

**YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI PİRAZOLİN EKLENMİŞ
TRIAZOL TÜREVLERİNİN ANTIMİKROBİYAL
AKTİVİTE VE TOKSİSİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Cem KARAEK
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Haziran-2006

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Cem Karael'in "Yeni Sentezlenmiş Bazı Pirazolin Eklenmiş Triazol Türevlerinin Antimikrobiyal Aktivite ve Toksisitelerinin Belirlenmesi" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 30.05.2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Öğr. Gör. Dr. MUHİTTİN ARSLANYOLU
Üye	:Yard. Doç. Dr. Z. ASIM KAPLANCIKLI
Üye	:Yard. Doç. Dr. BERRİN TÜYLÜ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI PİRAZOLİN EKLENMİŞ TRIAZOL
TÜREVLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE VE
TOKSİSİTELERİNİN BELİRLENMESİ****Cem KARAEL****Anadolu Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Öğr. Gör. Dr. Muhittin ARSLANYOLU****2006, 67 sayfa**

Geniş antifungal spektrumlu imidazol ve triazol türevi (azoller) antifungaller günümüzde fungal hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan ilaç tasarım çalışmalarında amaç, hasta üzerinde birden fazla ilaç kullanımı yerine gerekli kimyasal yapıların bir araya getirilmesiyle “çoklu ilaç direncini” kırabilecek en uygun ilacı bulmaktır. Bu amaç doğrultusunda antifungal ve antibakteriyal aktiviteleriyle oldukça yaygın bir kullanım alanı bulmuş triazol ve pirazolin gibi ilaç hammaddesi bileşiklerin aynı yapı üzerinde bir araya getirilmesiyle sentezlenen bir seri yeni nesil yapay bileşikler (Tp1-Tp12) sentezlenmiştir. Araştırma konumu bu bileşiklerin; antibakteriyal ve antifungal aktivitelerinin mikrodilüsyon broth yöntemi ile, toksisite düzeylerinin ise brine-shrimp toksisite testi ile araştırılması oluşturmaktadır. Mikrodilüsyon broth yöntemiyle 7 değişik fungusa karşı yapay 12 bileşiğin antifungal etkisi araştırılmış; bütün türevlerin pozitif kontrol olan flukonazol ve ketokonazol’ün etki değerlerine eşit veya daha yüksek antifungal aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. Mikrodilüsyon broth yönteminin 5 değişik bakteriyle yapılan antibakteriyal analizinde ise tüm türevler kloromfenikol’ün etki değerine eşit bir etki gösterirken, daha etkin antibakteriyal etki gösteren bir türev bulunamamıştır. Brine-shrimp toksisite testi ile yapay 12 bileşiğin toksisitesi araştırıldığı da türevlerden ilk (Tp1-Tp6) altısının zararlı toksik etkiye sahip olduğu gözlenirken, diğer (Tp7-Tp12) altısının toksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir. Tp8 türevi en yüksek aktiviteye sahip olup aynı zamanda da toksik değildir. Bu çalışma, tüm türevlerin ilaç potansiyellerinin daha iyi anlaşılabilmesi için ilave biyolojik aktivite testlerine tabi tutulmasının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: Toksisite, Triazol, Pirazolin, Antifungal, Antibakteriyal

ABSTRACT**Master of Science Thesis****DETERMINATION OF SOMENEW SYNTHESIZED PYRAZOLINE
ADJOINTTRIAZOL DERIVATE'S ANTIMICROBIAL
ACTIVITY AND TOXICITIES****Cem KARAEEL****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2006, 67 pages**

Wide spectrum antifungal agents such as imidasole and triazole derivative antifungal agents are still widely in use today. Main aim of the new drug design studies is to creat the most proper “single” agent carrying necessary chemical substructures, together which breaks multiple drug resistance that can be used to cure patients in place of multiple drug use. Set of new generation compounds has been synthetically synthesized (named shortly Tp1-Tp12) bearing both triazole and pyrazoline structures which have been widely used for their antifungal and antibacterial activities, respectively. Determination of either antibacterial / antifungal activities and toxicity levels of these newly synthesized compounds by using microdilution broth assay and brine-shrimp toxicity assay are the research goal for this thesis. Antifungal activity of this twelve synthetic compounds has been investigated against seven different fungi with MIC assay. All of the derivatives showed equal or better antifungal activity when compared with positive control drugs ketaconazole and fluconazole. Microdilution broth assay made for five different bacteria showed that none of the derivatives were more active then the control drug chloramphenicole as they were equal with the control drug. According to brine shrimp toxicity test applied for 12 compounds show that first six derivatives (Tp1-Tp6) are harmful while the others (Tp7-Tp12) are non-toxic. Tp8 is the most active compound among the others and it belongs to the non toxic group of the compounds at the same time. Result of this study suggests additional biologic activity tests needed for all compounds in order to determine the further drug potentialities of these compounds.

Keywords: Toxicity, Triazole, Pyrazoline, Antifungal, Antibacterial

TEŞEKKÜR

Araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Öğr. Gör. Dr. Muhittin ARSLANYOLU' na; yeni triazol türevlerinin temininde bana yardımcı olan Sayın Yard. Doç.Dr. Z.Asım KAPLANCIKLI' ya; testlerimde kullandığım fungusların temininde bana yardımcı olan Sayın Yard. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU' na; gerek laboratuvar çalışmalarında, gerekse tez yazımı konusunda bilgilerinden faydalandığım ve benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, değerli arkadaşım Yüksek Biyolog M. Taha YILDIZ' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince her konuda maddi ve manevi yardım ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Cem KARAEEL

Haziran-2006

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kemoterapötikler.....	10
1.1.1. Antimikrobiyal Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları.....	13
1.1.1.1. Bakteri hücre duvarının sentezini inhibe etmek ve litik enzimleri aktive etmek suretiyle etki	13
1.1.1.2. Sitoplazma membranının permeabilitesini arttırmak suretiyle etki.....	14
1.1.1.3. Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle etki.....	14
1.1.1.4. Genetik materyal içinde DNA sentezinin veya DNA kontrolü altında yapılan m-RNA sentezinin bozulmasıyla oluşan etki.....	15
1.1.1.5. İntermediyer metabolizmayı bozmak suretiyle etki.....	16
1.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	16
1.2.1. Mikrodilüsyon Broth Testi.....	17
1.3. Toksikite.....	19
1.3.1. Brine-Shrimp Toksikite Testi	20
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
2.1. Materyal.....	22
2.1.1. Yeni Triazol Türevi Bileşikler.....	22

2.1.2. Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	23
2.1.3. Toksisite Testinde Kullanılan Organizma.....	24
2.1.4. Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar.....	24
2.1.4.1. Mueller Hinton Broth.....	24
2.1.4.2. Mueller Hinton Agar	24
2.1.4.3. Sabouraud Dextrose Agar	25
2.1.4.4. Nutrient Agar	25
2.1.4.5. Nutrient Broth	25
2.1.4.6. McFarland No: 0.5 Bulanıklık Standardı.....	25
2.1.4.7. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Standart Maddeler.....	26
2.1.4.8. Kimyasal Çözücü.....	26
2.1.4.9. Mikroorganizmaların Üreme Durumlarının Tayininde Kullanılan Kimyasal Madde	26
2.1.5. Toksisite Testinde Kullanılan Maddeler.....	26
2.1.5.1. Kaya Tuzu.....	26
2.1.5.2. Yapay Deniz Suyu.....	26
2.2. Yöntem.....	27
2.2.1. Yeni Triazol Türevi Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	27
2.2.1.1. Mikroorganizmaların Canlandırılması.....	27
2.2.1.2. Yeni Triazol Türevi Bileşiklerin Dilüsyonlarının ve Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması.....	27
2.2.1.3. Mikrodilüsyon Broth Tekniğinin Uygulanması.....	30
2.2.2. “Brine-Shrimp Toxicity Assay” Tekniğiyle Bileşiklerin Toksisitelerinin Belirlenmesi.....	31
2.2.2.1. Test edilecek Bileşiklerin Hazırlanması.....	31
2.2.2.2. <i>Artemia salina</i> larvalarının hazırlanması.....	32
2.2.2.3. Testin Yapılışı.....	33
3. BULGULAR.....	34
3.1. Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	34

3.1.1. Bileşiklerin Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerleri...	34
3.2. Bileşiklerin Brine shrimp Toksikite Testi Yöntemiyle Belirlenmiş Toksikite Değerleri.....	36
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Azollerin, ergosterol biyosentezini inhibe etme mekanizması.....	4
2.1. McFarland 0,5 standardının inokulum süspansiyonu ile mukayesesi.....	29
2.2. Mikrodilasyon Broth Tekniğinin Denemelerde Uygulanış Şekli.....	31
2.3. <i>Artemia salina</i> larvaları.....	33
4.1. Triazol türevi bileşilerin genel formülleri.....	53
4.2. Biyolojik aktivite oluşturan türevler farklı R2 ve aynı R1 radikal gruplarına sahip pirazolin eklenmiş triazol türevleri aktivite gösteren yapılar.....	54
4.3. Fenil ve sikloheksil gruplarına bağlı olarak toksisite sonuçlarının yorumlanması.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Fungus ve Bakterilerin Karşılaştırılması.....	10
1.2. Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Gruplandırılması ve Bazı Örnekler.....	13
2.1. Testlerde Kullanılan Bileşiklerin Kod Numaraları ve Bunlara Karşılık Gelen Bileşikler.....	22
2.2. Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kaynakları.....	23
3.1. Funguslar Üzerinde Denenen Kimyasalların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK-µg/ml) Değerleri.....	34
3.2. Bakteriler Üzerinde Denenen Kimyasalların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK-µg/ml) Değerleri.....	35
3.3. Toksikite derecesi değerlendirilmesinde kullanılan referans değerler.....	36
3.4. Brine-Shrimp Toxicity Assay Testi sonuçları ve LD ₅₀ değerleri.....	37
4.1. TP1 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	41
4.2. TP2 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	42
4.3. TP3 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	43
4.4. TP4 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	44
4.5. TP5 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	45
4.6. TP6 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	46
4.7. TP7 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	47
4.8. TP8 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	48
4.9. TP9 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	49
4.10. TP10 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	50
4.11. TP11 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	51
4.12. TP12 bileşiğine ait toplu sonuçlar.....	52
4.13. Aktiviteleri standart ajan olarak seçilen Flukonazol ve Ketokonazol göre daha yüksek çıkan türevler.....	56
4.14. Mikroorganizmalar ve kendilerini etkileyen bileşiklerin en yüksek ve en düşük MİK değerleri.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
MİK	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
TTC	: Triphenyl Tetrazolium Chloride
MMD	: Minimal Mortal Doz
LD ₅₀	: Letal Doz 50
MHB	: Mueller Hinton Broth
MHA	: Mueller Hinton Agar
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
NA	: Nutrient Agar
NB	: Nutrient Broth
DMSO	: Dimetil-Sülfoksit
µg/ml	: Mikrogram / Mililitre
µl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
g	: Gram
EYED	: En Yüksek Etkin Doz
EDED	: En Düşük Etkin Doz

1. GİRİŞ

Günümüzde, hastanelerde yoğun antibiyotik kullanımı nedeniyle seleksiyona uğrayarak direnç kazanan patojen mikroorganizmaların miktarı önemli oranda artmıştır. Özellikle çoklu ilaç direnci hastanede yatan hastalar için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Gereksiz ve akılcı olmayan antibiyotik kullanımının esas sorumlu tutulduğu bu durum halk sağlığını tehdit ettiğinden tüm dünyada bu konu üzerinde ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda hedeflenen esas amaçlardan biri hasta üzerinde birden fazla ilaç kullanımı yerine gerekli kimyasal modifikasyonları yaparak en uygun molekülün ortaya çıkarılmasıdır.

