T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI DİOKSİMLERİN BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nebile ÇOLAKEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ LABORATUVAR ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr.Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ

KONYA - 2019

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI DİOKSİMLERİN BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nebile ÇOLAKEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ LABORATUVAR ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr.Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ

KONYA - 2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **iv**

ÖZET ..... **vi**

ÖNSÖZ ..... **viii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1 GİRİŞ **1**

2 GENEL BİLGİLER **3**

2.1 Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi 3
2.2 Mikroorganizmalar Neden Biyofilm Oluştururlar? 4
2.2.1 Çevrenin Zararlı Etkilerinden Korunma 4
2.2.2 Besin Elde Etme 5
2.2.3 Yeni Genetik Özelliklerin Kazanılması 5
2.3 Biyofilmlerin Oluşum Basamakları 5
2.3.1 Dönüşümlü Tutunma 6
2.3.2 Dönüşümsüz Tutunma 6
2.3.3 Koloni Oluşumu 6
2.3.4 Biyofilm Olgunlaşması 7
2.3.5 Biyofilm Oluşturan Hücrelerin Koparak Ayrılması (Dispersiyon) 8
2.4 Quorum Sensing ve Mekanizması 8
2.4.1 Gram (-) negatif ve Gram (+) pozitif Bakterilerde Quorum Sensing 8
2.5 Biyofilme Bağlı Enfeksiyonlar 12
2.6 Biyofilm Tayin Metodları 14
2.6.1 Boyama Teknikleri 14
2.6.2 Metabolik Yöntemler 16
2.6.3 Genetik Yöntemler 19
2.6.4 Fiziksel Yöntemler 20
2.7 *Staphylococcus* Türleri ve Özellikleri 24
2.7.1 Hücre Duvarı Yapısı 24
2.7.2 Staphylococcus epidermidis 26
2.7.3 *Staphylococcus aureus* ve Biyofilmler 27
2.7.4 *Staphylococcus aureus*'ta Metisilin Direnci 28
2.8 Biyofilm Kontrolünde İnhibisyon Stratejileri 28
2.8.1 Quorum Quenching (Biyofilm Direnci) 28
2.9 Oksimler 30
2.9.1 Oksimlerin Özellikleri 31
2.9.2 Oksimlerin Geometrik İzomerleri 32
2.9.3 Oksimlerin Bazı Önemli Sentez Metotları 33
2.9.4 Oksimlerin kullanım alanları 36

3 GEREÇ VE YÖNTEMLER **38**

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler 38

3.2 Biyolojik Çalışmada Kullanılan Materyaller 38
3.3 Kullanılan Cihazlar 38
3.4 Dioksimlerin Sentezlenmesi..... 39
3.4.1 α-Benzil Dioksim (1a) 39
3.4.2 4,4′-Dimetoksibenzil Dioksim (2a)..... 40
3.4.3 4,4′-Diflorobenzil Dioksim (3a) 40
3.4.4 9,10-Phenanthrenequinone Dioksim (4a) 41
3.4.5 Acenaphthenequinone Dioksim (5a) 42
3.4.6 2,2′-Pyridil Dioksim (6a) 42
3.4.7 α-furil Dioksim (7a)..... 43
3.5 Sentezlenen Dioksimler ve Başlangıç Maddelerinin MİK Değerlerinin Bulunması. 43
3.6 Kristal Viyole Mikro Plaka Boyama Yöntemi ile Biyofilm İnhibisyonun Belirlenmesi 45

4 BULGULAR..... 47

4.1 Sentezlenen Dioksimlerin Karakterizasyonu 48
4.2 Maddelerin Minumum İnhibitör Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi .. 49
4.3 Maddelerin Biyofilm İnhibisyonun Belirlenmesi 52

5 TARTIŞMA..... 64

6 SONUÇ ve ÖNERİLER 73

7 KAYNAKÇA..... 76

8 EKLER 86

8.1 Sentezlenen Dioksimlerin ^{1}H-NMR Spektrumları..... 86
8.2 Sentezlenen Dioksimlerin FT-IR Spektrumları 90

9 ÖZGEÇMİŞ 94

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bazı Dioksimlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması

Nebile ÇOLAKEL

Tıbbi Laboratuvar Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2019

Mikroorganizmaların çoğunluğu yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşturma yeteneğindedir. Biyofilmler, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur. Tıbbi uygulamalarda girişimsel tekniklerin ve kalıcı tıbbi araçların kullanımının artışı, biyofilme bağlı enfeksiyonların da artışına neden olmuştur. Biyofilmler özellikle immün baskılanmış ve kalıcı tıbbi araç veya kateteri olan hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu gerçekler nedeniyle, yüzeyleri biyofilm oluşumuna karşı korumak ve oluşan biyofilmleri uzaklaştırmak için stratejiler geliştirmeye yönelik artan bir talep vardır.

Oksim bileşikleri şelat oluşturma, biyolojik olarak parçalanabilme, oksijen tutma özelliklerinin yanı sıra fotokimyasal reaksiyonlardaki farklı etkinlikleriyle tanınmaktadır. Son yıllarda oksimlerin biyolojik süreçlerdeki etkileri üzerine yapılan antitümör, antioksidan ve antimikrobiyal vb. araştırmalar dikkat çekmektedir.

Yaptığımız literatür araştırmalarında, uzun yıllardır bilinen ve sentezlenen dioksim bileşiklerinin antibiyofilm etki çalışmalarında kullanılmadığı görülmüştür. Bu çalışmada tarafımızca sentezlenen bazı aromatik 1,2-diketon türevi dioksimlerin, biyofilm ürettiği bilinen 3 adet stafilakok suşu (*S.aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 43300, *S.epidermidis* NRRL B-4268) üzerinde antibiyofilm etkileri araştırılmıştır. Biyofilm oluşumunun inhibisyonu, doğal bir antibiyofilm ajan olarak bilinen C*urcuma longa* (zerdeçal) bitkisinin biyoaktivitesinden sorumlu bir diketon olan kurkumin ile kıyaslanmıştır. Bileşiklerin Minumum İnhibitör Konsantrasyonları (MİK) belirlenerek, MİK altı (sub-MİK) dozların biyofilm oluşumunu önleme etkileri kristal viyole mikrotitrasyon plak boyama tekniğiyle spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Sentezlenen bazı dioksimler, stafilakok türü biyofilmlerin oluşumunu %90'nın üzerinde inhibe ederek kurkumine yakın etki göstermiştir. Alınan sonuçlar dioksimlerin antibiyofilm özelliklerinin daha ileri çalışmalarla belirlenmesi için ümit vericidir.

Anahtar kelime: Biyofilm; diketon; dioksim; kristal viyole; kurkumin; MİK.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of the Inhibition Effects of Some Dioximes on Biofilm Formation

Nebile ÇOLAKEL

Department of Medical Laboratory

MASTER THESIS / KONYA-2019

The majority of microorganisms are capable of adhering to surfaces and forming biofilms. Biofilms are a group of microorganisms that live in layer of polymeric structure that they produce by adhering to a living or inanimate surface. The increase in the use of interventional techniques and permanent medical devices in medical applications has led to an increase in biofilm related infections. Biofilms can cause serious infections, especially in patients with immunosuppressed and persistent medical devices or catheters. Because of these facts, there is an increasing demand to develop strategies to protect and remove surfaces from biofilm formation.

Oxime compounds are known for their chelate formation, biodegradability, oxygen retention properties as well as their different activity in photochemical reactions in recent years, studies on the effects of oximes on biological processes such as antitumor, antioxidant and antimicrobial have attracted attention.

In our literature researches, it has been seen that dioxime compounds, which have been known and synthesized for many years, are not used in antibiofilm studies. In this study, some aromatic 1,2-diketone derived dioximes synthesized by us were investigated for antibiofilm effects on 3 standard strains of staphylococcus (*S.aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 43300, *S.epidermidis* NRRL B-4268) which are known to produce biofilm. Inhibition of biofilm formation was compared to curcumin, a diketone responsible for the bioactivity of the *Curcuma longa* plant, known as a natural antibiofilm agent. Minimum Inhibitor Concentrations (MIC) of the compounds were determined and the effects of sub-MIC doses to prevent formation of biofilm were evaluated spectrophotometrically by crystal violet microtitration plate staining technique. Some of the synthesized dioximes showed an effect close to curcumin by inhibiting the formation of staphylococcus biofilms over 90%. The results are promising for further evaluation of the antibiofilm properties of dioximes.

Key words: Biofilm; crystal violet; curcumin; diketone; dioxime; MIC.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Laboratuvar Anabilim Dalı öğretim üyesi olan Dr. Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ danışmanlığında hazırlanarak, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne sunulmuştur.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez aşamasında bana her türlü bilgi ve desteğini esirgemeyen, her türlü yardımları ile bana yol gösterip laboratuvar çalışmalarında sabırla yanımda olan kıymetli büyüğüm ve değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ'ye saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarımızda bize destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Zafer SAYIN hocama, Doç. Dr. Ahmet UYSAL hocama ve Doç. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ hocama saygı ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar deneylerinde bana yardımcı ve destek olan Ayşe KAYAN arkadaşıma en içten duygularımla sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bana arkadaşlığı, dostluğu öğreten, yanımda olan sevgili dostum, arkadaşım Ayşen BAYER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren, yetiştiren ve sabırla yanımda olan aileme saygı ve şükranlarımı en içten dileklerimle belirtmek benim için bir borçtur.

Nebile ÇOLAKEL

2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

µL	: Mikro litre
ABC	: ATP bağlayıcı kaset
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
AHL	: Açil Homoserin Lakton
AIP	: Oto indükleyici peptid
ATCC	: Amerikan tipi kültür koleksiyonu
ATP	: Adenozin tri fosfat
BTA	: BioTimer Assay
CLSM	: Konfakal lazer mikroskobu
CRM	: Konfakal raman mikroskobu
CV	: Kristal Viyole
DAP	: Diaminopimelik asit
DESI	: Desorption Electrospray Ionization
DMMB	: 1,9-Dimethyl-Methylene Blue
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDX	: Enerji dağıtıcı X ışını
EM	: Elektron mikroskobu
EPS	: Ekzo Poli Sakkarit
FBP	: Fruktoz bifosfat aldolaz
FDA	: Florasan di asetat
FIB	: Odaklanmış iyon ışını
FISH	: Fluorescent In Situ Hybridization
GAG	: Glikoz Amin Glikan
HSL	: (AHL) Hormon Serin Lipaz
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MRSA	: Metisilene Dirençli *Staphylococcus aureus*
MS	: Kütle Spektrofotometresi

MSCRAMM	: Mikroorganizmaların konak dokuya aracılı yapışması
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nano metre
NRRL	: Kuzey bölgesel araştırma laboratuvarı
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PIA	: Hücrelerarası polisakkarit adezini
qRT-PCR	: Gerçek zamanlı ters transkripsiyonlu -PCR
QS	: Quorum Sensing
rRNA	: Ribosomal Ribonucleic acid
SAM	: S-adenosil-L-metiyonin
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SPM	: Taramalı prob mikroskobisi
STXM	: Taramalı transmisyon X-ray mikroskobisi
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
TERS	: Terminal arttırıcı raman spektroskopisi
TSB	: Triptik Soy Broth
XM	: X-ray Mikroskobisi
XTT	: 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium tuzu

1 GİRİŞ

Bakteriyel biyofilmler, hücrenin kendi ürettiği hücre dışı polimerik matrikse (EPS) gömülerek canlı veya cansız yüzeylere tutunup gelişen mikroorganizmalar topluluğudur (Costerton ve ark 1999). Biyofilm oluşumu proteinler, polisakkaritler, lipidler ve hücre dışı DNA (eDNA) gibi bir veya daha fazla polimerik maddelerden oluşan mikrobiyal yapışmayla başlayıp devam eden çok aşamalı bir süreçtir (Azeredo ve ark 2017).

Biyofilm, organizmanın zorlu çevre koşullarına dayanmasını sağlayan bakteriler için koruyucu bir büyüme modelidir ve biyofilme gömülü bakteriler, aynı planktonik hücreleri öldüren konsantrasyonlardan yüzlerce kat daha yüksek konsantrasyonlarda antibiyotik ve antiseptiklerin kullanımında hayatta kalabilirler (Stewart ve Costerton 2001). Bir biyofilm içindeki bakteriler özellikle büyüme ve gen ekspresyonu açısından planktonik hücrelerden farklı fenotipler sergiler. Vücuttaki bakteriyel enfeksiyonların %80'i bakteriyel biyofilmlerle ilişkilidir (Davies 2003, Worthington ve ark 2012). Biyofilm olgunlaşmasından sonra, planktonik bakteri kolonileri biyofilmden yeni yüzeyleri veya dokuları enfekte etmek için ayrılır. Kistik fibroz (CF) hastalarında, *P. aeruginosa'nın* mukoid suşları, tekrarlayan enfeksiyöz pulmoner alevlenmelere, akciğer fonksiyonunun azalmasına ve nihayetinde ölüme yol açan akciğeri kolonize eder (Rowe ve ark 2005). Biyofilmlerle ilişkili hastalıklarda bir çok bakteriyel mekanizma etkili olmakla beraber en çok görülen enfeksiyonlar; doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, periodontit, gibi hastalıklar ve bunun yanı sıra protez kapak, santral venöz katater, üriner kateter, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar gibi yabancı cisim enfeksiyonu ile ilişkili hastalıklar görülmektedir (Donlan ve Costerton 2002). Bulaşıcı hastalıklarda biyofilmlerin belirgin rolleri göz önüne alındığında bakteriyel biyofilm gelişimini inhibe edecek küçük moleküllerin geliştirilmesine yönelik çabalar artmıştır (Worthington ve ark 2012).

Oksim bileşikleri metallerle kompleks oluşturma, biyolojik olarak parçalanabilme, oksijen tutma özelliklerinin yanı sıra farmakolojik ve fotokimyasal reaksiyonlardaki farklı etkinlikleriyle tanınmaktadır. Son yıllarda oksimler; antioksidan (Özen ve Taş 2009), antitümör (Çelik ve ark 2019) ve antimikrobiyal (Sevgi ve Bedük

2012) boyar maddeler için ara ürünler, değerli metallerin geri kazanılmasında kullanılmaktadır (Kurtoğlu ve Serin 2006).

Klorogliokşim, diklorogliokşim, klorofenilgliokşim gibi kolay ayrılan klor grubu taşıyan oksimlerin reaksiyonları ve metal kompleksleri yüzyıla aşkın bir süredir ilgi çekmektedir. Gerek bazı metal komplekslerinin biyolojik süreçlerle olan ilişkisi, gerekse *vic*-dioksimlerin analitik uygulamalarda kullanılabilirliği ilginin günümüze kadar canlı kalışının sebepleridir (Sevgi 2010).

Biyofilm hücreleri antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olup; antimikrobiyal ajanlarla teması engelleyen, ya da azaltan bariyere sahiptirler (O'Toole ve ark 2000) ve bu durum günümüzdeki bakteri kontrol yöntemlerini zora sokmaktadır. Son yıllarda antimikrobiyal ajanların kullanımıyla ilgili sorunlar, daha hızlı etki eden, yan etki oluşturmayan, alternatif yeni ajanlara ihtiyacın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu yaklaşım doğrultusunda toksik olmayan, kolay elde edilebilir, küçük yapılı dioksimlerin antibiyofilm çalışmalarının yapılmasının endüstriyel ve medikal alanda ciddi problem kaynağı olan biyofilmlerin inhibisyonu için iyi bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz.

Doğal bir antibiyofilm ajan olarak bilinen *Curcuma longa* (zerdeçal) bitkisinin biyoaktivitesinden sorumlu bir β-diketon olan kurkumin, çalışmamızda antibiyofilm referans maddesi olarak kullanılmıştır (Moshe ve ark 2011). Kurkumin, eski doğu tıbbında ve günümüzde antioksidan olarak kullanılmaktadır. Özellikle serbest radikallerde ve kanserden arınmada kullanılan zerdeçalın kurkumin sayesinde antibakteriyel olmasının yanı sıra tıbbi cihazlarda etki gösteren ve yaygın olan biyofilmlere karşı da inhibisyon özelliği görülmektedir (Karaman ve Köseler 2017).

Bu tezin temel amacı, dünya çapında yaygın hastalıklara sebep olan *Staphylococcus* spp. bakterilerinin neden olduğu biyofilm enfeksiyonlarının önlenmesinde 1,2-diketon türevi dioksimlerin etkinliklerinin olup olmadığı ilk defa araştırılarak ortaya konulmasıdır. Bu tezde, *Staphylococcus aureus*, MRSA (Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*) ve *Staphylococcus epidermidis* bakterileri kullanılmıştır. Sentezlenen dioksimlerin, başlangıç maddesi olarak kullanılan ticari diketonların ve kurkuminin çalışmada kullanılan bakterilere biyofilm inhibisyon

etkisinin olup olmadığı kristal viyole mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılarak araştırıldı.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi

17. yy'da Van Leeuwenhoek, kendi dişinden kazıdığı plakları basit bir mikroskopta incelemiş ve bazı mikrobiyal kümelerin varlığını bulmasına ve bunlara "animalculi" demesine rağmen bulduğu şeyin biyofilm olduğundan habersizdir. 1976 yılında Marshall, bakterileri yüzeylere bağlayan "çok ince ekstrasellüler polimer fibrilleri" nin tutulumuna dikkat çekmiş(Marshall 1976), Costerton ve arkadaşları, sudaki bağlanmış bakteri topluluklarının, doğada polisakkarit olduğu bilinen bir "glikokaliks" matrisiyle kaplandığını tespit etmiş ve bu matris malzemesinin yapışmaya aracılık ettiğini göstermişler ve bu yapılar için ilk defa "biyofilm" terimini kullanmıştır (Costerton ve ark 1978). Costerton ve arkadaşları, 1987'de, biyofilmin, hepsi yüksek oranda hidratlanmış, ağırlıklı olarak anyonik bir eksopolimer matrisine gömülmüş olan tek hücreler ve mikrokolonilerden oluştuğunu belirtmiştir (Costerton ve ark 1987).

Biyofilmlerin biyokimyasal yapısından ve koloni oluşturma özelliğinden bahseden Costerton, bu yapıların aynı zamanda hastane enfeksiyonlarına neden olan kolonilerle benzerlik gösterdiğini bulmuştur (Costerton ve ark 1978).

1978 yılında nehirlerde suyun alt kısımlarında yaşayan bakterilerin oluşturmuş oldukları slaym tabakası elektron mikroskobu ile incelenmiş ve yüzeylerde çoğunlukla sesil (bağlı) formdaki bakterilerin biyofilm oluşturdukları belirtilmiştir (Costerton ve ark 1978).

Costerton ve arkadaşları, 1995 yılında biyofilmleri mikrobiyal topaklar olarak tanımlamış ve ortamın gözenek boşlukları içindeki yapışkan popülasyonları da dahil olmak üzere arayüzeylere ve birbirine yapışabileceğini vurgulamıştır (Costerton ve ark 1995). Costerton ve Lappin-Scott, eş zamanlı biyofilm yapışmasının ilk hücre eklenmesi sırasında kopyalanan spesifik genler tarafından düzenlendiğini vurgulayarak bakteriyel bileşenlerin üretimini kontrol eden genlerin ekspresyonunun tetiklendiğini belirtmişlerdir (Costerton ve Lappin-Scott 1995).

Her ne kadar biyofilmler ilk kez Antonie van Leeuwenhoek tarafından tarif edilmiş olsa da, biyofilm sürecini açıklayan teori 1970'li yıllarda geliştirilmiştir. Günümüzde biyofilmlerin, endüstriyel su sistemlerinde ve aynı zamanda çok sayıda çevre ve tıbbi cihazda ortaya çıkan evrensel bir yapı olduğunu biliyoruz. Taramalı elektron mikroskobu ve daha yakın zamanlarda konfokal lazer tarama mikroskobu gibi araçların kullanılmasıyla biyofilm araştırmacıları artık biyofilmlerin homojen olmadığını ve birikmiş balçık olduğunu, ancak yüzey ile ilişkili hücrelerin polimer matrisinde bulunan kompleks topluluklarının olduğunu ve aralarında açık su kanalları bulunduğunu gözlemlemişlerdir (Donlan ve Costerton 2002).

2.2 Mikroorganizmalar Neden Biyofilm Oluştururlar?

Bakteriler canlı ve cansız yüzeylerde biyofilm oluşturduklarında bazı avantajlara sahip olurlar. Biyofilm oluşturan bakteriler, planktonik(serbest) haldeki bakterilere göre ortamın sıvı akışkanlığından, antibiyotik ve dezenfektanlara karşı daha dirençlidirler. Bakterilerin biyofilm oluşturma sebeblerinden en önemlisi; besin bulma, değişen pH dan korunma, yeni genetik özellikleri türlere aktarma olarak belirlenebilir (Kreft ve Wimpenny 2001). Bu etkilerden bazılarına aşağıda değinilmiştir.

2.2.1 Çevrenin Zararlı Etkilerinden Korunma

EPS yapısı birçok bakteri topluluklarında iyon değiştiricisi olarak kullanılarak çeşitli antibiyotik ajanların biyofilmin içerisine girmesini engeller. Aynı zamanda biyofilmi; UV ışığı, pH değişikliği, osmotik şok ve kuruma gibi çevresel streslerden korur.

Doğal ve endüstriyel ortamlarda büyüyen biyofilmler; çeşitli kimyasal biyositlere karşı duyarlıdırlar. Tıbbi alanda ise, hareketsiz bakteriyel hücreler canlı konak savunma sistemine karşı durmakta ve planktonik bakterilerden daha fazla dirençlidir. Planktonik bakteriler ile bakteriyel biyofilmler arasında antibiyotik dirençliliği farklıdır, bakteriyel biyofilmlerin antibiyotiklere direnci neredeyse 10-1000 kat fazladır (Costerton ve ark 1999).

2.2.2 Besin Elde Etme

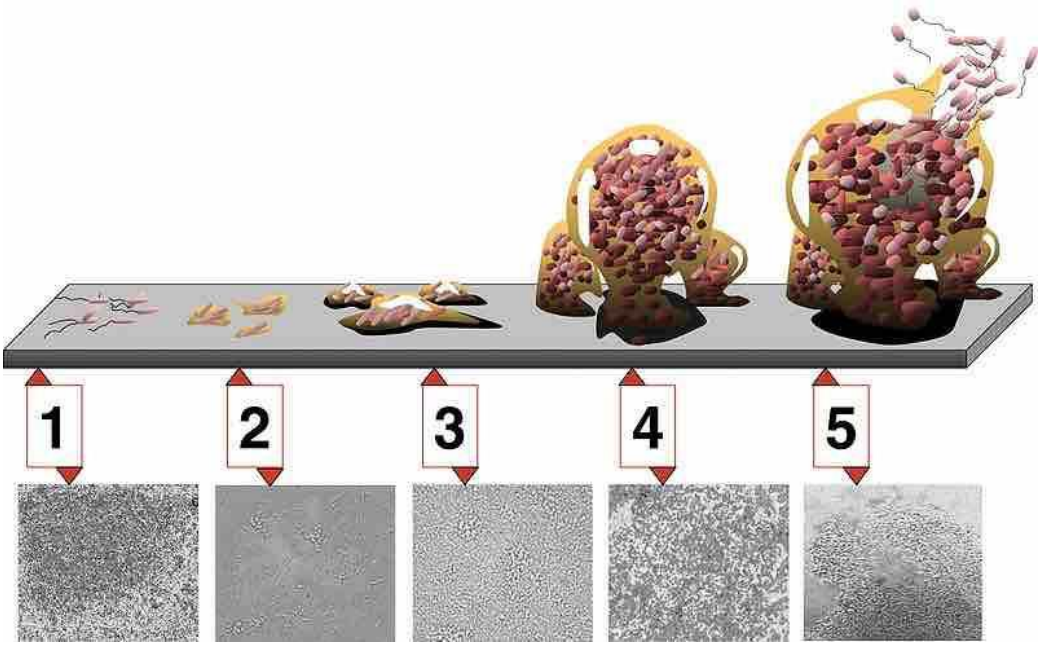
Biyofilm içinde mikrokolonileri birbirinden ayıran su kanalları bulunur ve bu kanallar sayesinde kolonilere eşit besin sağlanmakla birlikte yüksek toksik metabolitler uzaklaştırılır. EPS, çevredeki besin maddelerini (C - N - PO_4 gibi) bakterilerin kullanması için konsantre eder (Fisher ve Phillips 2009)

2.2.3 Yeni Genetik Özelliklerin Kazanılması

Yatay gen transferi mikrobiyal toplulukların gelişimi açısından ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum özellikle bakterilerin birçok ilaca karşı direnç kazanmasına imkân sağlar. Ayrıca biyofilm kolonilerinin içerisindeki bakterilerin konjugasyon yapmasına olanak tanır (Davey ve O'Toole G 2000).

2.3 Biyofilmlerin Oluşum Basamakları

Biyofilm oluşumu, birbirini takip eden fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçlerin bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Değişik çevrelerde oluşan biyofilmlerin yapısı, kompozisyonu ve mikro klonilerin aktiviteleri farklı olmasına rağmen mikro toplulukların gelişim aşamaları aynı basamakları takip etmektedir. Biyofilm oluşumu 5 basamakta incelenebilir (Srey ve ark 2013).



Şekil 2.1: Biyofilmlerin oluşum basamakları (Srey ve ark 2013)

2.3.1 Dönüşümlü Tutunma

Flagellar hareketlilik, bakterilerin yüzeye yakın hidrodinamik ve elektrostatik kuvvetleri engellemesine yardımcı olurken, abiyotik yüzeylere ilk bakteri yapışmasının, bakteriyel zarfın kendisi ile genellikle akışkanlar tarafından şartlandırılan substrat arasındaki fizikokimyasal ve elektrostatik etkileşimlere büyük ölçüde bağlı olduğu düşünülmektedir. Bakteriler ve yüzey arasındaki itme ve çekme kuvvetleri, bakterilerin yüzeye geri dönüşümlü yapışmasına neden olur; bakterilerin çoğu, yüzeyleri hafif kaygan veya bakterinin kendi hareketliliği nedeniyle planktonik faza katılmaya meyillidir (Dunne 2002). İlk başta bir yüzey üzerinde biyofilm oluşumunu sağlayan yapışkan hücreler küçük bir miktar hücre dışı polimerik maddeye (EPS) sahiptir ve birçoğu bağımsız hareket edebilmektedir (O'Toole ve Kolter 1998). Bu aşamada bağlı mikroorganizmalar henüz biyofilm oluşumuna yol açan ve bir dizi morfolojik değişiklik olan farklılaşma sürecine bağlı olmadığından ve hücrelerin çoğu yüzeyden ayrılıp planktonik yaşam tarzına döndüğü için yapışma geri dönüşümlüdür. Bu dönüşümlü tutunma ortamın hem pH'sına hem de iyonik kuvvetlere bağlıdır (Stoodley ve ark 2002). Yüzey özellikleri bakteri yapışmasında önemli bir rol oynar. Teflon veya plastik gibi yüzeylerin bakteri ile cam ve metal gibi hidrofilik yüzeylerden daha fazla kolonize olma olasılığı vardır (Fletcher 1988, Danese ve ark 2000).

2.3.2 Dönüşümsüz Tutunma

Dönüşümsüz tutunma basamağı bakterilerin oluşturduğu EPS yardımıyla herhangi bir canlı ya da cansız yüzeyle yapmış oldukları zayıf bağlanmaların kalıcıya dönüşmesidir. Mikrobiyal EPS, kimyasal bileşimde oldukça çeşitli olabilen biyosentetik polimerler olup proteinler, nükleik asitler ve fosfolipidler içerebilirler(Stoodley ve ark 2002). Bakteriler ve yüzey arasında bağlanmaya etkili olan etkileşimler; hidrofobik etkileşimler, dipol-dipol etkileşimler, iyon- dipol etkileşimler, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen bağları gibi fiziksel olaylardır (Poulsen 1999).

2.3.3 Koloni Oluşumu

Mikrokoloni oluşumu eşzamanlı birikim ve mikroorganizmaların büyümesinden kaynaklanır ve güçlenmesine yardımcı olan EPS üretimi ile gerçekleşir (Chmielewski ve Frank 2003), bakteri ve substrat arasındaki bağın güçlendirilmesine yardımcı olan ve

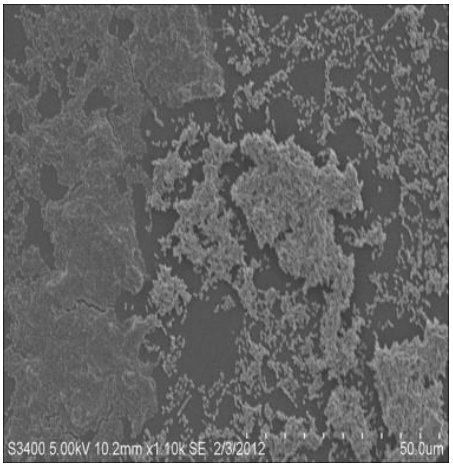
koloniyi herhangi bir çevresel strese karşı stabilize eder (Donlan 2002). Doğal bakteri sistemlerinin çalışması, birikmesi hücre-hücre arası iletişim olan (Quorum Sensing) sayesinde olur (McLean ve ark 1997).

Bu Quorum Sensing sayesinde planktonik hücreler sinyal molekülleri salgılayarak bakterilerin yüzeyde birikerek koloni oluşturmasını sağlar. Bu aşamada bakteriler herhangi bir yüzeyde ilk koloniyi oluşturduktan sonra diğer bakteriler ikinci koloni oluşturmaya başlar ve bu şekilde biyofilm büyüdükçe EPS içerisinde birleşmiş mikroorganizmalarda da artma olur (Poulsen 1999).

2.3.4 Biyofilm Olgunlaşması

Biyofilm olgunlaşması, bağlı olduğu besin kaynağına bağlı olarak düz veya mantar şeklinde olabilen organize bir yapıya dönüşen adımdır (Chmieleewski 2003).

Yapısal olgunluğa ulaşmak için 10 gün veya daha uzun süreler gerekir(Stoodley ve ark 2002). Bakteriler, açık su kanalları ile dağılmış, heterojen, kompleks-kapalı mikro-kolonilerde sapsız formda büyürler. Bu su kanalları koloniler arasında besin alış verişini sağlar (Davey ve O'Toole G 2000).



Şekil 2.2: Belli bir olgunluğa ulaşmış biyofilm tabakasının mikroskop görüntüsü (Chmieleewski 2003)

2.3.5 Biyofilm Oluşturan Hücrelerin Koparak Ayrılması (Dispersiyon)

Dispersiyon, biyofilm oluşum döngüsünün son basamağıdır ve hücrelerin planktonik formlarına geri dönmelerini sağlar (Sauer ve ark 2002). Artan akış gücü, hücre içi enzimatik degradasyon gibi dahili biyofilm işlemleri veya EPS yüzey bağlayıcı proteinin salınımı gibi dış bozulmalar, biyofilm ayrılmasının olası nedenleridir(Stoodley ve ark 2002, Kaplan ve ark 2003, Kaplan ve ark 2004). Ayrıca açlık aynı zamanda bir kopma nedeni olarak da kabul edilir ve bakterilerin besin açısından zengin bir ortam aramasına izin verir (O'Toole ve ark 2000).

2.4 Quorum Sensing ve Mekanizması

Bakteriler, ilk tanıımlandıklarında türlerinin diğer üyelerinden bağımsız olarak çalışan ilkel ve tek hücreli organizmalar olduğu düşünülmekteydi (Donabedian 2003). 1970'lerde dikkat çekici bir çalışma serisi, iki serbest yaşayan deniz bakteri türü olan *Vibrio harveyi* ve *Vibrio fischeri*'nin, bazı balıkların ve mürekkep balıklarının biyolüminesans organlarında yüksek yoğunlukta toplandıklarında ışık ürettiklerini göstermiştir. Deniz suyunda, bu bakteriler mililitre başına 100 bakteriden az bulunur (Fuqua ve ark 1996). Bu bakteriler sadece bu yüksek yoğunluklarda ışık yayarlar ve bu yoğunlukları besinlerin tükenmesi ile değil, yoğunluklarını yansıtan bir molekülün yüksek konsantrasyonlarını algılayarak tespit edebilirler. Biyolüminesans organlar, balık tarafından bir arkadaşı çekmek için kullanılır. Kalamar, siluetini denizin mehtaplı yüzeyine karşı azaltmak için ışık kullanır ve böylece yırtıcı hayvanlara karşı görünürlüğünü azaltır (Melissa B. Miller ve Bassler 2001). Her vibrio, türlerin yoğunluğunun bir göstergesi olarak işlev gören kendi N-açilhomoserin laktonunu (AHL) sentezler. Şaşırtıcı bir şekilde, *V. harveyi* ve *V. fischeri*, kendi AHL'lerinden yeterince yüksek bir konsantrasyon tespit etmedikleri sürece ışık yaymazlar. Bu nedenle, her bir bakterinin davranışı, kendi türünün varlığından ve daha spesifik olarak, ışık oluşumunu değerli kılmak için yeterli türdeki yoğunluğundan etkilenir (H. 2003).

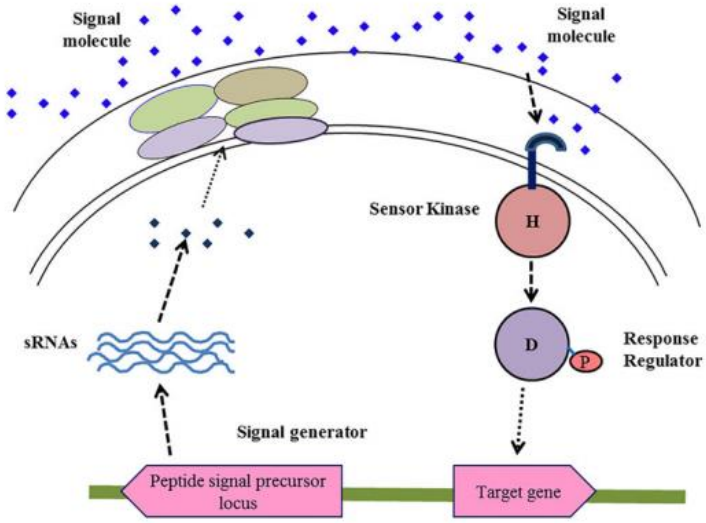
2.4.1 Gram (-) negatif ve Gram (+) pozitif Bakterilerde Quorum Sensing

Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler Quorum Sensing özelliğini kullanır. Gram-pozitif sistemler tipik olarak, gen ekspresyonundaki değişiklikleri yönlendiren, membran bağlı sensör kinaz reseptörleri ve sitoplazmik transkripsiyon

faktörlerinden salgılanan oligopeptitleri ve iki bileşenli sistemleri kullanır (Papenfort ve Bassler 2016).

Hemen hemen bilinen tüm Gram negatif bakterilerde Quorum Sensing sistemlerinde dört ortak özellik bulunur. İlk olarak, bu tür sistemlerdeki oto indüktörler açil-homoserin laktonlar (AHL'ler) veya S-adenosil-L-metiyonin (SAM) sentezlenen diğer moleküllerdir ve bakteriyel membrandan serbestçe dağılabilirler. İkinci olarak, oto indüktörler ya iç zarda ya da sitoplazmada bulunan spesifik reseptörler tarafından bağlanır. Üçüncüsü, Quorum Sensing tipik olarak çeşitli biyolojik işlemlerin temelini oluşturan pek çok geni değiştirir. Dördüncüsü, otomatik azaltma adı verilen bir işlemde, Quorum Sensing otomatik algılayıcı tarafından yönlendirilen aktivasyonu, popülasyonda senkronize gen ekspresyonunu teşvik etmek için önerilen bir ileri besleme halkası oluşturan otomatik algılayıcının sentezini arttırır (Ng ve Bassler 2009).

Çeşitli süreçlerin Quorum Sensing tarafından Gram-pozitif bakterilerde, örneğin *B. subtilis* ve *S. pneumoniae*'de genetik yeterlilik; virülans yanıtı ve *S. aureus*'ta antimikrobiyal peptid üretimi vb. gibi temel amaçlara sahip olarak düzenlendiği bildirilmektedir. Gram pozitif bakterilerde, QS bağımlı düzenleyici mekanizma, kararlı bir ATP bağlama kaseti (ABC) taşıyıcısı tarafından salgılanan öteleme sonrası olarak modifiye edilmiş bir peptid kullanır. Bu bakterilerdeki algılama ve yanıt mekanizması, LuxR benzeri transkripsiyon regülatörlerinin genel algılama/yanıt mekanizmasından farklıdır ve bakterilerin çevresel koşullardaki değişikliklere uyum sağlamasını ve fosforilasyon/defosforilasyon kaskadları ile röle sinyallerine uyum sağlamasını sağlayan iki bileşenli adaptif yanıt yolu aracılık eder. İki bileşenli sistemde, zara bağlı bir sensör kinaz proteini otofosforilasyon ile sinyal iletimini başlatır ve daha sonra fosfat grubunun bir yanıt düzenleyici proteine transferini müteakip hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (Kleerebezem ve ark 1997). Gram-pozitif bir QS genel şeması, **Şekil 2.3**'de gösterilmiştir.



