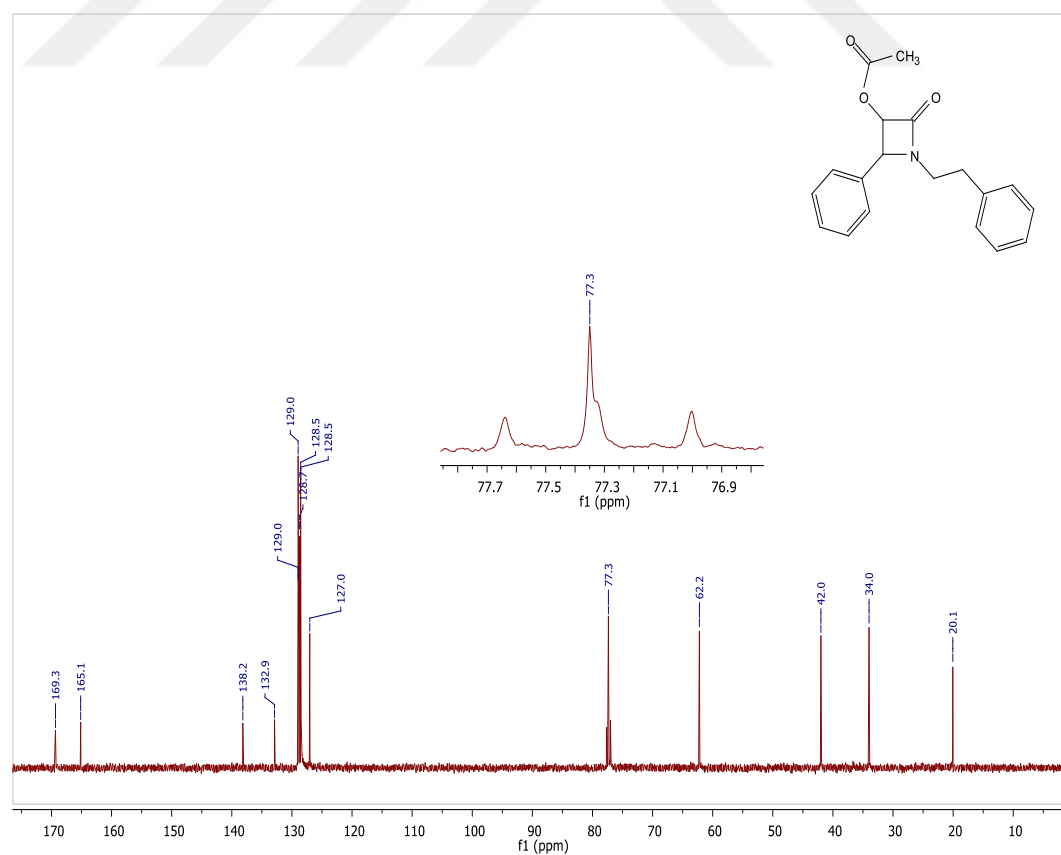


SS

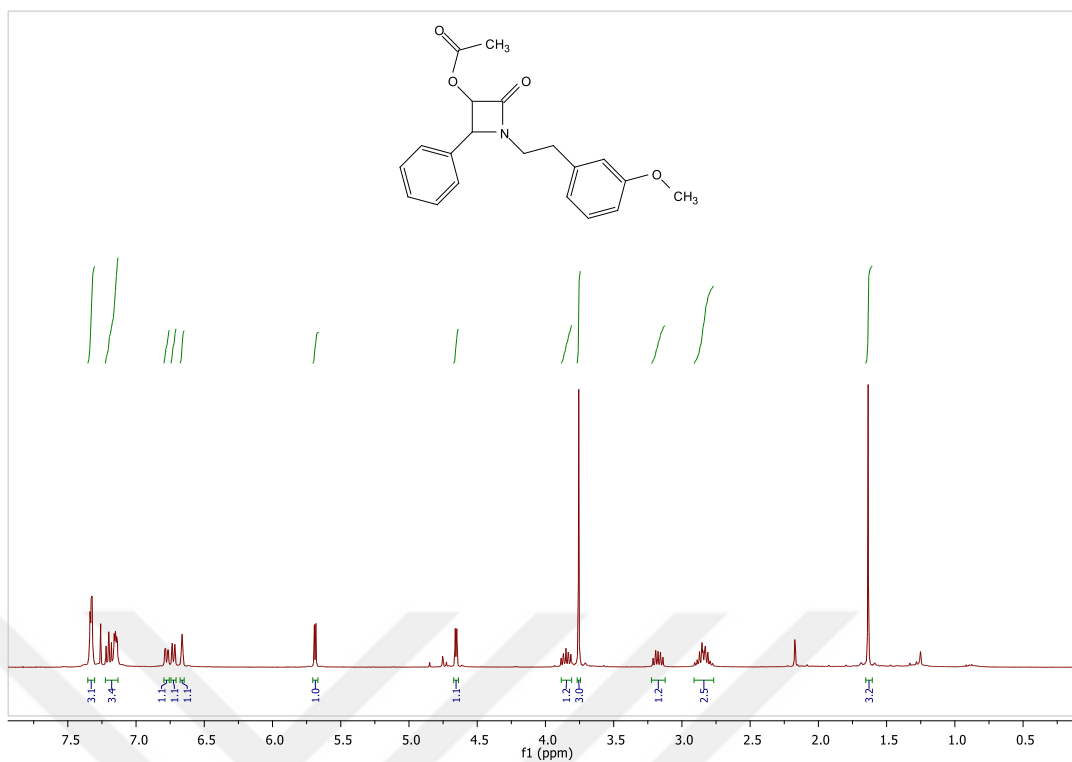
**EK 1.2.** (*E*)-*N*-benziliden-2-(4-florofenil) etanamin (**19**) <sup>13</sup>C