İlaç geliştirme çalışmaları bir takım zorlukları beraberinde getirmektedir. Bu zorlukların başında ideal bir ilaç dizaynı için gerekli olan uygun “öncü bileşiğin” seçiminde ortaya çıkmakta ve bu seçim çok iyi bir organik sentez bilgisinin yanı sıra biraz da şansa bağlı bulunmaktadır. Teorik yaklaşımlarda önder bileşik geliştirme çalışmaları genellikle yetersiz kaldığı için, sentetik ya da doğal maddeler üzerinde yapılan rasgele tarama çalışmaları eskiden olduğu gibi günümüzde de önemini korumaktadır. Eğer madde bir antibiyotik olmak üzere tasarlandıysa, öncelikle *in-vitro* olarak antibakteriyal ve antifungal aktivite testlerine tabi tutulmalıdır. Olumlu sonuç alındığı takdirde ise sırasıyla akut toksisite, mutajenite, revers-mutasyon testleri, *in-vitro* ve *in-vivo* kromozom aberasyon çalışmaları ile genetik toksisite çalışmaları gibi bir dizi çalışma yapılmalıdır. Ancak tüm bu testler istenilen düzeyde sonuçlar vermiş olsa bile pratikte kullanılabilirliğinin kanıtlanması için yıllar gerektiren bir dizi farmakodinamik, biyokimyasal, hayvan ve insan klinik testlerinden geçmeleri gerekmektedir. Bununla beraber günümüzde hızla gelişen teknolojik ilerlemeler bu tür çalışmaların süresini gittikçe kısaltmaktadır [1]. Ülkemizde ve dünyada antibakteriyal ve antifungal etkileri olması amaçlanan birçok yeni sentetik bileşik, laboratuvar koşullarında sentezlenmiş ve aranan etkilere sahip olup olmadıkları test edilmiştir [2-10].

Antifungal maddelerin ilk temsilcisi olan Griseofulvin’ in 1939 yılında keşfedilmesini, 1944 yılında ilk azol grubu antifungal olan Klormidazol ve 1949’da ise ilk polien grubu antifungal olan nistatinin keşfi takip etmiştir. Ancak

1958'e kadar sadece Klormidazol ve Griseofulvin klinik kullanıma girebilmiştir. İlerleyen yıllarda, günümüzde de hala etkinliğini ve güncelliğini koruyan Amfoterisin B (1960), Mikonazol (1969), Klotrimazol (1969) ve Ekonazol (1974) tedaviye sunulmuştur. 1940'larda başlayan antibakteriyal tedavi ve bu ajanlar üzerine yapılan çalışmalardaki artışın yanında ciddi fungal enfeksiyonların bakteriyal enfeksiyonlarla kıyaslandığında insidansının düşük oluşu, topikal ve sistemik antifungal ajanların geliştirilmesindeki ilerlemeyi yavaşlatmıştır. 1980'lere gelindiğinde polienler, azoller, morfolinler ve allilaminlerden oluşan 4 büyük antifungal ilaç grubu tanımlanmasına rağmen toksisite sorunu nedeniyle sistemik fungal enfeksiyonların tedavisine sunulan tek yeni ilaç, bir imidazol türevi bileşik olan Ketokonazol olmuştur. Takip eden 10 yılı aşkın sürede Ketokonazol'e alternatif olarak sadece imidazol'ün biyoizosteri triazol yapısı taşıyan bileşikler olan Flukonazol ile İtrakonazol sistemik mikoz ve Terkonazol ise topikal fungal enfeksiyonların tedavisine sunulmuştur. 1980-1990'lı yıllarda bağışıklık sistemini etkileyen HIV gibi enfeksiyonlar, kemoterapi ve organ nakli ile ilişkili olarak immün sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımındaki artış ve benzeri nedenler, ciddi fungal enfeksiyonların insidansını arttırmıştır. Bütün bunların sonucu olarak sistemik fungal enfeksiyonların tedavisine yönelik ilaç araştırmalarında artış meydana gelmiştir. Bu araştırmaların çok büyük bir kısmını ise, özellikle triazol halka sistemi taşıyan azol grubu bileşikler oluşturmaktadır. 1990'larda azol grubu antifungal ajanların gelişiminde görülen büyük ilerleme birçok fırsatçı ve endemik fungal enfeksiyonun tedavisine farklı alternatifler sunmuştur. Ancak aynı yıllarda azol grubu antifungal ilaçların yaygın ve kontrolsüz kullanımı, bu ilaçlara karşı direnç oluşumuna neden olmuştur. Günümüzde halen birçok fungal enfeksiyon çeşitli nedenlerden dolayı tedaviye cevap vermediğinden yeni nesil triazol grubu antifungal ilaç araştırmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir. Klinik kullanıma sunulmamış olmakla birlikte birçok aktif bileşik üzerine çalışmalar devam etmektedir (Ravuconazole, Voriconazole, T8581, UR0746). Günümüzde bu bileşiklerin her biri halen değişik geliştirme aşamalarında [11].

İmidazol türevi çeşitli antifungal ilaçlar 1978'den itibaren kullanıma sunulmuş geniş spektrumlu fungistatik ilaçlardır. Cilt ve mukozaların mantar

enfeksiyonlarıyla, kronik mukokütanöz kandidiyazis tedavisinde diğer ilaçlara göre daha üstündürler. Sistemik olarak kullanılanlar, sistemik mantar enfeksiyonlarının çoğunda Amfoterisin B'ye kıyasla daha az aktif olmalarına karşın daha düşük toksisiteye sahiptir.

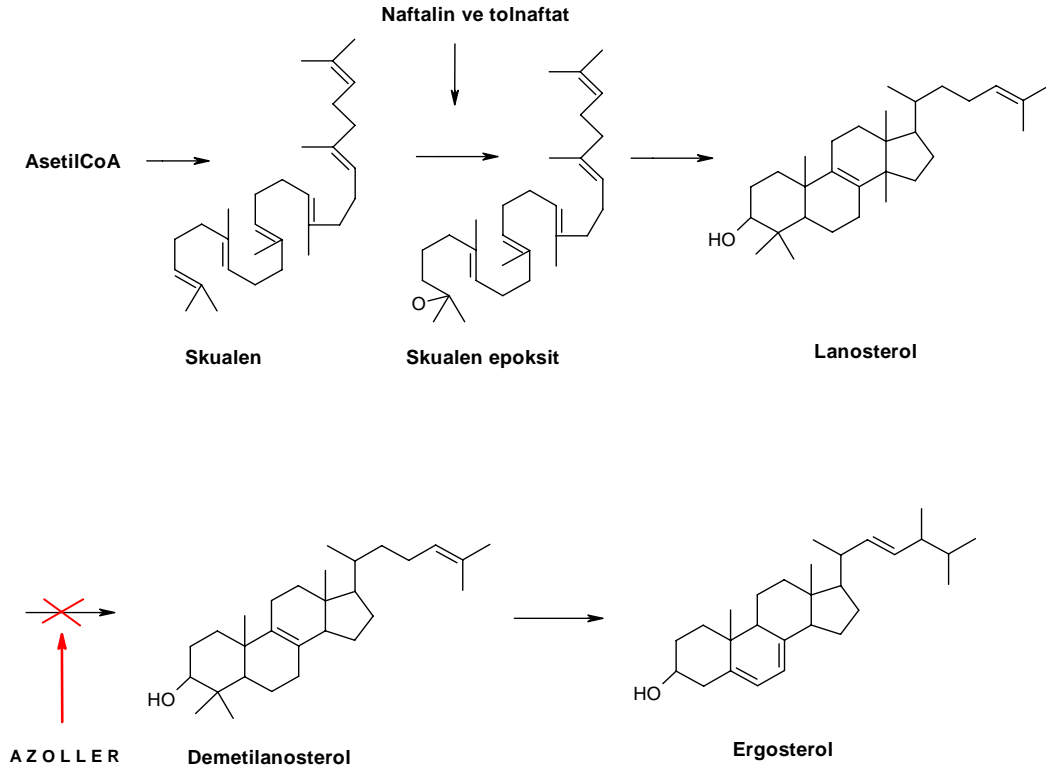
İmidazol türevi antifungal ilaçlardan sonra, yapıcı bunlara benzeyen triazol türevi fungostatik ilaçlar geliştirilmiştir [12]. Triazol türevleri, imidazol türevleriyle aynı antifungal spektruma sahip olmasına rağmen, sistemik verilişte imidazol türevlerine göre üç noktada üstünlük gösterirler;

i.) Daha yavaş metabolize edildikleri için daha uzun süre etkilidirler ve doz etkileri daha uzundur.

ii.) İnsan hücrelerindeki steroid sentezi üzerine, daha az etkilidirler; bu nedenle direkt toksik etkileri daha zayıftır.

iii.) İmidazol türevi ilaçların sistemik verilişte yapabildikleri endokrin yan tesirleri göstermezler.

İmidazol ve triazol türevi antifungal ilaçlar, mantar hücrelerinin sitoplazma membranındaki ana sterol bileşiği olan ergosterol'un sentezini, 14-metillanosterol'un desmetildihidrolanosterol'a dönüşümü basamağında inhibe etmektedir. Bu dönüşümü yapan 14α -demetilaz enzimi, bir mikrozomal sit-P450 enzim türüdür. İmidazol ve triazol türevi ilaçlar bu sit-P450'yi selektif olarak inhibe etmektedir. Mantarların sit-P450'si, imidazol türevlerine memelilerin aynı enzimlerine kıyasla en az 1000 kez daha duyarlıdır. Bu fark ve seçicilik triazol türevlerinde imidazol türevlerinde olduğundan yaklaşık 10000 kez daha fazladır. İmidazollere ve triazollere maruz kalan mantar hücrelerinde 14α -metil steroller birikmekte ve bunlar membran fosfolipitlerinin asil zincirlerinin normal düzenini ve membrana bağlı belirli enzimlerin fonksiyonlarını bozmaktadırlar. Sonuçta mantar hücrelerinin büyümeleri inhibe olmakta; ayrıca hücre membranının permeabilitesi de bozulmaktadır. Şekil 1,1.' de Azollerin, ergosterol biyosentezini inhibe etme mekanizması görülmektedir [13].