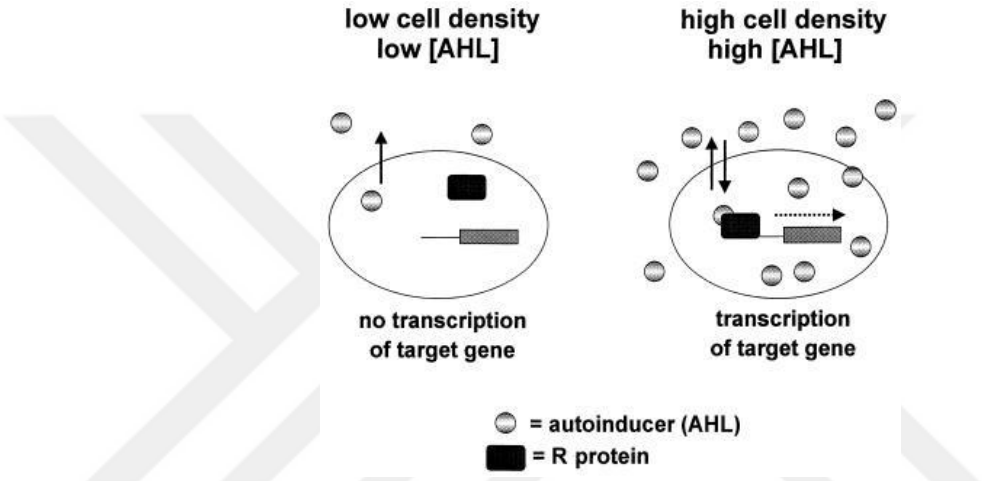
Şekil 2.3: Gram pozitif QS peptidi sinyalleri için genel bir model ve iki bileşen sinyal iletimidir. Membran bağlanma sensörü kinaz proteini, oto fosforilasyon ile sinyal iletimini başlatır ve bir yanıt düzenleyici protein, akış aşağı hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol eder (Haque ve ark 2019).

Gram negatif bakterilerdeki oto indüktörlerin çoğu N-asil homoserin laktonlar (HSL) iken Gram pozitif bakteriler tarafından kullanılanlar genellikle küçük peptitlerdir (AIP); ve genel dinamikler benzer olmakla birlikte, detaylar çok farklıdır: Tipik olarak, hücre dışı HSL hücreye serbestçe yayılır ve transkripsiyonel bir aktivatör olan spesifik bir hücre içi reseptör proteinine bağlanır. Bu bağlanma, HSL sentezini belirleyenler de dahil olmak üzere düzenlenmiş genlerin transkripsiyonunu aktive eden form olan dimerlerin oluşumuna izin vererek proteinin allosterik olarak açılmasına neden olur (Fuqua ve ark 2001). Hücre dışı AIP'ler, hücreye girmezler, ancak hareket halindeyken hedef genlerin aktivasyonu (veya bastırılması) ve ayrıca AIP'nin kendi sentezi ile sonuçlanan klasik bir sinyal iletim yolu oluşturan spesifik polipik transmembran reseptörlerine bağlanırlar (Novick ve ark 1995).

Vibrio'da başlangıçta tarif edilen sistem iki geni içerir: Luxl ve luxR. Luxl, bir otomatik indükleyici homoserin laktonunu sentezleyen bir enzimi kodlar. Bir lakton, bir karboksil grubu, aynı molekül içindeki bir hidroksil grubu ile esterlendiğinde oluşan bir siklik moleküldür. *V. fischeri* ve *V. harveyi*'nin AHL'leri, N-asil yan zincirine bağlı sübstitüentlerde farklıdır. *V. fischeri*, 3-okso-C6-homoserin lakton ve *V. harveyi* 3-hidroksi-C4-homoserin lakton üretir. Oto-indükleyen moleküllerin tümü lakton değildir, fakat çoğu basit bir siklik yapıya sahiptir. Moleküllere oto-indüktörler denir, çünkü

metabolizmasını düzenledikleri aynı hücre tarafından üretilirler (de Kievit ve Iglewski 2000).

AHL, vibriolardan yayılır ve LuxR geni tarafından kodlanan bir proteine bağlanır. Otomatik indükleyiciye bağlandığı zaman LuxR proteini, ışık üretiminde rol oynayan genlerin transkripsiyonuna ve daha fazla otomatik indükleyiciyi sentezleyen daha fazla Luxl proteinine izin verir. *V. fischeri* ve *V. harveyi*'de bulunan bu iki bileşenli temel gen sistemi, bitki ve omurgalı hayvanların patojenleri dahil olmak üzere birçok bakteri türünde homologlara sahiptir (Gray ve Garey 2001).

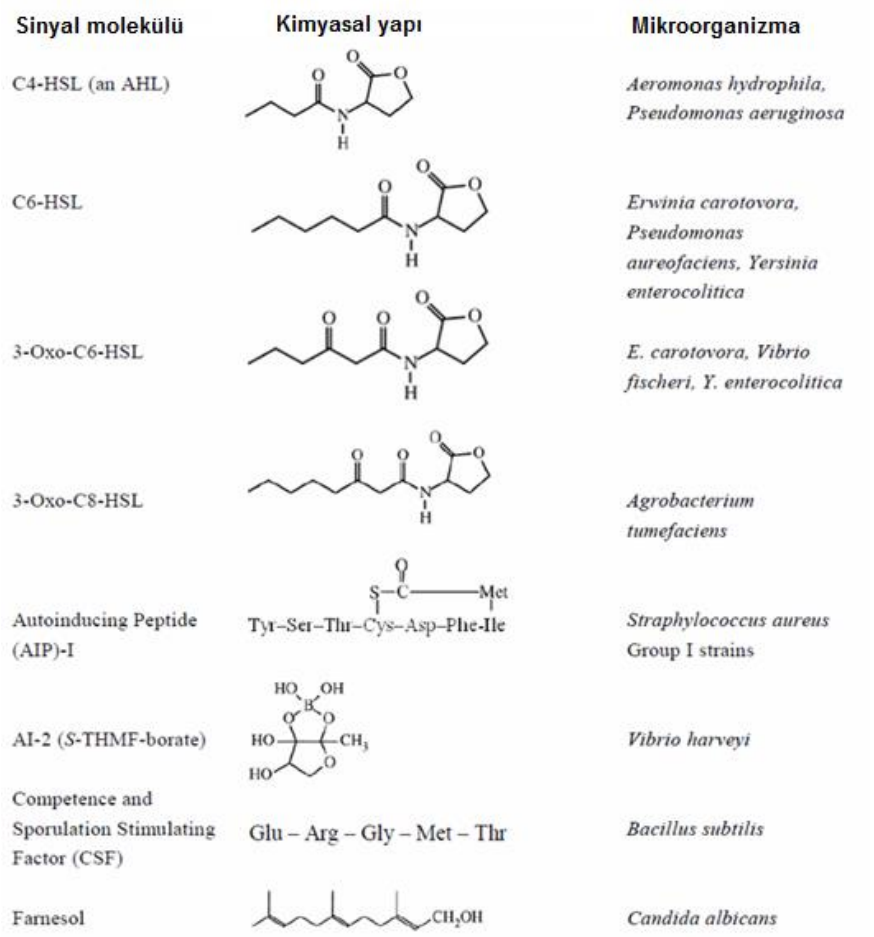


Şekil 2.4: AHL'nin Lux R geni ile proteine bağlanması (de Kievit ve Iglewski 2000)

Gram negatif organizmalarda Quorum Sensing algılaması iki düzenleyici bileşeni içerir: transkripsiyonel aktivatör proteini (R proteini) ve otoindüktör sentaz tarafından üretilen AI molekülü. AI birikimi, bir eşik seviyeye ulaşılıncaya kadar hücre yoğunluğuna bağlı bir şekilde gerçekleşir. Bu sırada AI, gen ekspresyonunu indükleyen R proteinine bağlanır ve aktive olur. R proteini iki alandan oluşur: AI ile etkileşime giren proteinin N terminali ve DNA bağlanmasında yer alan C terminalidir. Tipik olarak, Gram-negatif AI molekülleri, N -asil-HSL'lerdir; Bununla birlikte, diğer sinyal molekülü tipleri de mevcuttur (de Kievit ve Iglewski 2000).

Bakterilerin belirli genleri eksprese etmelerinde ancak türlerinin yoğunluğu yeterince yüksek olduğunda bir avantajı vardır. Bunun anlamı, istilacı organizmaların yoğunluğu bakteri için uygun bir metabolik değişiklik yapacak kadar yüksek olduğunda bazı patojenik mekanizmaların daha etkili olmasıdır. Yoğunluğa bağlı bir değişimin değeri, diğer bakterilerden DNA'yı ekleme kabiliyetine ancak belirli bir bakteri

yoğunluğunda eksprese edilmesine izin verilen *Streptococcus pneumoniae* gibi bazı türlerde belirgindir (Pestova ve ark 1996).



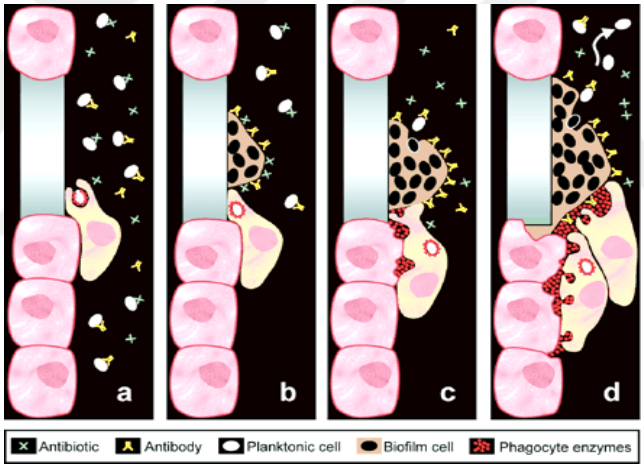
Şekil 2.5: Bazı sinyal molekülleri(http://aquafind.com/articles/Quorum_sensing.php)

2.5 Biyofilme Bağlı Enfeksiyonlar

Günümüzün akut enfeksiyonları, sıklıkla antibiyotiklerle etkili bir şekilde tedavi edilebilir (antibiyotiğe dirençli bir suşun neden olduğu enfeksiyon durumları hariç) ve biyofilm içerdiği düşünülmez. Bununla birlikte, hafif derecede tehlikeye giren bireyleri etkileyen bulaşıcı hastalıkların yarısından fazlası, insan vücuduyla uyumlu veya çevremizde yaygın olan bakteri türlerini içerir. Örneğin, cilt bakterisi *Staphylococcus epidermidis* ve sucul bakterisi *Pseudomonas aeruginosa* tehlike altındaki konaklarda yıkıcı kronik enfeksiyonlara neden olabilir (Costerton ve ark 1995). Cihaza bağlı enfeksiyonlarda tıbbi cihazların yüzeylerinin elektron mikroskopisi ile incelendiğinde

çok sayıda yapışkan bakterilerin varlığı görülmüştür (Costerton ve ark 1994). Cihazla ilgili olmayan kronik enfeksiyonlardan alınan doku örnekleri de ayrıca bir ekzopolisakkarit matrisi ile çevrili biyofilm bakterilerinin varlığını göstermiştir. Bu biyofilm enfeksiyonları, tek bir türden veya bakteri ve mantar türlerinin bir karışımından kaynaklanabilir (Costerton ve ark 1999).

Biyofilmler genellikle inert yüzeylerde gelişir ve tıbbi cihazlarda, ölü kemik parçaları gibi doku fragmanlarında görülmekle beraber endokarditte olduğu gibi canlı dokularda da oluşabilirler (Lambe ve ark 1991). Biyofilmler bir yerde yavaş büyür ve enfeksiyon semptomları yavaş ortaya çıkar. Sesil bakteri hücreleri, antijenleri serbest bırakır ve antikorların üretimini uyarır, ancak antikorlar, biyofilmler içindeki bakterileri öldürmede etkili değildir ve çevre dokularda immün kompleks hasarına neden olabilir (Ward ve ark 1992).



Şekil 2.6 : Bakteriyel Biyofilm Diyagramı (Costerton ve ark 1999).(a) Planktonik bakteriler, antikorlar ve fagositler tarafından temizlenebilir ve antibiyotiklere duyarlıdır.(b) Yapışkan bakteriyel hücreler, tercihen inert yüzeylerde biyofilm oluşturur, bu sesil topluluklar antikorlara, fagositlere ve antibiyotiklere karşı dirençlidir.(c) Fagositler biyofilmlere yönelir. Fagositoz engellenmiştir ancak fagositik enzimler serbest bırakılmaktadır. (d) Fagositik enzimler biyofilm etrafındaki dokulara zarar verir ve planktonik bakteriler biyofilmden salınır. Komşu dokuda yayılım ve akut enfeksiyona neden olur.

Biyofilm enfeksiyonları, immün sistemi mükemmel olan kişilerde bile, konakçı savunma mekanizmaları tarafından nadiren çözülür. Antibiyotik tedavisi tipik olarak biyofilmden salınan planktonik hücrelerin neden olduğu semptomları tersine çevirir, ancak biyofilmi öldürmez (Marrie ve ark 1982). Bu sebepten dolayı biyofilm enfeksiyonları tipik olarak, antibiyotik tedavisi döngülerinden sonra, sesil popülasyon vücuttan cerrahi olarak çıkarılıncaya kadar tekrar eden semptomlar gösterir. Planktonik

bakteri hücreleri biyofilmlerden salınmasıyla birlikte mobilize konak savunması enfeksiyon sırasında herhangi bir zamanda salınan planktonik hücreleri ortadan kaldıramazsa, biyofilmler konağa yerleşerek akut enfeksiyona neden olurlar (Dasgupta ve Costerton 1989).

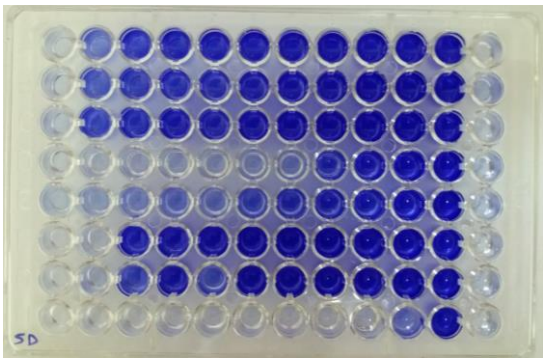
2.6 Biyofilm Tayin Metodları

Biyofilm oluşumunu gösteren en eski yöntemlerden birisi Christensen boyama yöntemidir ve hala günümüzde kullanılmaktadır (Christensen ve ark 1982). Biyofilmleri kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirmek için farklı yöntemler kullanılmıştır her bir yöntem biyofilm yaşam tarzının kendine özgü bir yönünü ayırt etmekte kullanılmıştır (Archer ve ark 2011). Bunlar; metabolik, moleküler ve fiziksel yöntemler olmak üzere üçe ayrılırlar.

2.6.1 Boyama Teknikleri

2.6.1.1 Kristal viyole tekniği:

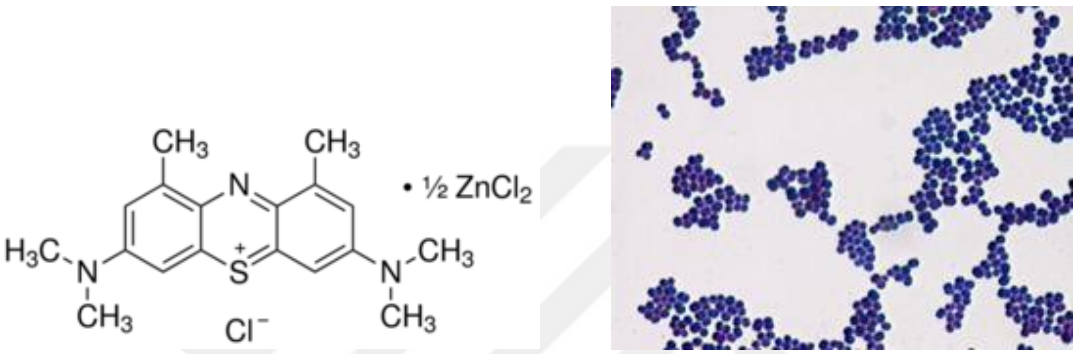
Kristal viyole (CV) boyama, biyofilm biyokütle ölçümü için kabul edilen ilk yöntemlerden biridir (Christensen ve ark 1985). Kısaca, bu yöntem negatif yüklü moleküllerin, bazik boya olan kristal viyole ile boyanmasından oluşur. Kristal viyole, EPS nin negatif yüklü polisakkarit yüzeyine bağlanır (Li ve ark 2003). Boyandıktan sonra CV etanol ve asetik asit gibi bazı çözücüler yardımı ile elimine edilir. Daha sonra spektrofotometre ile 570-590' nm de ölçümü yapılır. Bu yöntemle hem canlı hem de cansız hücreler tespit edilir (Pantanella ve ark 2007).



Şekil 2.7: *Staphylococcus aureus*'un oluşturduğu biyofilmin CV boyaması

2.6.1.2 1,9-dimetil metilen mavisi (DMMB)

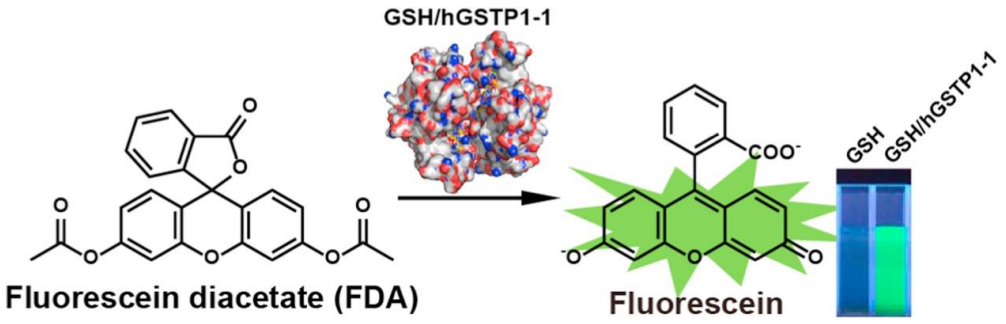
Bu yöntem, *S.aureus* biyofilmleri için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir (Tote ve ark 2008). Katyonik bir boya olan 1,9-dimetil metilen mavisi *S. aureus*'un oluşturduğu biyofilm tabakasındaki, ekstrasellüler matriksin yapısında bulunan poli-β-1,6 bağlarıyla bağlanmış N-asetilglukozaminleri spesifik olarak boyamaktadır (Tote ve ark 2008). Boyanın glikozaminoglikanlar (GAG) ile bağlanması maksimum 525 nm de absorbsiyon veren bir kompleksin oluşumuyla değerlendirilir(Stone ve ark 1994).



Şekil 2.8: 1,9 Dimetil metilen mavisinin kimyasal yapısı ve DMMB ile boyanmış bakteriler.

2.6.1.3 Florasan di asetat (FDA)

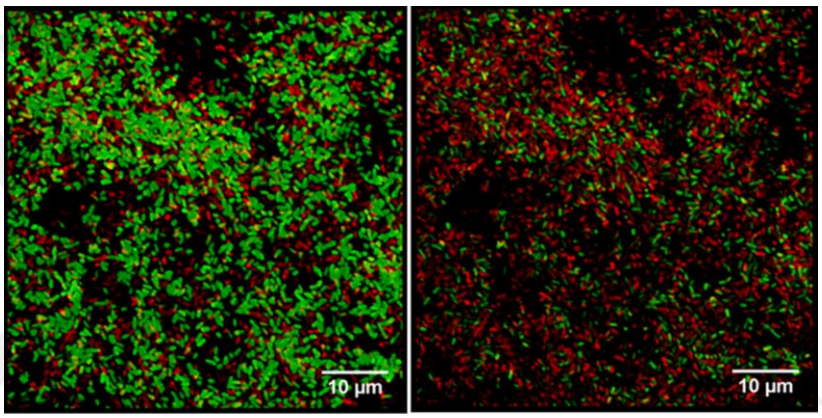
Bu boya hücre zarını renksiz olarak boyar. Bakteri FDA boyasını aldıktan sonra, hücresel esterazlar ile flüoresanı flüoresin'e hidrolize eder ve spektrofotometrik ölçülür. Ölü hücreler FDA'yı metabolize edemediğinden floresan sinyali vermezler. Kolay ve pahalı olmamakla birlikte, bu yöntem yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu metot sınırlı inceleme alanı ve biyofilm kalınlığı göz önüne alındığında özellikle olgun biyofilmler üzerinde kantitatif çalışmalar için uygun değildir (Pantanella ve ark 2013).



Şekil 2.9: FDA'nın kimyasal yapısı ve metabolizması (Fujikawa ve ark 2017)

2.6.1.4 Canlı / Ölü (Live/Dead BacLight) Bakteri boyama yöntemi

Bu yöntem, nükleik asite bağlanan iki farklı boyanın kullanıldığı bir yöntemdir. İlk boya, tüm bakteri zarlarını geçebilen ve hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerin DNA'sına bağlanan yeşil flüoresan Syto9 boyasıdır. İkinci boya yalnızca hasarlı bakteri zarlarını geçebilen kırmızı flüoresan propidium-iyodür'dür. Boyanan numuneler, canlı ve ölü bakteri popülasyonunu değerlendirmek için bir flüoresan optik mikroskopi kullanılarak gözlenir. Nitekim canlı bakteriler yeşil renkte, ölü bakteriler ise turuncu / kırmızı renktedir (Boulos ve ark 1999, Jin ve ark 2005).



Şekil 2.10: LIVE / DEAD bac light bakteriyel canlılık kiti kullanılarak boyanmış *P. aeruginosa* biyofilmlerinin konfokal lazer tarama mikroskopi görüntüleri. Yeşil canlı bakterileri ve kırmızı ölü bakterileri gösterir. (a) hücrelerin çoğu yeşil renkte boyanarak yüksek düzeyde bakteri canlılığı gösterir. (b) hücrelerin çoğu kırmızı floresanlarla belirlenmiş ölü hücrelerdir (Rudilla ve ark 2018).

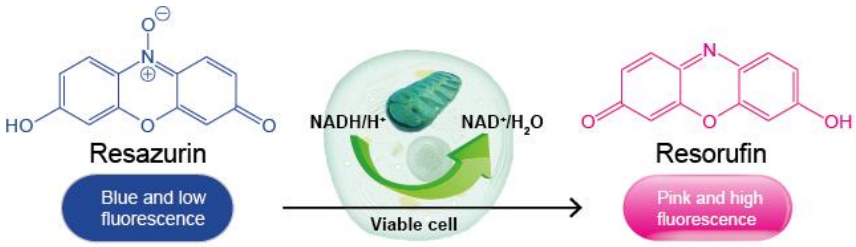
2.6.2 Metabolik Yöntemler

Biyofilm deneylerinde kullanılan metabolik yöntemler şunlardır:

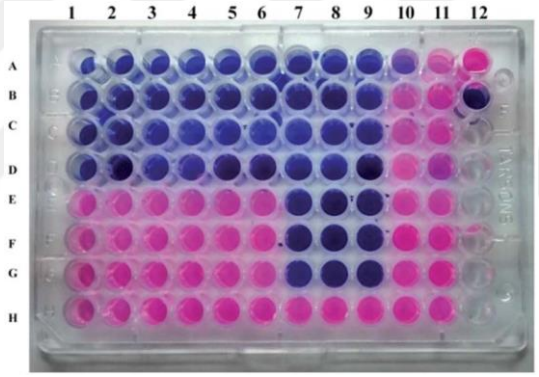
2.6.2.1 Resazurin Yöntemi

Resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) canlı hücrelere zarar vermeyen biyolojik bir boyadır. Alamar Mavisi olarak da bilinen mavi ve flüoresan özellik göstermeyen resazurin, hücresel metabolik aktivite sonucunda pembe flüoresan özelliği olan resorufine (geri dönüşsüz işlem) indirgenir. Pembe-floresan resorufin,

spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu özelliğinden dolayı resazurin, antimikrobiyallerle ilgili birçok çalışmada canlı mikroorganizmaları tespit etmek ve biyofilmdeki canlı hücre sayısını ölçmek için kullanılmıştır (Pantanella ve ark 2013).



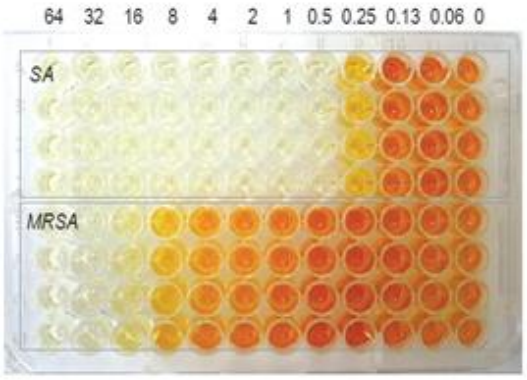
Şekil 2.11: Rezasurin boyasının kimyasal yapısı ve metabolizması (https://www.creative-bioarray.com).



Şekil 2.12: Mikroplakada rezasurin boyasıyla canlı hücrelerin tespit edilmesi (Subramaniam ve ark 2015)

2.6.2.2 XTT Yöntemi

Bu yöntem bir redoks indikatörü kullanılarak spektrofotometrik yöntemle biyofilm tabakasındaki canlı hücreleri görmeyi sağlar. Kısaca, bu yöntem canlı hücrelerin mikrobiyal solunum metabolizmasının sonucunda 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfonil)-2H-tetrazolyun-5-karboksianilit tuzunu suda çözünebilen formazana indirger. Biyofilmdeki canlı bakteri sayısı, XTT'nin metabolik indirgenmesinden sonra süpernatanın absorbansını ölçerek bulunabilir. Bu yöntemin ana sınırlamaları, biyofilm yapısının karmaşıklığı ve heterojenliği ile ilgilidir (Adam ve ark 2002).



Şekil 2.13: XTT yöntemiyle boyanan biyofilm bakteri çalışması.

2.6.2.3 BioTimer yöntemi (BTA)

BTA, biyofilm içerisindeki canlı bakterileri saymayı sağlayan bir kolorimetrik analiz yöntemidir. BTA fenol kırmızısı içeren spesifik bir reaktif içermektedir. Primer fermentasyon metabolizmasının mikrobiyal sentezi sonucunda spesifik reaktifin rengi kırmızıdan sarıya değişir. BTA'ya özgü reaktifin renk değişimi için gereken süre, başlangıçtaki bakteri konsantrasyonuna, bakteri cinsine ve numunede bulunan bakteri sayısına bağlı bir korelasyon izler. BTA düşük maliyetli, kolay uygulanabilen bir yöntemdir ve biyofilmdeki canlı bakterileri saymak, yiyeceklerin mikrobiyolojik kalitesini doğrulamak ve biyofilmin antibiyotik duyarlılığını değerlendirmek için de uygulanır (Frioni ve ark 2010, Pantanella ve ark 2011).



Şekil 2.14: BTA yöntemi ile biyofilm oluşturan hücrelerin tespiti (Samaha ve ark 2017)

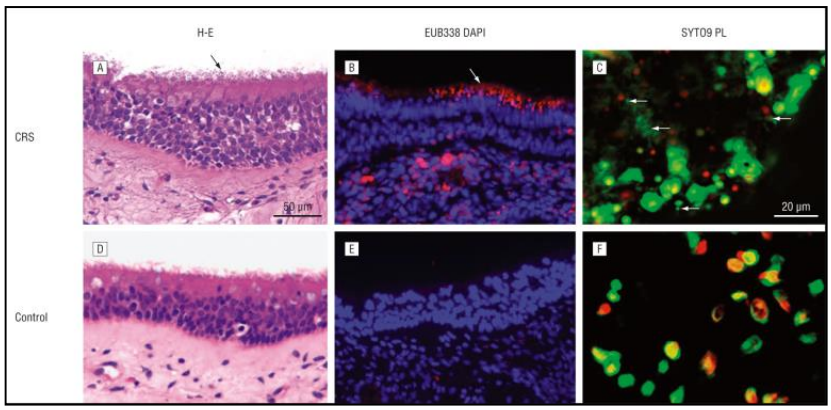
2.6.3 Genetik Yöntemler

2.6.3.1 PCR Yöntemi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), teşhis yöntemi olarak yaygın şekilde kullanılır. Biyofilmde bu yöntem, ayrı ayrı bakteri türleriyle ilgili spesifik genetik dizilerin varlığını etkili bir şekilde tanımlamaya olanak sağlar. PCR, biyofilm nicelik çalışmaları için uygun değildir sebebi ise hem canlı hem de ölü hücrelerin çoğaltılması, canlı hücrelerin sayımı için bize olanak tanımaz. Ayrıca, PCR'ın yüksek duyarlılığından dolayı hatalı pozitif sonuçlar vermektedir (Sheridan ve ark 1998, Warwick ve ark 2004).Bu problemlerin üstesinden gelmek için "Gerçek Zamanlı Kantitatif-Ters TranskripsiyonPCR" (qRT-PCR) kullanılır. qRT-PCR, günümüzde en güçlü ve hassas gen analizi tekniklerinden biridir. Geleneksel PCR analizinde, sonuçlar reaksiyonun sonunda toplanırken qRT-PCR analizi sırasında, floresan sinyal her amplifikasyon döngüsünde gerçek zamanlı olarak ölçülür ve üretilen amplikonların sayısı ile doğrudan orantı verir. qRT-PCR yalnızca belirli bir alanı tespit etmek için değil aynı zamanda belirli bir miktarı ölçmek için de uygulanır (Guilbaud ve ark 2005).

2.6.3.2 FISH Yöntemi

Flüoresans in situ Hibridizasyon (FISH) tekniği, flüoresan boyaları ile işaretlenmiş oligonükleotit problarını kullanan genetik bir uygulamadır. Bu yöntemde problar, özellikle canlı hücrelerde bol miktarda bulunan rRNA'yı bağlamak için kullanılır. Genetik yaklaşım sayesinde, bu yöntem çok alanlı biyofilm çalışmaları için de kullanılabilir (Thurnheer ve ark 2004, Machado ve ark 2012).

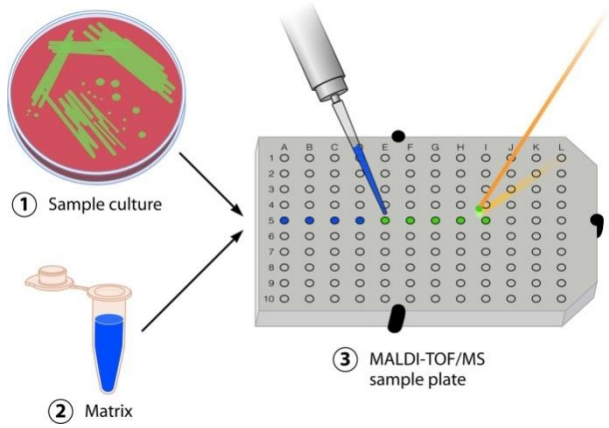


Şekil 2.15: FISH yönteminin mikroskop görüntüsü

2.6.4 Fiziksel Yöntemler

2.6.4.1 Kütle Spektroskopisi (MS, Mass spectrometry)

Kütle spektrometresi (MS), bilinen malzemeleri ölçmek ve farklı moleküllerin kimyasal özelliklerini ortaya çıkarmak için kullanılan güçlü bir analitik tekniktir. Kısaca, bu yöntemde, çalışılacak madde bir elektron ışını ile muamele edilir, böylece tüm moleküller gaz iyonlarının üretimi ile iyonize edilir. İyonlar daha sonra kütle spektrometresinde ayrılır ve kütle / yük oranları hesaplanarak karakterize edilir. Veriler, doğrudan kimyasal yapısıyla ilgili olduğundan, her bileşiğin tipik bir kütle spektrumunu vermektedir. Bu teknik hem niteliksel hem de niceliksel bir analiz sağlar (Takats ve ark 2004, Song ve ark 2009)

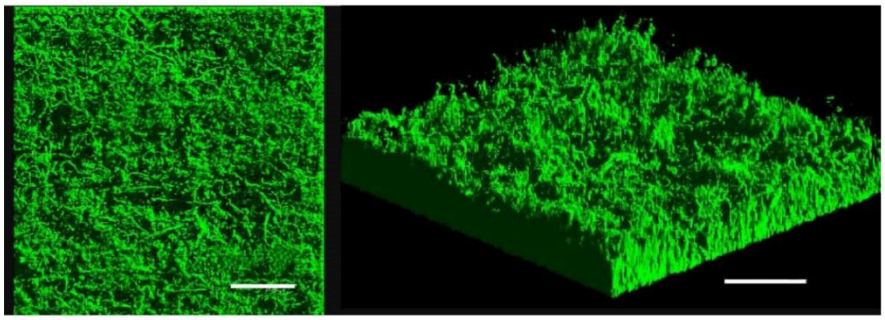


Şekil 2.16: MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri tayin metodu (Clark ve ark 2013)

2.6.4.2 Konfokal Lazer Tarama Mikroskopisi (CLSM)

Kalın numuneleri incelemek için özellikle biyoloji ve yaşam bilimlerinde yararlı olan, lazer ışınıyla donatılmış optik bir mikroskoptur. Konfokal lazer tarama mikroskobu teknolojisi, kalın bir biyolojik örneğin, X, Y ve Z eksenlerinde görüntülerini satır satır işleyerek bir mikrobial biyofilm görüntüsü oluşturur. Biyolojik numuneler genellikle spesifik flüoresan boya ile boyanır, böylece aydınlatılan noktadan flüoresan ışığı fotodiyot tarafından bir hedefte toplanır, toplanan ışık elektrik sinyalinde dönüştürülür ve bilgisayarda görüntülenir. Oluşan görüntü yüksek kontrast ve çözünürlüklü üç boyutlu görüntüdür. Bu teknik biyofilm araştırmalarında, özellikle de

EPS bileşenlerini incelemek için yaygın olarak kullanılır (Lawrence ve ark 1991, Karygianni ve ark 2012).



Şekil 2.17: *V. tapetis* CECT4600-GFP biyofilminin konfokal lazer tarama mikroskopisi (*CLSM*) gözlemi , üstten görünüm (solda) ve üç boyutlu görünümü (sağda) (Rodrigues ve ark 2018)

2.6.4.3 Konfokal-Raman Mikroskopisi (CRM)

Raman spektroskopisinde belirli dalga boylu elektromanyetik bir lazer ışını analiz edilecek numuneye çarpar. Saçılan ışınım maddenin enerji değişiminin ölçülmesini sağlar, böylelikle numunenin kimyasal özellikleri hakkında bilgi elde ederiz. Bununla birlikte, biyofilmin içindeki kalınlığı, derinliği araştırma zordur fakat Raman ve CLSM birleştirilerek, mikrobiyal biyofilm bileşimi üzerinde invazif olmayan çalışmalar yapmak mümkündür (Patzold ve ark 2006, Chao ve Zhang 2012).

2.6.4.4 Elektron mikroskobu (EM) teknikleri:

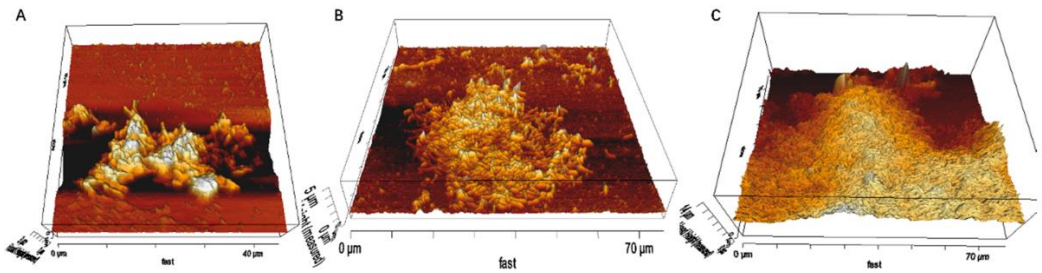
Bir elektron ışını, kısa dalga boylu ve yüksek enerjili radyasyon kullanımıyla daha yüksek çözünürlükte görüntü elde etmemizi sağlar. Taramalı elektron mikroskobu yüksek çözünürlüklü görüntü oluşturmak için vakum ortamında oluşturulan ve elektromagnetik lenslerle inceltilen elektron demeti ile analiz etme olanağı tanır. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM), biyofilmlerin ve hücre içi özelliklerin görüntülenmesi için benzersiz bir kolaylık sağlar, ancak numunenin ultra ince dilimler halinde hazırlanmasını gerektirir (Ridgway ve ark 1983, Allan-Wojtas ve ark 2010).

2.6.4.5 X-Işını Mikroskobu (XM) teknikleri

Numune, mono veya poli-kromatik, yumuşak bir X-ışını odaklı radyasyonla aydınlatılır. Biyolojik numunelerin herhangi bir spesifik hazırlıkları olmaksızın, EM'ye göre düşük radyasyon ile yüksek çözünürlüklü görüntüleme olanağı verir ve bilişimsel haritalanmasını yapar. Özellikle, tarama transmisyonu X-ışını mikroskobu (STXM), 25 nm nominal çözünürlükte bakteri hücreleri ve biyofilmlerin kompozisyonunu araştırmak için yaygın olarak kullanılmıştır (Hitchcock ve ark 2012).

2.6.4.6 Tarama probu mikroskopisi (SPM)

Numune, nanometrik bir prob sayesinde yüzeyinin yakın kısımları taranarak bize topografik bir görüntü sunar. Bu tekniklerin içinde bakteri hücreleri ve biyofilmler gibi mikrobiyolojiyi ilgilendiren konularda en çok atomik kuvvet mikroskobisi (AFM) kullanılır. AFM, nanometre ölçeğine kadar yüksek çözünürlük, inceleyeceğimiz numunenin tahribatsız analiz edilmesi, numune hazırlığının kolay olması gibi avantajlar sağlar. Ayrıca, bakterilerin yapışma özellikleri, bakteriyi substrattan ayırmak için AFM ucu kullanılarak kantitatif olarak incelenebilmeye olanak tanır. Son olarak, SPM'yi Raman spektroskopisi ile birleştiren SPM tabanlı bir teknik olan Tip-Enhanced Raman spektroskopisi (TERS), Raman sinyalinin SPM'nin nanometrik lateral çözünürlüğü ile tek noktadan elde edilmesini ve eşlenmesini sağlar (Bolshakova AV 2001, Beech ve ark 2002).