NMR spektrum



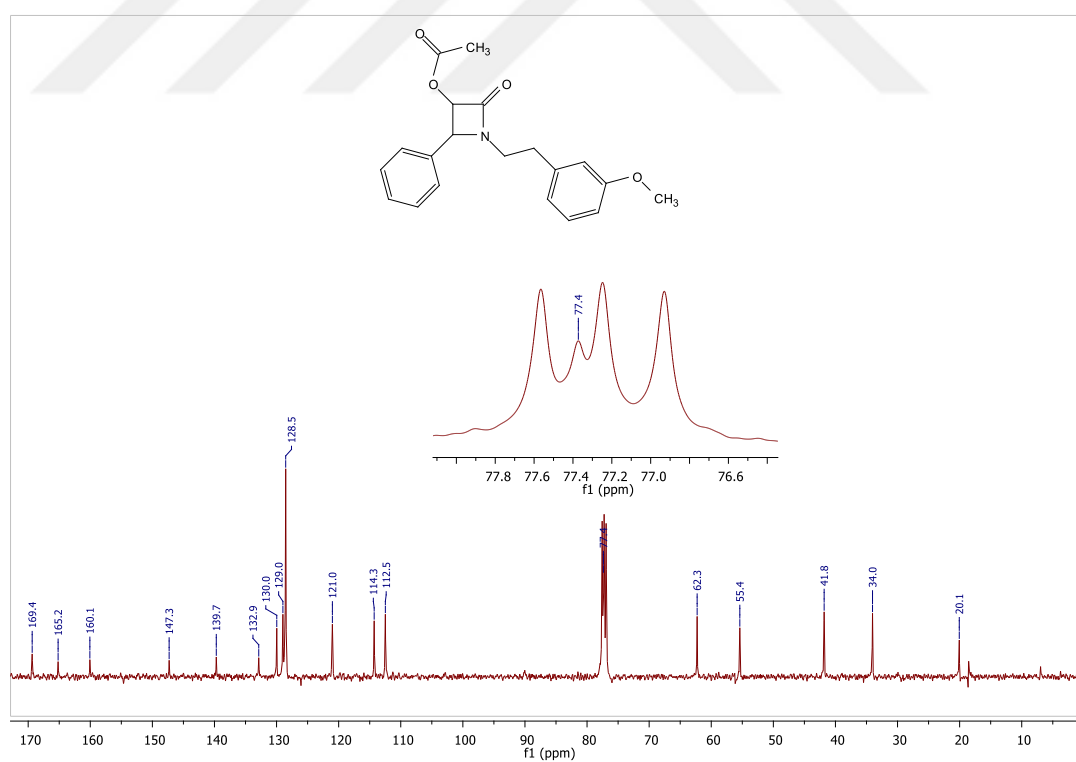
**EK 1.3.** 2-okso-1-fenetil-4-fenilazetididin-3-il aasetat (22) <sup>1</sup>H NMR spektrum