Şekil 1.1. Azollerin, ergosterol biyosentezini inhibe etme mekanizması [13]

Mukanazol ve klotrimazol gibi ilaçlar ise bu mekanizmaya ilaveten sitoplazmik membranın yapısını bozarak esansiyel hücre bileşenlerinin kaybına yol açarlar. Bu olay, antifungallerle fungal membrandaki doymamış yağ asitleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerin bir sonucu olarak meydana gelir. Membranın geçirgenliği ile transport fonksiyonlarındaki değişiklikler, metabolik dengesizliklere ve dolayısıyla fungus hücresinin ölümüne veya üremesinin inhibisyonuna yol açar. Ayrıca fungus hücresinde peroksitlerin birikmesiyle mitokondriyal enzimler bloke olur ve bunun sonucu olarak hücre ölür. Azol grubunda bulunan önemli antifungal ilaçlardan bazıları şunlardır; klotrimazol, izokonazol, ekonazol, tiokonazol, oksikonazol, sulkonazol, butokonazol, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, mikonazol, terkonazol vb.

İmidazol ve triazol türevi antifungallere ortak bir adla **azoller** denilir. Antifungal etkili azol türevleri büyük ve giderek genişleyen bir gruptur. Geniş antifungal spektrumları nedeniyle eski bileşiklerin yerini almış durumdadırlar [13].

Pirazolin türevi bileşikler ise; yapılan çalışmalar sonucunda yüksek düzeyde antibakteriyal aktivitelerinin yanı sıra antiinflamatuvar, antidepresan, aneljezik vb. olmak üzere birçok aktiviteyi yapısında bulunduran önemli bir gruptur.

Bu çalışmada test edilen maddeler, sentezi yeni gerçekleştirilmiş ve daha önce herhangi bir biyolojik aktivite testine tabi tutulmamış, azotlu heterosiklik yapısı itibariyle azoller grubuna dahil triazol türevi bileşiklerden oluşmaktadır. Özellikle de funguslara karşı etkili olabileceği ihtimalinden yola çıkılarak sentezlenen bu bileşiklerin; antibakteriyal, antifungal aktivite ve toksik etki düzeyleri açısından *in-vitro* olarak bir ön taraması yapılmış ve bu bileşiklerin, beklenin dışında başka olası biyolojik aktivitelere sahip olup olmadıkları incelenmiştir.

Antibakteriyal ve antifungal ajanlar arasındaki en temel fark, prokaryot bakteriler ile ökaryot olan fungus veya mayalar arasındaki farklılıkla izah edilebilir. İnsanlar ve diğer memeliler de funguslar gibi ökaryot olduğundan benzer biyolojiye sahip olan insan hücrelerine zarar vermeden fungus veya mayaları inhibe edecek bir mekanizma geliştirmenin güçlüğü nedeniyle antifungal etkili ilaçlar antibiyotiklere karşın çok daha az sayıdadır. Memeliler ve funguslar (ayrıca mayalar); t-RNA-AA-açıl transferazları, steroid sentetaz sistemleri (memelilerdeki kolesterolün yerini fungus/mayalarda ergosterol alır) ve hücre çeperlerinin karbonhidrat yapısı bakımından farklılıklar gösterirler. Dolayısıyla, halen kullanımda olan sentetik terapötik ajanların toksisiteleri, yan etkileri ve dirence sebep olmaları nedeniyle yeni, emniyetli ve etkin antifungal ilaçlara gerek duyulmaktadır [14].

Bakteriler prokaryotik organizmalar olmaları nedeniyle hücre yapıları bakımından diğer mikroorganizmalardan filogenetiksel olarak farklılıklar gösterirler. Prokaryotik hücrelerde nükleer materyal bir çekirdek zarı ile çevrili değildir. Hücrenin genel kısımları; hücre zarı, flagella, sitoplâzma, ribozomlar, nükleer bölge ve granüllerdir. Bakterilerin hücre yapıları elektron mikroskobu ile detaylı bir şekilde ortaya konmuştur ve ince yapıları türlere göre farklılık gösterebilmektedir. Bakteri hücreleri %70–80 oranında sudan oluşurken geri kalan kısmı C,O,N ve külden ibarettir. Mineral elementler ve iz elementler hücre yapısında bulunmaktadır. Organik maddeler bakteri kuru ağırlığının %40-90'nını

oluşturmaktadır. Çalışmamızda kullanılan bakteri türleri sırasıyla; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır.

Escherichia coli; yıllardır gıda maddelerinde fekal kontaminasyonun göstergesi olarak kabul edilen *E. coli*, enterobacteriaceae familyasında yer alan bir koliformdur. Çok farklı serotipleri bulunan *E. coli*'nin doğal habitatı sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarıdır. Önemli fırsatçı patojenlerdendir. Önceden zararsız gibi görünen *E. coli*'nin sadece bazı enteropatojenik suşlarından söz edilmiştir. Daha sonra bu bakterinin hem patojenik hem de enterotoksijenik özellikler gösterdiği ve çok çeşitli virulens faktörler içerdiği ortaya konmuştur. *E. coli* suşları; gram negatif, fakültatif anaerob, sporsuz, hareketli, çubuk şeklinde bakterilerdir. Optimum 37°C'da gelişirler. Minimum sıcaklık istekleri 4°C, maksimum 46°C'dir [15, 16].

Staphylococcus aureus; insanlar ve hayvanlar için fırsatçı patojendir. İnsan vücudunun çeşitli yerlerinde kolonize olurlar. Normal insanların, hastanede çalışanların ve tedavi altındaki hastaların %70'inin burun mukozasına kolonize olurlar. Pigmentli, gram pozitif, fakültatif anaerob çoğunlukla aerob üreyen, %10 NaCl'de üreyebilen, sporsuz ve hareketsiz bakterilerdir. İnsan ve hayvanlarda gıda zehirlenmesi ve piyojenik enfeksiyonları yapabilen bir stafilokoktur. Stafilokoklar; koagülaz, deoksiribonukleaz, lipaz, hiyalüronidaz, stafilokinaz, betalaktamaz ve antifagositik maddeler gibi enzim yapısında maddeler salgırlar. Toksinleri ve enzim yapısındaki maddelerin etkisiyle çeşitli enfeksiyonların oluşmasına neden olurlar [15,16].

Bacillus cereus; gram pozitif, aerob, sporlu basillerdir. Bu bakteri çok yaygın olarak hemen her yerde bulunur. Toprak kökenli olması nedeniyle gerek toz ve toprak gerekse su ile yayılım gösterirler. Tıbbi açıdan önemli bir organizmadır. *B. cereus* besin zehirlenmesi ve değişik hastalıklar yapabilir veya önemsiz bir bulaş olarak organizmada bulunabilir. *B. cereus* iki farklı toksin oluşturur. Bunlardan birisi ısıya stabil bir protein olan enterotoksindir. Gıda zehirlenmesine neden olan bu toksin 126 °C'da 90 dakikada inaktif hale gelir. Sulu diare ve kusmaya yol açarlar. Diğeri ise emetik toksin olarak tanımlanan

ısıya duyarlı olan bir peptittir. 60 °C'da birkaç dakikada tahrip olurlar. Sıklıkla diare ve kusmaya yol açarlar [15,16].

Micrococcus luteus; gram pozitif, aerobik, tekli, dörtlü veya düzensiz gruplar oluşturan kok şeklinde bakterilerdir. Çoğunlukla yüksek düzeyde tuz varlığında gelişebilirler. Çapları, ortalama, 0.8-1.0 µm arasında değişir. Önemli patojen organizmalardır [15,16].

Pseudomonas aeruginosa; psedomonadaceae familyası içinde yer alırlar. Sporsuz kapsülsüz çomaklardır. Gram negatif, 1-3 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde zincirler halinde görülen bakteridir. Tıbbi açıdan son derece önemli bir türdür. İnsan, hayvan ve bitkilerde patojendir. Aerobik olmaları nedeniyle gıdaların yüzeyinde hızla gelişebilmeleri sonucu okside ürünler ve mukoz madde oluştururlar. Kendi gelişmeleri için gerekli gelişme faktörleri ve vitaminleri sentezleme yeteneğindedirler [15,16].

Çalışmamızda bu bakterileri kullanmamızın başlıca nedenleri yukarıdaki bilgilerin de ışığında; seçilen organizmaların insan, hayvan ve bitkiler üzerinde son derece güçlü patojen etkilerinin bulunması, kolay üretilebilir olmalarıdır.

Funguslar; ökaryotik, tipik olarak iplikli yapıda olan canlılardır. Bitkiler gibi hücre duvarına sahiptirler ve hemen hemen tümü hareketsizdir. Birçok önemli fungus sıcaklığa bağımlı olarak dimorfik'tir, yani farklı sıcaklıklarda farklı yapılar gösterirler. Oda ısısında serbest yaşayan, saprofit küf halinde bulunurken vücut sıcaklığındaki konak dokularda maya halindedir. Fungusların çoğu zorunlu aéroptur; bazıları fakültatif anaéroptur; hiçbiri zorunlu anaerop değildir. Bütün funguslar önceden oluşmuş bir karbon kaynağına gereksinim duyarlar ve bundan ötürü sıklıkla çürümekte olan materyal üzerinde yer alırlar. Dolayısı ile fungusların çoğunun doğal yaşam alanı dış ortamdır. Bu genel ifadenin önemli bir istisnası *Candida albicans*'tır [16].

Candida türleri;

- Alem: Fungi (mantarlar)
- Bölüm: Amatiomyota (yüksek yapıli mantarlar)
- Sınıf: Ascomycetes (mayalar ve yaprak lekeleri)
- Takım: Sacchoromycetales(endomycetales) içerisinde yer alırlar.

Tek hücreli, hücre duvarında kitin ve selüloz içeren ökaryotik kemoheterotrof organizmalardır. Tomurcuklanma veya ortadan ikiye bölünme ile çoğalırlar. Bu türler, insanları etkileyen en yaygın fungal patojendir. Bu organizmalar yüzeysel enfeksiyonlardan, derin doku enfeksiyonlarına kadar geniş hastalık spektrumuna sahiptirler. Çalışmamız sırasında kullanılan fungus türleri sırasıyla; *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida utilis* ve *Geotricum candidum*'dur.