Şekil 2.18: Üç boyutlu Atomik Kuvvet Mikroskobu görüntüsü (Li ve ark 2016)

2.6.4.7 Christensen yöntemi (Kalitatif tüp testi)

Christensen ve arkadaşları tarafından 1982 ve 1985'de yapılmış testlerdir. Tüpteki 5 ml soy buyyon besiyerine, incelenecek bakteriden öze ile birkaç koloni alınarak inoküle edilir ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. Bakteri üremesini takiben tüpteki besiyeri boşaltılır ve boşaltılan her tüpe aynı miktarda 0.4'lük Trypan Blue veya Kristal Viyole boyası eklenir, elle yavaşça karıştırılır ve boya dökülür. Tüpler kurutma kağıtları üzerine ters çevrilerek kurumaları sağlanır. Tüp çevresinde oluşan mavi rengin koyuluk ve kalınlığına göre slime oluşumu +, ++, +++ pozitif, renk oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilir. Tüp testi değişken ve subjektiftir (Christensen ve ark 1982, Christensen ve ark 1985).



Şekil 2.19: Biyofilm tespiti için kalitatif test tüpü yöntemi 1- güçlü biyofilm oluşumu 2 orta biyofilm oluşumu 3- zayıf biyofilm oluşumu ve 4 biyofilm oluşumu yok (Rajalakshmi Ramachandran 2017).

2.6.4.8 Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Testi

Plastik mikroplakların çukurlarına bakteri suspansiyonu konarak inkubasyona bırakılır. Bu çukurların içi, daha sonra mikroplaklar ters çevrilerek boşaltılır. Fosfat tampon eriyiği (PBS) ile yıkandıktan sonra, her bir çukura metilen mavisi eklenir. Boya dökülür, PBS ile yeniden yıkama işlemi yapılır ve oda ısısında kurutulur. Mikroplaklar mikroelisa ile 490-492 nm dalga boyunda okunur. Beş kuyucuğa sadece steril-soy buyyon konarak, optik yoğunluk ölçümlerinin ortalaması alınır. Bu değerin üstünde olan kuyucuklar slime "pozitif" olarak değerlendirilir. Plastik doku kültür plakları ile slime oluşumunu kantitatif olarak inceleyen bir yöntemdir (Cengiz ve ark 2006).

2.7 *Staphylococcus* Türleri ve Özellikleri

Stafilokoklar, ilk kez Robert Koch tarafından 1878 yılında; yuvarlak, 0.5- 1.5 µm çapında, uniform olarak tanımlanmıştır. Üzüm salkımına benzeyen, tek tek olabildiği gibi, zincir halinde veya kısa zincir şeklinde de görülebilir (Madigan ve Martinko 2017). 1986' da Bergey'in ayrıntılı bir çalışma sonucunda yaptığı sistematik sınıflandırmaya göre Planokok, Mikrokok, Stamatokoklarla birlikte Micrococcacae ailesi içinde yer alır denmiştir, fakat daha sonra yapılan araştırmalar, genetik analizler ve taksonomik analizler sonucunda bu mikroorganizmaların Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı, Bacillales takımındaki Staphylococcaceae ailesi içinde sınıflandırılmıştır (Procop 2017). *Staphylococcus* cinsinde 30'dan fazla tür bulunmaktadır. Stafilokoklar fakültatif aerobik, hareketsiz, yüksek konsantrasyonda tuz içeren besiyerlerinde (%10 NaCl) ve 18-40 ºC aralıklarında üreyebilmektedir. Çoğu Staphylococci kolonisi, 24 saat içinde agar plakaları üzerinde büyür ve tipik olarak küçük, dairesel, tam ve beyaz veya bej pigmentlidir. *Staphylococcus sp*'in farklılaşması bakteriyel enfeksiyonların prognozunda ve tedavisinde önemlidir. Genellikle yapılan ilk test "koagülaz testi"dir. Bu, izole edilmiş bakterilerin plazması fibrinojeni bir fibrin pıhtısına dönüştürüp dönüştüremeyeceğini belirler ve koagülaz negatif *S. Epidermidis'*i daha baskın koagülaz pozitif patojen *S. aureus*'tan ayırt eder (Ng-Muk-Yuen 2008). 1881 yılında Alexander Ogston Stafilokoklar'ın farelerde hastalık yaptığını göstermiştir. 1940 yılında penisilinin klinik kullanıma başlamasıyla, tıp tarihinde önemli enfeksiyon nedeni bilinen stafilokokların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli yollar katedilmiştir (Yuksekdag ve Baltaci 2015).

2.7.1 Hücre Duvarı Yapısı

Stafilokok hücre duvarının kimyasal bileşimi diğer Gram pozitif bakterilere benzer. Kalınlığı genellikle 60-80 nm, oldukça homojen ve elektron bakımından çok yoğun olmayan tabakadan oluşur. Stafilokokların hücre duvarı; i) Peptidoglikan, ii) teikoik asit ve iii) protein olmak üzere üç yapıdan oluşur (Williams 1982).

2.7.1.1 Peptidoglikan

Gram-pozitif hücre duvarının %90'ı peptidoglikandan meydana gelmektedir. Peptidoglikan yaklaşık 50 nm genişlikte tel/ağ (ağ örgüsü)şeklinde ve hücre tarafından sentezlenmektedir.

Bakterilerin hücre duvarı, duvarın güçlü olmasından birinci derecede sorumlu olan sert bir tabaka içerir. Peptidoglikan olarak adlandırılan bu sert tabaka N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit olmak üzere iki tip şeker türevi ve L-alanin, D-alanin, D-glutamik asit veya L-lizin ya da yapısal olarak benzer bir molekül olan, diaminopimelik asit (DAP) olmak üzere az sayıda aminoasitten oluşur. Bu bileşenler tekrarlanan bir yapı olan ve glikan tetrapeptit olarak adlandırılan yapı ile birleşirler.

Uzun peptidoglikan zincirleri, hücreyi çevreleyen bir katman oluşturmak amacıyla birbirine bitişik şekilde biyosentezlenmektedir. Tekil zincirler, amino asitlerin çapraz bağları ile bağlanmaktadır. Şekerleri glikan dizinlerinde bağlayan glikozid bağlar kovalent bağlardır, fakat sadece tek yönde sertlik sağlamaktadır (Madigan ve ark 2012).

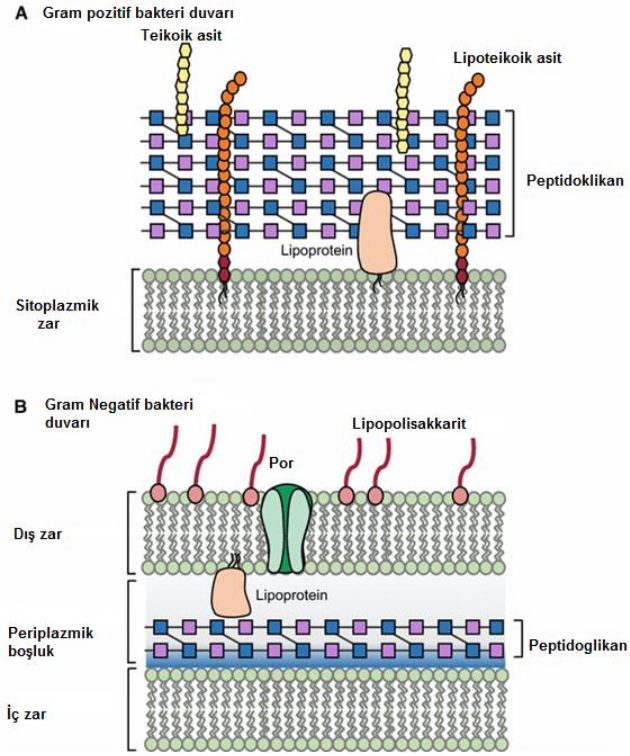
2.7.1.2 Teikoik Asit

Pek çok Gram-pozitif bakteri, hücre duvarına gömülü halde teiokik asitler olarak adlandırılan asidik bileşikler içerirler. "Teikoik asit" terimi, hücre duvarı stoplazmik zar ve gliserofosfat ya da ribitol fosfattan oluşan kapsüler polimerlerin tamamını içerir. Fosfat esterleri ile bağlı olan bu poli-alkoller genellikle şekerleri ve D-alaninleri içerirler. Teiokik asitler duvar peptidoglikanındaki muramik asitlere kovalent olarak bağlıdırlar. Fosfatların negatif yüklü olması nedeniyle, teikoik asitler hücre yüzeyinin tamamının negatif yüklenmiş olmasından sorumludurlar. Teikoik asitler aynı zamanda, Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iki değerli katyonları hücreye taşınmaları sırasında bağlayabilirler (Madigan ve ark 2012).

2.7.1.3 Lipoteikoik Asit

Bazı teikoik asitler zar lipidlerine kovalent bağlıdır, bunlar lipoteikoik asit olarak adlandırılırlar (Madigan ve ark 2012). Şekil 2.20'de Gram-pozitif bakterinin hücre

duvarı yapısı özetlenmekte, teikoik asit ve lipoteikoik asitlerin bütün duvar yapısındaki düzenlenişi ve Gram-negatif hücre zarındaki farklılıklar gösterilmektedir.



Şekil 2.20: Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısı. A) Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarları, teikoik asit, lipoteikoik asit ve diasilasyon ile hücre zarına bağlanmış lipoprotein ile kalın bir peptidoglikan tabakası ile çevrili tek bir lipid membran tabakası içerir. B) Gram-negatif bakteriler, lipopolisakkarit, porin ve lipoproteinden oluşan iç ve dış membranlar arasındaki periplazmik boşlukta ince bir peptidoglikana sahiptir (Kang ve ark 2016).

2.7.2 Staphylococcus epidermidis

S. epidermidis, Staphylococcus cinsi altındaki Micrococcaceae bakteriyel ailesinde sınıflandırılır. Hareketsiz, spor oluşturmayan, Gram pozitif, kok, çapı 0.8-1.0 µm; çapında; çift veya tetradlar halinde, zaman zaman tek hücrelerden de meydana gelir. *S. epidermidis* koagülaz negatif bakteridir. Kolonilerin bütün kenar boşluklarıyla birlikte genellikle pigmentsiz (gri veya grimsi beyaz), pürüzsüz, kabarık, parıltılıdır. Mukoid veya sümüksü olabilir; yarı saydamlık bakımından değişir; olgunlaştıkça bakteri yapışkan hale gelebilir. Koloni çapı 2.5–4.0 µm olabilir (Whitman 2009).

Staphylococcus epidermidis'in faj tiplemesi çok başarılı olmamıştır. Kromozomal ve plazmid DNA, transdüksiyon yoluyla uygun alıcı hücrelere aktarılabilir. Yerleşik olduğu insan derisinden izole edilmiş; bazen diğer memelilerin, özellikle de insanlarla yakın ilişki içinde yaşayanların derisinde bulunur. Fırsatçı patojen, çeşitli kalıcı tıbbi cihazları, ameliyat sonrası enfeksiyonları, idrar yollarını ve yara enfeksiyonlarını kolonize edebilir (Whitman 2009).

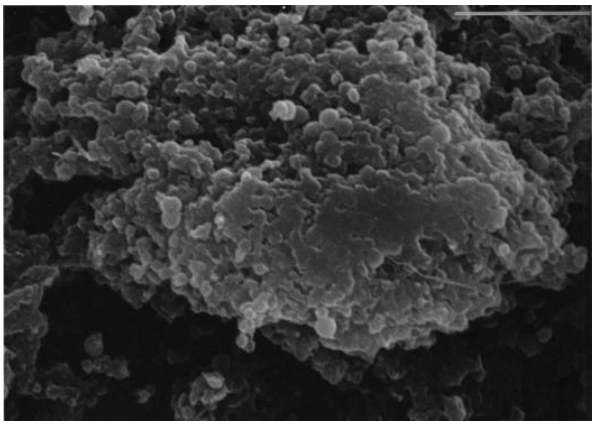
S. epidermidis , insan epitelinden en sık izole edilen türdür ve çoğunlukla koltuk altı, kafa ve burunları kolonize eder (Otto 2009). *S. Epidermis* 'in etkili olduğu enfeksiyonların çoğu katater, protez, kalp kapakçığı ve diğer cerrahi implantlar gibi yabancı tıbbi malzemelerin yerleştirilmesinden sonra görülür (Eryılmaz 2017).

2.7.3 *Staphylococcus aureus* ve Biyofilmler

Staphylococcus aureus, Gram pozitif, her yerde bulunan bir bakteri türüdür. İnsanlarda *S. aureus'un* ekolojik nişi ön burunlardır. İnsan popülasyonunda, yaklaşık %20-25'i kalıcı kolonileşmiş ve %75-80'i aralıklarla veya hiç kolonileşmemiştir (Kluytmans ve ark 1997, Dall'Antonia ve ark 2005).

Staphylococcus aureus, gıda zehirlenmesi, zatüre, menenjit, cilt enfeksiyonları, artrit, osteomiyelit, endokardit ve toksik şok sendromu gibi çok çeşitli insan enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı bir patojendir (Lowy 1998). *S. aureus*, ekzotoksinler, kapsüller, doku kolonizasyonunu kolaylaştıran yüzeye bağlı proteinler, doku hasarını ve immün kaçınmayı içeren çok sayıda virülans faktörü üretir. *S. aureus*, hücre dışı matrise (ECM) yapışkan matris molekülü (MSCRAMM) proteinlerini tanıyan çok sayıda mikrobiyal yüzey bileşeni üretir (Patti ve ark 1994, Clarke ve Foster 2006).

Staphylococcus aureus , içinde bir heterojen protein ekspresyonu olan bir glikokaliks veya balçık tabakası içine gömülmüş çok katmanlı bir biyofilm üretebilir (Archer ve ark 2011). İlk çalışmalar, glikokaliksin katı bileşenini esas olarak teikoik asitlerden (% 80) ve stafilokok ve konakçı proteinlerden oluştuğunu tarif etmiştir(Hussain ve ark 1993). Daha sonraki çalışmalarda, polisakkarit hücre içi antijen (PIA) olarak adlandırılan spesifik bir polisakkarit antijeni izole edilmiştir. PIA, β-1,6-bağlı N-asetilglukozamin kalıntıları (% 80-85) ve daha az fosfat ve ester-bağlı süksinat içerir. Geri kalan % 15-20'lik kısmı ise N-asetillenmemiş D-glukosamin kalıntıları içeren bir anyonik fraksiyondan oluşur (Mack ve ark 1996).



Şekil 2.21: Bir implanttan alınan SEM görüntüsü. Çok sayıdaki kok görüntüsü (Archer ve ark 2011).

2.7.4 *Staphylococcus aureus*'ta Metisilin Direnci

Staphylococcus aureus 1880'lerde keşfedilmesinden bu yana, cildin küçük enfeksiyonlarından ameliyat sonrası yara enfeksiyonlarına, bakteriyemi, yabancı cisimlerle ilgili enfeksiyonlara ve nekrotizan pnömoniye kadar çeşitli hastalıklara neden olabilen potansiyel olarak patojenik bir Gram-pozitif bakteri olarak ortaya çıkmıştır. Penisilin tedaviye eklenene kadar, *S. aureus* ile enfekte olan hastaların ölüm oranı %80 civarındaydı. 1940'ların başlarında, *S. aureus* enfeksiyonları penisilin ile tedavi edildi, ancak bu antibiyotiğe dirençli ilk suşlar 1942'de, ilk önce hastanelerde ve daha sonra toplumdan izole edildi. Bu direnç, bir penisilin-hidrolize edici enzimi, yani penisilinaz'ı kodlayan bir plazmidin edinilmesinden kaynaklıdır. 1960'dan beri, S. *aureus* izolatlarının %80'i penisiline dirençlidir. Ek olarak, *S. aureus* suşları, sırasıyla mecA ve vanA genlerinin edinilmesiyle metisilin ve vankomisine direnç kazanılmıştır (Lowy 1998, Lowy 2003).

2.8 Biyofilm Kontrolünde İnhibisyon Stratejileri

2.8.1 Quorum Quenching (Biyofilm Direnci)

Birçok organizma türü kendi türleri arasında veya türler arasında farklı sinyal molekülleri kullanarak birbirleriyle haberleşirler. Bakteriler bu haberleşme moleküllerini salgıladıkları gibi aynı zamanda bu moleküllerin ortamdaki yoğunluğunu

da ölçebilirler. Bu mekanizmaya Quorum Sensing denir. QS sinyal molekülü; beslenme, üreme, sporla çoğalma, biyofilm oluşturma ve antibiyotiklere karşı direnç oluşturma gibi davranışları sağlar. QS araştırmalarındaki önem; mikroorganizmalar arasındaki haberleşmeyi bloke ederek mikroorganizmaları kontrol eder. Bakteri hücreleri arasındaki bu haberleşmeyi engelleme mekanizmaları "Quorum Quenching" olarak isimlendirilir (Açıkgöz 2012).

Biyofilm oluşturan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi genellikle zordur. Antibiyotiklere karşı birkaç biyofilm direnci mekanizması önerilmiştir(Costerton ve Lappin-Scott 1995, Costerton ve ark 1999). Önerilen ilk mekanizma, antibiyotiklere karşı fiziksel ve kimyasal bir bariyeri temsil eden matrisleri içerir (Ciofu ve ark 2012).

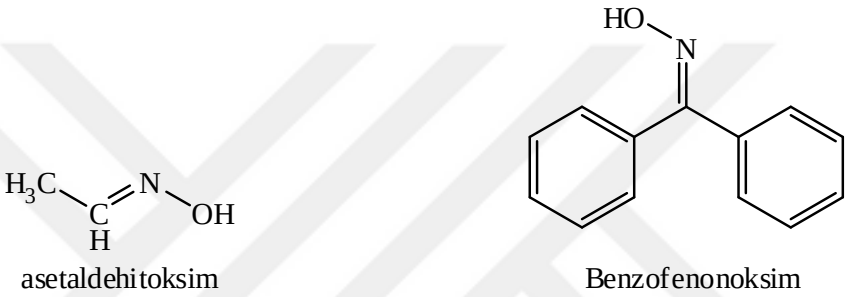
Biyofilm etkisini bozan veya biyofilm oluşumunu engelleyen bazı faktörler; (Taraszkiewicz ve ark 2013).

- Antimikrobiyal fotodinamik yöntem
- Bitki özleri
- Biyofilm bozucu enzimler
    - Deoksribonükleaz
    - Lisostafin
    - Amilaz
    - Lyase
    - Laktonaz
    - Gümüş nanopartikülleri

2.9 Oksimler

Oksimler, yapılarında "-C=NOH" fonksiyonel grubunu bulundurur ve bu bileşiklere oksi ve imin kelimelerinin kısaltılması ile "oksim" adı verilmiştir. Genellikle aldehit veya ketonların hidroksilaminle birleşiminden elde edilmektedir (Chakravorty, 1974). Oksim kimyasından 1905 yılında bahseden Tschugaeff, dimetil glioksimi tanımlamasıyla nikelin gravimetrik ölçümleri için aktif hale gelmiştir. Geçiş metalleri kimyasının gelişmesinde oksimler ligand olarak önemli rol oynamıştır.

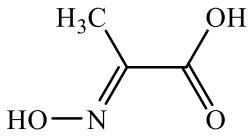
Oksimlerin isimlendirilmesi; aldehit ve ketonlardan sentezlendikleri için aldehit ve ketonların sonuna oksim getirilir.



asetaldehitoksim Benzofenonoksim

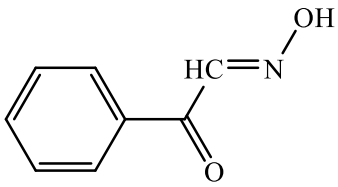
Şekil 2.22: Asetaldehitoksim ve benzofenonoksimin yapısı

Oksimler aynı zamanda "hidroksiimino" eki kullanılarak da adlandırılmaktadır(Smith 1966).



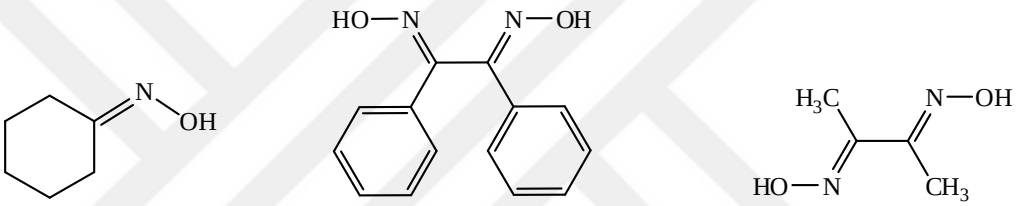
Şekil 2.23: 2-Hidroksiimino propiyonik asitin kimyasal yapısı.

Oksimler aynı zamanda nitrozo bileşiklerinin de yapı izomerleridirler ve bunlara izonitrozo bileşikleri adı verilir. İsimlendirilirken izonitrozo ekiyle de isimlendirilebilirler (Burakevich 1971).



Şekil 2.24: Izonitrozoasetofenonun kimyasal yapısı.

Organik moleküllerde oksim grubu sayısı bir veya birden fazla olabilmektedir. Örneğin; siklohegzanon oksimde bir tane oksim grubu vardır ve monoksim denir, benzildioksimde iki tane oksim grubu olduğu için dioksim denir. Eğer oksim grupları komşu karbonlarda bulunursa *vic*-dioksim olarak isimlendirilir. *Vic*-dioksimler aynı zamanda dimetilglioksimler gibi glioksim olarak da adlandırılır. En sık kullanılan isimler de, 1,2-diketon dioksimler ve α-dioksimlerdir (Sevgi 2010).



siklohegzanon oksim benzildioksim dimetilglioksim

Şekil 2.25: Bazı oksimler ve yaygın adları

2.9.1 Oksimlerin Özellikleri

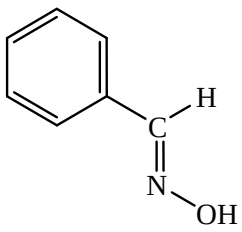
Oksimlerin özellikleri; erime sıcaklığında bozunan, renksiz, suda az çözünen kararlı maddelerdir. Oksimlerin yapısında bulunan azometin grubundaki (>C=N) ortaklaşmamış elektron çifti sebebiyle zayıf bazik, (-OH) grubundaki protondan dolayı da zayıf asidik özellik gösteren amfoter maddelerdir. Oksimlerin bazlıkları iminlerden daha az, derişik minerallerle çözünür ve su ile seyreltildiğinde tuz halinde çökerler. Aynı zamanda kuvvetli bazların seyreltik çözeltilerinde çözünüp CO_2 ile çöktürülebilirler. Basit oksimlerin pKa'ları 10-12 arasındadır. *Vic*-Dioksimlerin yapısında bulunan α-keto grubunun asitliğinin artmasından dolayı da monoksimlere göre daha asidik özellik gösterir (Patai 1970). Oksimlerin yapısında bulunan hidroksil grubu ve azot atomu sayesinde molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağı yapabilirler. Hidrojen bağları oksimlerin asitlik ve erime derecelerini etkiler (Bruton ve ark 2003).

Oksim bileşikleri biyolojik olarak parçalanıp, oksijen tutup, şelat oluşturma gibi özelliklerinin yanında biyolojik ve fotokimyasal reaksiyonlarda farklı etkileriyle bilinmektedir. Son zamanlarda oksimlerin kullanıldığı yerler arasında ; boyar maddeler için ara ürün, yakıtlarda oktan sayısının arttırılması, manyetik teyp bantların yapısı, deterjan sanayi, değerli madenlerin geri dönüşümü, tatlandırıcılarda, parfüm ve kozmetik nemlendiricilerinde (Kurtoğlu ve Serin 2006) ve antioksidan olarak kullanılmaktadır (Özen ve Taş 2009).

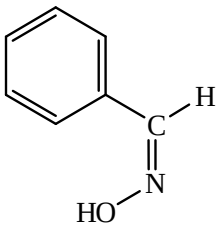
Vic-dioksimlere olan ilgi, dimetilglioksimlerin B12 vitamini için model bileşiği olarak kullanılacağı anlaşıldıktan sonra başlamıştır. Oksimin Co(III) kompleksi ilk defa 1907 yılında Tshugaev tarafından izole edilmiştir. Sonraki çalışmalarda yapıdaki bu komplekslerin dimetilglioksim molekülündeki dört azot ile birlikte eksensel doğrultuda bir ligand ve bir halojen ile koordinasyon bağı oluşturduğu anlaşılmıştır (Kurtoğlu ve Serin 2006).

2.9.2 Oksimlerin Geometrik İzomerleri

Oksimlerin geometrik izomerleri vardır, bunun nedeni C=N çiftt bağının etrafında dönmenin kısıtlı olmasından kaynaklanmaktadır. Oksimlerin geometrik izomerleri syn- ve anti- ön adları ile gösterilir (Smith 1966). Syn-eki, aldoksimler, hidrojen ve hidroksilinlerde aynı tarafta, anti-eki ise, hidrojen ve hidroksilin karşıt bölümlerinde kullanılır. Son zamanlarda Almanca kelimelerinin ilk harfleri olan Z(Zusammen= beraber) ve E(Entgegen= karşıt) kullanılır. E-Z izomerlerinde oksimin OH ile R grubunun birbiri ile olan konumuna bakılır.



syn-benzaldoksim
(E)-benzaldoksim



anti-benzaldoksim
(Z)-benzaldoksim

Şekil 2.26: Aldoksimlerde geometrik izomeri.

Keton türevi oksimlerin adlandırılmasında syn- ve anti- önekleri referans olarak alınan grubun yerine göre seçilir.

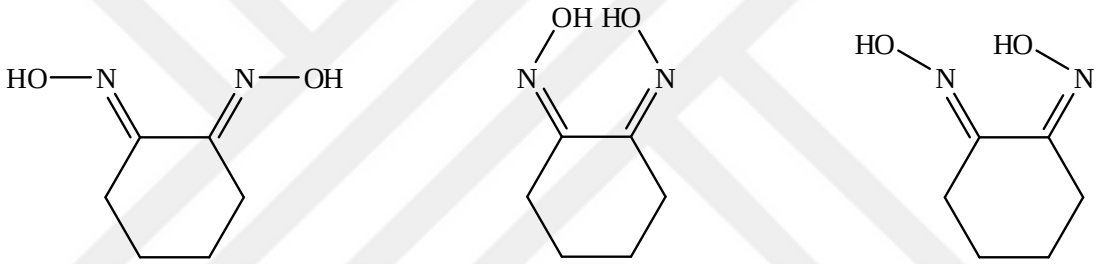


anti-etil metil ketoksim
syn-metil etil ketoksim

syn-etil metil ketoksim
anti-metil etil ketoksim

Şekil 2.27: Ketoksimlerde geometrik izomeri.

vic-Dioksimlerde bu ekler; OH gruplarının birbirine göre durumlarına bağlı olarak adlandırılır. OH gruplarının aynı tarafta olduğu yapılar syn-, zıt tarafta yapılar anti- ve birbirlerine paralel olduğu yapılar amfi- olarak adlandırılır (Nesmeyanov 1976).



anti- *syn*- *amfi*-

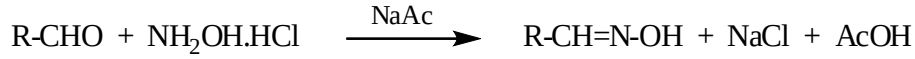
Şekil 2.28: *vic*-Dioksimlerde (siklohegzan-1,2-dion dioksim) geometrik izomeri

Syn-, anti- ve amfi- şekillerinde olan oksimlerin özellikleri farklılık gösterir: istisnalar dışında syn- ve amfi- formların erime noktaları daha düşük ve anti- formu daha kararlıdır (Smith 1966). Aynı zamanda bu anti- form organik reaksiyon için daha uygun olmakla beraber birçok katılma ve ayrılma reaksiyonu da bu formda oluşur (Burakevich 1971).

2.9.3 Oksimlerin Bazı Önemli Sentez Metotları

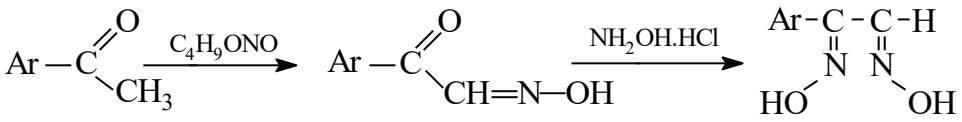
a) Aldehit ve ketonların hidroksilamin ile reaksiyonundan

Oksimler eski zamandan beri aldehit ve ketonların hidroksilamin ile reaksiyonundan elde edilmekte ve bu reaksiyon sulu alkollü ortamda, kaynama sıcaklığı ve optimum pH'larda gerçekleşmektedir (Bierlein ve Lingafelter 1951).



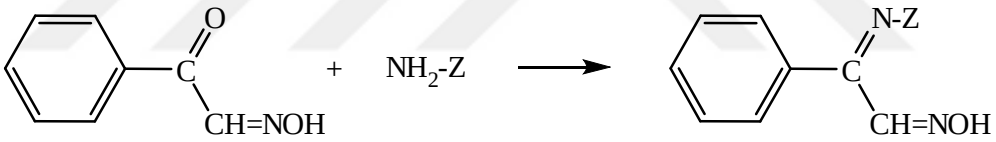
b) Nitrosoloma metodu

α-keto oksimlerin hazırlanmasında kullanışlı bir yoldur ve aktif metilen grup bileşiklerinde alkinitlerle asidik veya bazik ortamda nitrosolonması, keton grubu da korunmuş oksimleri verir. Oluşan α-keto oksimlerin hidroksilamin ile reaksiyonundan **vic**-dioksimler elde edilir (Burakevich 1971, Uçan ve Mirzaogiu 1990).



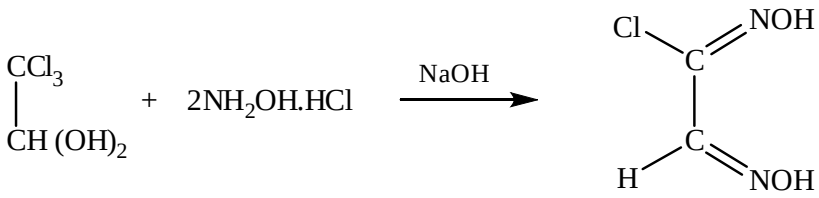
Şekil 2.29: α-keto oksimlerin hidroksilamin ile reaksiyonuyla *vic*-dioksim eldesi.

İzonitrozo oksimler hidroksilamin ile hidrazin, amin vb. bileşikler ile oksim türevlerini verirler (Chakravorty 1974).



c) Kloralhidrat ile hidroksilaminin reaksiyonundan

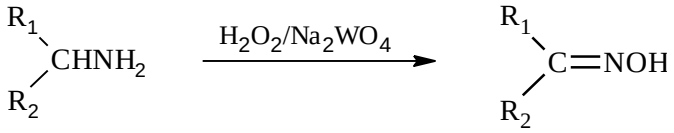
Klorogliоksim, kloralhidrat ile hidroksilaminin sentezinden elde edilir(Hesse ve Krehbiel 1955).



Şekil 2.30: Kloralhidrat ile hidroksilaminin reaksiyonu.

d) Primer aminlerin yükseltgenmesiyle

Hidrojen peroksit, primer amin sodyum tungstat katalizörüyle yükseltgendiğinde oksimler oluşur (Smith 1966).



Şekil 2.31: Primer aminlerin yükseltgenmesi

e) Ketiminlerin hidroksilaminle reaksiyonundan

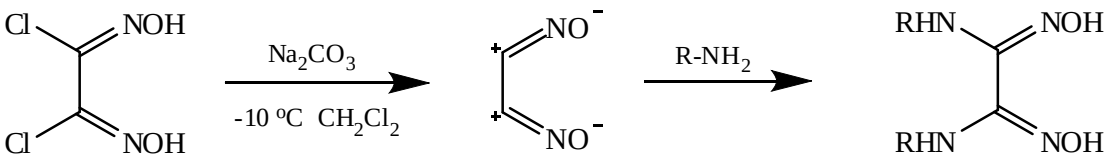
Ketiminlerin yapısında bulunan –C=NH, hidroksilaminle ketonlara göre daha kolay oksim oluşturur.



Şekil 2.32: Ketiminlerin hidroksilaminle reaksiyonu

f) Disiyan-di-N-oksit katılmasından

Dikolorogloksim bazlara karşı duyarlıdır ve bu metot dikkat gerektiren kullanışlı bir metottur. 1965'de Grundmann ve arkadaşları soğuk ortamda anti-dikolorogloksimden çıkarak disiyan-di-N-oksit elde etmişlerdir ve bu madde dikolorogloksime göre oldukça reaktiftir.



Şekil 2.33: Disiyan-di-N-oksit katılması reaksiyonuyla dioksimlerin eldesi.

2.9.4 Oksimlerin kullanım alanları

Oksimlerin kullanım yerleri; organik, inorganik kimyanın yanı sıra, endüstriyel ve biyokimya alanlarını da kapsamaktadır. Bazı oksim ve bu oksimlerin çeşitli alkil oksialkil ve amino türevleri biyolojik, fizyolojik aktif özelliklere sahiptirler. Makine/Kimya sanayinde ise motor yağlarının, boyaların, epoksit reçinelerin bazı davranışlarının düzeltilmesi için katkı maddesi olarak kullanılır (Carlos ve Shimp 1972, Leclerc ve ark 1980). Koordinasyon bileşikleri üzerine yapılan çalışmalarda antitümör etkinliklerin bulunması, özellikle *vic*-dioksim bileşikleri alanında yapılan çalışmaları arttırmıştır (Sevgi 2010).

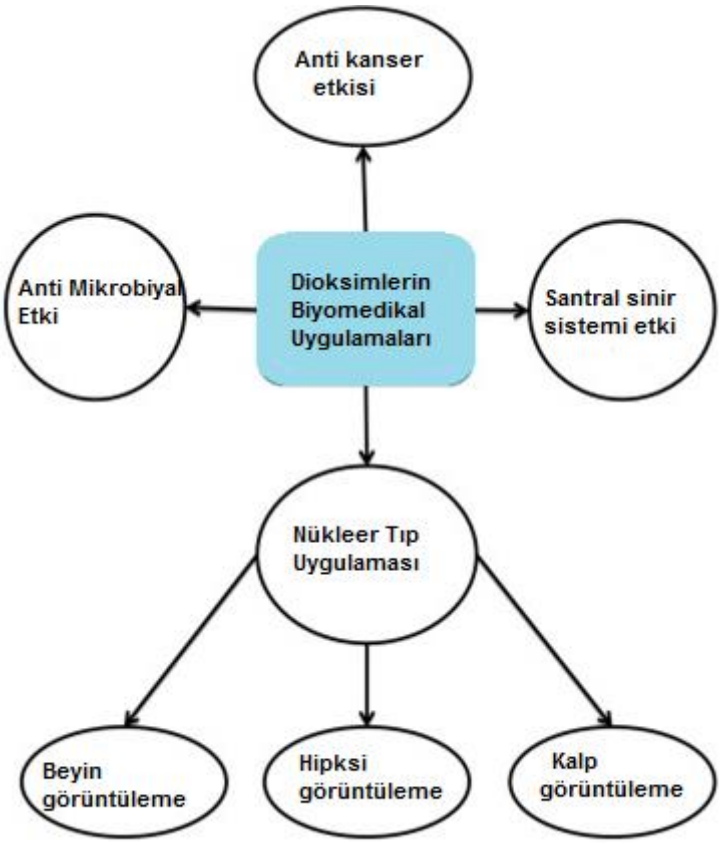
Çoğu oksim ve dioksim bileşikleri çok farklı ticari alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan bazıları;

Sağlık alanında özellikle de nükleer tıpta kalp, beyin gibi organların sintigrafilerini görüntülemek için radyofarmasötik olarak *vic*-dioksim sentezi kullanılmaktadır. En çok beyin sintigrafisinde kullanılan ^{99m}Tc-HMPAO (hekzametilpropilenamin oksim) (Fernandez ve ark 1999) ve kalp sintigrafisinde kullanılan Tebroksim'dir (Galt ve ark 2004).

2,3-difenilsikloprop-2-en-oksim türevleri potansiyel siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörü ve analjezik, anti-inflamatuar etki gösterirler (Huiying ve ark 2002). Bazı oksimlerin Cu(II), Co(II) ve Fe(II) kompleksleri sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu komplekslerin lösemi ve lenfoma kanserlerinin tedavisinde kullanımı hala araştırılmaktadır (Hall ve ark 1999). Yapılan başka bir çalışmada yeni bir hidrazit türevi vic-dioksim ligandı ve bunların Cu (II) ve Ni (II) metal kompleksleri sentezlenmiştir. Bu maddelerin in vitro sitotoksik ve apoptotik etkileri Caco-2 heterojen insan epitel kolorektal adenokarsinom hücreleri üzerinde denenmiştir. Ligand ve komplekslerin konsantrasyona bağlı sitotoksik ve apoptotik davranışlar sergilendiği bulunmuştur. Mevcut bulgular, Cu (II) kompleksinin, Caco-2 kolon kanseri hücrelerine karşı umut verici bir anti-kanser bileşiği olarak etki etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir(Çelik ve ark 2019). Obidoksim ve Pralidoksim gibi bazı kas gevşetici ve merkezi sinir sistemini etkileyen piridin oksimler özellikle organofosfor zehirlenmelerine karşı birlikte kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu sentezlenen bileşikler kimyasal silah olan sinir ajanların tedavilerinde kullanılır (Yaren 2007). Yapılan son çalışmalarda epilepsi tedavisinde sakinleştirici (antikonvulsant) olarak kullanılan oksim-

eter türevlerinin aynı zamanda antimikrobiyal olduğu da görülmüştür (Karakurt ve ark 2001).