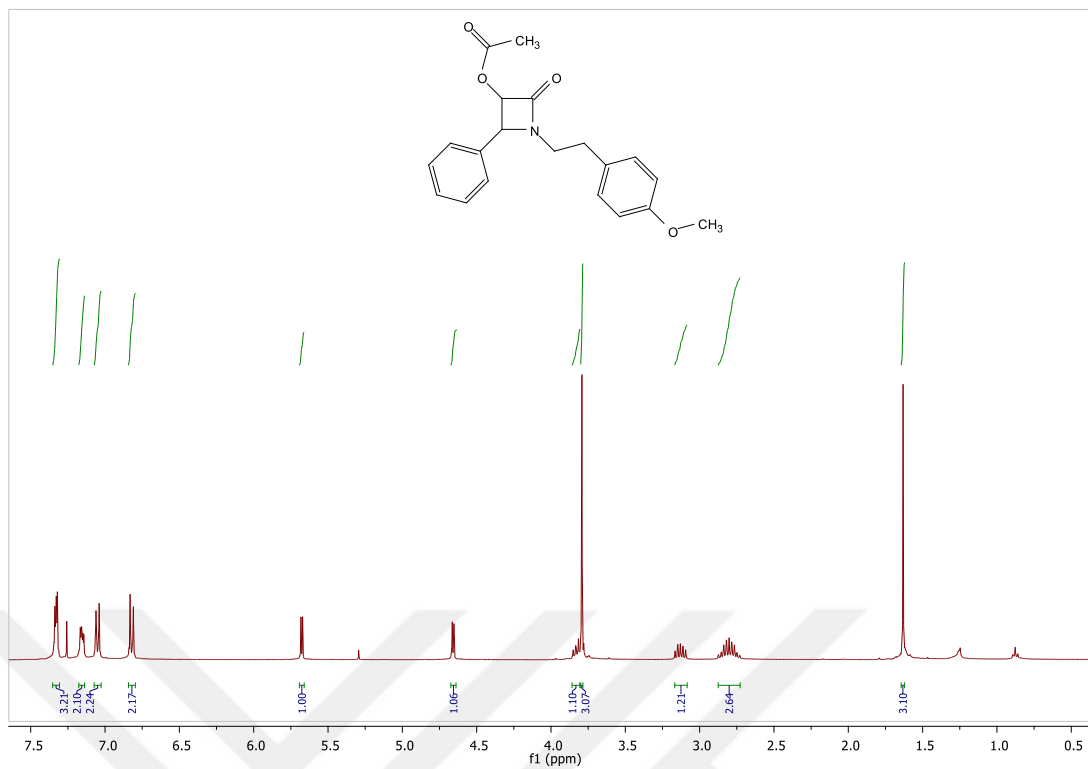
**EK 1.4.** 2-okso-1-fenetil-4-fenilazetididin-3-il aasetat (22) <sup>13</sup>C NMR spektrum