Candida albicans; krem renginde, yumuşak veya tereyağı kıvamında S tipi düzgün koloni morfolojisine sahiptirler. Yalancı hif, bazen gerçek hif oluşturabilirler. Karakteristik olarak tüp, germ ve klomidospor oluştururlar. Kandidozun en yaygın nedenidir. Vücudun her yerinde akut, subakut ve kronik enfeksiyon yapabilirler [17]. Yaptığı hastalıklara kandida menenjitisi örnek olarak verilebilir. Kandida menenjitisi sıklıkla prematüre yeni doğanlarda, santral sinir sistemi cerrahisi geçirenlerde ve immünsüpresif hastalarda görülen bir hastalıktır. Lipozomal amphoteresin B ve flukonazol kombinasyonunun tedavide iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir [18].

Candida tropicalis; krem renginde, yumuşak ve çevresinde misel oluşturan koloni morfolojisine sahiplerdir. Yalancı hif, bunun etrafında tek tek bazen kümeler yapan, çiçek gibi blaskonidiumlar ve bazen yalancı hiflerin ucunda ince duvarlı, yuvarlak klomidaspora benzer yapılar oluşturabilirler [17]. *Candida tropicalis* fungemisi olarak tanımlanan hastalığı meydana getirir ve flukonazol tedavisi uygulanır [19].

Candida glabrata; vücudun her yerinde akut, subakut ve kronik enfeksiyona yol açabilirler. Ancak idrar yolu enfeksiyonlarında, yenidoğanlarda, fungemilerde, immünoyetersizlikte konaklarda önemli etkenlerdir. Krem renginde, yumuşak veya tereyağı kıvamında S tipi düzgün koloni morfolojisine sahiptirler. Yalancı ve gerçek hif oluşturmazlar. Azollere, doza bağlı olarak duyarlı veya dirençli olması önemli özelliğidir [17,20].

Candida krusei; vücudun her yerinde akut, subakut ve kronik enfeksiyon yapabilirler. Bununla beraber flukonazol profilaksisi alan immünoyetersiz hastalarda önemli etkidir. Yassı, kuru, donuk, krem renginde çevresinden

miselin çıktığı koloniler şeklinde morfolojiye sahiplerdir. Azollere doğal dirençli olması önemli özelliğidir [17,20].

Candida utilis; NCYC (National collection of yeast cultures)'ye göre önemli bir patojenitesi olmamakla birlikte antifungal ajanların hassasiyet testlerinde kullanılan bir organizmadır. Genel olarak işlem görmüş gıdaların tatlandırılmasında kullanılırlar [17].

Geotricum candidum; mantarlar aleminin küfler sınıfında yer alan bu organizma beyaz renkte koloni morfolojisine sahiptir. Ekmek mayasına bulaştığında bu mayayla imal edilen ekmeklerde küf kokusuna neden olurlar ve ekonomik açıdan büyük zararlar meydana getirebilirler [17].

C. albicans, kandidozun en yaygın nedenidir. *C. glabrata*'nın azollere doza bağlı olarak duyarlı veya dirençli olması ile *C. krusei*'nin azollere karşı doğal dirençli oluşu bu organizmaları önemli bir tehdit haline getirmektedir [17,20]. Bu nedenden dolayı çalışmamızda referans organizmalardan biri olarak kullanılmışlardır.

Bakteriler prokaryotik organizmalar iken fungusların ökaryotik olmaları sebebiyle aralarında birçok yönden farklılıklar bulunur (Çizelge 1.1.) Mantar hücresi tıbbi yönden önem taşıyan iki yapıya sahiptir;

- Mantar hücre duvarı esas olarak kitinden (bakterilerde olduğu gibi peptidoglikan değil) yapılmıştır; dolayısı ile mantarlar, peptidoglikan sentezini inhibe eden penisilin gibi antibiyotiklere duyarsızdır.
- Mantar hücre zarı kolesterol içeren insan hücre zarlarının aksine ergosterol ve zimosterol içerir. Amfoterisin B'nin mantarlar üzerine gösterdiği seçici etki zar sterollerindeki bu farklılığa dayalıdır.

Çizelge 1.1. Fungus ve bakterilerin karşılaştırılması (16)

Nitelik	Funguslar	Bakteriler
Ortalama organizma çapı	Yaklaşık 4µm(Candida)	Yaklaşık 1µm(Staphylococcus)
Çekirdek yapısı	Ökaryotik	Prokaryotik
Sitoplazma	Mitokondri ve E.R. bulunur	Mitokondri ve E.R. yok
Hücre zarı	Steroidler vardır	Steroidler yok (Mycoplasma hariç)
Hücre duvar içeriği	Kitin	Peptidoglikan
Sporlar	Üreme için cinsel olan ve olmayan sporlar	Endosporlar hayatta kalmak için olup üreme amacıyla kullanılmazlar
Termal dimorfizm	Evet (bazıları)	Yok
Metabolizma	Organik karbon gereksinir; zorunlu anaerob değildir	Birçoğu organik karbon gereksinmez; birçoğu zorunlu anaerobtur.
Ribozom	80S (60S+40S)	70S (50S+30S)

1.1.Kemoterapötikler

Kimyasal maddelerin organizma dışındaki ortamda mikroorganizmalar üzerine olan öldürücü veya üremelerini durdurucu etkilerine bakılarak hastalıkların tedavisinde bu maddelerden yararlanma fikri oldukça eskidir. 17. yüzyıldan beri sıtma ve amipli dizanteriye karşı kullanılan kinin ve emetin gibi maddeler ilk kimyasal tedavi maddeleri arasında sayılmalarına rağmen; kimyasal maddelerle tedavinin yani kemoterapinin temelleri 20. yüzyılın başında Afrika uyku hastalığına karşı tedavi çareleri arayan Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda patojen mikroorganizmalara etkili fakat konak organizma için az zararlı arsenik ve antimon bileşiklerinin bulunmuştur. Paul Ehrlich'in de daha o zaman belirtmiş olduğu gibi mikrobik hastalıkları tedavi eden kimyasal maddenin yani kemoterapötik maddenin, antimikrobik etkisinin düşük konsantrasyonlarda bile fazla olmasının yanı sıra bu konsantrasyonlarda organizmaya olan toksik etkisinin çok az olması ya da hiç bulunmaması gerekir

[15]. Bu gelişmelere karşın modern kemoterapi, 1936 yılında sülfanilamidin ilk defa klinikte kullanılmasıyla başlamıştır [21].

Geçmişte, insanların bakteri kaynaklı bir hastalığa yakalanması durumunda, ölüm riski oldukça yüksektir. Bu durum, Alexander Fleming'in bulduğu penisilinin, 1940'lı yılların başında büyük ölçekte üretilmesine kadar sürmüştür. Böylelikle penisilinlerin 1941 yılında klinik kullanıma girmesiyle "antibiyotik çağı" başlamış ve günümüze kadar piyasaya birçok antibiyotik ilaç sürülmüştür [22].

Çok küçük konsantrasyonlarda bile patojen mikroorganizmalar üzerine zarar verici etkileri (parazitotrop etki) büyük, buna karşılık konak organizma üzerindeki etkileri (organotrop etki) çok küçük olan ya da hiç bulunmayan; tedavi amacı ile kullanılan kimyasal maddelere "kemoterapötikler" adı verilmektedir. Seçici toksik etki dediğimiz bu özellik kemoterapötiklerle antiseptik maddeler arasındaki başlıca ayrıcalıktır. Mikroorganizmalar soliter canlı hücrelerdir. Organizmanın yapısını da canlı hücreler oluşturur. Hücrelerin de mikroorganizmalar gibi seçici geçirgen zarları, benzer yapıda sitoplazmaları ve metabolizmalarını sağlayan mikroplarınkine benzer enzimleri vardır. Bu durumda bir kemoterapötik maddenin patojen mikroorganizmayla, konak organizma arasında seçici toksik etki göstermesi zorluğu ortaya çıkar [23].

Kemoterapiyi diğer tedavilerden ayıran en önemli özelliklerden birisi, tedavide hastalığa yol açan etkenin yani mikroorganizmaların doğrudan yok edilmesinin hedeflenmesidir. Diğer birçok hastalığın etiolojisinde çok çeşitli faktörlerin rol oynaması nedeniyle tedavide tek hedefe yönelik strateji geliştirme zorluğuna karşın enfeksiyon hastalıklarında, her ne kadar bireysel ve çevresel faktörlerin rolü olsa da esas olarak hastalığa yol açan mikroorganizmanın kemoterapötiklerle yok edilmesi büyük ölçüde başarı sağlamaktadır. Oldukça etkin olan bu tedavi yaklaşımı, bilinçsiz kullanım halinde direnç gelişmesi nedeniyle tedavide başarısızlığa neden olabilmektedir. Bu nedenle kemoterapötiklerin belirli kurallar dâhilinde, bilinçli olarak kullanılması önem kazanmaktadır. Kemoterapide ana ilke; konakçıda, hiç veya çok az toksik etki yapan bir kimyasal madde ile hastalık etkeni organizma üzerinde, yeteri kadar toksik veya letal etki oluşturmaktır. Kemoterapötik ilaçlar, vücutta kimyasal

maddelerin seçici etkisi için tipik birer örnektirler. Bu seçici etki, patojen mikroorganizma hücresi ile insan veya genel olarak memeli hücresi arasında, yapı ve biyokimyasal mekanizmalar bakımından var olan farklar sayesinde mümkün olmaktadır. Seçicilik derecesi, çeşitli terapötik ilaç gruplarında değişiklik gösterir. Penisilinler en çok seçicilik gösteren ilaçlardır. Güçlü bakterisidal etki gösterdikleri halde, memeli hücresi üzerindeki yalın toksik etkileri çok zayıftır. Buna karşılık, sitoplazma membranına veya çekirdekte DNA / m-RNA sentezine ya da m-RNA'nın ribozomlardaki çevirisine etki yapmak suretiyle antibakteriyal etki gösteren bazı kemoterapötik ilaçların seçiciliği düşüktür; genellikle bakteri yanında memeli hücresi üzerine de toksik etki yaparlar. Bu konuya penisilinlerin etki mekanizması örnek olarak verilebilir. Bakterilerde; memeli hücrelerinde de bulunan lipit tabiatındaki hücre sitoplazma membranına ilave olarak, bir de onun dış tarafında hücre duvarı denilen daha sağlam bir tabaka vardır. Bu duvar sayesinde bakteri sitoplazmasının osmotik basıncı, ortamına göre çok yüksek değere ulaştığı zaman bile, tümlüğünü ve şeklini koruyabilir. Penisilinler, hücre duvarının esasını oluşturan uzun polimer molekül zincirlerinin yan dallarla birbirine kenetlenmelerini engeller; böylece hücre duvarının oluşması önlenmiş olur ve sonuçta bakterinin ölümüne yol açar. Memeli hücresinde böyle bir yapı bulunmadığından onun üzerine penisilinlerin belirgin bir toksik etkisi yoktur [23].