Tarım alanında kullanılan ve ismi Iyermectin ve Doramectin olan oksim türevleri ile beraber propilbenzaldehid oksim böcek öldürücü (insektisid) olarak kullanılır. Yine tarımda pestisit olarak kullanılan ve ticari adı Aldricab olan oksim türevi, Tetra pirofasfat oksim kompleksi ve bisipiridinyum monooksim kuaterner tuzları da kullanılır. Tarımda bir de yaygın olarak kullanılan ve mantar öldürücü olan (fungusid) Siyazofamid olarak adlandırılan oksim türevi de kullanılır (Asma 2007).



Şekil 2.34: Dioksimlerin sağlık alanındaki kullanım alanları(Motaleb ve Selim 2019)

3 GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Benzil, 4,4′-Dimetoksibenzil, 4,4′-Diflorobenzil, 9,10-Phenanthrenequinone, Acenaphthoquinone, silika jel, n-hegzan, etil asetat, susuz sodyum sülfat, sodyum hidroksit, hidroksilamin hidroklorür, kloroform, aseton, diklormetan, glasiyel asetik asit, susuz sodyum asetat, kristal viole, D-Glukoz, DMSO, DMSO-d_6 maddeleri Merck firmasından temin edilmiştir.

2,2′-Pyridil, furil, Kurkumin, mutlak etanol, PBS (phosphate buffered saline) maddeleri Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.2 Biyolojik Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), bakterileri standart (ATCC-American Type Culture Collection) Amerikan tipi kültür koleksiyon suşudur. *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268 (NRRL - Northern Regional Research Laboratory) ARS kültür koleksiyon suşudur. Bu suşlar sırasıyla 5, 22 ve 29 kod numaralı suşlar olarak Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Müeller Hinton Broth (MHB), Müeller Hinton Agar (MHA) ve Nutrient Broth (NB) besiyerleri Merck firmasından, Tryptic Soy Broth (TSB) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Mikrodilüsyon Broth yönteminde kullanılan 96 kuyucuklu polisitiren düz tabanlı mikrotitrasyon plakları Isolab firmasından, 8 kanallı mikropipet Socorex firmasından temin edilmiştir. Klaritromisin (Klacid 500 mg I.V.) Abbott firmasından, TTC redoks indikatörü ise Merck firmasından alınmıştır.

3.3 Kullanılan Cihazlar

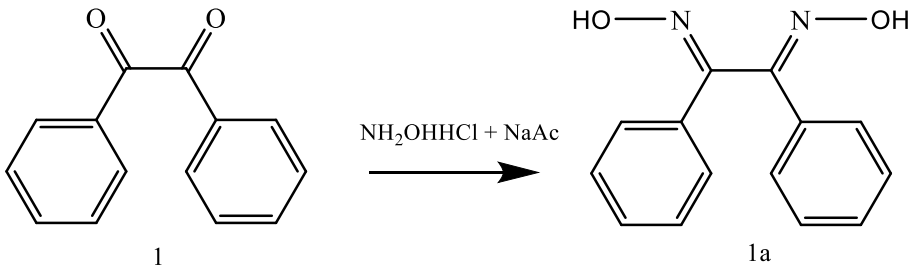
- Vortex cihazı (Jeio Tech)
- Mc Farland cihazı (Biosan Den-1)
- Mikroplaka okuyucu (BioTek μQuant)

- Otomatik dispenser (BioTek MicroFill)
- Otoklav (Nüve OT 4060)
- Analitik Terazi (Precisa XB 220 A)
- Döner buharlastırıcı (Heidolph Laborata 4000)
- Soğutmalı sirkülatör (Lab. Companion RW-0525G)
- Erime noktası (Stuart SMP30)
- Ph metre (VWR phenomenal)
- İnkübatör (Nüve EN 055)
- Çeker ocak (Qualitech)
- Biyogüvenlik Kabini (Nüve MN 120)
- NMR spektrometresi : Varian 400-MR (400 MHz.)
- Infrared spektrometresi (Bruker Vertex 70 FT-IR ATR proplu)

3.4 Dioksimlerin Sentezlenmesi

Dioksimler ticari olarak temin edilen aromatik 1,2-diketonların hidroksilamin hidroklorür ile bazik ortamda reaksiyonuyla, literatürlerde verilen metotlar takip edilerek sentezlenmiştir. Yeniden kristallendirme yöntemiyle saflaştırılan dioksimler; erime noktası, ^{1}H-NMR ve FT-IR ölçümleri yapılarak karakterize edilmiştir. Sentezlenen maddelerin eldesi için aşağıda verilen metotlar takip edilmiştir.

3.4.1 α-Benzil Dioksim (1a)



1 1a

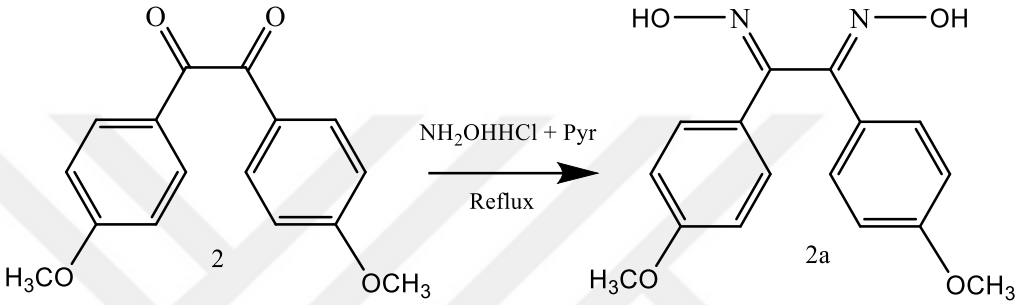
1a maddesi benzil'den çıkılarak literatürdeki metoda göre sentezlenmiştir (Essa ve ark 2008). 1,4 gr. (0.02 mol) hidroksilamin hidroklorür küçük bir cam balonda 10 ml saf su içerisinde çözündürülür. Üzerine 4 gr. susuz sodyum asetat ilave edilir. Çözelti yaklaşık 40 ^{0}C'ye ısıtılır ve 2,1 gr. (0,01 mol) benzil ilave edilir. Balon sıkıca

kapatılarak birkaç dakika karıştırılır. Dioksim kısa bir süre sonra beyaz kristalimsi bir katı olarak ayrılır. Buzla soğutulur ve süzülür. Soğuk suyla yıkanıp petrol eterinden kristallendirilir. E.N: 237-238 ^{0}C.

^{1}H-NMR (400 MHz, ppm, DMSO-d_6): δ 11.53 (s, 1H), 7.31 – 7,42 (m, 5H) (Şekil 8.1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3266(geniş), 1389, 979, 694 (Şekil 8.8).

3.4.2 4,4′-Dimetoksibenzil Dioksim (2a)

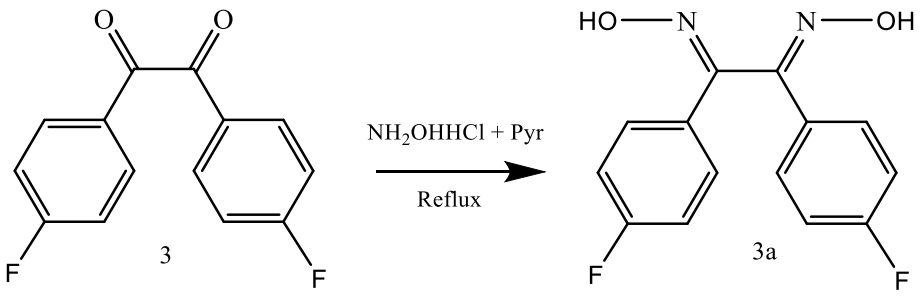


2a maddesi 4,4′-Dimetoksibenzil'den (anisil) literatürlerdeki (Yadav ve ark 2007, Sevgi 2016) metotlar takip edilerek sentezlenmiştir. 2,7 gr (0,01 mol) anisil , 4,17 gr (0,06 mol) hidroksilamin hidroklorür ve 10 mL pridin karışımı 7 saat boyunca geri soğutucu altında ısıtılır. Reaksiyon karışımı 10 mL konsantre hidroklorik asit içeren kırılmış buz parçaları üzerine dökülür. Elde edilen kirli beyaz yapışkan çökeltiler süzülürek etanol-su (1,5-1) karışımından kristallendirilir. E.N: 209-210 ^{0}C.

^{1}H-NMR (400 MHz, ppm, DMSO-d_6): δ 11.44 (s, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H) (Şekil 8.2).

IR (ATR, cm^{-1}): 3260(geniş), 1604, 1508, 1392, 1237, 978, 657, (Şekil 8.9).

3.4.3 4,4′-Diflorobenzil Dioksim (3a)

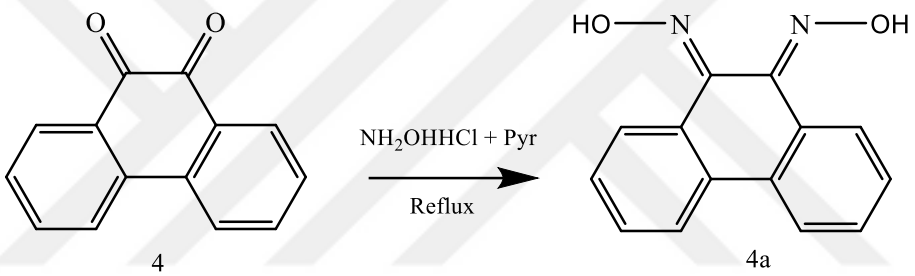


3a maddesi 4,4-diflorobenzil'den benzer literatürlerden faydalanılarak sentezlenmiştir (Yadav ve ark 2007, Sevgi 2016). 2,46 gr (0,01 mol) 4,4-diflorobenzilden, 4,17 gr (0,06 mol) hidroksilamin hidroklorür ve 10 mL pridin karışımı 7 saat boyunca geri soğutucu altında ısıtılır. Reaksiyon karışımı 10 mL konsantre hidroklorik asit içeren kırılmış buz parçaları üzerine dökülür. Elde edilen kirli beyaz yapışkan çökeltiler süzülürek etanol-su (1,5-1) karışımından kristallendirilir. E.N: 237 ^{0}C.

^{1}H-NMR (400 MHz, ppm, DMSO-d_6): δ 11.60 (s, 1H), 7.38 – 7.35 (m, 2H), 7.20 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H) (Şekil 8.3).

IR (ATR, cm^{-1}): 3268(geniş), 1602, 1509, 1400, 1233, 985, 666, (Şekil 8.10).

3.4.4 9,10-Phenanthrenequinone Dioksim (4a)



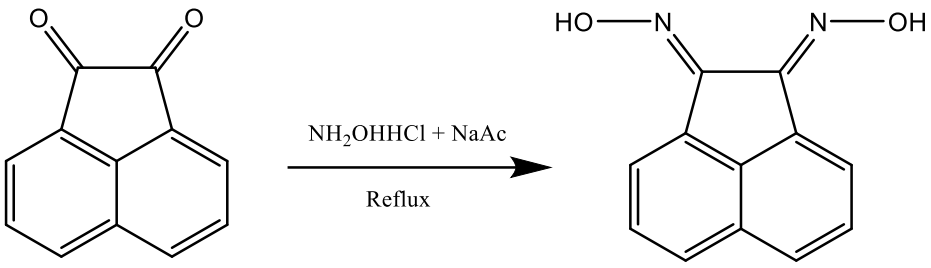
4 4a

4a maddesi; 9,10-Phenanthrenequinon'dan çıkılarak literatürde bazı değişiklikler yapılarak sentezlenmiştir (Colak ve ark 2017). 3 gr (14,4 mmol) 9,10-Phenanthrenequinon, 5 gr (72 mmol) hidroksilamin hidroklorür ve 9 mL piridin karışımı 150 mL etanol içerisinde geri soğutucu altında 48 saat ısıtılarak karıştırılır. Daha sonra çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçurulan karışıma 10 mL metanol- 100 mL su karışımı ilave edilir. Oluşan çökelekler süzülür ve etanol-su (1,5-1) karışımından birkaç defa kristallendirilir. E.N: 212-214 ^{0}C.

^{1}H-NMR (400 MHz, ppm, DMSO-d_6): δ 12.44 (s, 1H), 12.24 (s, 1H), 12.18 (s, 0,5H), 12.15 (s, 1H), 8.42 (dd, *J* = 7.3, 2.4 Hz, 3H), 8.18 – 7.94 (m, 5H), 7.83 – 7.76 (m, 1,5H), 7.74 (dd, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 0,5H), 7.59 – 7.45 (m, 6H), 7.45 – 7.33 (m, 5H) (Şekil 8.4).

IR (ATR, cm^{-1}): 3005(geniş), 1430, 954, 747, (Şekil 8.11).

3.4.5 Acenaphthenequinone Dioksim (5a)



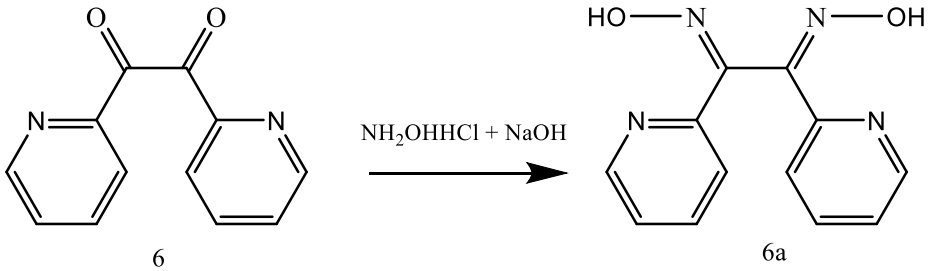
5 5a

5a maddesi; acenaphthenequinon'dan çıkılarak literatürlere göre sentezlenmiştir (Satake ve ark 1989, Rai ve Rai 2001). 2,75 gr (15 mmol) acenaphthenequinon, 3,5 gr (50 mmol) hidroksilamin hidroklorür ve 5 gr (60 mmol) susuz sodyum asetat, 125 mL etanol ve 50 mL su içeren 250 mL balon içerisinde çözündürülür. Karışım geri soğutucu altında 12 saat ısıtılarak karıştırılır. Soğutulan karışım sulu buz karışımına dökülerek çöktürülür. Oluşan çökelekler etil alkolden iki kere kristallendirilir. E.N: 212 ^{0}C.

^{1}H-NMR (400 MHz, ppm, DMSO-d_6): 12.36 (s, 1H), 8.37 – 8.30 (m, 1H), 8.04 – 7.96 (m, 1H), 7.68 (dd, *J* = 9.8, 5.3 Hz, 1H) (Şekil 8.5).

IR (ATR, cm^{-1}): 3090(geniş), 1413, 995, 765, (Şekil 8.12).

3.4.6 2,2′-Pyridil Dioksim (6a)



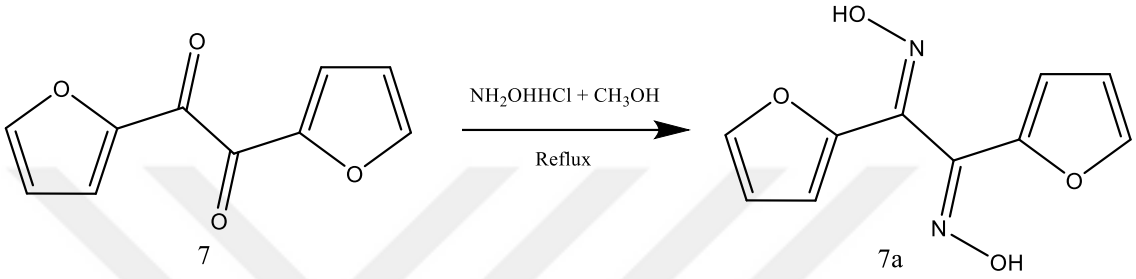
6 6a

6a maddesi; 2,2'-Pyridil' den çıkılarak literatüre göre sentezlenmiştir (Richardson ve ark 2002). 2,12 gr (10 mmol) 2,2'-Pyridil, 2,78 gr (40 mmol) hidroksilamin hidroklorür ve 8 gr NaOH 80 mL su içeren cam balonda 40 saat karıştırılır. Bir buz banyosunda soğutulan çözeltiye çökelekler oluşuncaya kadar konsantre hidroklorik asit damlatılır. Çökelekler süzülür , soğuk suyla yıkanır ve kurutulur. E.N: 217-219 ^{0}C.

^{1}H-NMR (400 MHz, ppm, DMSO-d_6): δ 11.71 (s, 1H), 8.57 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.86 – 7.79 (m, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J* = 11.7, 6.5 Hz, 1H). (Şekil 8.6).

IR (ATR, cm^{-1}): 2804(geniş), 1586, 1464, 985, 743, (Şekil 8.13).

3.4.7 α-furil Dioksim (7a)



7a maddesi; furil'den çıkılarak literatüre göre sentezlenmiştir (Banks ve LaPlante 1956).1,04 gr (15 mmol) hidroksilamin hidroklorür 40 mL metil alkolde çözüldü. Üzerine 0,285 gr (1,5 mmol) furil ilave edildi. 5 saat geri soğutucu altında ısıtılarak karıştırılan çözeltinin döner buharlaştırıcıda çözücüsü uçurulur. Kahverengi yağımsı madde su ve alkolden kristallendirilir. E.N: 168 ^{0}C.

^{1}H-NMR (400 MHz, ppm, DMSO-d_6): δ 12.81 (s, 2H), 12.30 (s, 1H), 12.23 (s, 1H), 11.94 (s, 2H), 11.61 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 7.75 (ddd, *J* = 7.6, 7.0, 3.7 Hz, 2H), 7.61 (dd, *J* = 8.4, 6.7 Hz, 1H), 7.42 – 7.30 (m, 4H), 6.78 – 6.51 (m, 4H) (Şekil 8.7).

IR (ATR, cm^{-1}): 3273(geniş), 1656, 1458, 990, 756, (Şekil 8.14).

3.5 Sentezlenen Dioksimler ve Başlangıç Maddelerinin MİK Değerlerinin Bulunması.

Sentezlenen dioksim bileşikleri (1a-7a) ve başlangıç maddeleri olan diketonların (1-7) ve antibiyofilm kontrol maddesi olarak kullanılan kurkuminin antibakteriyel etkileri, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri bulunarak test edildi. Biyofilm inhibisyon çalışmaları MİK altı (sub-MİK) dozlarda uygulanacağı için MİK değerlerinin tespiti antibiyofilm çalışması için önemli bir basamaktır. MİK değerleri mikrodilüsyon

broth yöntemine göre 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarında spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Jorgensen ve Turnidge, 2003; Kang ve ark., 2008). MİK değerlerinin tespitinde maddelerin besiyeri ortamında çözünürlüğü az ise gözle değerlendirme veya 2,3,5-trifenil tetrazolyum klorür (TTC) çözeltisiyle değerlendirme yoluna gidilmiştir (Elof, 1998).

MİK ölçümleri, biyofilm üreten 3 adet gram pozitif stafilakok suşu (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268) üzerinde yapılmıştır.

Bileşiklerin antibakteriyel etkinliklerini test etmek için, DMSO içerisinde 8192 μg/mL stok çözeltileri hazırlandı. MHB besiyerinde aktifleştirilen bakteri kültürlerinden MHA agara tek koloni ekimi yapılarak bir gece inkübasyon sonunda oluşan saf kolonilerden steril öze yardımıyla Mc. Farland 0.5'e göre TSB (%1'Glukoz eklenmiş) besiyerinde stok bakteri çözeltileri hazırlandı. Mc. Farland 0.5 bulanıklık standardına göre hazırlanan bakterilerden 1/100 oranında TSB (%1'Glukoz eklenmiş) ile seyreltme yapılarak yaklaşık olarak 10^6 cfu mL^{-1} olacak şekilde çalışmada kullanılacak bakteri kültürleri hazırlandı.

Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile MİK tayini için; 96 kuyucuklu steril mikrotitrasyon plaklarının bütün kuyucuklarına otomatik dispenser cihazı (BioTek, MicroFill) ile 100 μL TSB (%1 Glukoz) besiyeri eklendi. Plakların ilk kuyucuklarına sentezlenen maddelerin stok çözeltilerinden 100 μL ilave edildi. İlk kuyucuktaki maddelerden 8 kanallı mikropipet yardımı ile 100'er μL alınarak 10. kuyucuğa kadar ½ seri dilüsyonlar hazırlandı. 11. kuyucuk besiyeri ve mikroorganizma içeren pozitif kontrol, son kuyucuk sadece besiyeri içeren negatif kontrol olarak seçildi. Daha sonra otomatik dispenser ile mikrotitrasyon plaklarının 12. sırası hariç bütün kuyucuklara hazırlanan bakteri kültürlerinden 100 μL ilave edilerek kapakları kapatıldı. Aynı işlemler kontrol standardı olarak kullanılan Klaritromisin için de uygulandı. Böylelikle kuyucuklarda ≈$5x10^5$ cfu mL^{-1} yoğunlukta bakteriyle birlikte ilk kuyucukta 2048 μg/mL olmak üzere ½ azalan konsantrasyonlarda sentez maddeleri bulunmaktadır (4, 4a maddesi ve klaritromisin ilk kuyucukta 128 μg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır). 24 saat süreyle 37°C de inkübe edilen plakların mikroplaka okuyucu (BioTek, μQuant) ile 600 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüştür. KCjunier programıyla her bir kuyucuğun absorbansının kuyucuktaki madde konsantrasyonuna karşı grafiğe

geçirilmesiyle elde edilen eğrilerden MİK değerleri hesaplanmıştır. Grafiklerde üreminin olduğu kuyucukların absorbansları yüksek ve üremenin engellendiği kuyucukların absorbansları ise negatif kontrol ile karşılaştırılabilir derecede düşüktür. Eğrilerde bu durumu temsil eden, absorbansın keskin bir düşüşle sabitlendiği ilk kuyucuğun değeri MİK olarak alınmıştır (Kang ve ark., 2008). Deneyler üç tekrarlıdır ve sonuçlar Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de verilmiştir.

MİK değerleri ayrıca TTC yöntemiyle de (Eloff, 1998) doğrulanmıştır. Mikrotitrasyon plakları mikroplaka okuyucuda okutulduktan sonra her bir kuyucuğa steril PBS ile hazırlanan % 0.5 lik TTC boyasından 25 µL ilave edilmiştir. Karanlıkta yarım saat bekletilen plaklarda üremenin olduğu kuyucuklar kırmızı renklenirken üremenin olmadığı kuyucuklarda bir renk değişikliği olmaz yani renksizdir. Plaklar gözle değerlendirilerek renklenmenin olmadığı kuyucukların en düşük konsantrasyonu MİK olarak bulunur.

3.6 Kristal Viyole Mikro Plaka Boyama Yöntemi ile Biyofilm İnhibisyonun Belirlenmesi

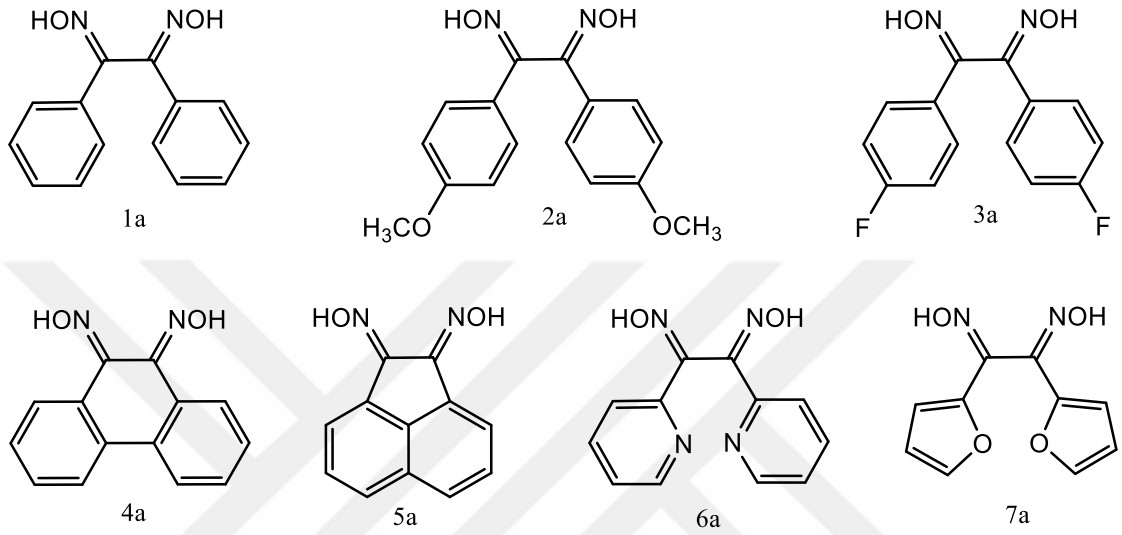
Christensen ve arkadaşları tarafından tarif edilen mikro plaka boyama yöntemi yaygın şekilde kullanılır ve biyofilm oluşumunun tespiti için standart test olarak kabul edilir (Christensen ve ark 1985). Biyofilm inhibisyon çalışması için biyofilm ürettiği bilinen 3 adet stafilokok suş üzerinde Christensen'in metodu modifiye edilerek çalışmamıza uyarlanmıştır (Rane ve ark 2014, Bai ve ark 2019). Yukarıda MİK tespiti için kullandığımız mikro plakalar MİK ölçümünden sonra ters çevrilip boşaltılır, yıkama basamağının standart olması için otomatik dispenser (BioTek Microfill) kullanarak her bir kuyucuk 250 µL steril PBS ile üç kere yıkanır. Böylece planktonik olan bakterilerin tamamen uzaklaştırılması sağlanır. Ters çevrilerek kurutulan mikro plakaların her bir kuyucuğuna % 0,1(w/v)'lik Kristal Viyole çözeltisinden (steril su ile hazırlanmış ve 0.45 µm steril şırınga ucu ile filtre edilmiş) 225 µL otomatik dispenser yardımıyla eklenerek 15 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plakalar ters çevrilerek biyofilme tutunmayan boyalar dökülmüş ve otomatik dispenser yardımıyla her bir kuyucuğa 250 µL olacak şekilde steril saf su eklenerek 3 kere yıkanmıştır.

Plakalar kurutulduktan sonra, boyanmış biyofilm tabakası %33 lük glasiyel asetik asit ile çözündürülüp yeni bir mikro plakaya aktarılarak 570 nm dalgaboyunda mikroplaka okuyucu ile (BioTek µQuant) OD (Optik Dansite) ölçümü yapılmıştır. Plakaların 11. sırasında bulunan sadece besiyeri ve bakteri içeren biyofilm pozitif kuyucukların OD değerlerinin ortalaması alınarak "OD570 nm (kontrol)" değeri oluşturulmuştur. Biyofilm inhibisyonu ise aşağıdaki verilen formüle göre hesaplanmış ve Çizelge 4.4 - Çizelge 4.8'de verilmiştir. (Deneyler üç tekrarlı ve sonuçlar ortalama değerleri göstermektedir.)

$$\%\ İnhibisyon = \frac{\text{OD 570nm (kontrol)} - \text{OD 570nm (örnek)}}{\text{OD 570nm (kontrol)}}\ \text{X 100}$$

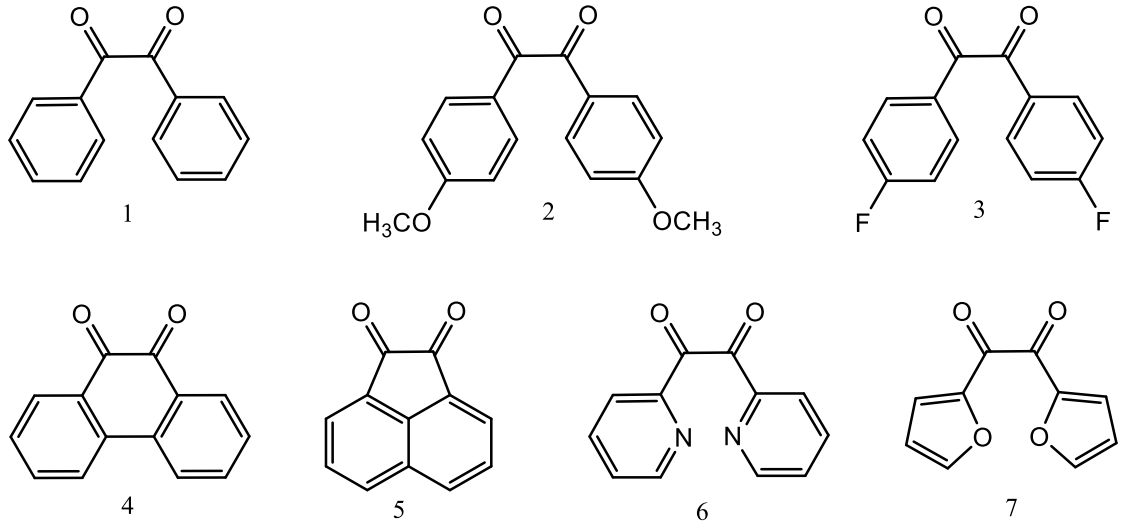
4 BULGULAR

Çalışmada ticari olarak temin edilen aromatik 1,2-diketonların literatürlerde verilen metotlar takip edilerek hidroksilaminhidroklorür ve bir baz yardımıyla reaksiyonundan dioksimler elde edilmiştir. Elde edilen dioksimler kodlarıyla birlikte Şekil 4.1'de verilmiştir.



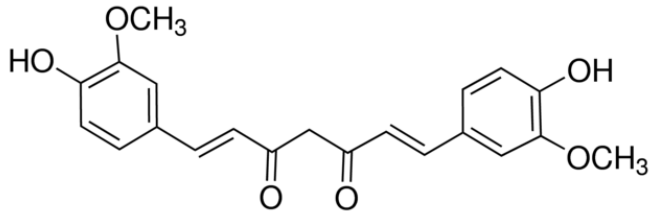
Şekil 4.1: Sentezlenen 1,2-diketon türevi aromatik dioksimler ve kodları.

Dioksimlerle başlangıç maddelerinin antibakteriyel ve antibiyofilm özelliklerini kıyaslamak için çalışmaya ticari 1,2-diketonlar da dahil edilmiştir. Ticari olarak temin edilen başlangıç maddeleri olan diketonlar kodlarıyla birlikte şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2: Başlangıç maddeleri olan 1,2-diketonlar ve kodları.

Biyofilm oluşumunun inhibisyonu, doğal bir antibiyofilm ajan olarak bilinen Curcuma longa (zerdeçal) bitkisinin biyoaktivitesinden sorumlu bir β-diketon olan kurkumin ile kıyaslanmıştır. Kurkumin'in *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* tarafından üretilen biyofilm oluşumunu azalttığı ve ek olarak olgun biyofilmlerin çıkarılmasını ve/veya öldürülmesini etkileyebileceği bulunmuştur (Moshe ve ark 2011). Antibiyofilm ve antibakteriyel özelliklerinden dolayı çalışmaya pozitif kontrol olarak dahil edilen Kurkuminin yapısı şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3: Doğal antibiyofilm ajan olarak bilinen Kurkumin.

4.1 Sentezlenen Dioksimlerin Karakterizasyonu

Sentezlenen dioksimlerin karakterizasyonları ^{1}H-NMR, FT-IR ve erime noktalarının literatür değerleriyle karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. Önemli spektroskopik veriler ve erime noktaları Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. ^{1}H-NMR ve FT-IR spektrumları Ekler kısmında verilmiştir.

Çizelge 4.1: Sentezlenen Dioksimlerin Bazı Fiziksel ve Spektroskopik Verileri

Diok-simler	**Erime Nokt. (^{0}C)**	**FT-IR (ATR, cm^{-1})**	**^{1}H-NMR (400 MHz-ppm- DMSO-d6)**
1a	237-238	3266(geniş),1389,979, 694	11.53 (s, 1H), 7.31 – 7,42 (m, 5H)
2a	209-210	3260(geniş),1604,1508, 1392, 1237, 978, 657	11.44 (s, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H)
3a	237	3268(geniş),1602,1509, 1400, 1233, 985, 666	11.60 (s, 1H), 7.38 – 7.35 (m, 2H), 7.20 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H)
4a	212-214	3005(geniş), 1430, 954, 747	12.44 (s, 1H), 12.24 (s, 1H), 12.18 (s, 0,5H), 12.15 (s, 1H), 8.42 (dd, *J* = 7.3, 2.4 Hz, 3H), 8.18 – 7.94 (m, 5H), 7.83 – 7.76 (m, 1,5H), 7.74 (dd, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 0,5H), 7.59 – 7.45 (m, 6H), 7.45 – 7.33 (m, 5H)

5a	212	3090(geniş), 1413, 995, 765	12.36 (s, 1H), 8.37-8.30 (m,1H),8.04-7.96 (m, 1H), 7.68 (dd, *J* = 9.8, 5.3 Hz, 1H)
6a	217-219	2804(geniş), 1586, 1464, 985, 743	11.71 (s, 1H), 8.57 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.86 – 7.79 (m, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J* = 11.7, 6.5 Hz, 1H)
7a	168	3273(geniş), 1656, 1458, 990, 756	12.81 (s, 2H), 12.30 (s, 1H), 12.23 (s, 1H), 11.94 (s, 2H), 11.61 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 7.75 (ddd, *J* = 7.6, 7.0, 3.7 Hz, 2H), 7.61 (dd, *J* = 8.4, 6.7 Hz, 1H), 7.42 – 7.30 (m, 4H), 6.78 – 6.51 (m, 4H)

4.2 Maddelerin Minumum İnhibitör Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi

Sentezlenen dioksimler, başlangıç maddeleri olan diketonlar ve kurkuminin antibakteriyel etkileri minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri bulunarak test edildi. MİK değerleri mikrodilüsyon broth yöntemine göre 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarında spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Kang ve ark 2008, Jorgensen ve Turnidge 2015) Aynı zamanda besiyeri ortamında çözünürlük probleminden dolayı spektrofotometrik olarak değerlendirilemeyen MİK değerleri gözle değerlendirme ve 2,3,5-trifenil tetrazolyum klorür (TTC) kullanarak bulunmuştur (Eloff 1998, Sevgi ve ark 2018)

Maddelerin antibakteriyel etkileri Klaritromisin kontrol standartı ile karşılaştırılmıştır. Başlangıç maddeleri olan diketonların MİK değerleri Çizelge 4.2'de dioksimlerin MİK değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.2: Başlangıç maddeleri 1,2-diketonlar ve kurkuminin MİK değerleri (µg/mL).

	1	2	3	4	5	6	7	KUR
S. a	2048	2048	1024	2	2048	512	2048	128
MRSA	1024	1024	1024	16	1024	512	1024	256
S. e	>2048	>2048	>2048	8	1024	512	1024	128

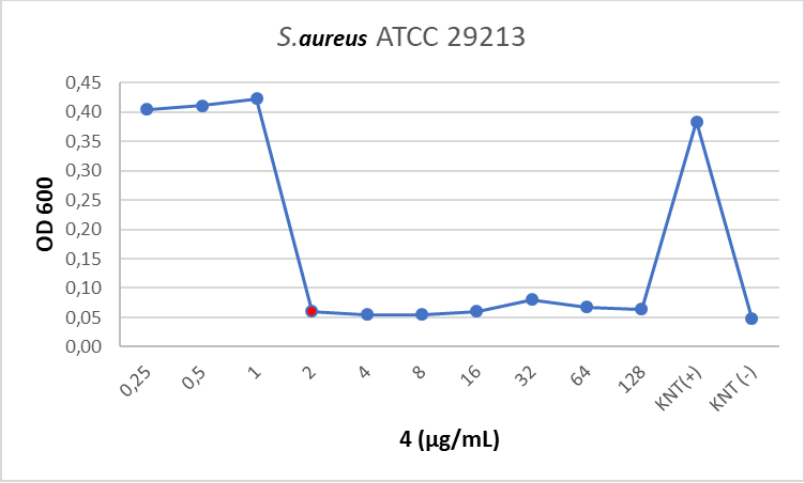
S.a: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, MRSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *S.e*: *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268, KUR: Kurkumin

Çizelge 4.3: Dioksimler ve Klaritromisinin MİK değerleri (µg/mL).