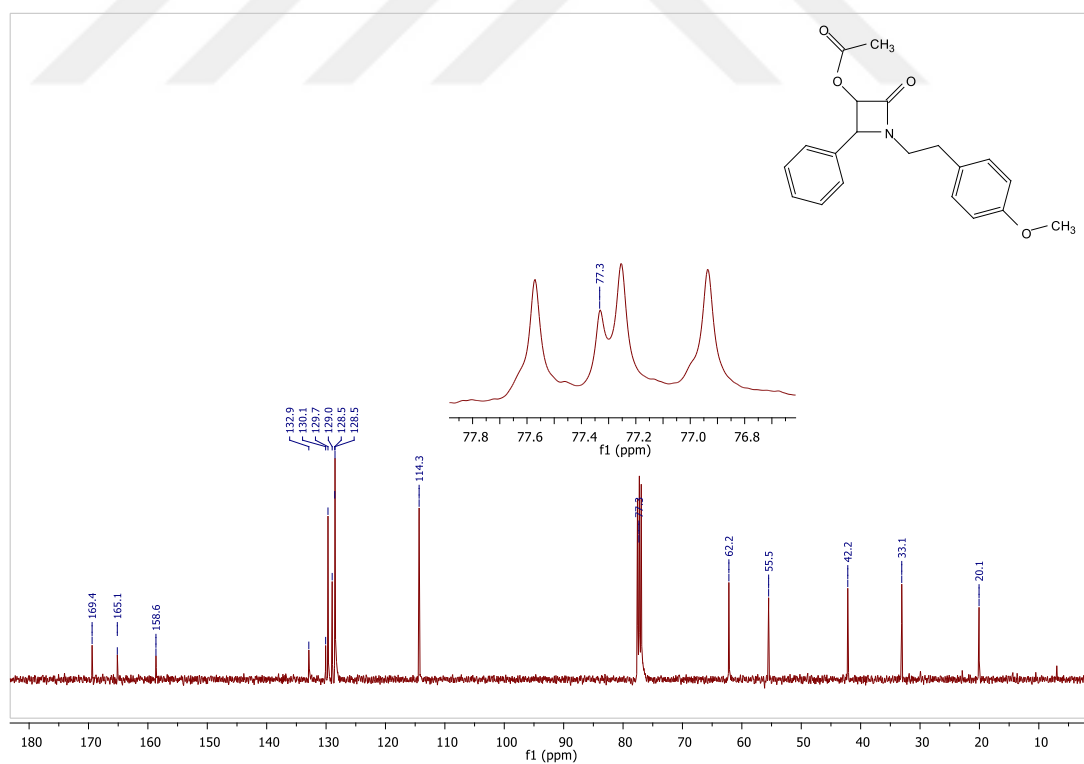
**EK 1.5.** 1-(3-metoksifenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (**23**) <sup>1</sup>H NMR spektrum



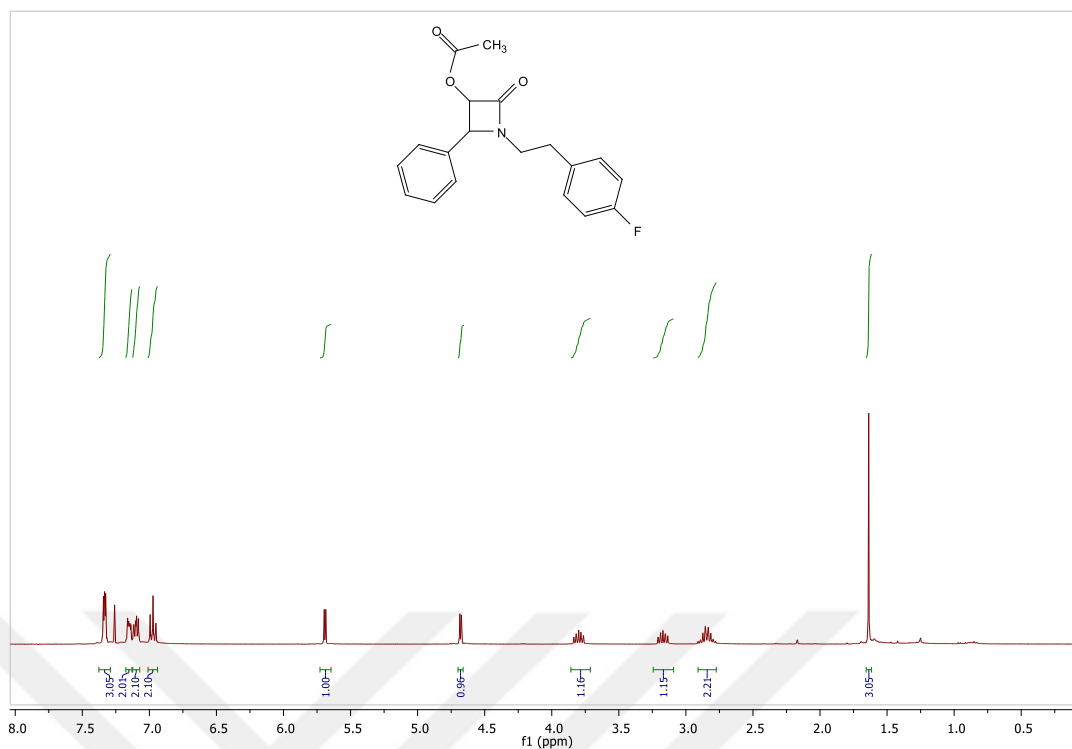
**EK 1.6.** 1-(3-metoksifenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (**23**) <sup>13</sup>C NMR spektrum