Antimikrobiyal tedavinin temelinde yatan en önemli kavram seçici toksisite, yani konağı harap etmeden mikroorganizmaların inhibe edilmesidir. Seçici toksisite mikroorganizmalar ile insan hücreleri arasında yapı ve metabolizma farklarının ortaya çıkarılması ile elde edilir. Örneğin penisilinler ve sefalosporinler peptidoglikan sentezini önlemeleri nedeniyle bakteri üremesini inhibe edip, insan hücrelerinin üremesini etkilemediklerinden etkin antibakteriyal ajanlardır [16]. Kemoterapötiklerin etki mekanizmalarını Çizelge 1.2.'de görüleceği üzere beş grupta toplayabiliriz.

Çizelge 1.2. Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Gruplandırılması ve Bazı Örnekler [7]

<i>Etki Mekanizması</i>	<i>İlaçlar</i>
<p>Hücre Duvar Sentezinin İnhibisyonu</p> <p>Peptidoglikanın çapraz bağlanmasının (transpeptidasyon) inhibisyonu</p> <p>Diğer peptidoglikan sentezbasamakları inhibisyonu</p>	<p>Penisilinler, Sefalosporinler, İmipenem, Aztreonam,</p> <p>Vankomisin, Basitrasin, Sikloserin</p>
<p>Protein Sentezinin İnhibisyonu</p> <p>50S ribozomal altbirim üzerine etki</p> <p>30S ribozomal altbirim üzerine etki</p>	<p>Kloramfenikol, Eritromisin, Klindamisin</p> <p>Tetrasiklinler ve Aminoglikozidler</p>
<p>Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu</p> <p>Nükleotid sentezinin inhibisyonu</p> <p>DNA sentezinin inhibisyonu</p> <p>mRNA sentezinin inhibisyonu</p>	<p>Sülfonamidler, Trimethoprim</p> <p>Kinolonlar</p> <p>Rifampin</p>
<p>Hücre Zar İşlevinin Değiştirilmesi</p> <p>Antibakteriyal aktivite</p> <p>Antifungal aktivite</p>	<p>Polimiksin ve Gramisidin</p> <p>Amfoterisin B, Nistatin, Ketokonazol, Flukonazol ve diğer triazololler</p>
<p>İntermediyer Metabolizmayı Bozanlar</p>	<p>İzoniazid, Metronidazol, Pentamidin, Etambutol</p>

1.1.1. Antimikrobiyal Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları

1.1.1.1. Bakteri Hücre Duvarının Sentezini İnhibe Etmek ve Litik Enzimleri Aktive Etmek Suretiyle Etki

Bakteri hücresi lipit yapıdaki sitoplâzma membranına ilave olarak membranın dış yüzünü örten bir de hücre duvarına sahiptir. Bakteriler dış ortamdan aktif transport sistemiyle, suda çözülmüş bir çok maddeyi alarak sitoplazmalarında konsantre ederler ve bunun sonucu olarak hücre içi osmotik basınçlarını yükselir. Hücre duvarının görevi, bakteri sitoplazmasının içindeki yüksek osmotik basınca (yaklaşık 25 atmosfer'e kadar) direnmek suretiyle, hücrenin bütünlüğünü korumaktır. Eğer bu duvar herhangi bir nedenle zayıflayacak olursa veya oluşmazsa hücre şişer ve parçalanır [24].

Bazı antibiyotikler bakteri hücre duvarının senteziyle ilgili biyokimyasal reaksiyonları bozarlar. Sonuçta hücre duvarı oluşamayacağı için bakteri hücresi ölür. Bu tip ilaçlar, gelişmesini tamamlamış bakteriler üzerine etkisizdirler; çünkü

bunlarda hücre duvarının oluşumu zaten tamamlanmış durumdadır. Bu ilaçlar özellikle gelişmekte ve üremekte olan bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterirler. Hücre duvarının ana maddesi olan murein rijid polimer bir bileşiktir. Bu madde, bir mukopolisakkarid olan lineer peptidoglikan zincirlerinin yan dallarla birbirine bağlanması sonucu oluşur. Murein, gram-pozitif bakterilerde duvar kalınlığının yaklaşık %50'sini oluşturur ve bu duvarın mekanik dayanıklılığını sağlayan esas ögedir. Penisilinler ve sefalosporinler, transpeptidaz enzimlerini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler ve sonuçta peptidoglikanlardan murein oluşması bozulur. Murein sentezi bozulunca ortamda polimerize olamamış nükleotidler birikir ve sonuçta hücreler lizise uğrar [13].

1.1.1.2. Sitoplâzma Membranının Permeabilitesini Arttırmak Suretiyle Etki

Deterjan özelliğine sahip antibiyotikler ve bazı antiseptikler sitoplâzma membranının permeabilitesini arttırarak sitoplâzma içindeki fonksiyonel önemi bulunan nispeten ufak moleküllü bileşiklerin (aminoasitler, nükleotidler ve potasyum gibi) hücreden dışarı sızmalarına neden olurlar ve böylece bakterisidal etki oluştururlar. Bunların etkisi, hücre duvarının sentezini bozan antibiyotiklerin aksine, bakterinin gelişme ve üreme döneminde olup olmaması ile ilişki göstermez; gelişmesini tamamlamış bakterileri de öldürürler. Bu gruptaki antibiyotiklere örnek polimiksinler, gramisidin, amfoterisin-B, nistatin ve diğer bazı antifungal ilaçlar ile siklosporin-A'dır [13].

1.1.1.3. Bakteri Ribozomlarında Protein Sentezini İnhibe Etmek Suretiyle Etki

Bu tip etki gösteren kemoterapötikler çoğunlukla geniş spektrumludur ve bakteriyostatik etki gösterirler. Gerek gram-negatif, gerekse gram-pozitif mikroorganizmaların gelişmesini inhibe ederler. Bu şekilde etki yapan ilaçların bazıları bakterilerin ribozomları ile kombine olur ve orada m-RNA tarafından yönetilen protein sentezini bozarlar. Birçok ilaç, insan hücrelerindeki protein sentezini bozmadan bakterilerdeki protein sentezini inhibe eder. Bu seçicilik bakteri ve insan ribozomal proteinleri, RNA'lar ve bunlarla ilişkili enzimler arasındaki farklılıklara bağlıdır. Bakteriler 50S ve 30S alt birimlerine sahip 70S

ribozomlar içerirken, insan hücreleri 60S ve 40S alt birimli 80S ribozomlara sahiptir. 70S bakteri ribozomu, ökaryot hücrelerin (insan hücrelerinin) 80s ribozomuna göre antibiyotiklere daha fazla duyarlılık gösterir. Yalnızca memelilerin mitokondrilerinde bulunmakta olan 55S ribozomları; antibiyotiklere duyarlılık bakımından bakteri ribozomlarına benzerler. Bakteri 70S ribozomları sadece protein ve RNA'dan oluşurlar [16].

Kemoterapötikler, protein sentezi olayı ile ilgili çeşitli basamakları bozabilirler. Böylece bakteri hücresi için gerekli proteinleri, dolayısıyla enzimlerin sentezini engellerler. Bu ilaçların ribozomlardaki etki türleri şunlardır [13];

- Tetrasiklinler, t-RNA'nın ribozomlara bağlanmasını engelleyerek protein sentezini inhibe edebilir.
- Kloramfenikol, eritromisin, klindamisin ve fusidin m-RNA'nın okunmasını bozarak protein sentezini inhibe edebilir.
- Aminoglikozid antibiyotikler, m-RNA'nın ribozomlara bağlanmasını engelleyerek protein sentezini inhibe edebilir.

1.1.1.4. Genetik Materyal İçinde DNA Sentezinin veya DNA Kontrolü Altında Yapılan m-RNA Sentezinin Bozulmasıyla Oluşan Etki

Bu gruptaki ilaçların büyük bir kısmı, memeli hücresinin çekirdeğini de etkilediğinden sitotoksik ilaçlardır. Bunların antibakteriyal etkileri olmasına karşın çoğu bu amaçla kullanılmazlar. Bir kısmı antineoplastik ilaç olarak malin tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır (mitomisinler, aktinomisinler, daunorubisin ve doksorubisin gibi). Memeli hücresi üzerinde fazla toksik olmayan rifamisinler (rifampin ve benzerleri) ile kinolonları antibakteriyal ilaç olarak kullanılır. DNA'yı etkileyerek antibakteriyal etkinlik oluşturan ilaçlar [13];

- Aktinomisinler ve Rifamisinler
- Kinolonlar (Nalidiksik asit, oksolinik asit ve flurookinolonlar)
- Mitomisinler ve benzerleri

1.1.1.5. İntermediyer Metabolizmayı Bozmak Suretiyle Etki

Bu gruptaki ilaçlar daha çok bakteriostatiktirler. Bu şekilde antibakteriyal etki yapan ilaçlara örnek olarak sulfonamidler, sulfonlar, trimetoprin, p-aminosalisilik asit ve izoniazid verilebilir. Bunlar bakterinin metabolizması için gerekli bazı maddelerin sentezini engellerler. Bakteriler için antimetabolit niteliğinde olan maddelerdir [13].

1.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık deneyini uygulamak için ilk yöntem Fleming tarafından 1929 yılında geliştirilmiştir. Bu yöntemde Fleming, bir petri kutusunda katı besiyerini, ortadan kenara çok daha yakın bir yerden, dik olarak kesmiş ve bir şerit halinde dışarı almıştır. Açılan bu boşluğa küf özütü (Penisilin gibi) içeren besiyerini yerleştirmiş, daha sonra bu boşluğa dik bir açıda paralel olarak değişik bakteri kültürlerini (*Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Pneumococcus* ve başkaları gibi) yayma yöntemiyle ekmiştir. İnokulasyondan sonra kültürlerin üreme ve inhibasyon zonlarını gözleyerek kültürlerin duyarlılığını değerlendirmiştir [25].