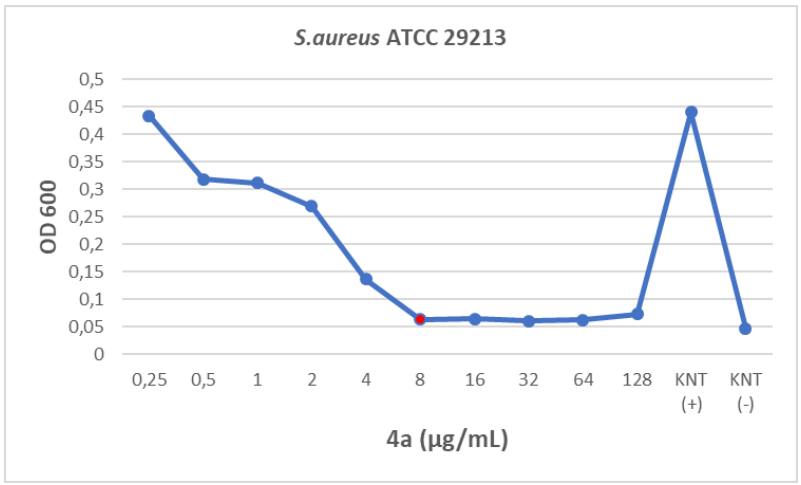
	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	KLR
S. a	2048	2048	2048	8	>2048	1024	1024	0,5
MRSA	1024	1024	1024	32	2048	1024	1024	>128
S. e	1024	1024	1024	32	1024	1024	1024	0,5

S.a: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, MRSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *S.e*: *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268, KLR: Klaritromisin

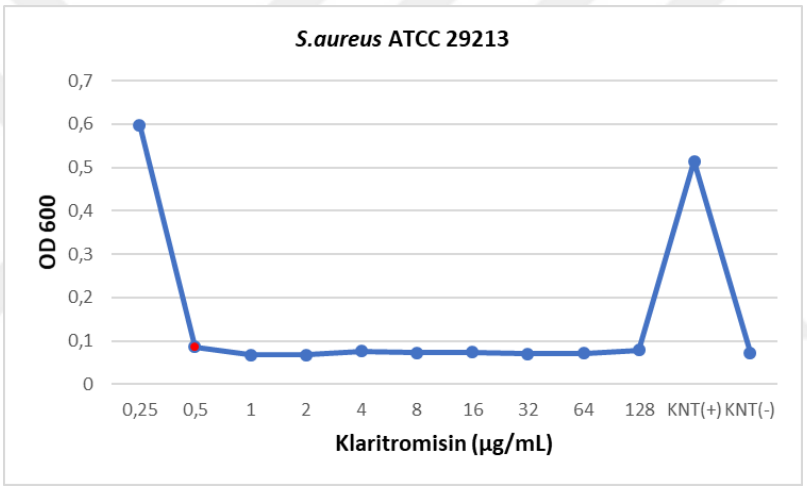
Spektrofotometrik MİK değerleri bulunurken mikroplaka okuyucu (BioTek, µQuant) ile 600 nm dalga boyundaki absorbanslar ölçülmüştür. KCjunier programıyla her bir kuyucuğun absorbansının kuyucuktaki madde konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen eğrilerden MİK değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalara ilişkin bazı örnekler Şekil 4.4 - Şekil 4.9'da verilmiştir. Grafiklerde üremenin olduğu kuyucukların absorbansları yüksek ve üremenin engellendiği kuyucukların absorbansları ise negatif kontrol ile karşılaştırılabilir derecede düşüktür. Eğrilerde bu durumu temsil eden, absorbansın keskin bir düşüşle sabitlendiği ilk kuyucuğun değeri MİK olarak alınmıştır (Kang ve ark 2008, Kursunlu ve ark 2013).



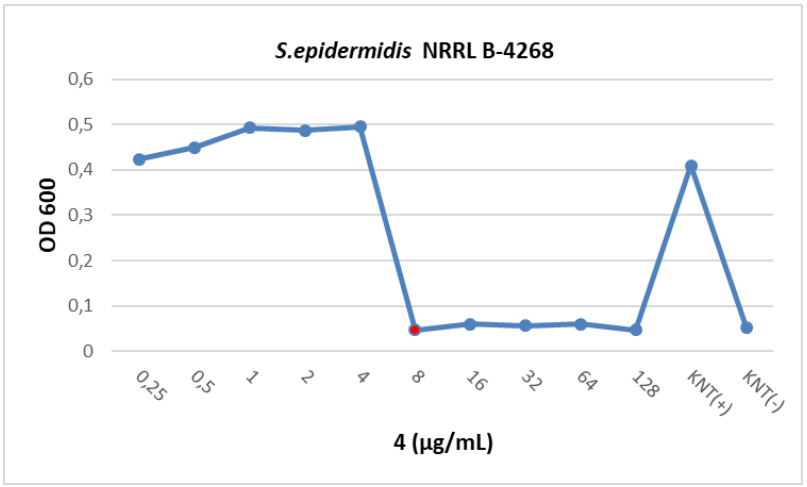
Şekil 4.4: Spektrofotometrik MİK ölçümü ; 2 µg/mL, (4 maddesi, *S.aureus)*



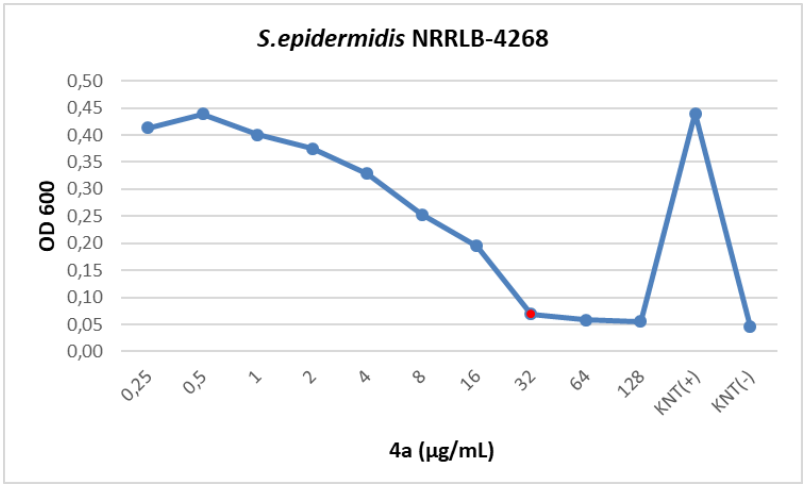
Şekil 4.5: Spektrofotometrik MİK ölçümü ; 8 µg/mL, (4a maddesi, *S.aureus).*



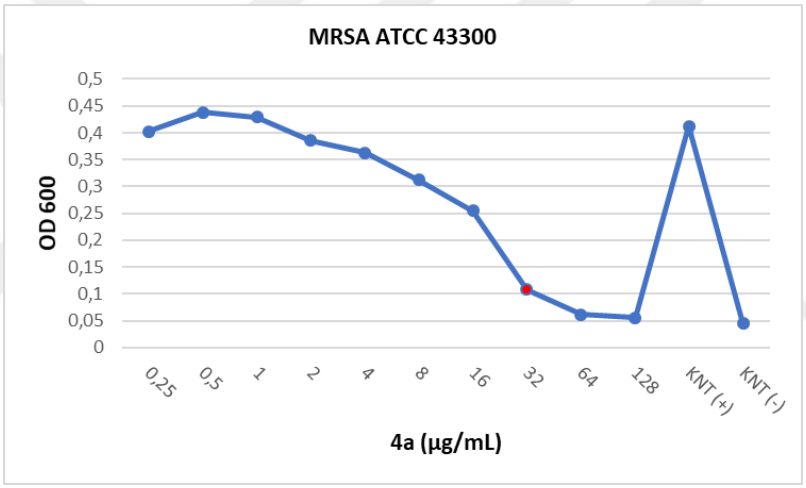
Şekil 4.6: Spektrofotometrik MİK ölçümü; 0,5 µg/mL, (Klaritromisin, *S.aureus).*



Şekil 4.7: Spektrofotometrik MİK ölçümü ; 8 µg/mL, (4 maddesi, *S.epidermidis*).



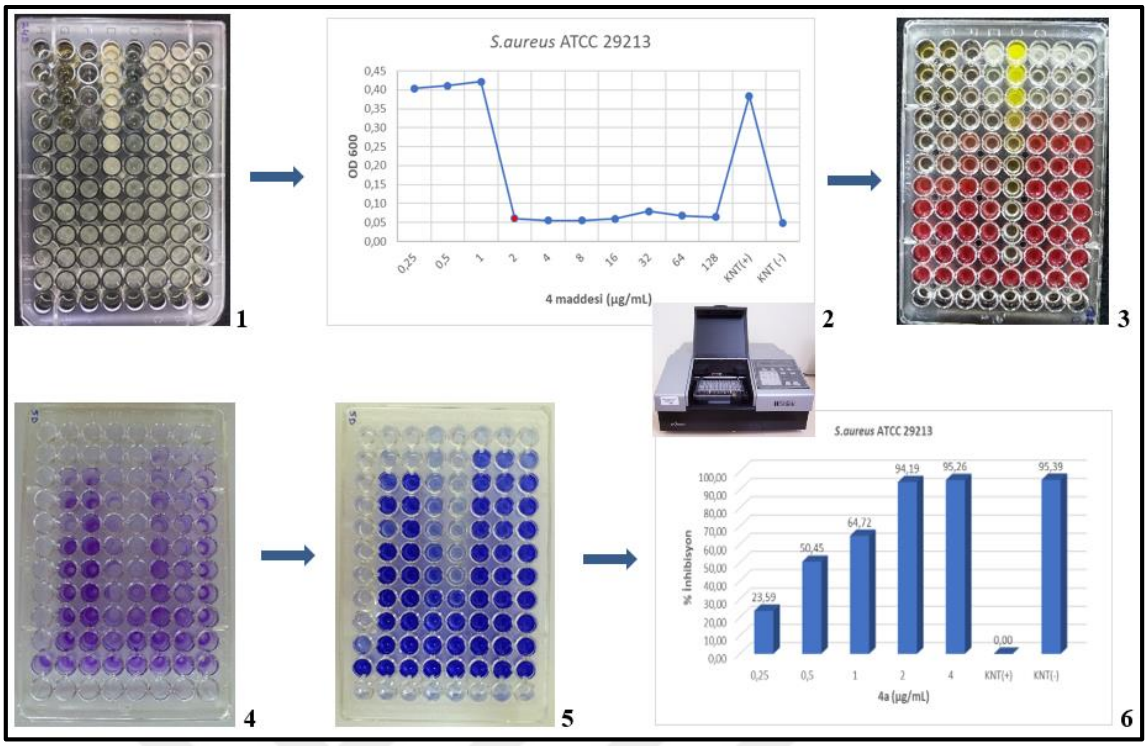
Şekil 4.8: Spektrofotometrik MİK ölçümü ; 32 µg/mL, (4a maddesi, *S.epidermidis*).



Şekil 4.9: Spektrofotometrik MİK ölçümü ;32 µg/mL, (4a maddesi, MRSA).

4.3 Maddelerin Biyofilm İnhibisyonun Belirlenmesi

Çalışmanın ilk aşamasında üç stafilakok türüne karşı MİK dozları bulunan diketon ve dioksimlerin sub-MİK dozlarda biyofilm üretimine karşı inhibisyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın aşamaları şekil 4.10'de şematik olarak verilmiştir. Kristal viyole mikrotitrasyon plak boyama tekniğiyle yapılan çalışmada hesaplanan % inhibisyon değerleri başlangıç maddesi olan (1,2,3,5,6,7) kodlu diketonlar için Çizelge 4.4'de verilmiştir. 4 numaralı diketon olan 9,10-Phenanthrenequinon çok düşük konsantrasyon değerlerinde oldukça yüksek biyofilm inhibisyonu sergilemiştir ve Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10: Biyofilm İnhibisyon çalışmasının aşamaları. 1- 24 saatlik inkübasyon sonu mikroplakalar, 2- Spektrofotometrik MİK değerlerinin bulunması, 3- Spektrofotometrik olarak ölçülemeyen MİK değerlerinin TTC metodu ile tayini, 4- Planktonik bakterilerin uzaklaştırılmasından sonra CV boyaması, 5- Bağlı CV boyasının çözündürülmesi, 6- Spektrofotometrik (%) inhibisyon değerlerinin bulunması.

Çizelge 4.4: Başlangıç maddesi 1,2-diketonların biyofilm inhibisyon değerleri (%).

Bakteriler	*S.aureus* ATCC 29213			MRSA ATCC 43300			*S.epidermidis* NRRL B-4268		
Konsantr / Diketonlar	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL
1	20,59	16,48	8,47	-	-	-	46,67	44,90	17,66
2	22,11	16,61	15,82	38,89	27,65	10,74	47,62	48,40	38,75
3	14,94	8,26	3,27	40,51	13,58	1,70	22,70	15,12	17,20
5	84,44	75,72	44,10	31,47	17,63	14,56	82,54	80,25	70,12
6	*	92,75	87,97	*	58,08	-	*	71,74	38,63
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : İnhibisyon yok, * : MİK değeri olduğu için hesaplanmamıştır.

Çizelge 4.5: 9,10-Phenanthrenequinon'un (4) biyofilm inhibisyon değerleri (%)

Bakteriler	*S.aureus* ATCC 29213			MRSA ATCC 43300			*S.epidermidis* NRRL B-4268		
Konsantr / Diketon	1 µg/mL	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL
4	90,70	65,15	37,06	*	-	-	94,72	87,98	72,61

- : İnhibisyon yok, * : MİK değeri olduğu için hesaplanmamıştır.

1,2-diketonlardan sentezlenen dioksimlerin (1a,2a,3a,5a,6a,7a) biyofilm inhibisyon sonuçları (%) olarak çizelge 4.6'de verilmiştir. 4a kodlu 9,10-Phenanthrenequinon dioksim çok düşük konsantrasyon değerlerinde oldukça yüksek biyofilm inhibisyonu sergilemiştir ve çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Kontrol standartı olarak kullanılan kurkuminin biyofilm inhibisyon değerleri ise çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6: Dioksimlerin biyofilm inhibisyon değerleri (%)

Bakteriler	*S.aureus* ATCC 29213			MRSA ATCC 43300			*S.epidermidis* NRRL B-4268		
Konsantr / Dioksimler	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL
1a	58,48	44,52	40,75	45,35	7,27	2,12	51,07	35	15,47
2a	70,83	61,03	59,79	62,05	62,19	58,46	76,29	70,1	58,36
3a	61,72	41,4	46,35	54,5	39,89	13,45	75,21	41,51	15,04
5a	90,68	88,11	86,85	40,94	38,39	36,26	85,85	59,78	43,63
6a	40,42	28,00	17,26	37,84	2,94	4,03	63,33	15,10	4,61
7a	66,12	30,09	29,66	-	-	-	53,28	11,70	7,94

- : İnhibisyon yok.

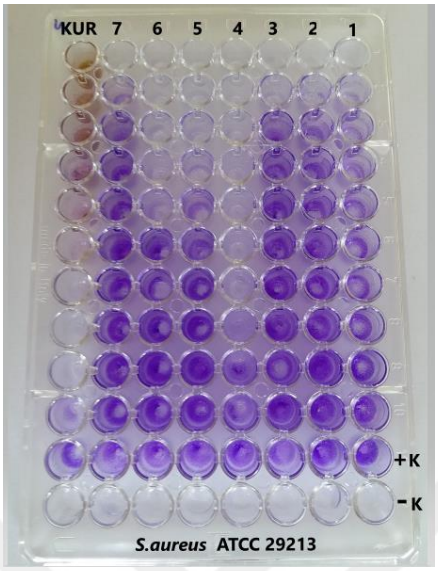
Çizelge 4.7: 9,10-Phenanthrenequinon dioksim'in(4a) biyofilm inhibisyon değerleri (%)

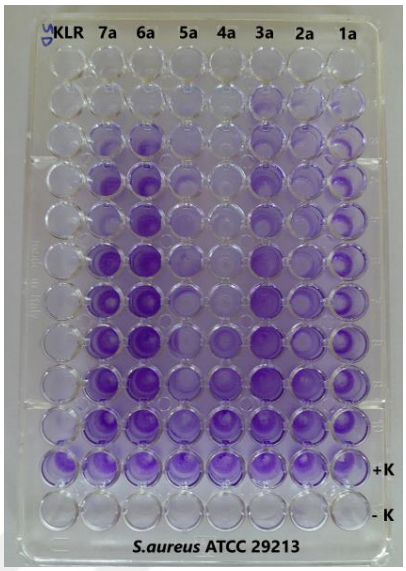
Bakteriler	*S.aureus* ATCC 29213			MRSA ATCC 43300			*S.epidermidis* NRRL B-4268		
Konsantr/ Dioksim	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL
4a	95,26	94,19	64,72	34,89	28,35	19,86	28,05	16,32	1,69

Çizelge 4.8: Kontrol standartı Kurkuminin biyofilm inhibisyon değerleri (%)

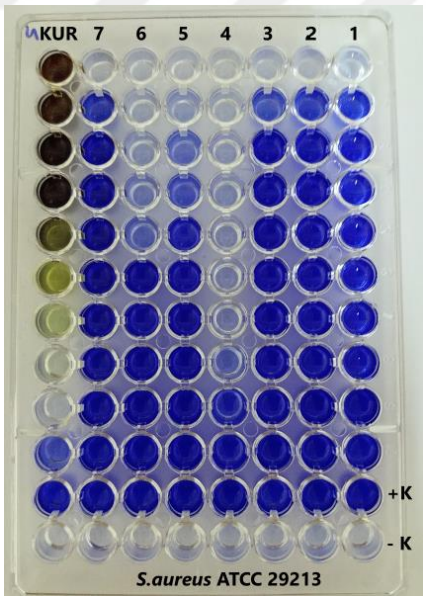
Bakteriler	*S.aureus* ATCC 29213			MRSA ATCC 43300			*S.epidermidis* NRRL B-4268		
Konsantr/ Kontrol	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL
Kurkumin	96,50	95,88	93,49	84,71	39,41	33,68	92,79	85,97	79,19

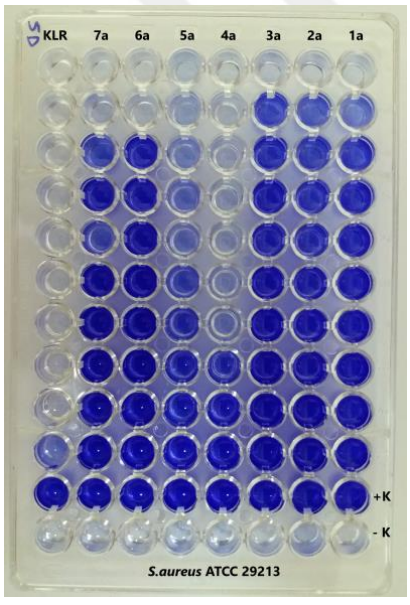
Yukarıda çizelgeler halinde verilen % inhibisyon değerleriyle ilgili mikroplaka görüntüleri ve oluşturulan grafiklerin bazılarına aşağıda örnekler verilmiştir.

a) 

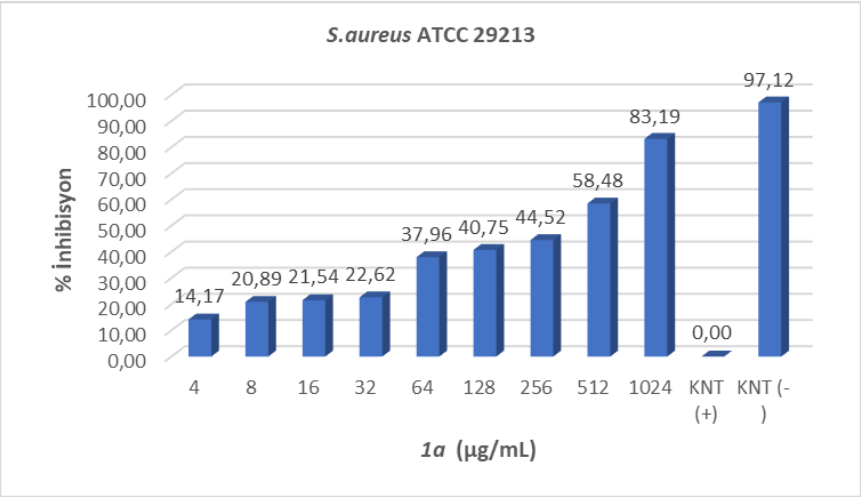
b) 

Şekil 4.11: a) *S.aureus* biyofilmlerine tutunmuş CV boyanma görüntüleri (Diketonlar), b) *S.aureus* biyofilmlerine tutunmuş CV boyanma görüntüleri (Dioksimler).

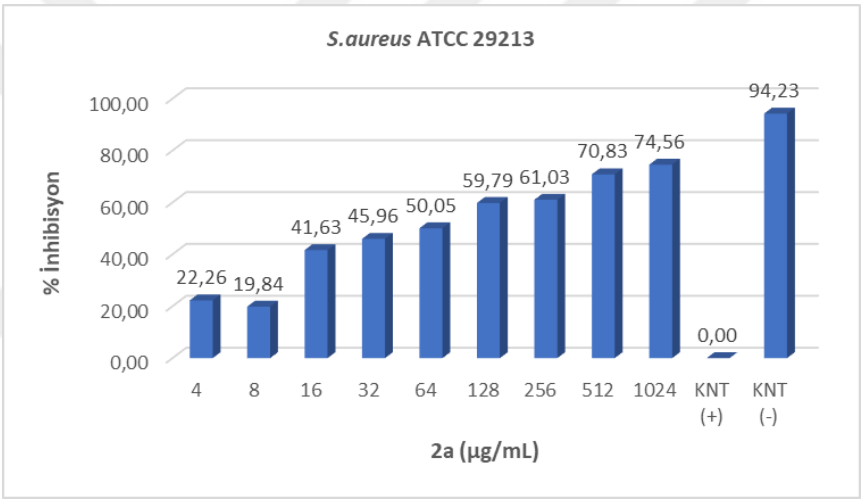
a) 

b) 

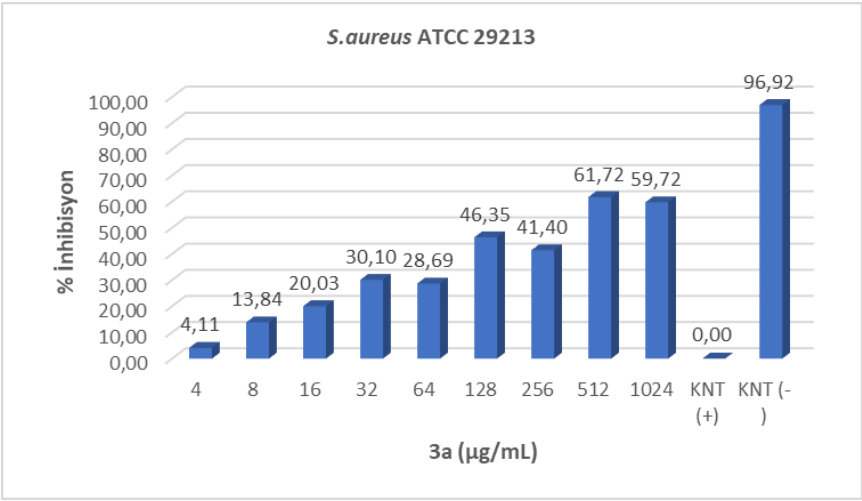
Şekil 4.12: a) *S.aureus* biyofilmlerine tutunmuş CV boyasının asetik asitle çözündürülmesi (Diketonlar), b) *S.aureus* biyofilmlerine tutunmuş CV boyasının asetik asitle çözündürülmesi (Dioksimler).



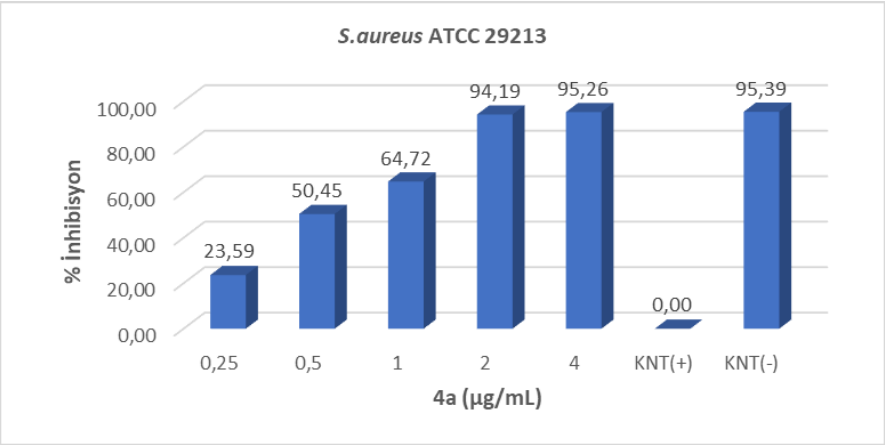
Şekil 4.13: Dioksim 1a'nın *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



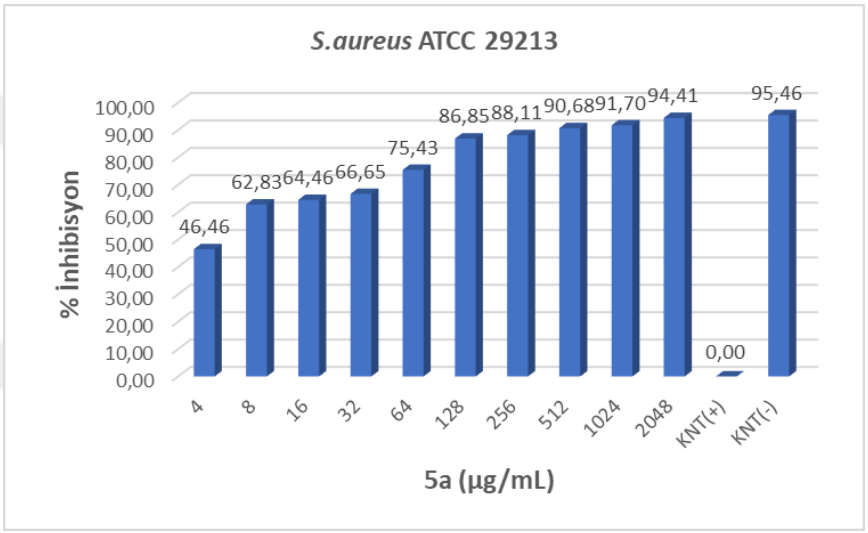
Şekil 4.14: Dioksim 2a'nın *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



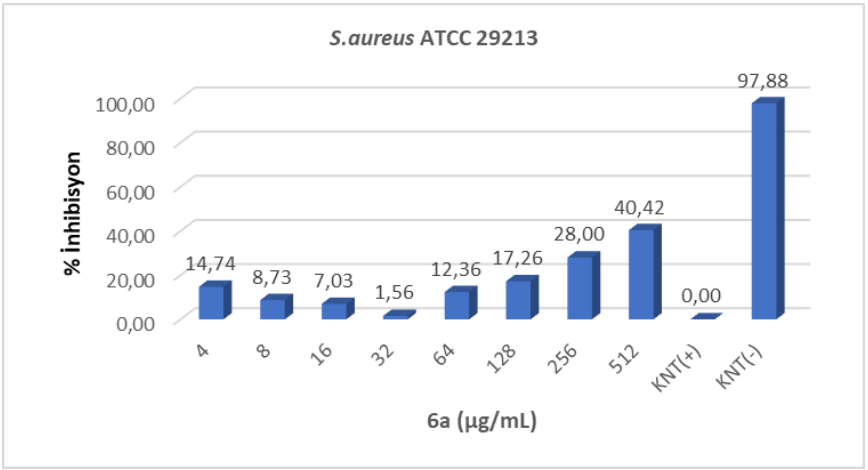
Şekil 4.15: Dioksim 3a'nın *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



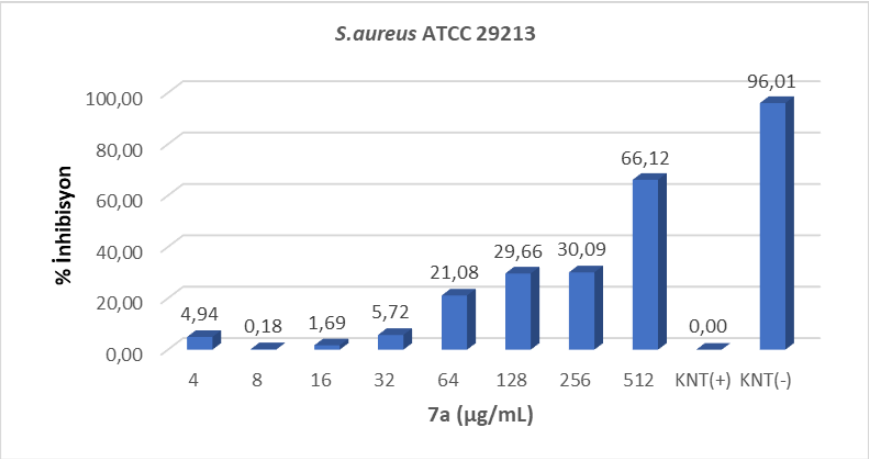
Şekil 4.16: Dioksim 4a'nın *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



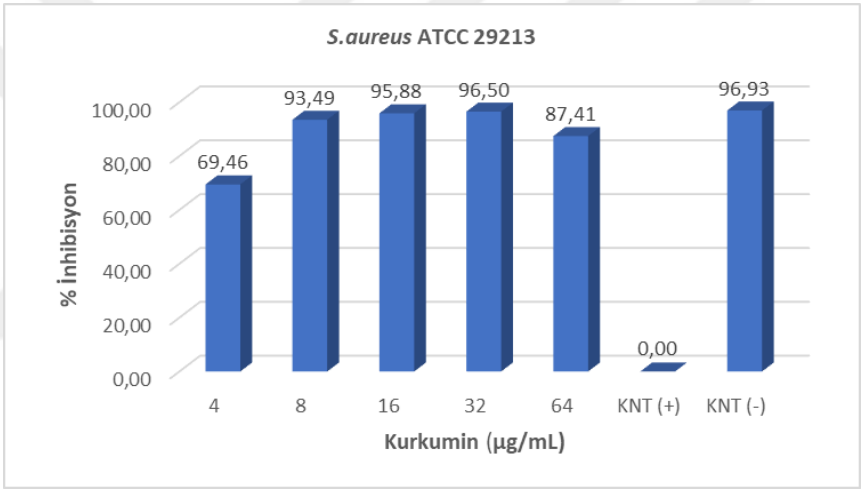
Şekil 4.17: Dioksim 5a'nın *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



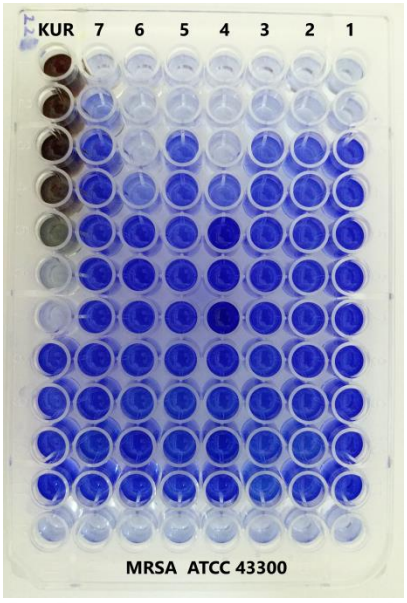
Şekil 4.18: Dioksim 6a'nın *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

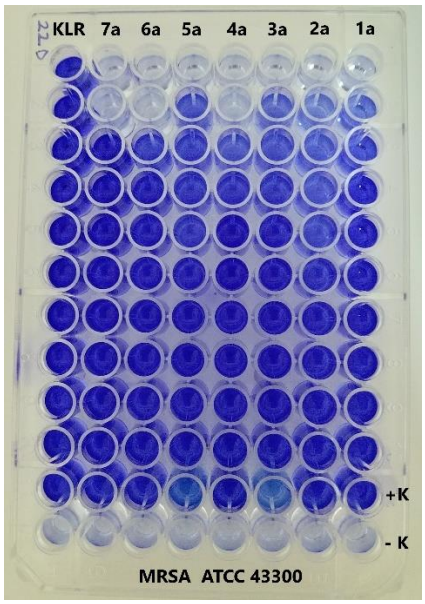


Şekil 4.19: Dioksim 7a'nın *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

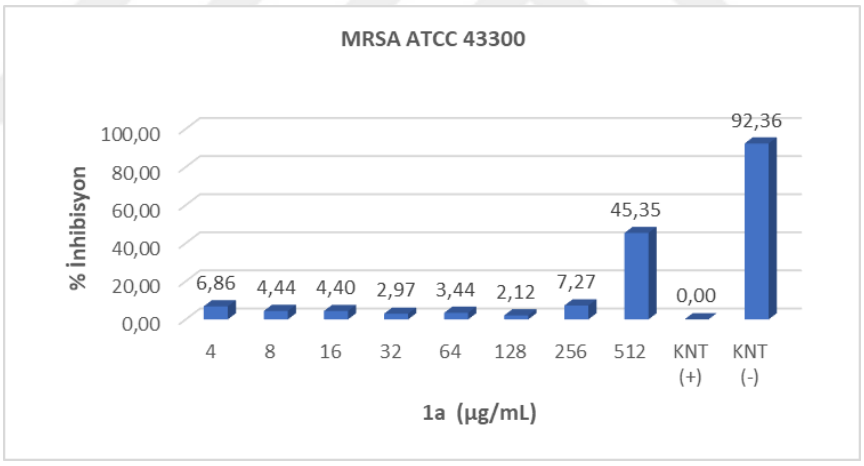


Şekil 4.20: Kurkuminin *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

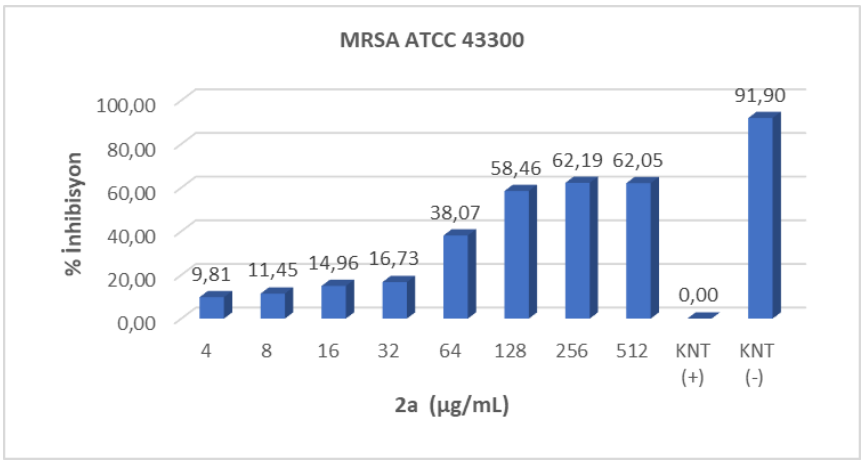
a) 

b) 

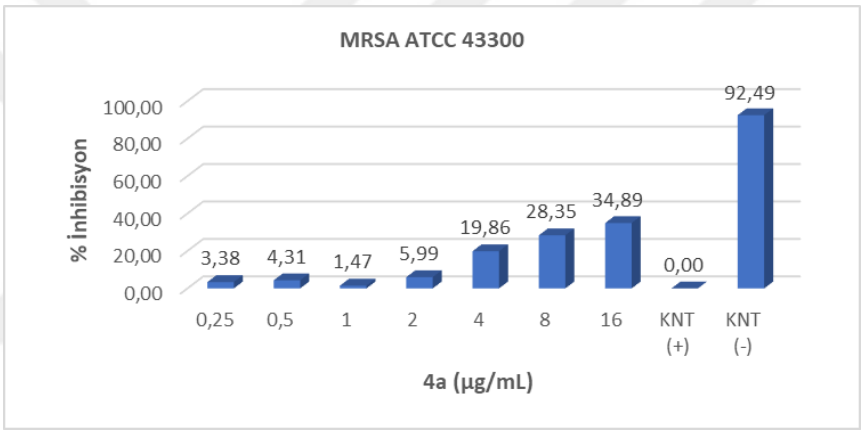
Şekil 4.21: a) MRSA biyofilmlerine tutunmuş CV boyasının asetik asitle çözündrülümesi (Diketonlar), b) MRSA biyofilmlerine tutunmuş CV boyasının asetik asitle çözündürülmesi (Dioksimler).