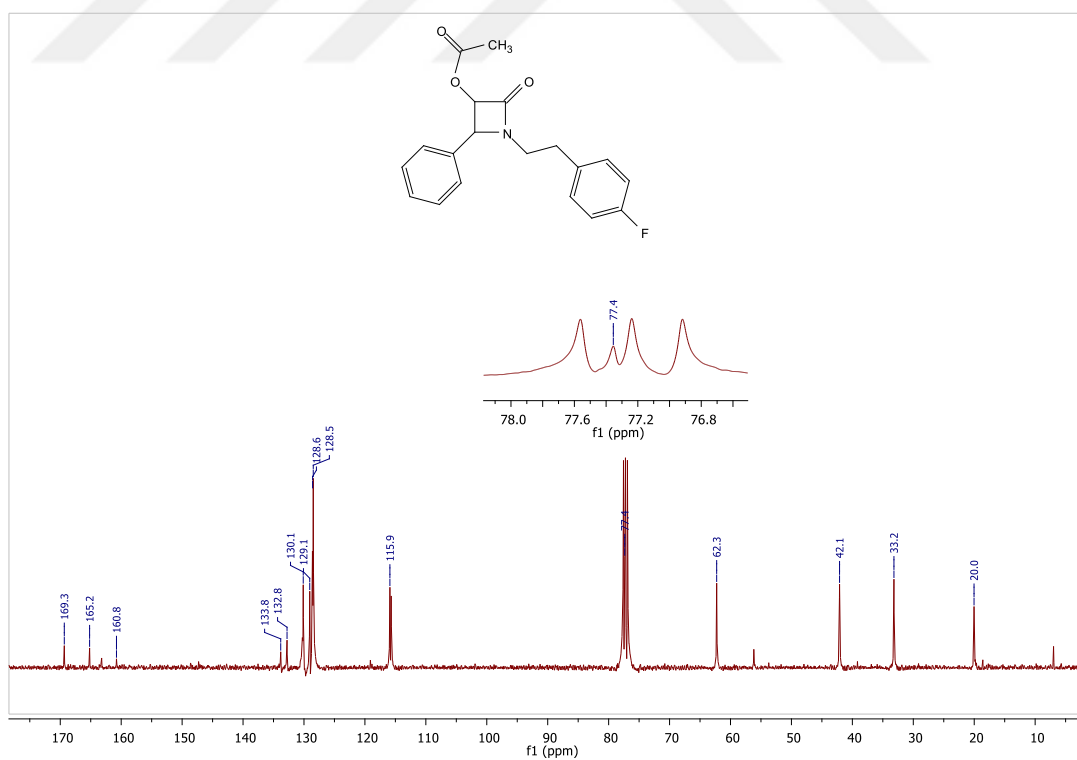
**EK 1.7.** 1-(4-metoksifenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (**24**)  $^1\text{H}$  NMR spektrum