İkinci Dünya Savaşı sırasında birçok değişik antibiyotik bulunmuş ve değişik mikroorganizmalara karşı duyarlılık modelleri saptanmıştır; yeni antibiyotikler medikal uygulamada “olağan üstü” ilaçlar olarak kabul edilmiştir. Ancak dirençli bakteriyal suşların ortaya çıkmasıyla yeni önlemlere gerek duyulmuş ve bakterilerin *in-vitro* kemoterapötik maddelere karşı olan dirençlerini tayin için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1940’lı yıllarda birçok antibiyotiğin ortaya çıkmasıyla; tüp dilisyon yöntemleri yetersiz kalmış ve uygulamada pratik bulunmamıştır [25].

Foster ve Woodruff, duyarlılık testlerinin uygulamasında ilk kez antibiyotik emdirilmiş süzgeç kâğıtlarının kullanılmasını önermişlerdir. Araştırmacılar, duyarlılığı test edilecek organizma ile önceden inokule edilen petri kutusundaki besiyeri üzerine bir antibiyotik emdirilmiş şeridi yerleştirerek duyarlılık testini yapmışlardır. Vincent, antibiyotik solüsyonun kâğıt disklerde kurutulduktan sonra kullanılabilmesini ve böylece taze stok solüsyonlara her zaman gereksinme duyulmayacağını göstermiştir. 1960’lı yıllara dek mikroorganizmaların ilaç duyarlılık, özellikle de antibiyotik duyarlılık testleri için

birçok yöntem (difüzyon ve titrasyon yöntemleri) veya bu yöntemlerin değişik birçok modifikasyonu bildirilmiştir. Her yöntemin bazı avantajları ve kullanım sınırlılığı gibi dezavantajları vardır. Sonuçların en yüksek düzeyde verimlilikle yorumlanabilmesi için yöntemin tüm özelliklerinin iyi kavranılması ve yöntemlerin sürekli yenilenebilir sonuçlar vermesi gereği göz önünde tutulduğunda, bir standardizasyonun saptanmasına gerek duyulmuştur. İlk kez 1970'li yıllarda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) önderliğinde, Anderson ve Bauer-Kirby'nin yöntemlerindeki standart aşamalar dikkate alınmak suretiyle, Uluslararası İşbirliği Çalışma Kurulunca bir standardizasyona gidilmiştir [25,26]. Günümüzde kullanılan antibiyotik duyarlılık testleri;

- Difüzyon Yöntemleri
- Kirby-Bauer Yöntemi
- Epsilometer Testi
- Titrasyon Yöntemleri
- Agar Dilüsyon Testi
- Makrodilüsyon Broth Testi
- Mikrodilüsyon Broth Testi

Çalışmamızda; kolay ve pratik oluşunun yanı sıra sonuçlarının daha doğru, güvenilir ve hassas olması gibi özellikleri nedeniyle Mikrodilüsyon Broth Testi kullanılmıştır.

1.2.1. Mikrodilüsyon Broth Testi

Enfeksiyonların çoğunda tedavi yönünden erken sonuç almak amacıyla yapılan duyarlılık testi olan agar disk difüzyon yöntemi; yeterli, yol gösterici bir tekniktir. Ancak toksik olabilecek bir antibiyotik ile uzun süre tedavi edilen bir hasta için çok daha doğru ve güvenilir bir saptamaya gerek duyulabilir. MİK değerlerini tayin etmek için birçok yöntem bildirilmiştir. Ya agar difüzyonla inhibisyon bölgeleri ölçülür ya da antibiyotik dilüsyonları içeren sıvı veya katı besiyerlerinde test organizması titre edilir.

Genellikle duyarlılığı bilinen bir mikroorganizma (standart kontrol suşu) ile bilinmeyen bir mikroorganizma yani test organizması paralel olarak titre edilmelidir [25].

Mikrotüp dilüsyon testinin prosedürü prensip olarak makrotüp dilüsyon testinin metoduna oldukça benzerdir. Tek fark; mikroorganizmaların, test edilen madde konsantrasyonlarına karşı hassasiyetinin, plastikten yapılmış bir plaka içinde bulunan çukurlarda test ediliyor olmasıdır.

Deney için 96 “U” tipi çukurları olan mikrotitrasyon petrileri kullanılır. Deneyde petrinin son sütunu olan 12. sütunu mikroorganizmaların pozitif kontrolü için boş bırakılır ve her çukura sadece 100 µl steril distile su konulur. Yatayda yer alan en alttaki H sırası negatif kontrol olarak, test maddesinin kontrolüne ayrılarak mikroorganizma eklenmemiştir. Buna göre ilk olarak; 1’den 11’e kadar sıralanmış olan kimyasalların dilüsyonları, kendi numaralarına denk gelen petri sütunlarındaki çukurlara, sırasıyla mikropipetör yardımıyla 100’er µl olacak şekilde aktarılır. Böylelikle tüm konsantrasyonlar kuyucuklara aktarıldıktan sonra, mikroorganizmaların eklenmesine geçilir. Bunun için önceden bulanıklığı McFarland No: 0,5’e göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri mikropipetör yardımıyla A’dan H’ye sıralanmış her bir kuyucuk satırına (H satırı hariç) bir mikroorganizma denk gelecek şekilde, 12. çukurdan 1. çukura doğru 100’er µl aktarılır. Bu işlemlerden sonra mikrotitrasyon petrilerinin kapakları kapatılarak bakteriler için 37°C’de 24 saat, funguslar için ise 28 °C’de saat 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda üreme, petrilerin üzerlerine sıkılan Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC)’nin bir iki saat inkübasyonu sonunda meydana gelen renklenmeye bakılarak tespit edilir. TTC hücre zarı ve duvarından geçebilme yeteneğine sahip bir tuz türevidir. Bu madde hücre içerisine girdiğinde dehidrogenaz enzimleri ve kofaktörler ile etkileşimi sonucunda indirgenerek kırmızı renkli formazon isimli pigmentleri oluşturmaktadır. Üremenin oluşmasına ve buna paralel olarak hücre yoğunluğunun artmasına bağlı olarak kırmızı ve tonları şeklinde bir renklenme meydana gelmektedir. Hücre yoğunluğu arttıkça meydana gelen renklenme de artmaktadır [27,28]. Üremenin olduğu kuyucuklarda kırmızı bir renklenme gözlenirken üremenin olmadığı kuyucuklarda herhangi bir renk değişimine rastlanmamaktadır. Üremenin gözlemlendiği en küçük numaralı kuyucuğun temsil ettiği konsantrasyon Minimal İnhibe edici Konsantrasyon yani MİK olarak saptanır [29-31].

Bu yöntemin avantajı, küçük hacimlerde maddelerin ve çok sayıda mikroorganizma süşunun, basit ve ucuz bir şekilde test edilmesine olanak sağlıyor olmasıdır [32].

1.3. TOKSİSİTE

İlaçların yan etkileri, aslında toksik etkileridir. Belirli bir dozdan sonra öldürücü etki gösterebilirler. Kimyasal maddelerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu toksik etkiler akut ve kronik olarak gelişir. Bazı araştırmacılar akut toksisiteyi, tek ya da birkaç dozun 48 saat içinde deney hayvanlarında veya kaza sonucu insanlarda oluşturduğu etki olarak tanımlamaktadırlar. Akut toksisite saptanmasında başvuru deneylerin amacı biyolojik sistemlerde kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek ve doz-yanıt ilişkisinde karakteristik veriler elde etmektir. Bu veriler, yeni drogların kliniğe uygulanmasındaki olabilirlik derecesini ortaya koymaktadır. Toksikolojide akut toksisite deneyleri; ilaç, kozmetik, hijyenik maddeler ve evlerde çeşitli amaçla kullanılan diğer kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek için yapılır. En sık kullanılan akut toksisite testleri;

- Minimal Mortal Doz (MMD)
- Letal Doz 50 (LD₅₀) dir.

1926 yılında Knaffl-Lenz tarafından kobaylarda dijital'in toksik aktivitesinin gösterilmesinde tarif edilen **Minimal Mortal Doz** (MMD), damar içi yolla sürekli ve yavaş akımla bir ilacın, hayvanın ölmesine kadar verilmesiyle elde edilir. Tavşan, kedi, köpek gibi hayvanlarda kolay uygulanabilir ve fizyolojik parametrelerdeki değişiklikler izlenebilir. Ancak çok sayıda hayvana uygulanmasının biyoistatistik zorunluluğu yanında, damar içi verilmesi nedeniyle kimyasal maddenin inert bir solvent içinde erimesi ve etkisini çabuk göstermesi gerekir. Hayvana enjekte edilen total sıvı hacmi dolaşım kapasitesini geçmemelidir. Bu nedenlerden ötürü fazla kullanılan bir akut toksisite yöntemi değildir. Bazı araştırmacıların medyan letal doz diye adlandırıldığı **Letal Doz 50** (LD₅₀) bir deney hayvan gurubunun % 50'sini öldürebilen bir kimyasal maddenin tek bir dozunun istatistiki değerlendirmesidir. Bir maddenin akut toksisitesinin

değerlendirilmesinde LD₅₀ tayini sıklıkla başvurulan bir toksikoloji değerlendirme yöntemidir [32].

1.3.1. Brine-Shrimp Sitotoksite Testi

LD₅₀ düzeyinin tespitinde kullanılan toksisite testlerindedir. *Artemia salina* larvaları, farklı mikotoksinlere karşı geniş bir yelpazede duyarlılık gösterirler [33]. Bu larvalar, günümüzde biyolojik aktiviteleri araştırılan örneklerin sitotoksitelerinin tayininde, oldukça geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Dolayısıyla, toksik maddelerin in-vivo olarak *Artemia salina* larvalarına olan öldürücü etkisi, hızlı ve basit bir yöntem olarak “Brine-Shrimp Lethality Assay”in kullanılmasına olanak sağlamaktadır [34].

Toksisitenin öngörülmesi açısından kullanışlı bir testtir. Ayrıca fungal toksinlerin, bitkisel ekstraktların, ağır metallerin, cyanobacteria toksinlerinin, pestisitlerin ve diş hekimliğinde kullanılan bazı maddelerin, sitotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır [35-44].

Bunlara ek olarak, embriyonel gelişim sürecini etkileyen teratojen maddelerin [45], organofosfor insektisitlerin [46], ve zirai amaca yönelik olarak oldukça sık kullanılan birçok antibiyotiğin, toksisite düzeylerinin tespitinde de kullanılmaktadır [47].