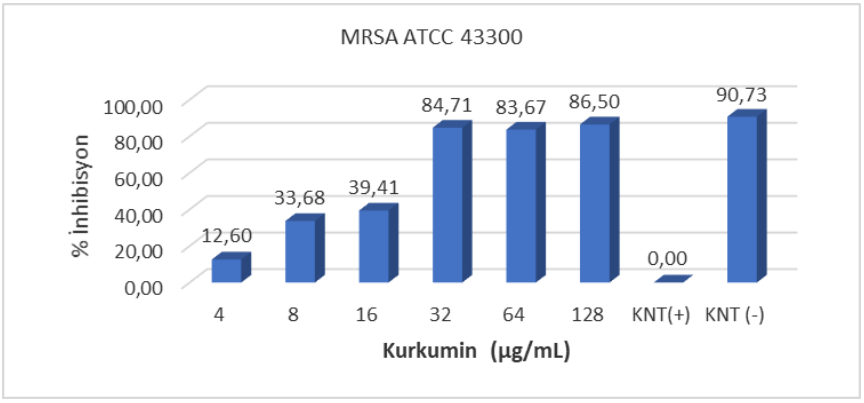
Şekil 4.22: Dioksim 1a'nın MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



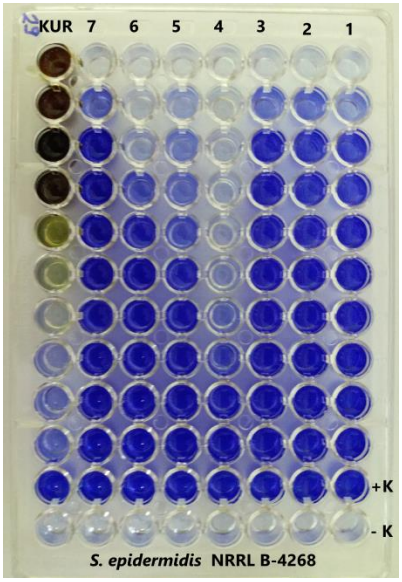
Şekil 4.23: Dioksim 2a'nın MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

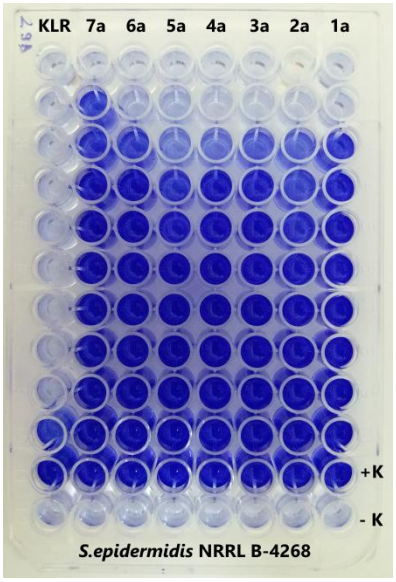


Şekil 4.24: Dioksim 4a'nın MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

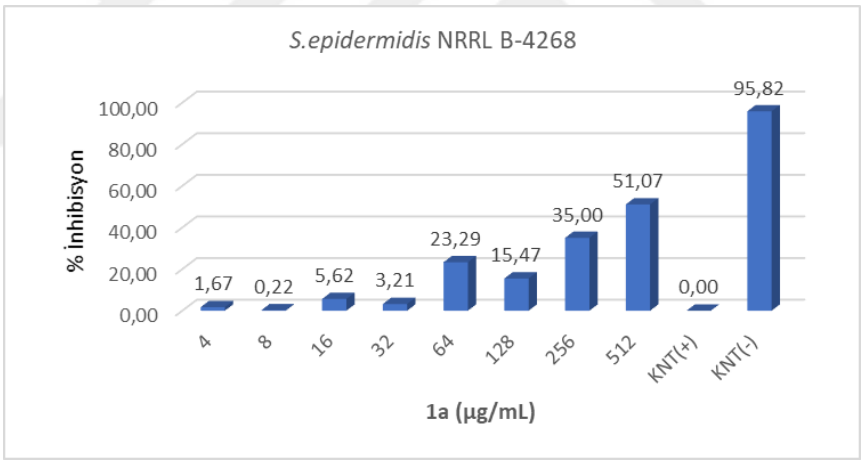


Şekil 4.25: Kurkuminin MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

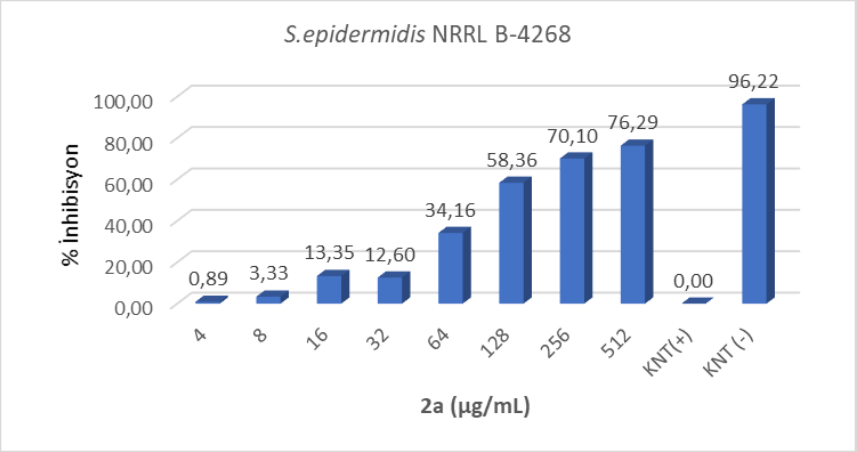
a) 

b) 

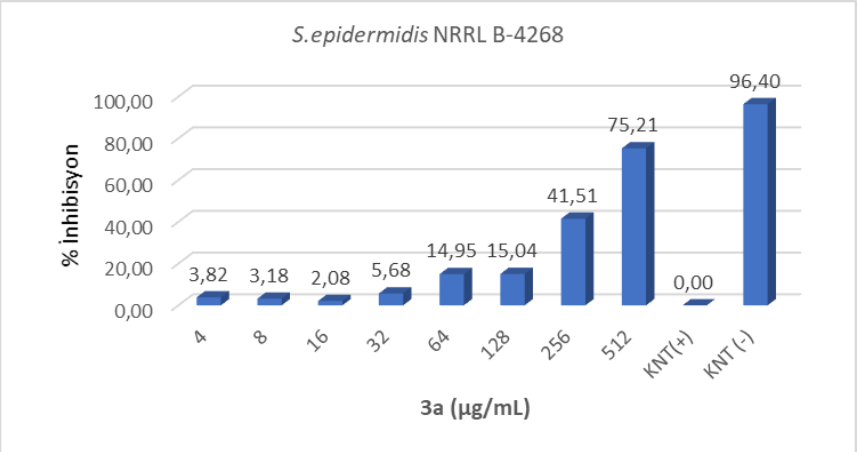
Şekil 4.26: a) *S.epidermidis* biyofilmlerine tutunmuş CV boyasının asetik asitle çözündürülmesi (Diketonlar), b) *S.epidermidis* biyofilmlerine tutunmuş CV boyasının asetik asitle çözündürülmesi (Dioksimler).



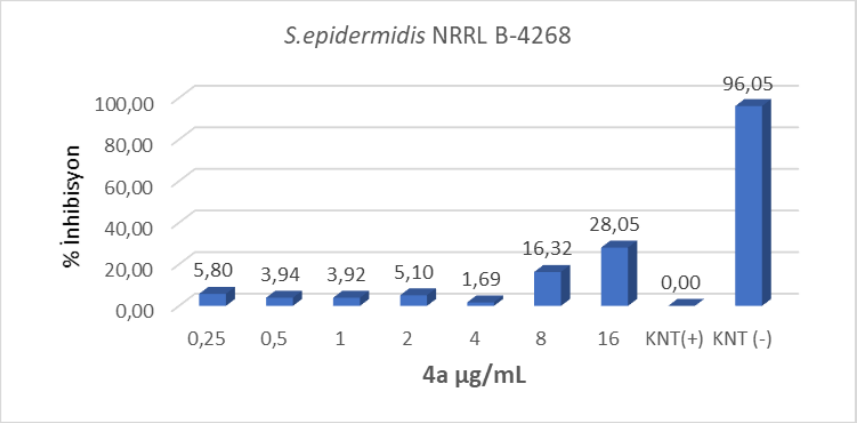
Şekil 4.27: Dioksim 1a'nın *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



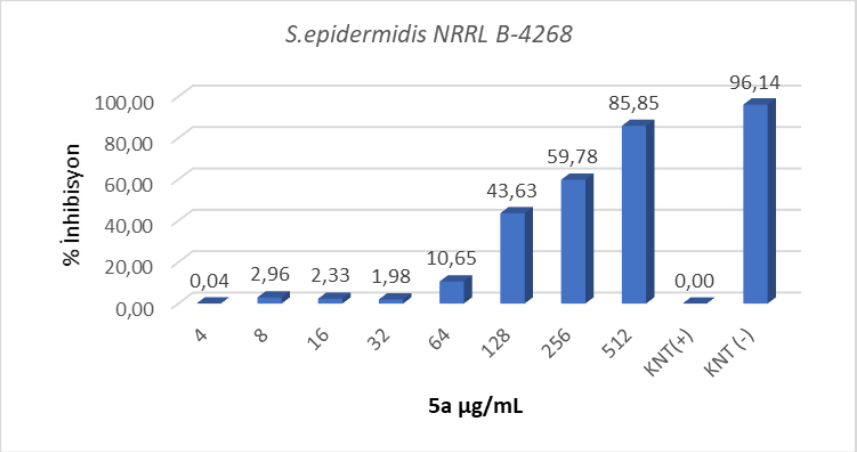
Şekil 4.28: Dioksim 2a'nın *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



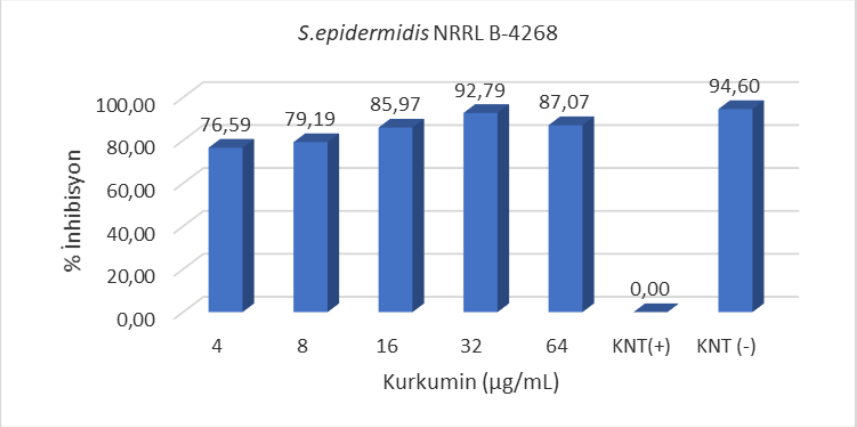
Şekil 4.29: Dioksim 3a'nın *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.30: Dioksim 4a'nın *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.31: Dioksim 5a'nın *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.32: Kurkuminin *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

5 TARTIŞMA

Dioksimler ve onların metal kompleksleri çeşitli kullanım alanlarıyla önemli bir bileşik sınıfını oluşturmaktadır. Son yıllarda dioksimlerin ilginç biyolojik özelliklerinin ortaya çıkmasıyla birlikte, bu bileşiklerin bilimsel ve ticari bakımdan önemi daha da artmıştır. *Vic*-dioksimler; 1905 yılında Tschugaeff'in dimetilglioksim'in nikel ile çözünmeyen kırmızı kompleksler verdiğini ve nikelin tayini için etkili bir analitik reaktif olarak kullanılabileceğini keşfettiği günden itibaren yaygın olarak kullanılmış ve hala üzerinde birçok araştırma yapılan eşsiz bileşiklerdir (Tschugaeff 1905, Yilmaz ve ark 2010). Çalışmamızda kullanılan α-benzil dioksim (1a), bitkisel ve hayvansal gıda maddelerinde voltametrik bir yöntemle seçici ve hassas kobalt tayini için kullanılan önemli bir şelatlama ajanıdır (Giroussi ve ark 1995). Ayrıca ucuz ve hassas spektrofotometrik metotla nikel (II) iyonu tespit etmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Ghaedi 2007, Bakkiyaraj ve ark 2016). Gün geçtikce dioksimler ve onların metal komplekslerinin farmakolojik özellikleri de ortaya çıkmaktadır. Özellikle antitümör (Çelik ve ark 2019), antimikrobiyal (Uğur ve ark 2000, Sevgi ve Bedük 2012), antioksidan (Özen ve Taş 2009), tümör biyogörüntüleme ajanı (Motaleb ve ark 2018) ve kalp görüntüleme ajanı (Schwochau ve ark 1993, Liu ve ark 2016) olarak kullanım alanları bulunmuştur. Yaptığımız literatür araştırmalarında, uzun yıllardır bilinen ve sentezlenen dioksim bileşiklerinin antibiyofilm etki çalışmalarında kullanılmadığı görülmüştür.

Biyofilm hücreleri antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olup; antimikrobiyal ajanlarla teması engelleyen, ya da azaltan bariyere sahiptirler (O'Toole ve ark 2000) ve bu durum günümüzdeki bakteri kontrol yöntemlerini zora sokmaktadır. Son yıllarda antimikrobiyal ajanların kullanımıyla ilgili sorunlar, daha hızlı etki eden ve yan ürünler üretmeyen, alternatif yeni ajanlara ihtiyacın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu yaklaşım doğrultusunda toksik olmayan, kolay elde edilebilir, küçük yapılı dioksimlerin antibiyofilm çalışmalarının yapılmasının endüstriyel ve medikal alanda ciddi problem kaynağı olan biyofilmlerin inhibisyonu için iyi bir alternatif olabilir. Bu düşünceyle seçtiğimiz, kolay elde edilebilen, aromatik 1,2-diketon türevi dioksimler literatürlerdeki metotlara bağlı kalarak sentezlenmiş ve stafilakok türü bakterilerin ürettikleri biyofilmleri inhibe etme özellikleri incelenmiştir.

Stafilokoklar hastane enfeksiyonlarında en sık izole edilen cinsi temsil eder ve implant kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenidir (Conrady ve ark 2013). İmplant yüzeylerini kolonize eden en yaygın bakteriler *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus'tur* (Costerton ve ark 1995). Bu enfeksiyonlardaki anahtar patojenik mekanizma bir biyofilm oluşumudur. Hastane enfeksiyonlarına neden olan *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterileri birçok antibiyotiğe dirençlidir. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), potansiyel olarak ölümcül enfeksiyonlara neden olan morbidite, hastanede kalış süresi ve hastane maliyetlerinin artışında rolü olan bir bakteridir. Bir biyofilm içinde gömülü olan bakteriler genellikle, düşük bir metabolik faaliyet içerisinde ve durgun bir büyüme fazında bulunmakla birlikte konakçı bağışıklık sistemine ve antimikrobiyal maddelere karşı daha az duyarlıdırlar. Hatta biyofilmdeki bakterilerin, antimikrobiyal ajanların etkilerine karşı planktonik olan bakterilerle kıyaslandığında 10-1000 kat daha dirençli oldukları varsayılmaktadır (Amorena ve ark 1999, Mah ve O'Toole 2001). Bu durum, vasküler kateterler ve eklem protezleri gibi implante tıbbi cihazların artan kullanımıyla birlikte ilaca dirençli ve biyofilm ile ilişkili hastalıklarla etkin bir şekilde mücadele etmek için yeni tip antibiyotikler geliştirme ihtiyacını beraberinde getirmektedir.

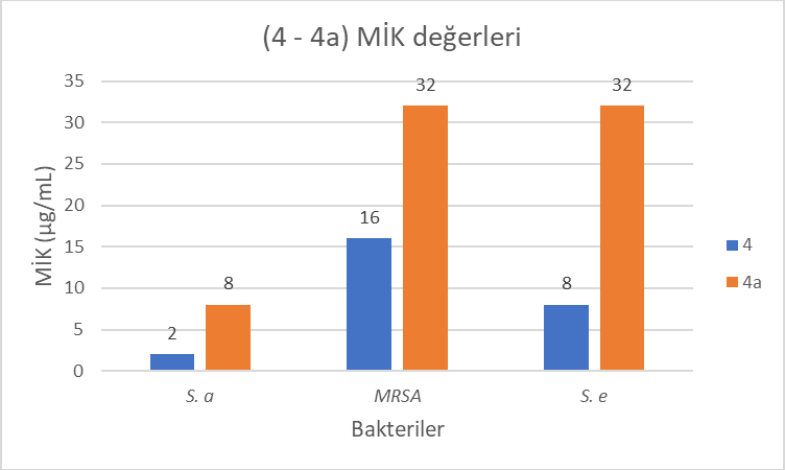
Bu amaçlar doğrultusunda dioksimlerin biyofilm enfeksiyonlarını önlemedeki rollerini araştırmak amacıyla sentezlediğimiz yedi dioksim ve bunların çıkış maddeleri olan diketonların stafilok türü biyofilm oluşturan üç suşa (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 43300 ve *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268) karşı etkinlikleri araştırılmıştır.

Araştırmaya dahil ettiğimiz dioksimlerin sentezi için ticari diketonlar (1-7) kullanılmıştır. Elde edilen dioksimlerden bir tanesi (3a, 4,4′-Diflorobenzil dioksim) hariç diğerleri literatürlerde var olan maddelerdir. 3a maddesine en geniş online veri tabanları olan Scifinder® ve Reaxys® veri tabanlarında rastlanmamış ve benzer literatürlerdeki metotlar esas alınarak sentezlenmiştir. Maddelerin karakterizasyonu erime noktaları, FT-IR ve ^{1}H-NMR verileri alınarak yapılmıştır. Spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle uyumludur. Ekler kısmında verilen ^{1}H-NMR spektrumları incelendiğinde dioksimler için karakteristik olan 10 ppm ve üzeri oksim protonlarına ait pikler (Karataş ve ark., 1991) ilk üç dioksim (1a,2a,3a) için sırasıyla 11.53, 11.44 ve 11.60 ppm de görülmektedir. Ayrıca bütün dioksimlerin Ni^{+2} iyonlarıyla kırmızı-

turuncu renkte kompleks vermeleri diketonların dioksimlere dönüştüğünü doğrulamıştır. Bilindiği üzere dioksimler diketonlardan sentezlenirken başlıca *amfi-*, *anti-* ve *syn-* olmak üzere üç izomer şeklinde sentezlenmektedir(Gök ve Bekaroglu 1981). Tek singlet pik çıkması izomerik saflığı göstermekle birlikte maddelerin *anti-* konfigürasyonunda olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca anti izomerler için karakteristik olan Ni^{+2} iyonları ile kırmızının tonlarında kompleksler oluşması *anti-* yapıyı desteklemektedir. 4a maddesi için literatürdeki metot (Colak ve ark 2017) takip edilerek yapılan çalışmalarımızda ortamda monoksim ve dioksimlerin izomerlerinin karışım halinde oluştuğu tespit edilmiştir. 3 saat olan reaksiyon sürenin yetersiz olduğu görülmüş ve reaksiyona 48 saat devam edilmiştir. Etanol/sudan birkaç kez kristallendirilerek saflaştırılan maddenin ^{1}H-NMR spektrumundan 12.44-12.15 ppm arasında singlet piklerin görülmesi ortamda dioksim izomerlerinin var olduğunu göstermektedir. Kromatoğrafik ayırma birbirine çok yakın Rf (retention factor, geciktirme faktörü) değerleri yüzünden mümkün olmamıştır. 5a ve 6a dioksimleri için sırasıyla 12,36 ve 11,71 ppm de çıkan singlet pikler anti izomere ait olup yapıları doğrulamaktadır. 7a dioksiminin ^{1}H-NMR spektrumunda görülen 12,81-11,61 ppm pikler ortamda dioksim izomerlerinin varlığını göstermektedir. Kromotoğrafik ayırma birbirine çok yakın Rf değerleri yüzünden mümkün olmamıştır.

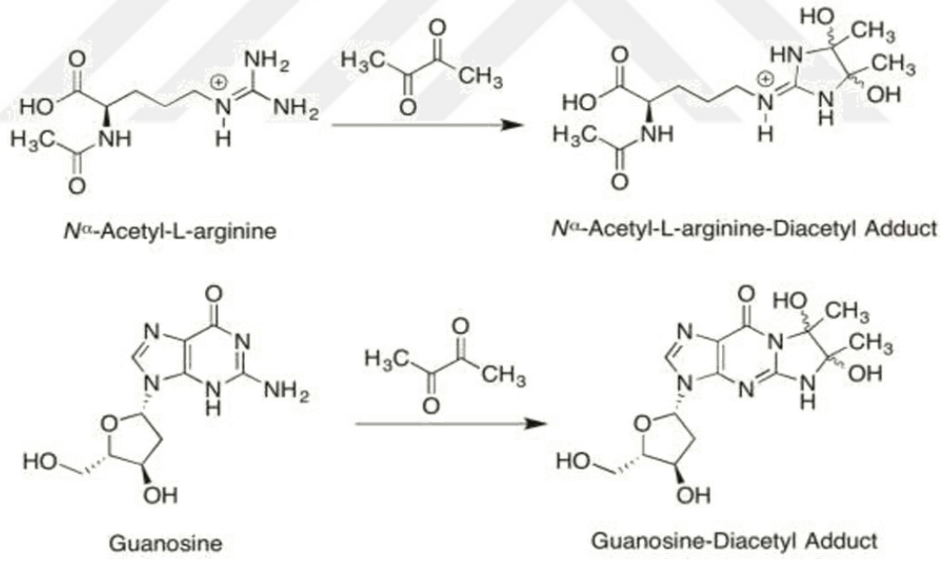
Sentezlenen dioksimlerin stafilokok türlerinin biyofilm oluşumunu inhibe etme potansiyellerini değerlendirmek için ilk çalışma MİK ölçümleri olmuştur. MİK ölçümleri broth mikro dilüsyon yöntemiyle 96'lık mikro plakalarda yapılmıştır. Dioksimlerle (1a-7a) başlangıç maddeleri olan diketonların antibakteriyel etkilerini karşılaştırabilmek için diketonların da (1-7) MİK'leri tespit edilmiştir. Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3' de verilen sonuçlar incelendiğinde sadece (4) numaralı diketon olan 9,10-Phenanthrenequinone ve onun dioksim türevi olan (4a) kodlu 9,10-Phenanthrenequinone dioksim bileşiğinin antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur.

Şekil 5.1'den de görüldüğü gibi diketon olan (4) bileşiği *S.aureus* bakterisine karşı 2 µg/mL gibi oldukça küçük bir MİK değeriyle kontrol antibiyotiği olan klaritromisin'e (0,5 µg/mL) yakın bir antibakteriyel etki göstermiştir.



Şekil 5.1: 4 ve 4a maddelerinin MİK değerleri.

Genel olarak başlangıç maddeleri olan diketonlar ile dioksimleri kıyasladığımızda diketonların antibakteriyel etkilerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun sebepleri arasında 1,2-diketonların, polipeptitler ve proteinlerdeki arginin kalıntılarını, pozitif yük kaybı ve tripsin bölünmesi yoluyla değiştirmesinden kaynaklı olabilir (Carter 2018).



Şekil 5.2: N-α-asetilarjinin ve 2-deoksiguanisin ile diketon olan diasetil'in reaksiyonu (Anders 2017)

Bazı diketonlara maruz kalmanın, insanlarda ve deney hayvanlarında solunum yolu hasarına neden olduğuyla ilgili çalışmalar vardır. Elektrofilik diketonlar kritik proteinlerdeki nükleofilik arginin kalıntılarını kovalent olarak değiştirebilir (Şekil 5.2) ve böylece gözlenen solunum yolu patolojisini üretebilir (Anders 2017).

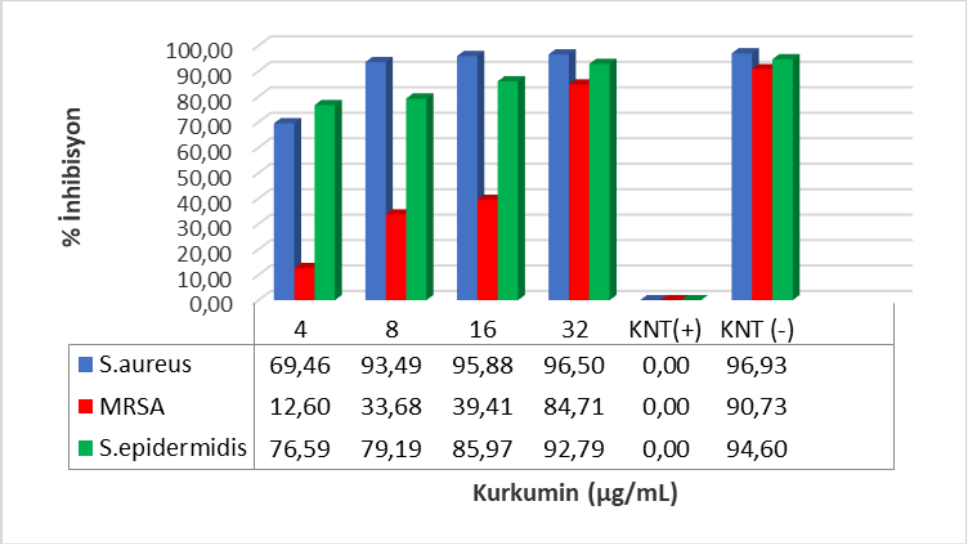
Çalışmamızda kullandığımız antibakteriyel etkisi en fazla olan 4 numaralı diketon (9,10-Phenanthrenequinone) atmosfer gazında bulunan, dizel yakıtlardan kaynaklı kirleticiler içerisinde değerlendirilmekte ve toksik etkileriyle ilgili çalışmalar oldukça fazladır (Kumagai ve ark 2016). Bu madde aynı zamanda arjinin ve guanidinlerin teşhisi için analitik reaktif olarak da kullanılmaktadır (Yamada ve Itano 1966). Diğer maddelerin MİK değerleri incelendiğinde diketon ve dioksimlerin stafilakok cinsi bakteriler üzerinde antibakteriyel etki göstermedikleri sonucuna varılmıştır (MİK ≥ 512). Doğal antibiyofilm bir ajan olan ve çalışmanın kontrolü için kullandığımız kurkumin'nin MİK değerleri ise literatürlerde verilen değerlerle uyumlu olarak 128-256 μg/mL aralığında ölçülmüştür. Kurkumin suda çözünmediği için biyolojik çalışmalarda DMSO çözeltisi halinde kullanılmaktadır. Besiyeri ortamında DMSO da çözünmüş kurkuminin de kısmen çökmesi MİK ölçümlerini zorlaştırmaktadır (Singh ve ark 2017). Bu nedenden kaynaklı literatürlerde farklı sonuçlarla karşılaşılmaktadır. Kurkumin'in 7 standart suş üzerinde yapılan bir antibakteriyel etki çalışmasında MİK değerleri 163-293 μg/mL aralığında bulunmuştur(Gunes ve ark 2016). Bir başka çalışmada ise biofilm üreten 60 bakteri izolatı üzerinde yapılan MİK çalışmasında gram pozitif izolatlar için 126,9 μg/mL, gram negatif izolatlar için ise 117,4 μg/mL ortalama MİK değerleri bulunmuştur(Kali ve ark 2016). Literatürlerle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da kurkuminin antibakteriyel etkisinin yüksek olmadığı fakat kuvvetli antibiyofilm özelliği gösterdiği bulunmuştur.

MİK değerleri belirlendikten sonra sub-MİK dozlarda dioksim ve başlangıç maddeleri olan diketonların üç stafilokok suşu (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) ve *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268) üzerinde biyofilm inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Biyofilm çalışmalarında en çok kullanılan yöntem Christensen ve arkadaşları tarafından tarif edilen mikroplaka boyama yöntemidir ve biyofilm oluşumunun tespiti için standart test olarak kabul edilir (Christensen ve ark 1985). Çalışmada planktonik bakterilerin yıkanarak uzaklaştırılması aşaması çalışmanın en kritik basamağını oluşturmaktadır. Yaptığımız denemeler neticesinde kuyucukların hepsi aynı şekilde standart bir yıkama işlemine tabi olmadığı sürece doğru ve optimum sonuçlar alınamamıştır. Bu sorun, her bir kuyucuğa eşit ve aynı şartlarda dağıtım yapabilen otomatik bir dispenser (BioTek microFill) kullanarak çözülmüş ve tekrarlanabilir optimum sonuçlar ancak bu şekilde alınmıştır.

Biyofilm inhibisyon sonuçları diketonlar için çizelge 4.4'de verilmiştir. 4 numaralı diketon olan 9,10-Phenanthrenequinon'un % biyofilm inhibisyon değeri Çizelge 4.5'de verilmiştir. Dioksimlerin % biofilm inhibisyon değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. 4a kodlu dioksim olan 9,10-Phenanthrenequinon dioksimin % biyofilm inhibisyon değeri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Kontrol standartı olarak kullanılan doğal antibiyofilm ajan olan kurkumin'in % biyofilm inhibisyon değerleri ise Çizelge 4.8'de verilmiştir. Stafilakok biyofilmleri üzerinde diketonların % inhibisyon değerleri incelendiğinde en yüksek inhibe edici madde 4 numaralı diketon olan 9,10-Phenanthrenequinon'dur. 4 bileşiği özellikle *S.aureus* biyofilmini 1 μg/mL gibi oldukça düşük konsantrasyonda bile % 90,70 oranında inhibe etmiştir. *S.epidermidis* biyofilmi üzerinde ise 1 μg/mL derişiminde %72,61 oranında, 4 μg/mL derişiminde ise % 94,72 inhibisyon sergileyerek hem kuvvetli antibakteriyel hem de antibiyofilm özellikte bir madde olarak dikkat çekmektedir. İlginç olarak MRSA biyofilmleri üzerinde inhibisyon göstermemiştir. Diğer diketonları incelediğimizde 128 μg/mL derişiminde 5 numaralı diketon *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % 70,12 inhibisyon gösterirken 6 numaralı diketon *S.aureus* biyofilmi üzerine % 87,97 inhibisyon göstermiştir. Diğer diketonlar (1,2 ve 3) %45'in altında inhibisyon göstermiştir. 7 numaralı diketon ise bütün bakteriler için herhangi bir biyofilm inhibisyon özelliği göstermemiştir.

Bir β-diketon olan kurkumin, zerdeçal olarak da bilinen *Curcuma longa* bitkisinin doğal bir bileşenidir. Antik çağlardan beri, zerdeçal kökü Hindistan ve diğer Asya ülkelerinde bir baharat olarak popüler olmuştur. Önceki araştırmalar diyabet, inflamatuar bozukluklar ve farklı kanser türlerini içeren birçok hastalıkta terapötik bir rol oynadığını göstermiştir (Tyagi ve ark 2015). Son yıllarda ise kurkuminin antibakteriyel ve antibiyofilm özelliğini ön plana çıkaran çalışmalar yapılmıştır (Moshe ve ark 2011, Khan ve ark 2012, Tyagi ve ark 2015, Gunes ve ark 2016). Antibiyotiklerle sinerjik olarak daha güçlü bir antibiyofilm özellik kazanan kurkumin (Kali ve ark 2016), nano boyutta sentezlendiğinde ise çözünürlük ve antibiyofilm aktivite artışı ile dikkat çeken doğal ve toksik olmayan bir tedavi ajanı potansiyeli sergilemektedir(Loo ve ark 2016, Singh ve ark 2017, Pal ve ark 2018). Çalışmamızda kurkuminin 32 μg/mL derişiminde her üç türün de üretmiş olduğu biyofilmleri kuvvetli bir şekilde (%96,50-%84,71, %92,79) inhibe ettiği görülmektedir (**Şekil 5.3**). Derişim azaldıkça MRSA hariç etki devam etmektedir. Literatürde de kurkumin, *S. aureus* için 100 μg/mL

derişiminde biofilm üretimini tamamen inhibe ederken 25 µg/mL derişiminde %86'nın üzerinde inhibisyon göstermiştir (Moshe ve ark 2011).

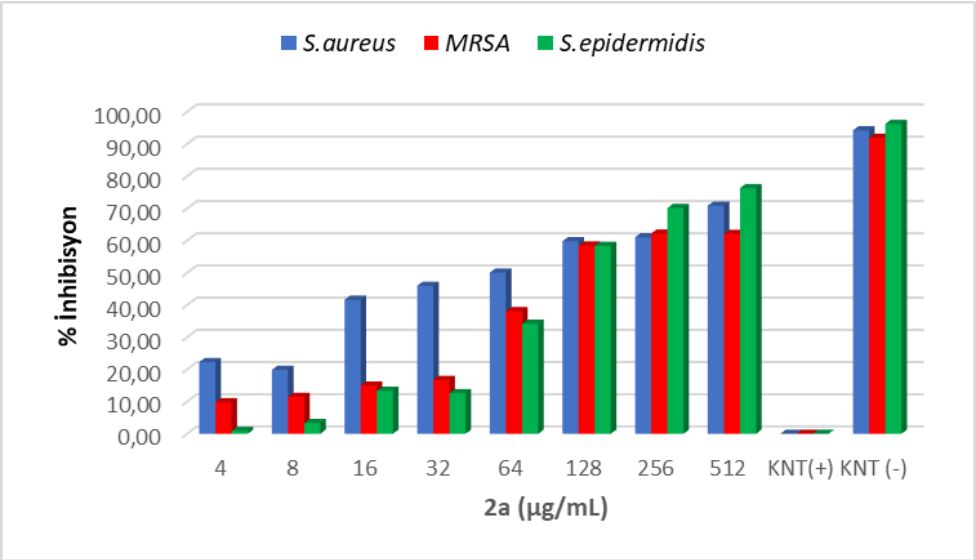


	4	8	16	32	KNT(+)	KNT (-)
S.aureus	69,46	93,49	95,88	96,50	0,00	96,93
MRSA	12,60	33,68	39,41	84,71	0,00	90,73
S.epidermidis	76,59	79,19	85,97	92,79	0,00	94,60

Şekil 5.3: Kurkumin'in stafilakoklar üzerinde biyofilm inhibisyon yüzdeleri (%).

Sentezlenen dioksimlerin biyofilm inhibisyonlarını tek tek inceleyecek olursak. 1a maddesi 128 µg/mL derişiminde *S. aureus*'a karşı % 40,75 inhibisyon gösterirken, diğer bakterilere karşı kayda değer bir etki göstermemiştir. Başlangıç maddesi olan 1 numaralı diketonun %8,47 inhibisyon değeriyle kıyaslandığında maddenin dioksime dönüşmesi inhibisyon özelliğini 5 kat arttırmıştır.

2a maddesi 128 µg/mL derişiminde *S. aureus* biofilmlerine karşı % 59,79 inhibisyon gösterirken, MRSA'ya karşı % 58,46, *S.epidermidis*'e karşı da % 58,36 inhibisyon aktivitesi göstererek dikkat çekmiştir (Şekil 5.4). Ayrıca etki doza bağlı bir değişim göstermektedir. 2a dioksimi, diketonu olan 2 maddesiyle kıyaslandığında ortalama 4 kat aktivite artışı gözlenmiştir. MRSA'ya karşı diğer dioksimlerin ya hiç ya da düşük aktivite sergilemelerine karşın 2a maddesinin etki göstermesi önemli bir sonuçtur.

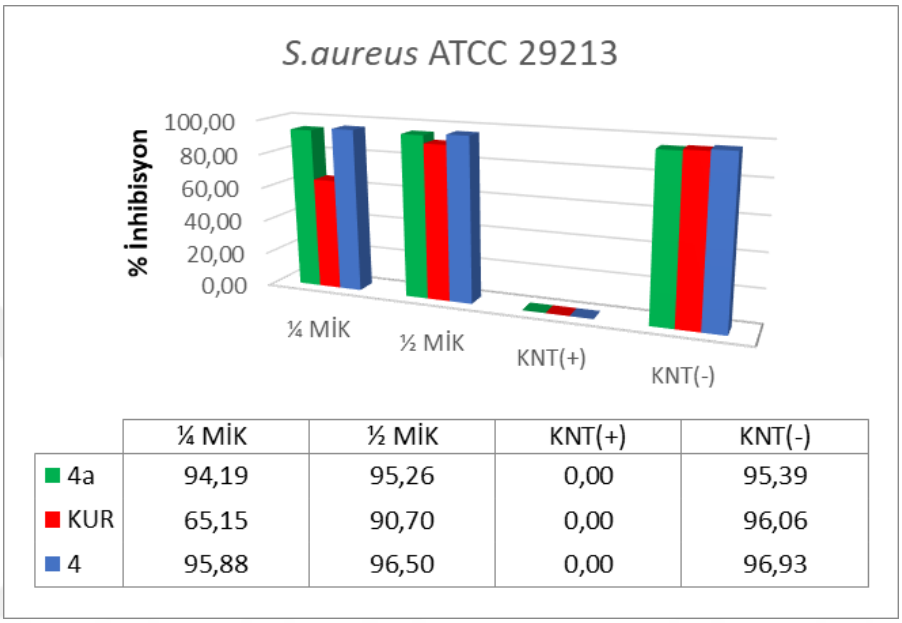


Şekil 5.4: 2a Dioksiminin stafilakoklar üzerinde (%) biyofilm inhibisyonları.

3a maddesi 128 µg/mL derişiminde *S. aureus*'a karşı % 46,35 inhibisyon gösterirken, diğer bakterilere karşı kayda değer bir etki göstermemiştir. Başlangıç maddesi olan 3 numaralı diketonun %3,27 inhibisyon değeriyle kıyaslandığında maddenin dioksime dönüşmesi inhibisyon özelliğini 14 kat arttırmıştır.

4a maddesi dioksimler arasında, *S. aureus*, MRSA, *S.epidermidis* biyofilmlerine karşı sırasıyla 8, 32 ve 32 µg/mL MİK değerleriyle antibakteriyel etkisi en fazla olan bileşik olarak bulunmuştu. Bu maddenin biyofilm oluşumunu önleme etkileri incelendiğinde, *S. aureus*'a karşı biyofilm inhibisyonu sub-MİK doz olan 4 ve 2 µg/mL derişiminde sırasıyla %95,26 ve %94,19 gibi yüksek inhibisyon değerleriyle dikkat çekmiştir. Kontrol maddesi olan kurkuminin 16 ve 32 µg/mL derişimde sırasıyla %95,88- %96,50 inhibisyon değeri gösterdiği dikkate alındığında 4a maddesi *S. aureus* için kurkuminden daha etkili biyofilm inhibisyonu sergilemiştir. 4a maddesi MRSA ve *S.epidermidis* türlerine karşı %35'in altında etki göstermiştir. Başlangıç maddesi olan 4 numaralı diketon ile 4a dioksimi, ½ MİK ve ¼ MİK dozları için karşılaştırıldığında 4 için % 90,70, % 65,15 iken 4a için % 95,26, % 94,19 inhibisyon değerleri gözlenmiştir (Şekil 5.5). Diketon olan 4 maddesi sadece *S.epidermidis* için dioksim 4a'dan daha fazla biyofilm inhibisyonu sergilemiştir. 9,10-Phenanthrenequinon'un (4) dioksime (4a) dönüştürülmesiyle antibakteriyel etkisinin azaldığı fakat antibiyofilm özelliğinin arttığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç 9,10-Phenanthrenequinon'un oldukça reaktif olan

komşu karbonil gruplarının daha az reaktif olan oksim gruplarıyla yer değiştirmesiyle elde edilen 9,10-Phenanthrenequinon dioksim (4a) bileşiğinin toksisitesinde de azalma oluşturacağı tahmin edilmektedir. Bakteriyel toksisitesinde görülen azalma buna işaret etmektedir. 4a dioksiminin toksisite analizlerinin yapılması planlanmıştır. 4a dioksimi toksik özellik göstermiyorsa kuvvetli bir antibiyofilm madde olarak kullanma potansiyeli taşımaktadır.