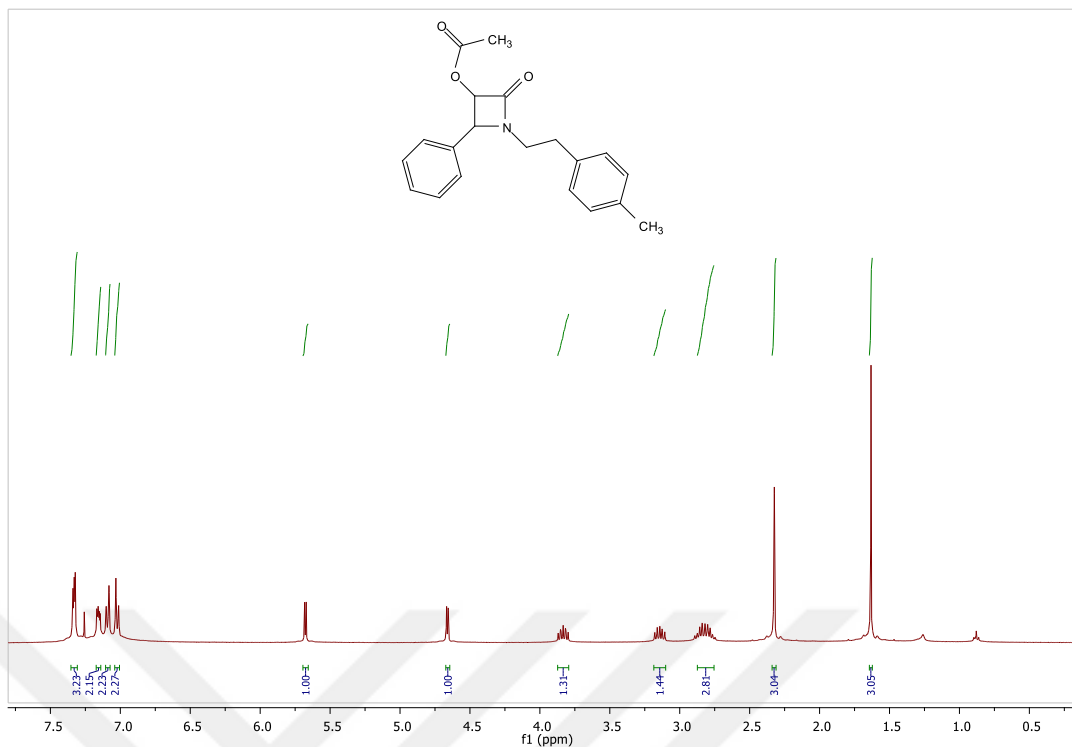
**EK 1.8.** 1-(4-metoksifenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (**24**)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum



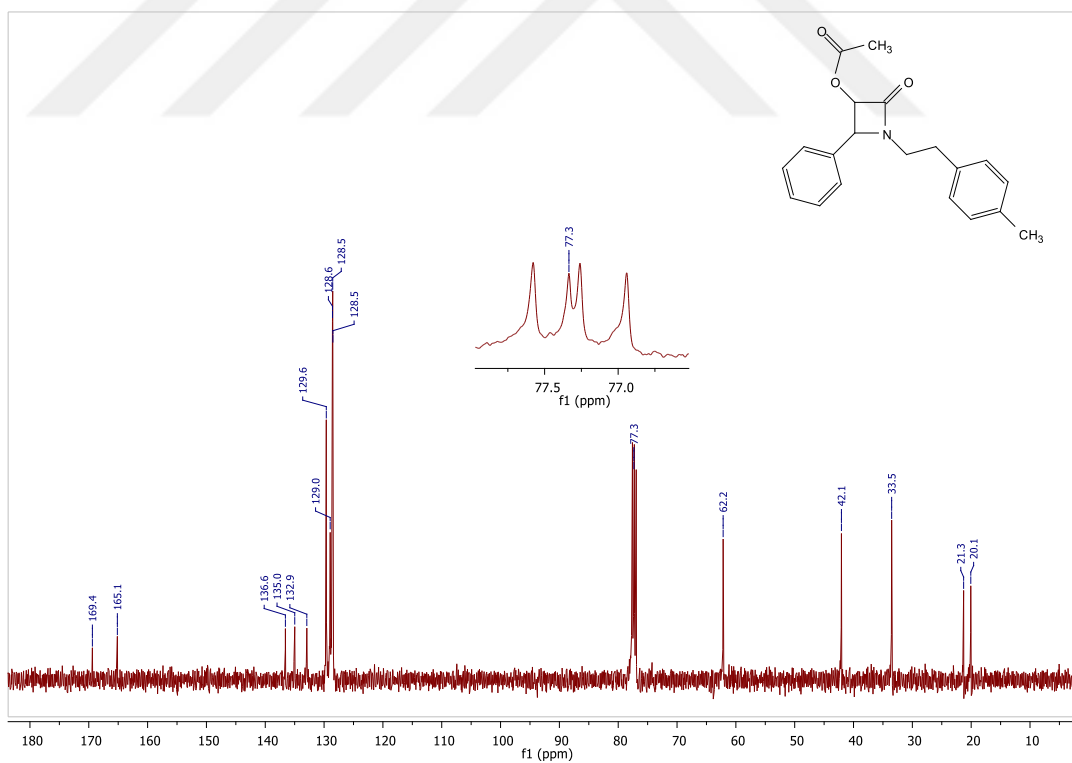
**EK 1.9.** 1-(4-florofenetil)-2-okso-4-fenilazetid-3-il aaset (25) <sup>1</sup>H NMR spektrum