Artemia salina'nın kullanıldığı bazı akuatik toksisite testleri ile, rodentlerin (fare veya rat) kullanıldığı toksisite testleri arasında bir korelasyon olup olmadığını anlamak üzere bazı çalışmalar yapılmış ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Her iki testten elde edilen LD₅₀ değerleri, aynı kimyasalların insanlar için geçerli olan akut oral letalite verileriyle kıyaslandığında, sonuçlar arasında genellikle iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Benzer olarak, bu kimyasalların, oral akut toksisite potansiyellerinin test edilip, insanlar için geçerli olan akut dozlarla kıyaslandığında; akuatik testlerin, rodent testlerine nispeten biraz daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Ancak akuatik toksisite testlerinin, suda çözünebilen maddelerin toksisite değerlerinin saptanmasında daha uygun olduğuna da değinilmiştir [48,49]. Yine başka bir çalışmada ise, *Artemia salina* ile yapılan bu testin modifiye edilmiş şekli ile alınan sonuçlar, memeli hücre

kültürleri ile yapılan toksisite testlerinde alınan sonuçlarla karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir [50].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Yeni Triazol Türevi Bileşikler

Bu çalışmada kullanılan sentetik maddeler Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Z. Asım KAPLANCIKLİ tarafından sentezlenmiştir (51,52) (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Testlerde Kullanılan Bileşiklerin Kod Numaraları ve Bunlara Karşılık Gelen Bileşikler

Bileşik İsmi	
TP1	<i>4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-fenil-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP2	<i>4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-dimetilaminofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP3	<i>4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-florofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP4	<i>4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-klorofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP5	<i>4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-metoksifenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP6	<i>4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-metilfenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP7	<i>4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-fenil-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP8	<i>4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-dimetilaminofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP9	<i>4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-florofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP10	<i>4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-klorofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP11	<i>4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-metoksifenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>
TP12	<i>4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-metilfenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol</i>

2.1.2. Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar

Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar, Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu, Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu ve Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesinden temin edilmiştir (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kaynakları

	Mikroorganizma	Kaynak Kurum
1	<i>Escherichia coli</i> (NRRL B-3704)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
2	<i>Staphylococcus aureus</i> (NRLL B-767)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
3	<i>Bacillus cereus</i> (NRRL B-3711)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
4	<i>Micrococcus luteus</i> (NRRL B-4375)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NRRL B-23)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
6	<i>Candida albicans</i> (Y-12983)	Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
7	<i>Geotricum candidum</i> (Y-552)	Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
8	<i>Candida tropicalis</i> (Y-12968)	Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
9	<i>Candida krusei</i> (Y-7179)	Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
10	<i>Candida utilis</i> (Y-900)	Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
11	<i>Candida albicans</i> (Klinik İzolat)	Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi
12	<i>Candida glabrata</i> (Klinik İzolat)	Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi

2.1.3. Toksikite Testinde Kullanılan Organizma

Artemia salina (Yumurtalar akvaryumculardan temin edilmiştir)

2.1.4. Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

2.1.4.1. Mueller Hinton Broth (Merck)

Et Ekstresi.....	2.0 g
Kazein Hidrolizatı.....	17.5 g
Nişasta.....	1.5 g
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 10'ar ml steril tüplere dağıtılmıştır.

Çift Kuvvet

Et Ekstresi.....	4.0 g
Kazein Hidrolizatı.....	35 g
Nişasta.....	3.0 g
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 10'ar ml steril tüplere dağıtılmıştır.

2.1.4.2. Mueller Hinton Agar (Merck)

Et Ekstresi.....	5 g
Agar.....	12.0 g
Kazein Hidrolizatı.....	17.5 g
Nişasta.....	1.5 g
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 15'er ml 90 mm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüştür.

2.1.4.3. Sabouraud Dextrose Agar (Difco)

Bacto Pepton.....	10 g
Bacto Dekstroz.....	40 g
Bacto Agar.....	15 g
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 25'er ml 120 mm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüş ve düz bir zeminde katılaşması sağlanmıştır.

2.1.4.4. Nutrient Agar (Merck)

Nutrient Agar.....	20 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 20'şer ml 120 mm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüştür.

2.1.4.5. Nutrient Broth (Merck)

Nutrient Broth.....	25 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 10'ar ml steril tüplere dağıtılmıştır.

2.1.4.6. McFarland No: 0.5 Bulanıklık Standardı

BaCl ₂ (% 1.175).....	0.5 ml
H ₂ SO ₄ (0.36N).....	99.5 ml

BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırılarak 10 ml lik kapaklı tüpe doldurulmuş ve kapağı parafilm ile sıkıca kapatılan tüp, karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.1.4.7. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Standart Maddeler

Flukonazol (Pfizer)

Ketokonazol (Sigma)

Kloramfenikol (Sigma).....2 mg/ml oranında DMSO' da çözülmüştür.

2.1.4.8. Kimyasal Çözücü

Dimetil-Sülfoksit (DMSO) (Sigma)

2.1.4.9. Mikroorganizmaların Üreme Durumlarının Tayininde Kullanılan Kimyasal Madde

2,3,5- Triphenyltetrazolium Chloride(Sigma)....250 mg

Etanol (%96).....100 ml

Madde tartılarak etanolde iyice çözülmüş ve spreylilikli cam şişede buzdolabında saklanmıştır.

2.1.5. Toksikite Testinde Kullanılan Maddeler**2.1.5.1. Kaya Tuzu**

Akvaryumculardan temin edilmiştir.

2.1.5.2. Yapay Deniz Suyu

Steril edilmiş distile suyun her 1 litresi için, kaya tuzunun 3,8 g' ı çözümlenerek elde edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Yeni Triazol Türevi Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antifungal ve Antibakteriyal aktivite testleri Mikrodilüsyon Broth Test Tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu teknik; mikroorganizmaların canlandırılması, kimyasal maddelerin dilüsyonlarının ve kültürlerin hazırlanması ve testin uygulanması olmak üzere üç aşamadan meydana gelmiştir [53,54].

2.2.1.1. Mikroorganizmaların Canlandırılması

Liyofilize kültürler halinde bulunan bakteriler, tüplerinden aseptik şartlar altında çıkarılmış ve canlandırılmak üzere Nutrient Broth (NB) tüplerine aktarılmıştır. 37°C de 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, kültürlerin Nutrient Agar (NA) plaklarına tek koloni ekimleri yapılarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda mikroorganizmaların saflıkları kontrol edilmiş ve önceden hazırlanan ve içlerinde 1.5 ml %15'lik steril gliserol çözeltisi bulunan 2 ml'lik mikro-reaksiyon tüplerine bir öze dolusu aktarılmışlardır. Bu tüpler, daha sonra kullanılmak üzere - 20 °C' de saklanmışlardır. -20 °C'de saklanan bakteri kültürleri yatık Nutrient Agar tüplerine inoküle edilmiştir ve geliştikten sonra ağızları parafilmle kapatılıp daha sonra kullanılmak üzere +4 °C' de saklanmışlardır.

Buzlukta saklanan stok maya kültürleri ise, yatık Sabouraud Dextrose Agar (SDA) tüplerine inoküle edilmiş, geliştikten sonra ağızları parafilmle kapatılıp daha sonra kullanılmak üzere +4°C de saklanmışlardır.

2.2.1.2 Yeni Triazol Türevi Bileşiklerin Dilüsyonlarının ve Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması

Antifungal ve Antibakteriyal aktivite testleri için farklı dilüsyonlar hazırlanmıştır.

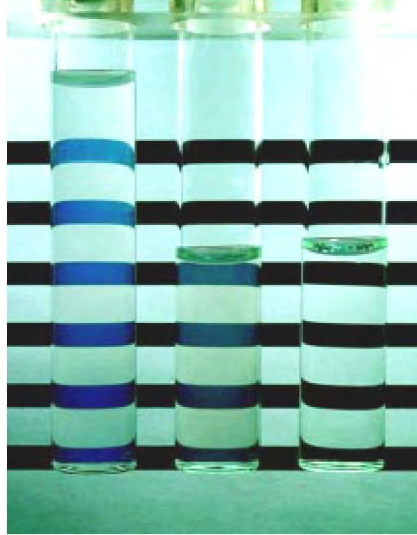
Antifungal Aktivite Testleri İçin Kullanılacak Dilüsyonların ve Kültürlerin Hazırlanması:

Test edilecek olan kimyasal maddeler, analitik terazide 4.8 mg (0,048 g) olmak üzere tartılarak steril flakonlara aktarılmış ve üzerlerine 3'er ml steril Dimetil-Sülfoksit (DMSO) eklenerek çözülmüştür. Kimyasal maddeler, DMSO içerisinde tam olarak çözünmeleri ve homojen bir karışım haline gelmeleri için belli bir süre vorteks ile karıştırılmıştır. Önceden hazırlanan ve 1'den 11'e kadar numaralandırılan 2ml'lik steril mikro-reaksiyon tüplerinin (eppendorf) her birine 500µl (mikrolitre) steril distile su konulmuştur. Ardından da birinci eppendorfa stok solüsyondan 500µl aktararak karıştırılmıştır. Eppendorf iyice çalkalandıktan sonra birinci eppendorfdan yine 500µl karışım alınarak ikinci eppendorfa aktarılmış ve bu işleme, her aktarımda mikropipetöre takılı pipet ucu değiştirilmek suretiyle onbirinci eppendorfa kadar devam edilmiştir. Bu şekilde tüm kimyasal maddelerin iki katlı seri dilüsyonları hazırlanarak, kimyasal maddelerin 1'den 11'e kadar numaralandırılmış eppendorflar içerisinde seri konsantrasyonları (1, 1/2, 1/4, 1/8, ...) elde edilmiştir. Daha sonra her birine 900µl sıvı besiyeri eklenmiş olan eppendorf tüplerine bu hazırlanan dilüsyonlardan 100'er µl eklenerek madde konsantrasyonları tekrar 1/10 oranında dilüe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan Ketokonazol ve Flukonazol' de aynı oranlarda ve aynı şekilde hazırlanmıştır [54].

Tüplere aktarılan canlandırılmış stok kültürler 35 °C'de 46-50 saat inkübasyona bırakılmıştır. 46-50 saatlik inkübasyondan sonra sıvı besiyerinde gelişen kültürler, McFarland No:0.5 (1×10^6 - 5×10^6 hücre/ml) bulanıklık standardına uygun hale getirilmiştir. Bulanıklılık ayarının uygun bir şekilde yapılabilmesi için siyah-beyaz şeritli bir fon kullanılmıştır (Şekil 2.1.).Ayrıca gözlemden ötürü meydana gelebilecek hatayı ortadan kaldırmak için McFarland' da yoğunluk ayarlaması yapılan mikroorganizmalar spektrofotometrede de yoğunluğu tespit edilerek doğruluğu tekrar kontrol edilmiştir. Daha sonra standarda göre ayarlanmış olan kültürler sırasıyla 1/20 ve 1/100 oranında seyreltilmiştir. Böylelikle $5,0 \times 10^2$ - $2,5 \times 10^3$ hücre/ml. yoğunlukta kültürler elde edilmiştir.