	¼ MİK	½ MİK	KNT(+)	KNT(-)
4a	94,19	95,26	0,00	95,39
KUR	65,15	90,70	0,00	96,06
4	95,88	96,50	0,00	96,93

Şekil 5.5: (4a), Kurkumin, (4) bileşiklerinin ½ ve ¼ -MİK dozlarda % biofilm inhibisyonları.

5a maddesi 128 µg/mL derişiminde *S. aureus* biofilmlerine karşı % 86,85 inhibisyon göstererek 4a'dan sonra en etkili 2. madde olmuştur. 4a ile yapısal benzerliğe sahip olan bu dioksim, aromatik kinonların biyofilm inhibisyonu çalışmalarında önemli etkiler gösterdiğiyle ilgili literatürlerle uyumludur(Lee ve ark 2016, Manoharan ve ark 2017). 128 µg/mL derişiminde diğer bakteri türlerine karşı ise önemli bir etki göstermemiştir.

6a ve 7a dioksimleri incelendiğinde ise önemli bir biyofilm inhibisyon etkisine sahip olmadıkları görülmüştür.

6 SONUÇ ve ÖNERİLER

Dioksimler ve metal kompleksleri yüzyılı aşkın süredir bilinen ve çeşitli kullanım alanlarıyla önemli bir bileşik sınıfını oluşturmaktadır. Son yıllarda dioksimler ve türevlerinin çeşitli biyolojik özelliklerinin ortaya çıkması bu bileşiklere olan ilginin canlı kalmasını sağlamaktadır. Yaptığımız literatür araştırmalarında, uzun yıllardır bilinen ve sentezlenen dioksim bileşiklerinin antibiyofilm etki çalışmalarında kullanılmadığı görülmüştür.

Antibiyotiklere karşı oluşan bakteriyel direnç çözülmesi gereken acil bir sorun olarak karşımızda durmaktadır. Biyofilm ortamının kazanılmış direnç mekanizmalarında etkin role sahip olduğunun anlaşılması biyofilm oluşumunun önlenmesiyle ilgili çalışmaların önemini artmıştır. Hastane enfeksiyonlarında yaşanan artışlar ve tedavisinde yaşanan güçlükler, hastane florasında yaşayan dirençli mikroorganizmaları özellikle de biyofilm oluşturma yetenekleriyle bilinen ve implante cihazlarda enfeksiyonların en sık nedeni olan stafilokokları ön plana çıkarmaktadır. Bu amaçlar doğrultusunda dioksimlerin biyofilm oluşumunu önleme potansiyellerini anlamaya bir başlangıç olması adına kolay elde edilebilen, yedi tane aromatik 1,2-diketon türevi dioksim literatürlerdeki metotlara bağlı kalarak sentezlenmiş ve stafilok türü biyofilm oluşturan üç bakteriye (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 ve *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268) karşı etkinlikleri araştırılmıştır.

Sentezlenen dioksimlerin stafilokok türlerinin biyofilm oluşumunu inhibe etme özelliklerini değerlendirmek için ilk çalışma MİK ölçümleri olmuştur. MİK ölçüm sonuçlarından sadece (4) numaralı diketon olan 9,10-Phenanthrenequinone ve onun dioksim türevi olan (4a) kodlu 9,10-Phenanthrenequinone dioksim bileşiğinin antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. Diğer maddelerin MİK değerleri incelendiğinde diketon ve dioksimlerin stafilakok türü bakteriler üzerinde antibakteriyel etki göstermedikleri sonucuna varılmıştır (MİK $\geq$ 512). Genel olarak başlangıç maddeleri olan Diketonlar ile Dioksimleri kıyasladığımızda diketonların antibakteriyel etkilerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Doğal bir antibiyofilm ajan olan ve çalışmanın kontrolü için kullandığımız kurkumin'nin MİK değerleri ise 128-256 µg/mL aralığında ölçülmüştür. Literatürlerle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da kurkuminin

antibakteriyel etkisinin çok yüksek olmadığı fakat kuvvetli antibiyofilm özelliği gösterdiği bulunmuştur.

MİK değerleri belirlendikten sonra sub-MİK dozlarda dioksim ve başlangıç maddeleri olan diketonların biyofilm inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Stafilakok biyofilmleri üzerinde başlangıç maddeleri olan ticari diketonların % inhibisyon değerleri incelendiğinde en yüksek inhibe edici madde 4 numaralı diketon olan 9,10-Phenanthrenequinon'dur. 4 bileşiği özellikle S.*aureus* biyofilmini 1 µg/mL gibi oldukça düşük konsantrasyonda bile % 90,70 oranında inhibe etmiştir. Diketonlar içerisinde 4 numaralı diketon (9,10-Phenanthrenequinon) hem kuvvetli antibakteriyel hem de antibiyofilm özellikte bir madde olarak dikkat çekmektedir.

Sentezlenen dioksimlerin biyofilm inhibisyonları incelenecek olursa, 1a maddesi 128 µg/mL derişiminde *S. aureus*'a karşı % 40,75 inhibisyon gösterirken, diğer bakterilere karşı kayda değer bir etki göstermemiştir. 2a maddesi 128 µg/mL derişiminde *S. aureus* biyofilmlerine karşı % 59,79 inhibisyon gösterirken, MRSA'ya karşı % 58,46, *S.epidermidis*'e karşı da % 58,36 inhibisyon aktivitesi göstererek dikkat çekmiştir. 3a maddesi 128 µg/mL derişiminde *S. aureus*'a karşı % 46,35 inhibisyon gösterirken, diğer bakterilere karşı kayda değer bir etki göstermemiştir.

Çalışmamızda en yüksek biyofilm oluşumunu önleme özelliği olan madde 4a olarak kodlanan 9,10-Phenanthrenequinon dioksim'dir *S. aureus*'a karşı biyofilm inhibisyonu sub-MİK doz olan 4 ve 2 µg/mL derişiminde sırasıyla % 95,26 ve % 94,19 gibi yüksek inhibisyon değerleriyle dikkat çekmiştir. Kontrol maddesi olan kurkuminin ancak 16 ve 32 µg/mL derişiminde benzer inhibisyon değerlerine ulaştığı dikkate alındığında 4a maddesi *S. aureus* için kurkuminden daha etkili biyofilm inhibisyonu sergilemiştir. 4a maddesi çalışmada kullanılan diğer bakteriler üzerinde ise kayda değer biyofilm inhibisyon etkisi (<%35) göstermemiştir. Başlangıç maddesi olan diketonun (4), dioksime (4a) dönüştürülmesiyle antibakteriyel etkisinin azaldığı fakat antibiyofilm özelliğinin arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç; toksik etki gösterdiği bilinen 9,10-Phenanthrenequinon'un (4) oldukça reaktif olan komşu karbonil gruplarının daha az reaktif olan oksim gruplarıyla yer değiştirildiğinde toksitesinde de bir azalma meydana geleceğini düşündürmektedir. Bakteriyel toksisitesinde görülen azalma buna işaret etmektedir. 4a dioksiminin bundan sonraki çalışmalarda toksisite analizlerinin yapılması ve biyofilm görüntüleme ajanlarıyla ileri biyofilm çalışmalarının yapılması

planlanmıştır. 4a dioksimi toksik özellik göstermiyorsa, kuvvetli bir antibiyofilm madde olarak kullanma potansiyeli taşımaktadır.

Yapılan bu çalışmayla dioksimlerin biyofilm oluşumunu önleme etkileri ilk defa araştırılmıştır. 1,2 diketonların dioksimlere dönüştürülmesiyle antibakteriyel etkilerinde azalma olmasına karşın antibiyofilm etkilerinin arttığı gözlenmiştir. Özellikle 2a bileşiğinin doza bağlı biyofilm oluşumunu önleme etkisi ve 4a bileşiğinin ise 2 μg/mL gibi oldukça düşük konsantrasyonda % 94,19 gibi yüksek *S. aureus* biyofilmini inhibe etme özelliği gösterdiği bulunmuştur. Alınan bu sonuçlar toksik etki göstermeyen farklı dioksimlerin sentezlenip etki mekanizmalarına yönelik çalışmalara devam etmek için teşvik edicidir.

7 KAYNAKÇA

Açıkgöz E, 2012. Quorum Quenching. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 10, 27-44.

Adam B, Baillie GS, Douglas LJ, 2002. Mixed species biofilms of Candida albicans and Staphylococcus epidermidis. J Med Microbiol, 51, 4, 344-9.

Allan-Wojtas P, Hildebrand PD, Braun PG, Smith-King HL, Carbyn S, Renderos WE, 2010. Low temperature and anhydrous electron microscopy techniques to observe the infection process of the bacterial pathogen Xanthomonas fragariae on strawberry leaves. Journal of microscopy, 239, 3, 249-58.

Amorena B, Gracia E, Monzón M, Leiva J, Oteiza C, Pérez M, Alabart J-L, Hernández-Yago J, 1999. Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro. J Antimicrob Chemoth, 44, 1, 43-55.

Anders MW, 2017. Diacetyl and related flavorant α-Diketones: Biotransformation, cellular interactions, and respiratory-tract toxicity. Toxicology, 388, 21-9.

Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME, 2011. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence, 2, 5, 445-59.

Asma S, 2007. Yeni tip alkil tiyasubstitue vic-dioksim sentezi ve karakterizasyonu, Gebze Y.T.E Mühendislik ve F.B.E.

Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Desvaux M, Di Bonaventura G, Hébraud M, Jaglic Z, Kačániová M, Knøchel S, Lourenço A, Mergulhão F, Meyer RL, Nychas G, Simões M, Tresse O, Sternberg C, 2017. Critical review on biofilm methods. Critical Reviews in Microbiology, 43, 3, 313-51.

Bai J-R, Zhong K, Wu Y-P, Elena G, Gao H, 2019. Antibiofilm activity of shikimic acid against Staphylococcus aureus. Food Control, 95, 327-33.

Bakkiyaraj D, Periandy S, Xavier S, 2016. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, FT-NMR and UV–Vis) investigation on benzil dioxime using quantum computational methods. J Mol Struct, 1108, 33-45.

Banks CV, LaPlante JP, 1956. Annotated bibliography of α-furildioxime.

Beech IB, Smith JR, Steele AA, Penegar I, Campbell SA, 2002. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 23, 2-3, 231-47.

Bierlein TK, Lingafelter EC, 1951. The crystal structure of acetoxime. Acta Crystallographica, 4, 5, 450-3.

Bolshakova AV KO, Filonov AS, Frolova OY, Lyubchenko YL, Yaminsky IV., 2001. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes.

Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R, 1999. LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J Microbiol Methods, 37, 1, 77-86.

Bruton E, Brammer L, B. Aakeroy C, S. Leinen D, 2003. Hydrogen bond patterns in aromatic and aliphatic dioximes. New Journal of Chemistry - NEW J CHEM, 27.

Burakevich JV, Lore, A.M. and Volpp, G.P., 1971. Phenylglyoxime Separation, Characterization, and Structure of Three Isomers,. J. Org. Chem, 36, 1-4.

Carlos DD, Shimp DA, (1972). Oximes as accelerators for the amine curing of epoxy resins, Google Patents.

Carter WA, 2018. Selective Inhibitors Of Viral Functions, CRC Press, p. 56.

Cengiz SA, Us E, Cengiz AT, 2006. Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 13(3), 193-7.

Chakravorty A, 1974. Structural chemistry of transition metal complexes of oximes. Coordination Chemistry Reviews, 13, 1, 1-46.

Chao Y, Zhang T, 2012. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm. Anal Bioanal Chem, 404, 5, 1465-75.

Chmielewski R, Frank J, 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive reviews in food science and food safety, 2, 1, 22-32.

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH, 1982. Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. Infect Immun, 37, 1, 318-26.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH, 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol, 22, 6, 996-1006.

Ciofu O, Mandsberg LF, Wang H, Hoiby N, 2012. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of Pseudomonas aeruginosa biofilm infections. FEMS Immunol Med Microbiol, 65, 2, 215-25.

Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM, 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. 26, 3, 547-603.

Clarke SR, Foster SJ, 2006. Surface Adhesins of Staphylococcus aureus. In: Advances in Microbial Physiology Volume 51. Eds, p. 187-224.

Colak B, Büyükkoyuncu A, Baycan Koyuncu F, Koyuncu S, 2017. Electrochromic properties of phenantrene centered EDOT polymers. Polymer, 123, 366-75.

Conrady DG, Wilson JJ, Herr AB, 2013. Structural basis for Zn2+-dependent intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110, 3, E202-E11.

Costerton JW, Cheng K, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ, 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annual Reviews in Microbiology, 41, 1, 435-64.

Costerton JW, Ellis B, Lam K, Johnson F, Khoury AE, 1994. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. Antimicrob Agents Chemother, 38, 12, 2803-9.

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ, 1978. How Bacteria Stick. Scientific American, 238, 1, 86-95.

Costerton JW, Lappin-Scott H, 1995. Introduction to Microbial Biofilms. In: Microbial Biofilms. Eds: Lappin-Scott HM, Costerton JW. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1-12.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM, 1995. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol, 49, 1, 711-45.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP, 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. 284, 5418, 1318-22.

Çelik TA, Sarikavakli N, Aslantürk ÖS, 2019. In vitro cytotoxic and apoptotic effect of vic-dioxime ligand and its metal complexes. Appl Organomet Chem, 33, 4, e4818.

Dall'Antonia M, Coen PG, Wilks M, Whiley A, Millar M, 2005. Competition between methicillin-sensitive and -resistant Staphylococcus aureus in the anterior nares. J Hosp Infect, 61, 1, 62-7.

Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R, 2000. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within Escherichia coli biofilms. Molecular microbiology, 37, 2, 424-32.

Dasgupta M, Costerton J, 1989. Significance of biofilm-adherent bacterial microcolonies on Tenckhoff catheters of CAPD patients. Blood purification, 7, 2-3, 144-55.

Davey ME, O'Toole G A, 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev, 64, 4, 847-67.

Davies D, 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nature Reviews Drug Discovery, 2, 2, 114-22.

de Kievit TR, Iglewski BH, 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect Immun, 68, 9, 4839-49.

Donabedian H, 2003. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. Journal of infection, 46, 4, 207-14.

Donlan RM, 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis, 8, 9, 881-90.

Donlan RM, Costerton JW, 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev, 15, 2, 167-93.

Dunne WM, Jr., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev, 15, 2, 155-66.

Eloff JN, 1998. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. Planta Med, 64, 08, 711-3.

Eryılmaz M, 2017. Hastanelerde sık kullanılan bazı antiseptiklerin biyofilm oluşturan ve oluşturmayan Staphylococcus epidermidis suşlarına karşı antibakteriyel etkinliğinin araştırılması. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 41, 1-8.

Essa AH, Al-Shamkhani ZAN, Jalbout AF, 2008. Synthesis and characterization of 2, 3, 5, 6-tetraphenyl-pyrazine-N, N-dioxyde: new nitrone dimer species. Heterocycles, 75, 9, 2235-42.

Fernandez P, Bordenave L, Celerier C, Bareille R, Brouillaud B, Basse-Cathalinat B, 1999. A novel potential application for 99mTc-HMPAO: Endothelial cell labeling for in vitro investigation of cell-biomaterial interactions. Journal of Nuclear Medicine, 40, 10, 1756-63.

Fisher K, Phillips C, 2009. The Ecology, Epidemiology and Virulence of Enterococcus. Microbiology (Reading, England), 155, 1749-57.

Fletcher M, 1988. Attachment of Pseudomonas fluorescens to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. Journal of bacteriology, 170, 5, 2027-30.

Frioni A, Natalizi T, Tendini M, Fraveto A, Pantanella F, Berlutti F, Pietropaoli M, Passeri D, Terranova ML, Rossi M, 2010. Biotimer assay for counting bacterial biofilm. Biophysics and Bioengineering Letters, 3, 2.

Fujikawa Y, Nampo T, Mori M, Kikkawa M, Inoue H, 2017. Fluorescein diacetate (FDA) and its analogue as substrates for Pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) and their biological application. Talanta, 179.

Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP, 2001. Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. Annu Rev Genet, 35, 1, 439-68.

Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP, 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annual review of microbiology, 50, 1, 727-51.

Galt JR, Chen J, Aarsvold JN, Krawczynska EG, Alazraki NP, Zafari AM, Faber TL, Garcia EV, 2004. Dynamic cardiac SPECT with Tc-99m teboroxime: compensation for rapid myocardial washout and high liver uptake. IEEE Transactions on Nuclear Science, 51, 5, 2705-12.

Ghaedi M, 2007. Selective and sensitized spectrophotometric determination of trace amounts of Ni(II) ion using α-benzyl dioxime in surfactant media. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 66, 2, 295-301.

Giroussi S, Voulgaropoulos A, Ayiannidis AK, Golimowski J, Janicki M, 1995. Determination of cobalt in vegetable animal foodstuffs by differential pulse adsorptive voltammetry using α-benzil dioxime. Science of The Total Environment, 176, 1, 135-9.

Gök Y, Bekaroglu Ö, 1981. The Synthesis and Complex Formatirn of Stererisomers of some new α-Dioximes. Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry, 11, 7, 621-31.

Gray KM, Garey JR, 2001. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. Microbiology, 147, 8, 2379-87.

Guilbaud M, de Coppet P, Bourion F, Rachman C, Prévost H, Dousset X, 2005. Quantitative detection of Listeria monocytogenes in biofilms by real-time PCR. Appl Environ Microbiol, 71, 4, 2190-4.

Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE, 2016. Antibacterial effects of curcumin:An in vitro minimum inhibitory concentration study. Toxicology and Industrial Health, 32, 2, 246-50.

H. D, 2003. Quorum Sensing and its Relevance to Infectious Diseases.

Hall IH, Bastow KF, Warren AE, Barnes CR, Bouet GM, 1999. Cytotoxicity of cobalt complexes of furan oximes in murine and human tissue-cultured cell lines. Applied organometallic chemistry, 13, 11, 819-28.

Haque S, Yadav DK, Bisht SC, Yadav N, Singh V, Dubey KK, Jawed A, Wahid M, Dar SA, 2019. Quorum sensing pathways in Gram-positive and -negative bacteria: potential of their interruption in abating drug resistance. J Chemother, 1-27.

Hesse G, Krehbiel G, 1955. Die Nitrosierung einiger Chlorketone, ein neuer Weg zu Hydroxamsäurechloriden. Chemische Berichte, 88, 1, 130-3.

Hitchcock AP, Obst M, Wang J, Lu YS, Tyliszczak T, 2012. Advances in the detection of as in environmental samples using low energy X-ray fluorescence in a scanning transmission X-ray microscope: arsenic immobilization by an Fe(II)-oxidizing freshwater bacteria. Environ Sci Technol, 46, 5, 2821-9.

Huiying L, Praveen Rao P, Habeeb AG, Knaus EE, 2002. Design, syntheses, and evaluation of 2, 3-diphenylcycloprop-2-en-1-ones and oxime derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors with analgesic-antiinflammatory activity. Drug development research, 57, 1, 6-17.

Hussain M, Wilcox MH, White PJ, 1993. The slime of coagulase-negative staphylococci: Biochemistry and relation to adherence. FEMS Microbiology Reviews, 10, 3-4, 191-208.

Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranayake LP, 2005. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in Candida albicans biofilms. Mycopathologia, 159, 3, 353-60.

Jorgensen JH, Turnidge JD, 2015. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods*. In: Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. Eds: American Society of Microbiology, p. 1253-73.

Kali A, Bhuvaneshwar D, Charles PMV, Seetha KS, 2016. Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. J Basic Clin Pharm, 7, 3, 93-6.

Kang M-S, Choi E-K, Choi D-H, Ryu S-Y, Lee H-H, Kang H-C, Koh J-T, Kim O-S, Hwang Y-C, Yoon S-J, Kim S-M, Yang K-H, Kang I-C, 2008. Antibacterial activity of pyrrolidine dithiocarbamate. Fems Microbiol Lett, 280, 2, 250-4.

Kang SS, Sim JR, Yun CH, Han SH, 2016. Lipoteichoic acids as a major virulence factor causing inflammatory responses via Toll-like receptor 2. Arch Pharm Res, 39, 11, 1519-29.

Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH, 2003. Detachment of Actinobacillus actinomycetemcomitans biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. Journal of bacteriology, 185, 16, 4693-8.

Kaplan JB, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N, 2004. Enzymatic detachment of Staphylococcus epidermidis biofilms. Antimicrob Agents Chemother, 48, 7, 2633-6.

Karakurt A, Dalkara S, Özalp M, Özbey S, Kendi E, Stables JP, 2001. Synthesis of some 1-(2-naphthyl)-2-(imidazole-1-yl) ethanone oxime and oxime ether derivatives and their anticonvulsant and antimicrobial activities. European journal of medicinal chemistry, 36, 5, 421-33.

Karaman BE, Köseler E, 2017. Zerdeçalın Kronik Hastalıklarla İlişkisi. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi-BÜSBİD, 2, 2.

Karygianni L, Follo M, Hellwig E, Burghardt D, Wolkewitz M, Anderson A, Al-Ahmad A, 2012. Microscope-based imaging platform for large-scale analysis of oral biofilms. Appl Environ Microbiol, 78, 24, 8703-11.

Khan N, Shreaz S, Bhatia R, Ahmad SI, Muralidhar S, Manzoor N, Khan LA, 2012. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. Fitoterapia, 83, 3, 434-40.

Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, De Vos WM, 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. Molecular microbiology, 24, 5, 895-904.

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H, 1997. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev, 10, 3, 505-20.

Kreft J-U, Wimpenny J, 2001. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. Water Science and Technology, 43, 6, 135-.

Kumagai Y, Abiko Y, Cong NL, 2016. Chemical toxicology of reactive species in the atmosphere: two decades of progress in an electron acceptor and an electrophile. The Journal of Toxicological Sciences, 41, Special, SP37-SP47.

Kursunlu AN, Guler E, Sevgi F, Ozkalp B, 2013. Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with Schiff bases derived from 5-bromo-salicylaldehyde. J Mol Struct, 1048, 476-81.

Kurtoğlu M, Serin S, 2006. Oksimler; sentezi, reaksiyonları ve metal kompleksleri. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9, 2, 25-32.

Lambe JD, Ferguson K, Mayberry-Carson K, Tober-Meyer B, Costerton J, 1991. Foreign-body-associated experimental osteomyelitis induced with Bacteroides fragilis and Staphylococcus epidermidis in rabbits. Clinical orthopaedics and related research, 266, 285-94.

Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE, 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. Journal of bacteriology, 173, 20, 6558-67.

Leclerc G, Bieth N, Schwartz J, 1980. Synthesis and. beta.-adrenergic blocking activity of new aliphatic oxime ethers. Journal of medicinal chemistry, 23, 6, 620-4.

Lee J-H, Kim Y-G, Yong Ryu S, Lee J, 2016. Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of Staphylococcus aureus. Sci Rep-Uk, 6, 19267.

Li Q, Sand W, Zhang R-Y, 2016. Enhancement of Biofilm Formation on Pyrite by Sulfobacillus thermosulfidooxidans. Minerals, 6, 71.

Li X, Yan Z, Xu J, 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of Candida albicans. Microbiology, 149, Pt 2, 353-62.

Liu M, Zheng Y, Avcibasi U, Liu S, 2016. Novel 99mTc(III)-azide complexes [99mTc(N3)(CDO)(CDOH)2B-R] (CDOH2=cyclohexanedione dioxime) as potential radiotracers for heart imaging. Nuclear Medicine and Biology, 43, 11, 732-41.

Loo C-Y, Rohanizadeh R, Young PM, Traini D, Cavaliere R, Whitchurch CB, Lee W-H, 2016. Combination of Silver Nanoparticles and Curcumin Nanoparticles for Enhanced Anti-biofilm Activities. J Agr Food Chem, 64, 12, 2513-22.

Lowy FD, 1998. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med, 339, 8, 520-32.

Lowy FD, 2003. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest, 111, 9, 1265-73.

Machado FC, Cesar DE, Assis AVDA, Diniz CG, Ribeiro RA, 2012. Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women. Brazilian oral research, 26, 5, 443-9.

Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R, 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. Journal of bacteriology, 178, 1, 175-83.

Madigan M, Martinko J, Stahl D, Clark D, 2012. Brock biology of microorganisms. (Global Edition), Pearson/Benjamin Cummings, p.

Madigan MT, Martinko JM, 2017. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayıncılık, p. 41-46.

Mah T-FC, O'Toole GA, 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology, 9, 1, 34-9.

Manoharan RK, Lee J-H, Kim Y-G, Lee J, 2017. Alizarin and Chrysazin Inhibit Biofilm and Hyphal Formation by Candida albicans. Front Cell Infect Microbiol, 7, 447-.

Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW, 1982. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. Circulation, 66, 6, 1339-41.

Marshall KC, 1976. Interfaces in microbial ecology, Harvard University Press, p.

McLean RJ, Whiteley M, Stickler DJ, Fuqua WC, 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. FEMS Microbiology Letters, 154, 2, 259-63.

Melissa B. Miller, Bassler BL, 2001. Quorum Sensing in Bacteria. Annual Review of Microbiology, 55, 1, 165-99.

Moshe M, Lellouche J, Banin E, 2011. Curcumin: a natural antibiofilm agent. In: Science and Technology against microbial pathogens: research, development and evaluation. Eds: World Scientific, p. 89-93.

Motaleb MA, Selim AA, 2019. Dioximes: Synthesis and biomedical applications. Bioorg Chem, 82, 145-55.

Motaleb MA, Selim AA, El-Tawoosy M, Sanad MH, El-Hashash MA, 2018. Synthesis, characterization, radiolabeling and biodistribution of a novel cyclohexane dioxime derivative as a potential candidate for tumor imaging. International Journal of Radiation Biology, 94, 6, 590-6.

Nesmeyanov AN, and Nesmeyanov, N.A, , 1976. Fundamental of Organic Chemistry, Trans. from the Russ. by A., Beknazarov, Mir, p. 166.

Ng-Muk-Yuen JD, 2008. Prevention of bacterial growth in platelet products via inclusion of iron chelators, University of British Columbia.

Ng WL, Bassler BL, 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. Annu Rev Genet, 43, 197-222.

Novick R, Projan S, Kornblum J, Ross H, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S, 1995. Theagr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system inStaphylococcus aureus. Molecular and General Genetics MGG, 248, 4, 446-58.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R, 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology, 54, 1, 49-79.

O'Toole GA, Kolter R, 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Molecular microbiology, 30, 2, 295-304.

Otto M, 2009. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. Nature reviews. Microbiology, 7, 8, 555-67.

Özen T, Taş M, 2009. Screening and evaluation of antioxidant activity of some amido-carbonyl oxime derivatives and their radical scavenging activities. J Enzym Inhib Med Ch, 24, 5, 1141-7.

Pal T, Mohiyuddin S, Packirisamy G, 2018. Facile and Green Synthesis of Multicolor Fluorescence Carbon Dots from Curcumin: In Vitro and in Vivo Bioimaging and Other Applications. ACS Omega, 3, 1, 831-43.

Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S, 2007. Violacein and biofilm production in Janthinobacterium lividum. J Appl Microbiol, 102, 4, 992-9.

Pantanella F, Berlutti F, Passeri D, Sordi D, Frioni A, Natalizi T, Terranova ML, Rossi M, Valenti P, 2011. Quantitative evaluation of bacteria adherent and in biofilm on single-wall carbon nanotube-coated surfaces. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases, 2011.

Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F, 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. Ann Ig, 25, 1, 31-42.

Papenfort K, Bassler BL, 2016. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. Nature reviews. Microbiology, 14, 9, 576-88.

Patai S, 1970. The Chemistry of the Carbon-Nitrogen Double Bond., New York, Wiley, p.

Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M, 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annual Reviews in Microbiology, 48, 1, 585-617.

Patzold R, Keuntje M, Anders-von Ahlften A, 2006. A new approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy. Anal Bioanal Chem, 386, 2, 286-92.

Pestova E, Håvarstein L, Morrison D, 1996. Regulation of competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. Molecular microbiology, 21, 4, 853-62.

Poulsen LV, 1999. Microbial Bio"lm in Food Processing.

Poulsen LV, 1999. Microbial biofilm in food processing. LWT-Food Science and Technology, 32, 6, 321-6.

Procop GW, Church, D.L., Hall, G.S., Janda, W.M., Koneman, E.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L., , 2017. Koneman's Color Atlas and Text Book of Diagnostik Microbiology.

Rai H, Rai B, 2001. Studies on Spectral Properties of Cu (II), Ni (II) and Cu (II) Complexes with Bis-Acenaphthenequinonedioxaime. Asian J Chem, 13, 1, 264.

Rajalakshmi Ramachandran SD, 2017. Phenotypic Evaluation Of Biofilm Formation In Human Pathogenic Bacterial Isolates From Different Clinical Specimens. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical sciences, 4, 10, 625-32.

Rane RA, Sahu NU, Shah CP, Shah NK, 2014. Design, synthesis and antistaphylococcal activity of marine pyrrole alkaloid derivatives. J Enzym Inhib Med Ch, 29, 3, 401-7.

Richardson C, Steel PJ, D'Alessandro DM, Junk PC, Keene FR, 2002. Mono- and di-nuclear complexes of the ligands 3,4-di(2-pyridyl)-1,2,5-oxadiazole and 3,4-di(2-pyridyl)-1,2,5-thiadiazole; new bridges allowing unusually strong metal-metal interactions. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 13, 2775-85.

Ridgway HF, Kelly A, Justice C, Olson BH, 1983. Microbial fouling of reverse-osmosis membranes used in advanced wastewater treatment technology: chemical, bacteriological, and ultrastructural analyses. Appl Environ Microbiol, 45, 3, 1066-84.

Rodrigues S, Paillard C, Van Dillen S, Tahrioui A, Berjeaud J-M, Dufour A, Bazire A, 2018. Relation between Biofilm and Virulence in Vibrio tapetis: A Transcriptomic Study. Pathogens, 7, 4, 92.

Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ, 2005. Cystic Fibrosis. New England Journal of Medicine, 352, 19, 1992-2001.

Rudilla H, Merlos A, Sans E, Fusté E, Sierra J, Zalacain-Vicuña A, Vinuesa T, Vinas M, 2018. New and old tools to evaluate new antimicrobial peptides. AIMS Microbiology, 4, 522-40.

Samaha HA, Al-Agamy MH, Soliman WE, 2017. Antibiotic Effect on Planktonic and Biofilm-Producing Staphylococci. Advances in Microbiology, 7, 06, 498.

Satake M, Miura Ji, Usami S, Puri BK, 1989. Use of dimethylglyoxime, acenaphthenequinone dioxime and mixed ligands of dimethylglyoxime and acenaphthenequinone dioxime supported on naphthalene for the pre-concentration and determination of nickel in alloys, tea and water samples using atomic absorption spectrometry. Analyst, 114, 7, 813-8.

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG, 2002. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. Journal of bacteriology, 184, 4, 1140-54.

Schwochau K, Linse KH, Steinmetz HJ, Astheimer L, 1993. Preparation, characterization and biological evaluation of cationic 99Tc/99mTc-dioxime complexes. Nuclear Medicine and Biology, 20, 3, 317-24.

Sevgi F, 2010. İndollerin bazı dioksim türevlerinin sentezi, mikrodalga ile furazanlara dönüştürülmesi ve antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Sevgi F. Microwave Synthesis of Anisil Furazan as Potential Bioactive Small Molecules. International Human and Nature Sciences: Problems and Solution Seeking Congress, 453, 2016.

Sevgi F, Bagkesici U, Kursunlu AN, Guler E, 2018. Fe (III), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of schiff bases based-on glycine and phenylalanine: Synthesis, magnetic/thermal properties and antimicrobial activity. J Mol Struct, 1154, 256-60.

Sevgi F, Bedük AD, 2012. Synthesis and antimicrobial activity of novel glyoximes containing quinoline moiety. World Applied Sciences Journal, 19, 2, 192-7.

Sheridan GE, Masters CI, Shallcross JA, MacKey BM, 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in Escherichia coli cells. Appl Environ Microbiol, 64, 4, 1313-8.

Singh AK, Prakash P, Singh R, Nandy N, Firdaus Z, Bansal M, Singh RK, Srivastava A, Roy JK, Mishra B, Singh RK, 2017. Curcumin Quantum Dots Mediated Degradation of Bacterial Biofilms. Frontiers in Microbiology, 8, 1517.

Smith PAS, 1966. The Chemistry of Open-chain Organic Nitrogen Compounds: Derivatives of oxidized nitrogen: hydrazines to nitrates, WA Benjamin, p.

Song Y, Talaty N, Datsenko K, Wanner BL, Cooks RG, 2009. In vivo recognition of Bacillus subtilis by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). Analyst, 134, 5, 838-41.

Srey S, Jahid IK, Ha S-D, 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. Food control, 31, 2, 572-85.

Stewart PS, Costerton JW, 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The lancet, 358, 9276, 135-8.

Stone JE, Akhtar N, Botchway S, Pennock CA, 1994. Interaction of 1,9-Dimethylmethylene Blue with Glycosaminoglycans. Annals of Clinical Biochemistry, 31, 2, 147-52.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW, 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Reviews in Microbiology, 56, 1, 187-209.

Subramaniam S, Rajendran N, brinda Muralidharan S, Subramaniam G, Raju R, Sivasubramanian A, 2015. Dual role of select plant based nutraceuticals as antimicrobial agents to mitigate food borne pathogens and as food preservatives. RSC Advances, 5, 94, 77168-74.

Takats Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG, 2004. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. Science, 306, 5695, 471-3.

Taraszkiewicz A, Fila G, Grinholc M, Nakonieczna J, 2013. Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance, p.

Thurnheer T, Gmür R, Guggenheim B, 2004. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. Journal of Microbiological Methods, 56, 1, 37-47.

Tote K, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P, 2008. A new colorimetric microtitre model for the detection of Staphylococcus aureus biofilms. Lett Appl Microbiol, 46, 2, 249-54.

Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K, 2015. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. PLoS One, 10, 3, e0121313.

Uçan Hİ, Mirzaogiu R, 1990. Synthesis and Complex Formation of Six New Unsymmetrical vic-Dioximes. Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry, 20, 4, 437-49.

Uğur A, Mercimek B, Özler MA, Şahin N, 2000. Antimicrobial effects of bis(Δ2-2-imidazolinyl)-5,5′-dioxime and its mono- and tri-nuclear complexes. Transit Metal Chem, 25, 4, 421-5.

Ward K, Olson M, Lam K, Costerton J, 1992. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. Journal of medical microbiology, 36, 6, 406-13.

Warwick S, Wilks M, Hennessy E, Powell-Tuck J, Small M, Sharp J, Millar MR, 2004. Use of quantitative 16S ribosomal DNA detection for diagnosis of central vascular catheter-associated bacterial infection. J Clin Microbiol, 42, 4, 1402-8.

Whitman WB, 2009. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology.

Williams REO, 1982. Staphylococci and Staphylococcal Infections. J Clin Pathol, 35, 2, 248-.

Worthington RJ, Richards JJ, Melander C, 2012. Small molecule control of bacterial biofilms. Org Biomol Chem, 10, 37, 7457-74.

Yadav M, Shirude S, Puntambekar D, Patel P, Prajapati H, Parmar A, Balaraman R, Giridhar R, 2007. Studies in 3, 4-diaryl-1, 2, 5-oxadiazoles and their N-oxides: Search for better COX-2 inhibitors. Acta pharmaceutica, 57, 1, 13-30.

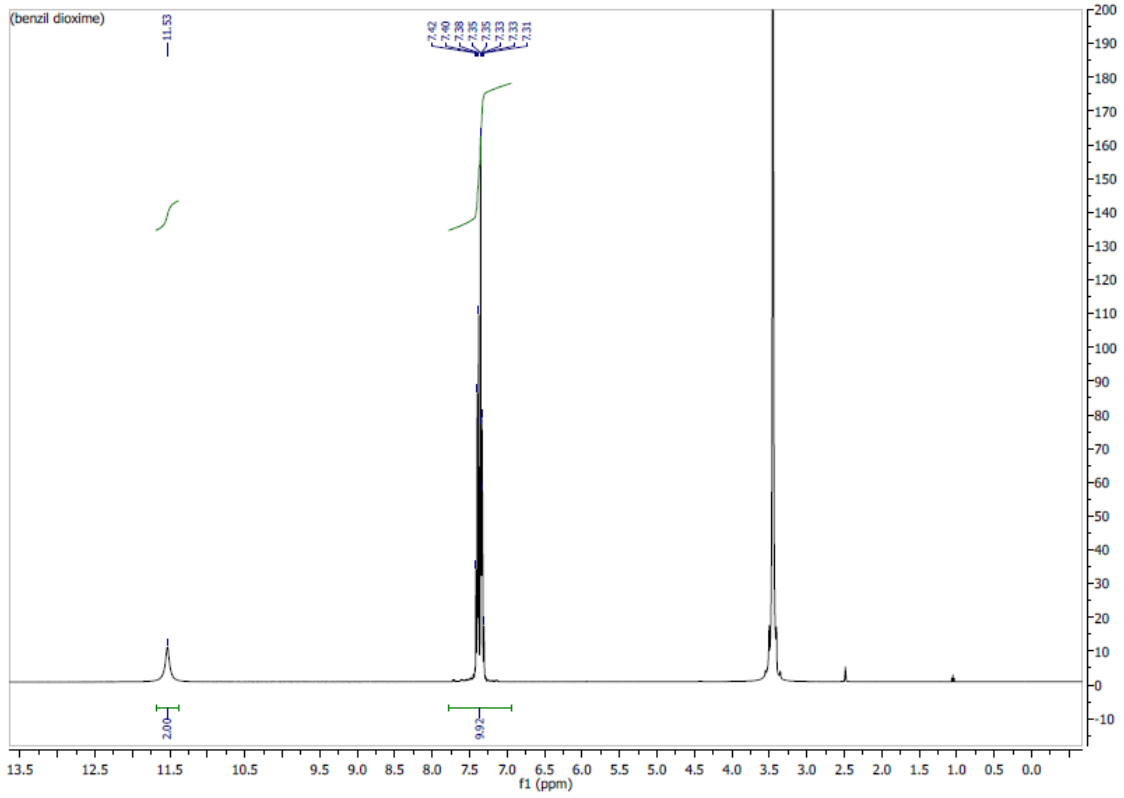
Yamada S, Itano HA, 1966. Phenanthrenequinone as an analytical reagent for arginine and other monosubstituted guanidines. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 130, 2, 538-40.