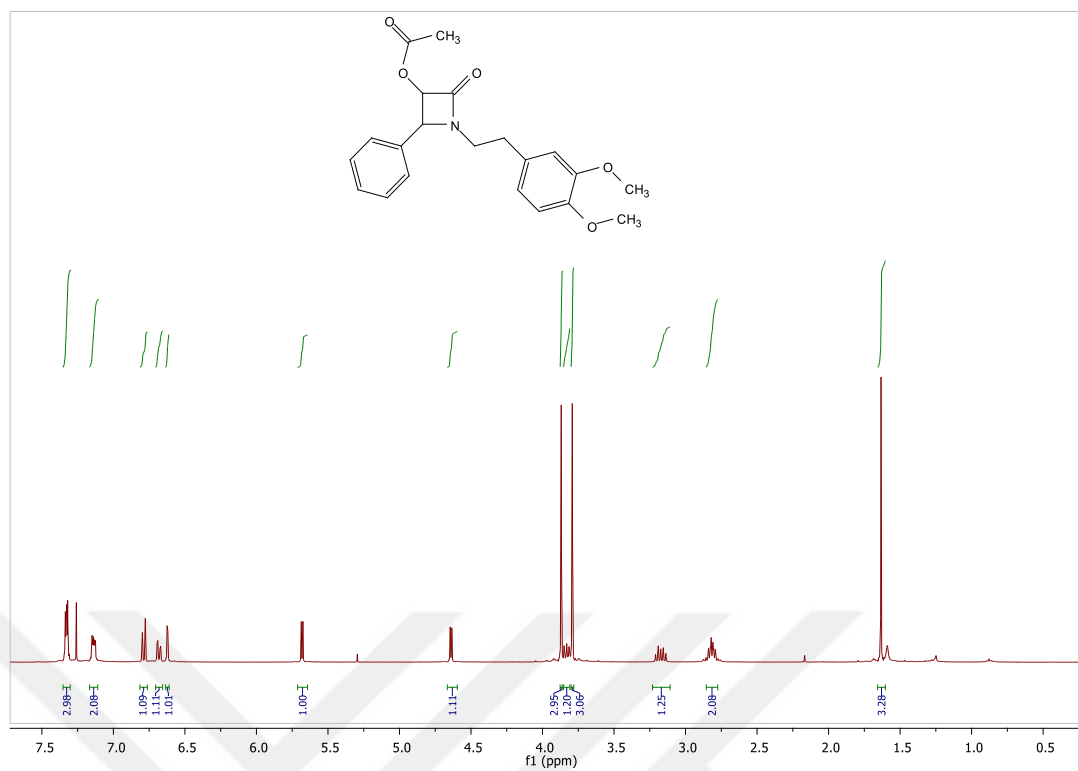
**EK 1.10.** 1-(4-florofenetil)-2-okso-4-fenilazetid-3-il aaset (25) <sup>13</sup>C NMR spektrum