Yaren H, Kenar, L., Karayılanoğlu, T., 2007. Önemli Bir Kimyasal Silah Grubu: Sinir Ajanları. Kor Hek, 6, 491-500.

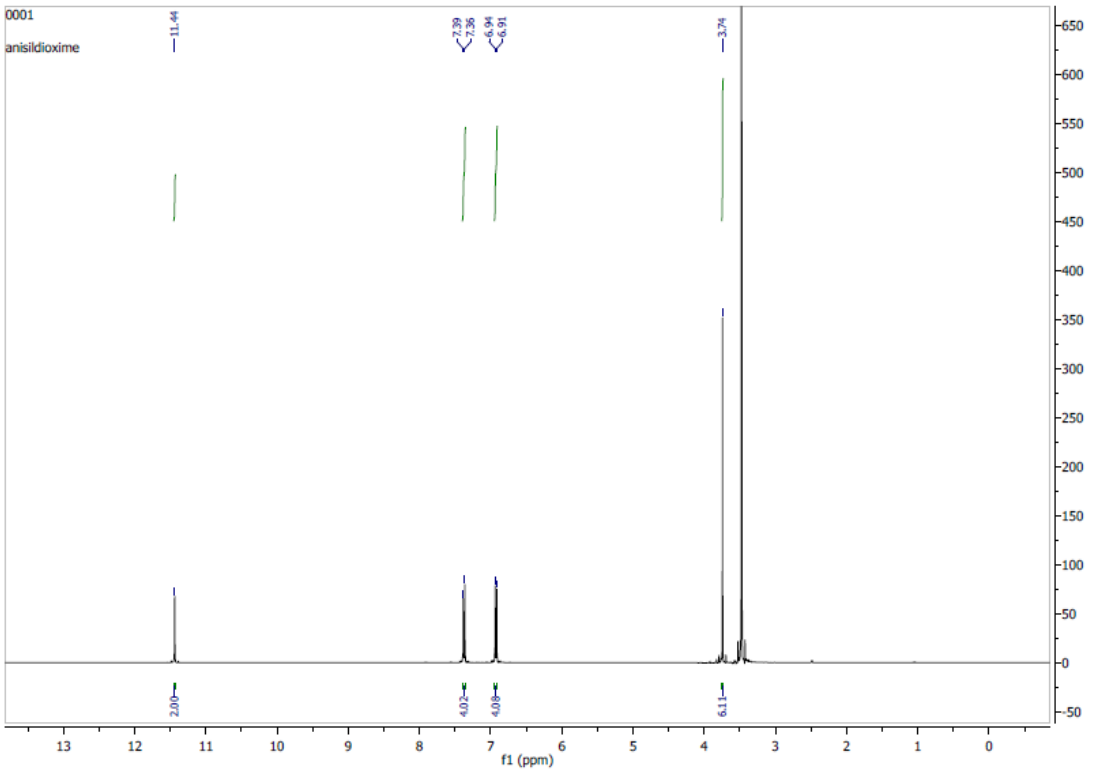
Yuksekdag Z, Baltaci N, 2015. Staphylococcus aureus Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 43, 77-83.

8 EKLER

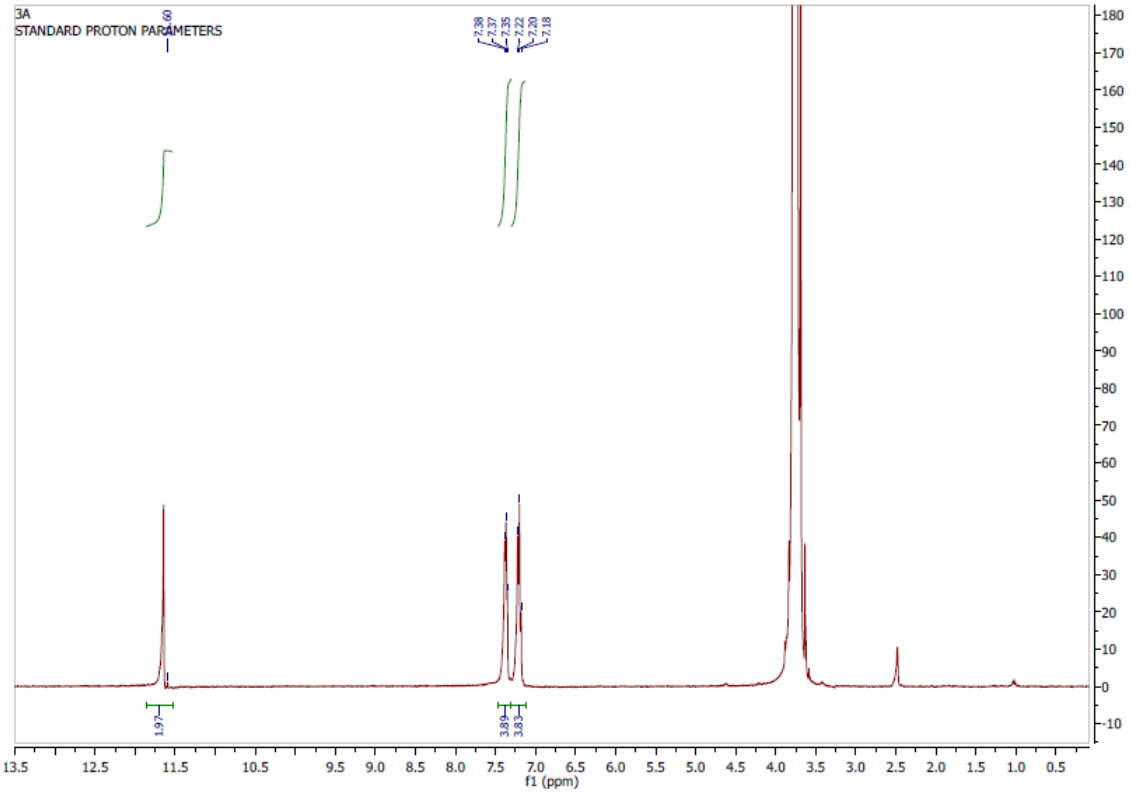
8.1 Sentezlenen Dioksimlerin ^{1}H-NMR Spektrumları.



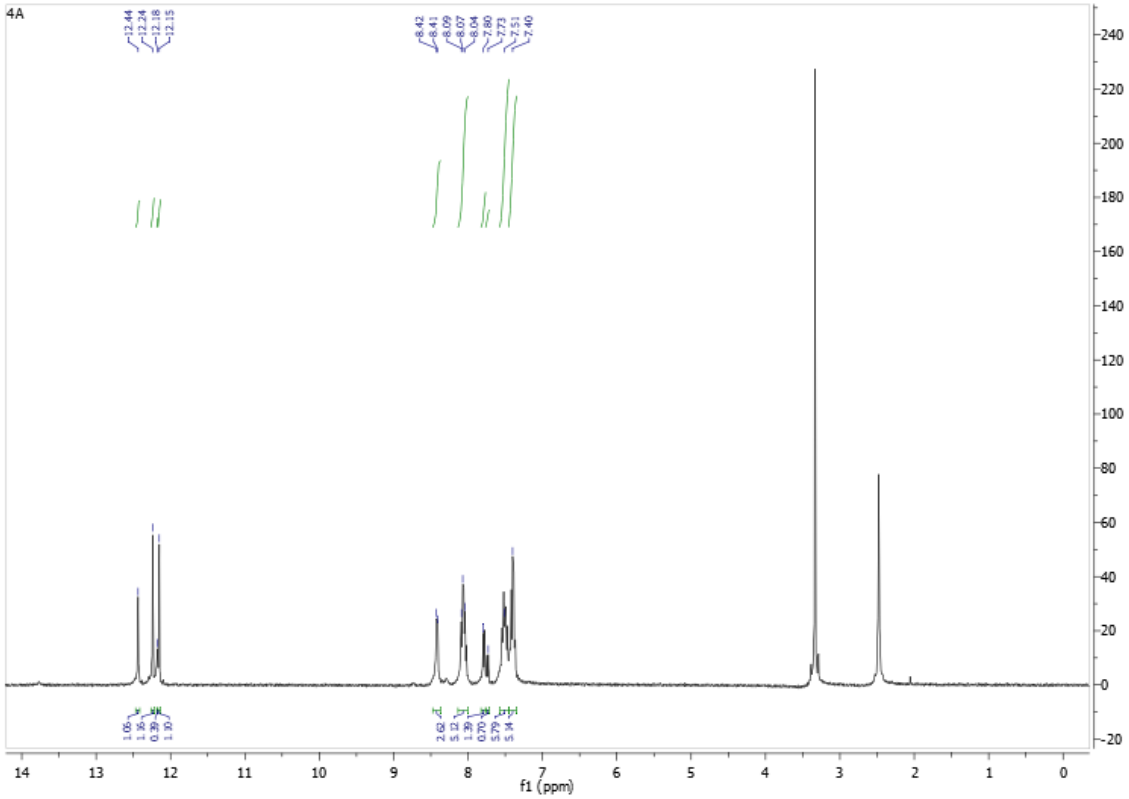
Şekil 8.1: α-Benzil dioksim'in (1a) ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



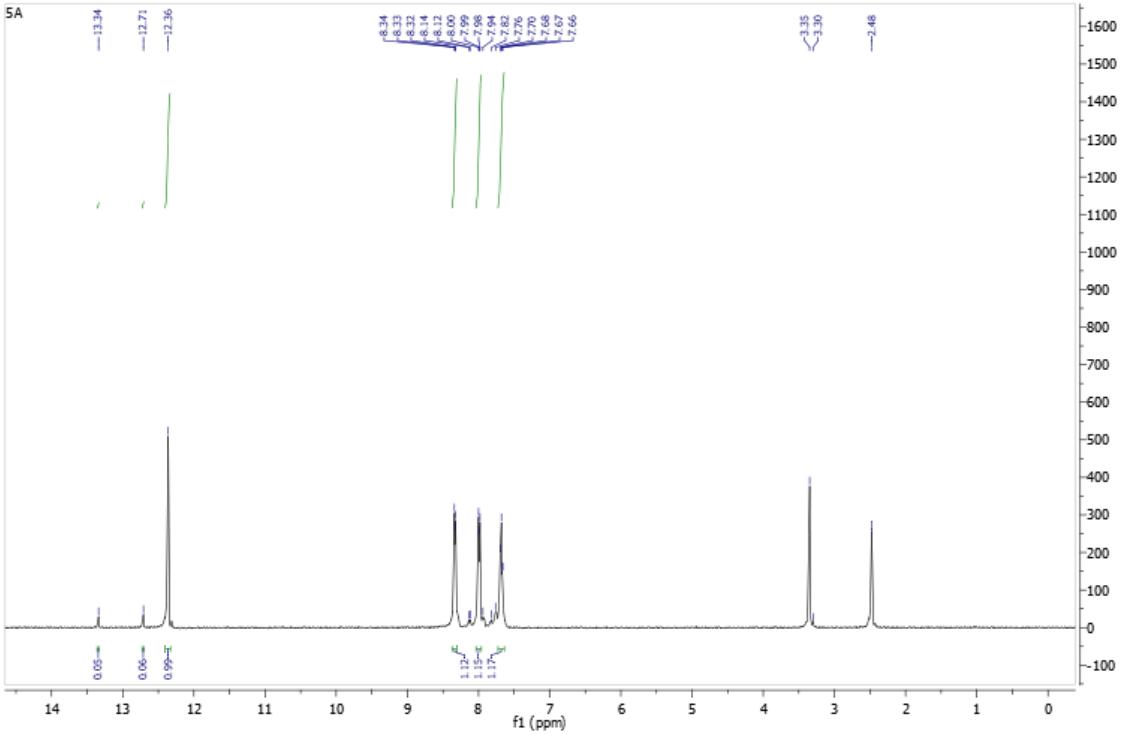
Şekil 8.2: 4,4′-Dimetoksibenzil dioksim'in (2a) ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



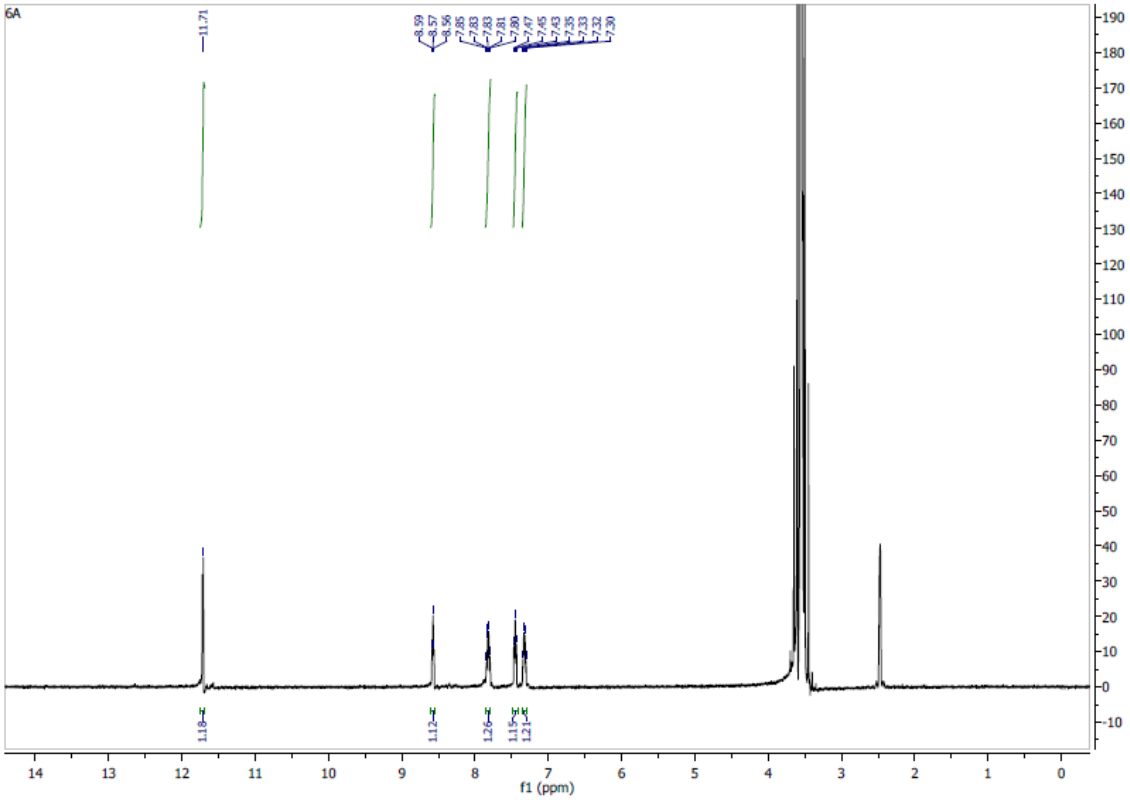
Şekil 8.3: 4,4′-Diflorobenzil dioksim'in (3a) ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



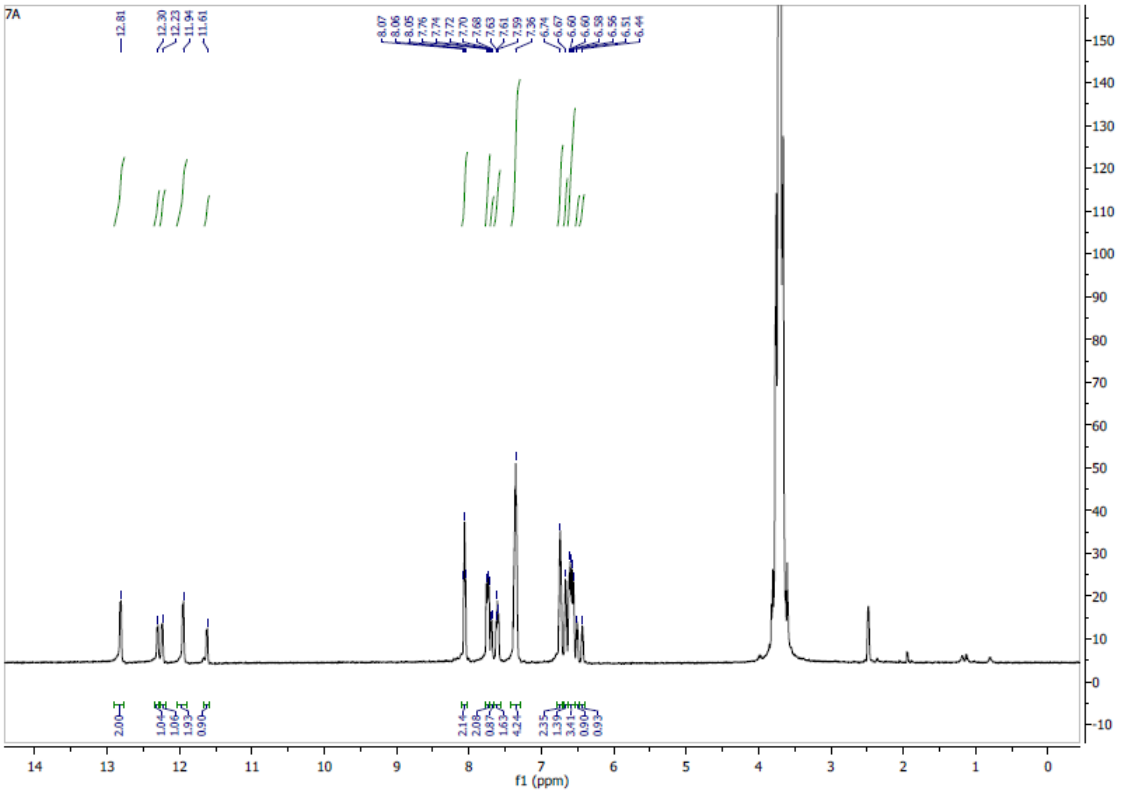
Şekil 8.4: 9,10-Phenanthrenequinone dioksim'in (4a) ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 8.5: Acenaphthenequinone dioksim'in (5a) ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)

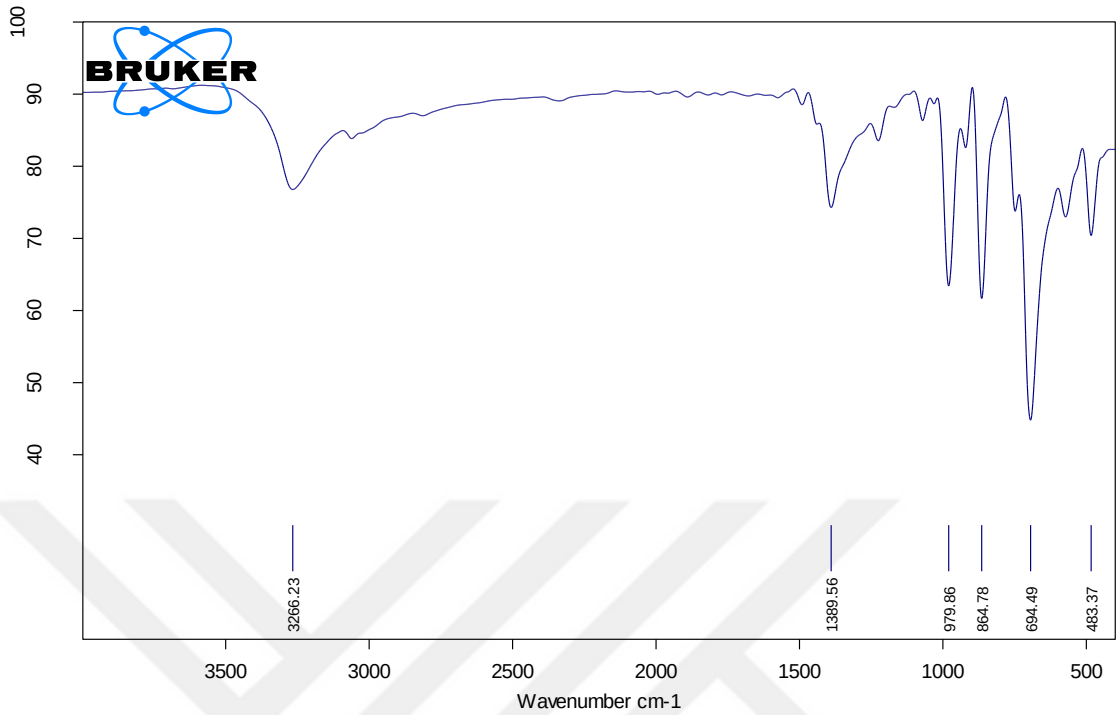


Şekil 8.6: 2,2'-Pyridil dioksim'in (6a) ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)

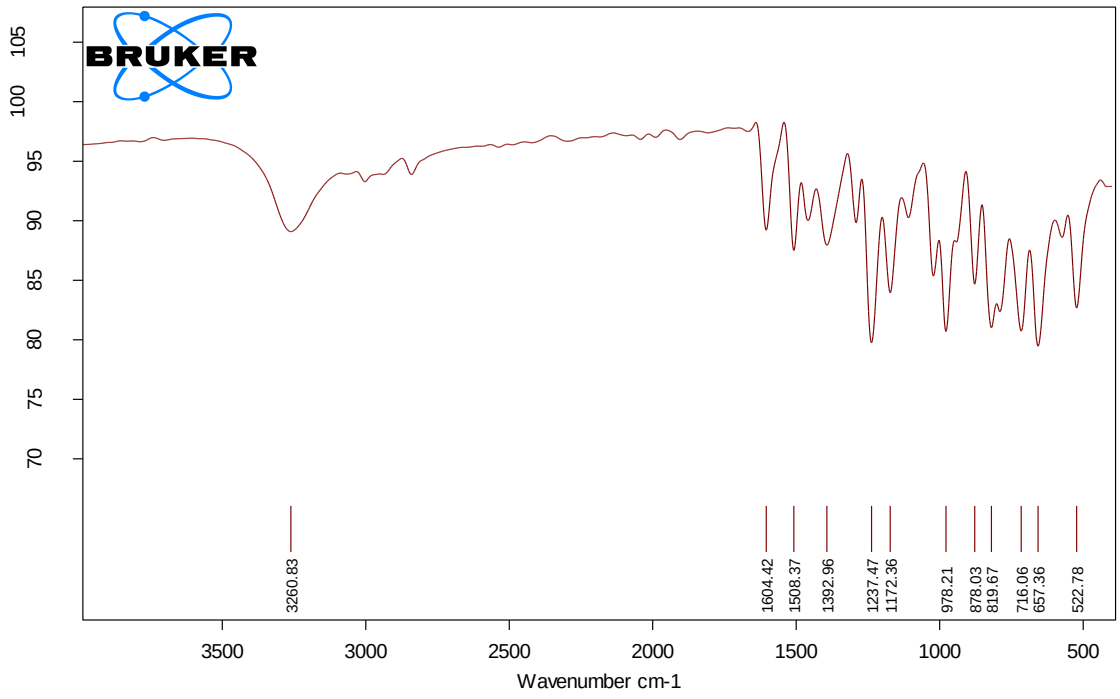


Şekil 8.7: α-furil dioksim'in (7a) ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)

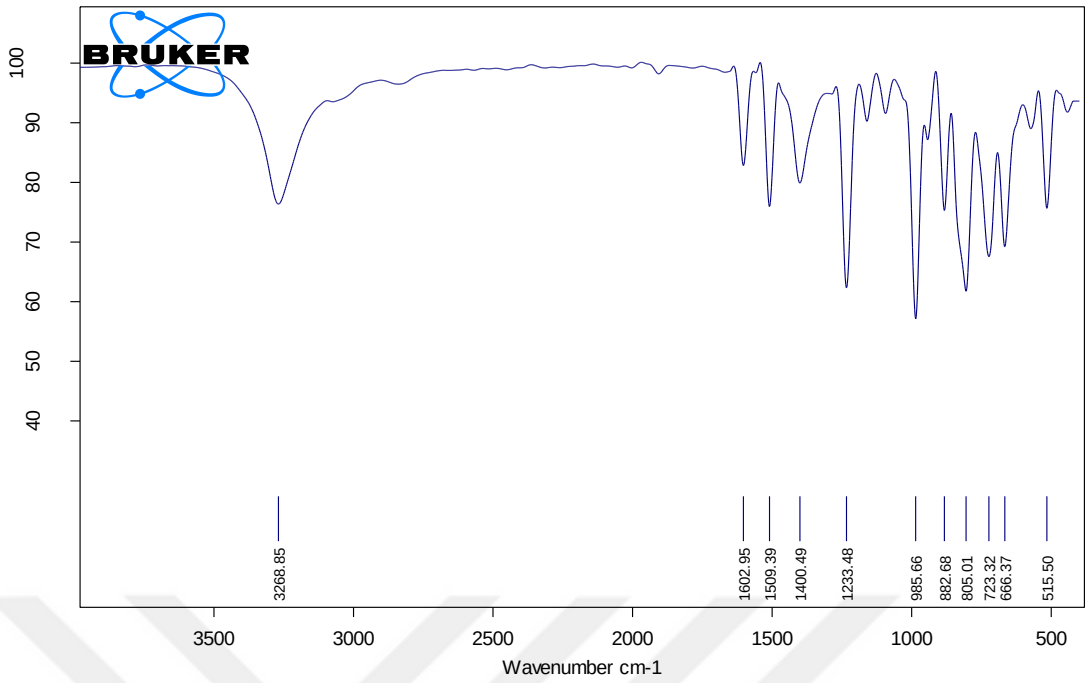
8.2 Sentezlenen Dioksimlerin FT-IR Spektrumları



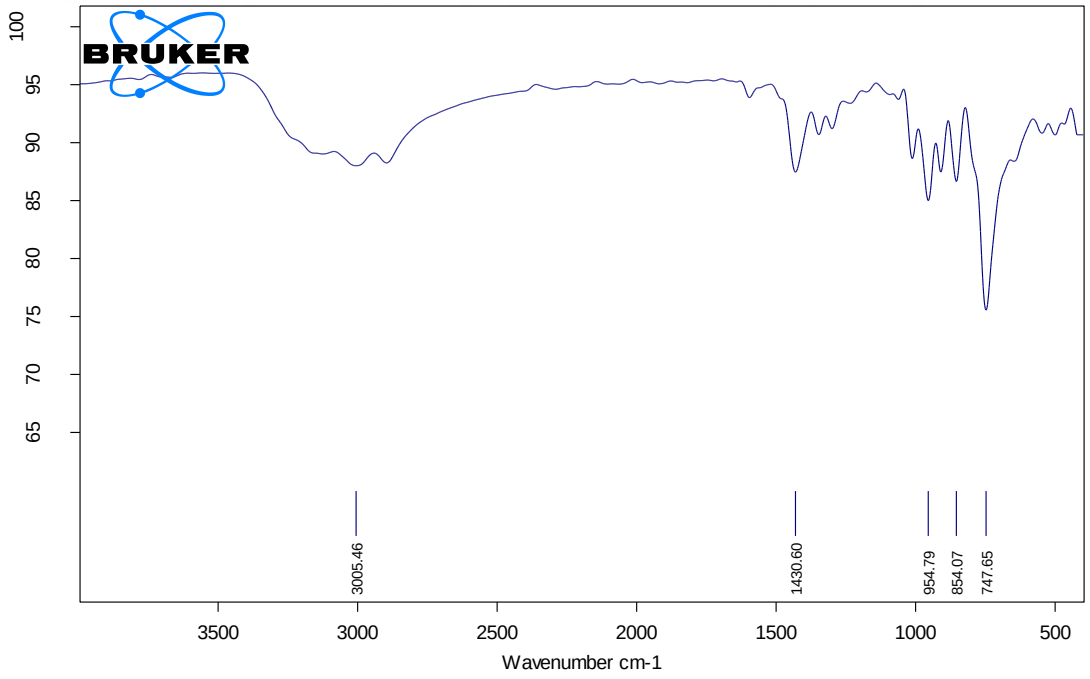
Şekil 8.8: α-Benzil dioksim'in (1a) FT-IR spektrumu



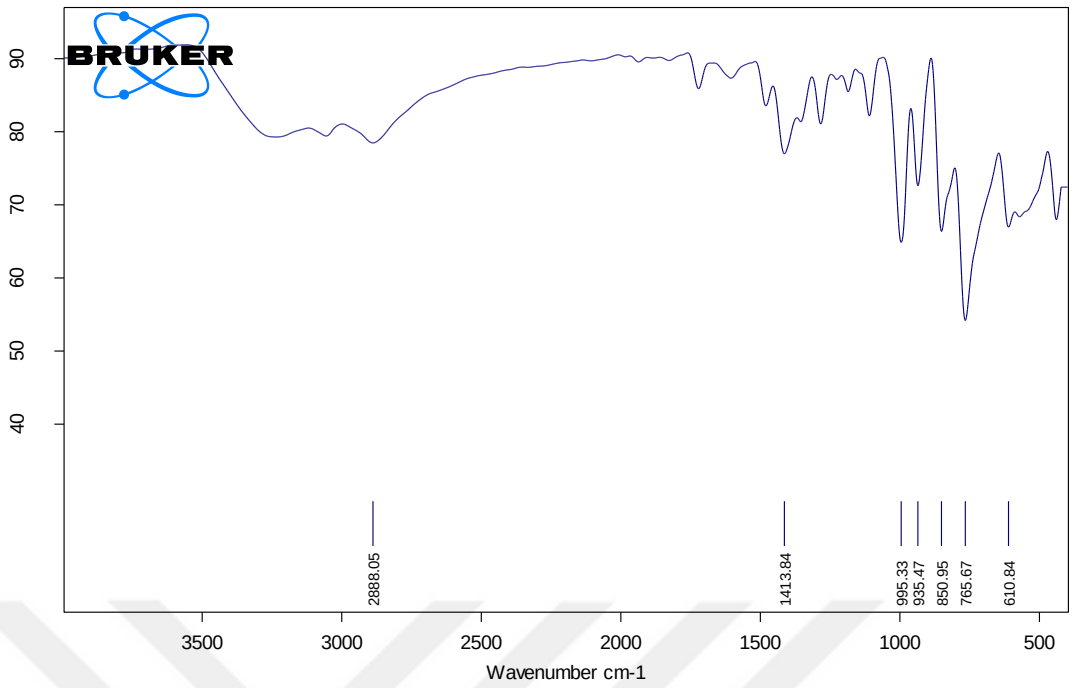
Şekil 8.9: 4,4′-Dimetoksibenzil dioksim'in (2a) FT-IR spektrumu.



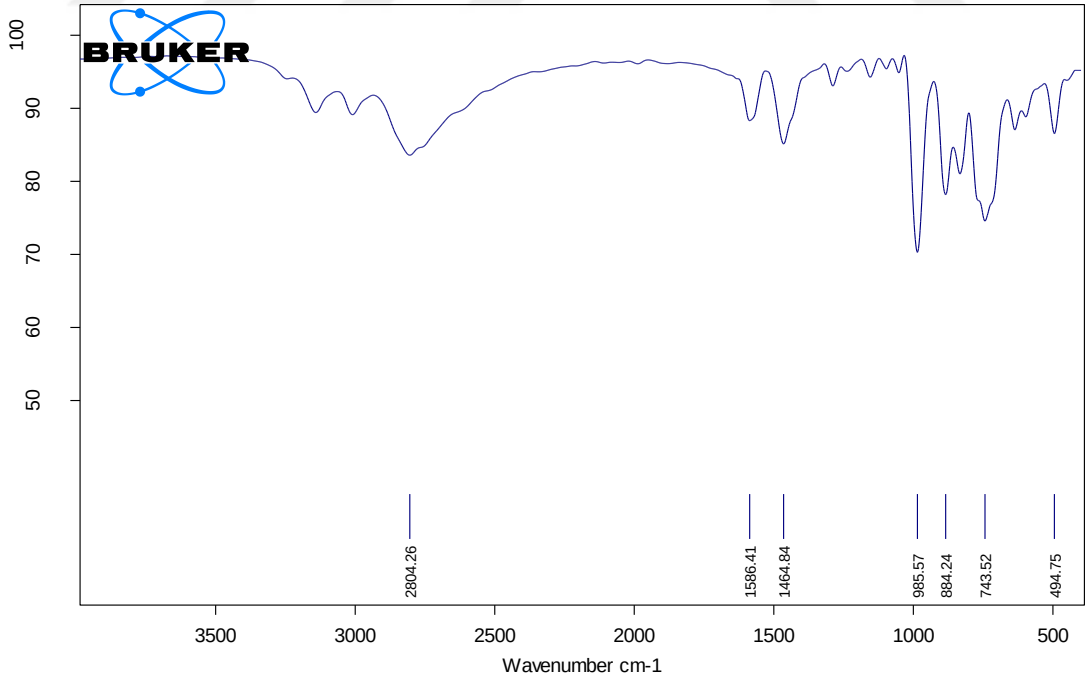
Şekil 8.10 : 4,4′-Diflorobenzil dioksim'in (3a) FT-IR spektrumu.



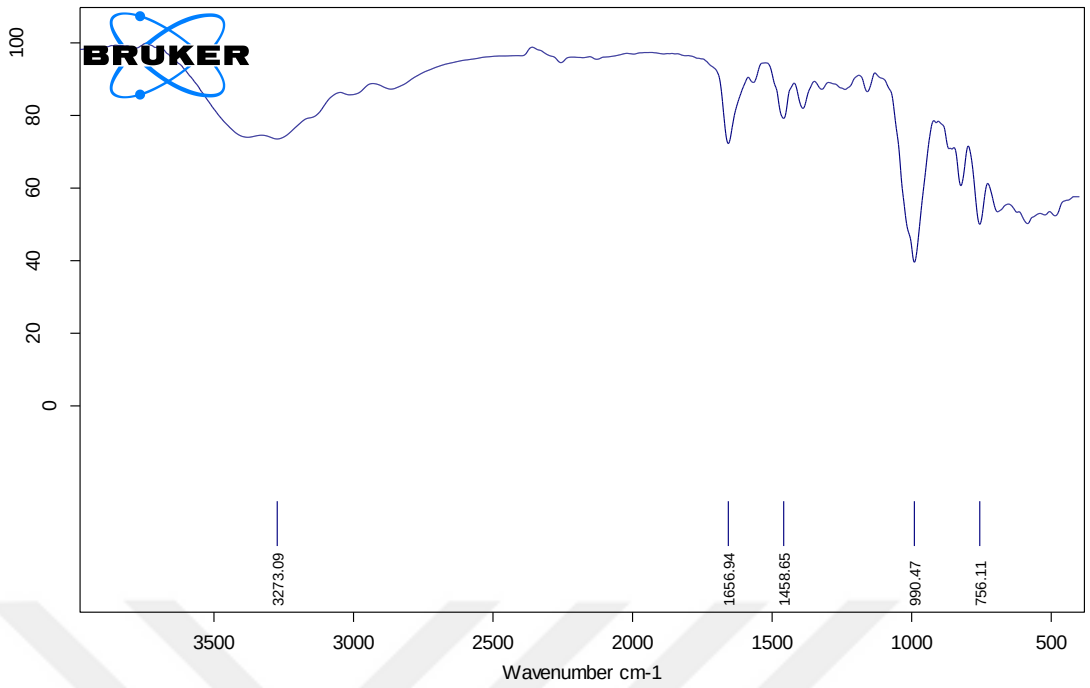
Şekil 8.11: 9,10-Phenanthrenequinone dioksim'in (4a) FT-IR spektrumu.



Şekil 8.12 : Acenaphthenequinone dioksim'in (5a) FT-IR spektrumu.



Şekil 8.13: 2,2'-Pyridil dioksim'in (6a) FT-IR spektrumu.



Şekil 8.14: α-furil dioksim'in (7a) FT-IR spektrumu.

9 ÖZGEÇMİŞ

NEBİLE ÇOLAKEL

Tuna Mh. Tuna Cd. 674. Sk. No:4 D:10 Esenler/ İstanbul

0 507 949 5254

E-mail: nebilecolakel@gmail.com

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi : 1987

Medeni Durumu : Bekar

EĞİTİM BİLGİLERİ

2001-2004 : Fatih Kız Lisesi – Fen Bilimleri

2007-2009 : İstanbul Bilim Üniversitesi-Sağlık Hizmetleri MYO- Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı

2009-2014 : İstanbul Üniversitesi/ Fen Fakültesi/ Astronomi ve Uzay Bilimleri

2016-2019 : Selçuk Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Tıbbi Laboratuar ABD

İŞ TECRÜBELERİ

2014- devam : MİNİMED Çocuk Kliniği, Tıbbi Laboratuvar Teknikeri ve klinik sorumlusu,

BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

2017 : Yüksek Lisans Semineri , “Biyofilmler ve Antibiyofilm çalışmaları”.

2019 : 2.Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi, Poster sunumu, “Bazı Dioksimlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması” 28-30 Haziran 2019,İstanbul

YABANCI DİL

İngilizce : TOEFL kurs sertifikası (Yazma :İyi, Okuma:iyi, Konuşma:iyi)