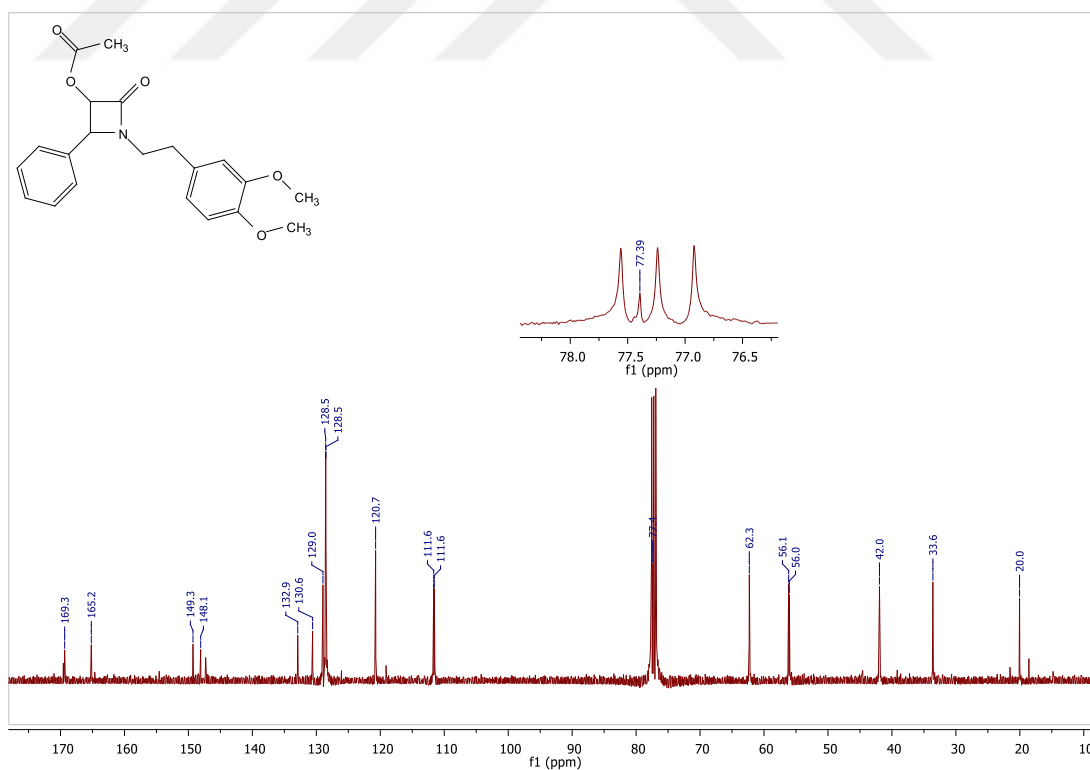
**EK 1.11.** 1-(4-metilfenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (26) <sup>1</sup>H NMR spektrum



**EK 1.12.** 1-(4-metilfenetil)-2-okso-4-fenilazetidin-3-il asetat (26) <sup>13</sup>C NMR spektrum



**EK 1.13.** 1-(3,4-dimetoksifenetil)-2-okso-4-fenetilazetidin-3-il asetat (27) <sup>1</sup>H NMR spektrum



**EK 1.14.** 1-(3,4-dimetoksifenetil)-2-okso-4-fenetilazetidin-3-il asetat (27) <sup>13</sup>C NMR spektrum

## EK-2



**EK 2.1. MSSA ATCC 25923 Çok Aşamalı Direnç Çalışması**



**EK 2.2. MRSA ATCC 43300 Çok Aşamalı Direnç Çalışması**



**EK 2.3.** Klinik İzolat 1 Çok Aşamalı Direnç Çalışması



**EK 2.4.** Klinik İzolat 2 Çok Aşamalı Direnç Çalışması



**EK 2.5.** Klinik İzolat 3 Çok Aşamalı Direnç Çalışması