Petri çukurlarının her birine, hazırlanan kültürleri içeren besi yerinden 225µl aktarılmıştır ve sonra bu çukurlara önceden hazırlanan son dilüsyonlardan 25'er µl eklenmiştir. Böylelikle 1'den 11'e kadar 16µg/ml'den başlayıp yarı yarıya

seyreltilerek son çukurda 0,313 µg/ml kimyasal madde konsantrasyonuna sahip kültür içeren seriler hazırlanmıştır.



Şekil 2.1. McFarland 0,5 standardının inokulum süspansiyonu ile mukayesi. Soldan sağa doğru, McFarland 0,5 standardı, standarda göre bulanıklılığı ayarlanmış inokulum ve distile su görülmektedir

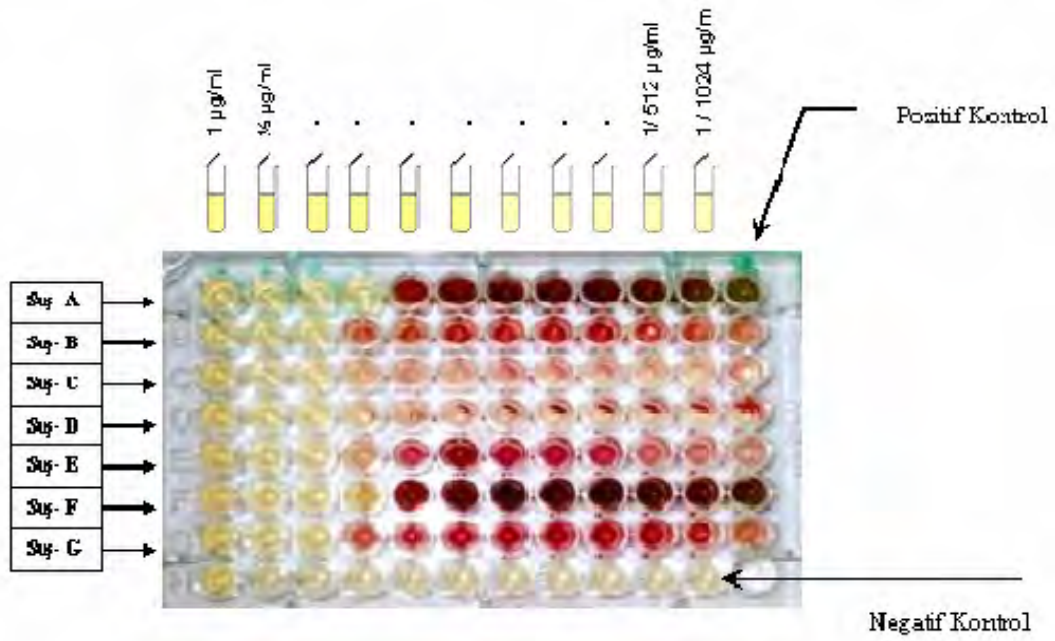
Antibakteriyal Aktivite Testleri İçin Kullanılacak Dilüsyonların ve Kültürlerin Hazırlanması:

Test edilecek olan kimyasal maddeler, analitik terazide 2'şer mg (0,002 g) olmak üzere tartılarak steril flakonlara aktarılmış ve üzerlerine 2'şer ml steril Dimetil-Sülfoksit (DMSO) eklenerek çözülmüştür. Kimyasal maddeler, DMSO içerisinde tam olarak çözünmeleri ve homojen bir karışım hale gelmeleri için belli bir süre çalkalanmıştır. Önceden hazırlanmış ve 1'den 11'e kadar numaralandırılmış steril mikro-reaksiyon tüplerinin (eppendorf) her birine 850µl steril distile su konulmuştur. Ardından da birinci eppendorfa stok solüsyondan 850µl aktararak karıştırılmıştır. Eppendorf iyice çalkalandıktan sonra birinci eppendorfdan yine 850µl karışım alınarak ikinci eppendorfa aktarılmış ve bu işleme, her aktarımda mikropipetöre takılı pipet ucu değiştirilmek suretiyle onbirinci eppendorfa kadar devam edilmiştir. Bu şekilde tüm kimyasal maddelerin iki katlı seri dilüsyonları hazırlanarak, kimyasal maddelerin 1'den 11'inci eppendorfa kadar (1, 1/2, 1/4, 1/8, ...) seri konsantrasyonları elde edilmiştir ve böylelikle kimyasalların onbirinci eppendorfa kadar 10^{-11} 'lik dilüsyonları

hazırlanmıştır. Daha sonra petri çukurlarının her birine, hazırlanan kültürleri içeren besi yerinden 225µl aktarılmıştır ve ardından bu çukurlara önceden hazırlanan son dilüsyonlardan 25µl eklenmiştir. Standart antibakteriyal ajan olarak kullanılan Kloramfenikol’ de aynı oranlarda ve aynı şekilde hazırlanmıştır [32].

2.2.1.3. Mikrodilüsyon Broth Tekniğinin Uygulanması

Deney için 96 “U” tipi çukurları olan mikrotitrasyon petrileri (Brand) kullanılmıştır (Şekil 2.2.). Deneyde petrinin son sütunu olan 12. sütun mikroorganizmaların pozitif kontrolü için boş bırakılmış ve her çukura sadece 100µl steril distile su konulmuştur. Yatayın en alt sırası olan H sırası çukurları negatif kontrol olarak ayrılmıştır; bu nedenle bu çukurlara mikroorganizma eklenmemiştir. Buna göre ilk olarak dilüsyonları 1’den 11’e kadar sıralanmış kimyasallar kendi numaralarına denk gelen petri sütunlarındaki çukurlara, sırasıyla mikropipetör yardımıyla 100’er µl olarak aktarılmıştır. Böylelikle tüm konsantrasyonlar kuyucuklara aktarıldıktan sonra, mikroorganizmaların eklenmesine geçilmiştir. Bunun için önceden bulanıklığı McFarland No: 0,5’ e göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri mikropipetör yardımıyla A’ dan H’ ye sıralanmış her bir kuyucuk satırına (H satırı hariç) bir mikroorganizma denk gelecek şekilde, 12. Çukurdan 1.’ye doğru 100’er µl aktarılmıştır. Bu işlemlerden sonra mikrotitrasyon petrilerinin kapakları kapatılarak bakteriler için 37°C de 24 saat, funguslar için ise 35 °C de saat 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda üreme, petrilerin üzerlerine sıkılan Triphenyltetrazolium Chloride (TTC)’nin 37 °C de 3 saatlik inkübasyonu sonucu meydana gelen renklenmeye bakılarak tespit edilmiştir (Şekil 2.2.). Üremenin olduğu kuyucuklarda kırmızı bir renklenme gözlenirken üremenin olmadığı kuyucuklarda herhangi bir renk değişimine rastlanmamıştır. Üremenin gözlemlendiği en küçük numaralı kuyucuğun temsil ettiği konsantrasyon Minimal İnhibe edici Konsantrasyon yani MİK olarak saptanmıştır [29,55-57]. Deneyler üç paralel olarak tekrarlanmıştır.



Şekil 2.2. Mikrodilüsyon Broth Tekniğinin Denemelerde Uygulanış Şekli

2.2.2. “Brine-Shrimp Toxicity Assay” Tekniğiyle Bileşiklerin Toksisitelerinin Belirlenmesi

2.2.2.1 Test Edilecek Bileşiklerin Hazırlanması

Çözücü olarak kullanılan DMSO’ nun toksisite sonuçlarını etkilememesi için, kimyasallar önerilen limitler dâhilinde (5 ml deniz suyunda en çok 50 µl DMSO olacak şekilde) DMSO ile çözülmüştür [58]. DMSO’ nun da bir takım antimikrobiyal etkilere sahip olduğu Zgoda ve ark. tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacıların Mikrodilüsyon Broth yöntemini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, mikrotitrasyon petrisi kuyucuklarındaki 0,2ml’ lik son hacim içerisinde bulunan %2,5 oranında DMSO’ nun *C. albicans*’ın, %5 konsantrasyondaki DMSO’ nun ise *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterilerinin gelişimlerini engellediklerini belirlemişlerdir [59]. Çalışmamızda da bileşiklerin stok çözeltileri hazırlanırken, çözücü olarak kullandığımız DMSO %25 oranında seyreltilmiş, stok çözeltiden distile su ile hazırlanan dilüsyonlarda DMSO’ nun yüzde miktarı Zgoda ve ark. bildirdiği seviyenin altına düşürülmüştür. Kontrol olarak; bileşiklerin test edilmesi sırasında yalnızca DMSO çözücü olarak kullanılmış ve DMSO’ nun kullandığımız mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye

sahip olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte çözücü olarak kullanılan DMSO toksite testinde test organizması olan *A. salina* larvası üzerine de saf haldeyken toksik etkiye sahip olduğu Choudhary ve ark. tarafından bildirilmiştir [34]. Bu nedenle çalışmaya başlamadan önce ön çalışma olarak Choudhary ve ark. bildirdiği oran olan 1/50 oranında seyreltme yapılarak DMSO' nun organizmalar üzerinde gerçekten toksik etkisinin ortadan kalkıp kalkmadığı denenmiş ve sonuç beklendiği gibi olmuştur. Bu saflıkta DMSO' nun test organizması üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediği ortaya konulmuştur. 1mg olarak tartılan maddeler 2ml'lik ependorflara konulmuş ve üzerine 10µl DMSO eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra 990µl suni deniz suyu eklenmiş ve böylece deneyde kullanılacak stok solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra eliza petrisinin ilk çukuruna stok solüsyondan 280µl konulmuştur. Geri kalan 11 çukura 130µl distile su konulmuştur. 1. çukurdan 150µl alınarak 2. çukura aktarılmış ve birkaç defa pipetlenmiştir. Buradan 150µl alınarak 3. çukura aktarılmış ve bu işlem 12. çukura kadar devam etmiştir. 12. çukurda da birkaç defa pipetlendikten sonra ve 150µl alınarak atılmıştır. Diğer 11 madde içinde aynı işlemler yapılmıştır. Böylece maddeler çözülmüş ve seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

2.2.2.2. *Artemia salina* Larvalarının Hazırlanması

Artemia salina yumurtaları akvaryumculardan temin edilmiştir. Üzerinde delikler bulunan bir bölmeyle eşit olarak iki bölüme ayrılmış küçük bir su tankının, yapay deniz suyu ile doldurulmasından sonra, yumurtalar bölmelerden birisine yerleştirilmiş ve bölmenin üstü, ışık geçirmeyecek şekilde alüminyum folyo ile kapatılmıştır.

Akvaryum motoru ile havalandırılan tank bu şekilde 48 saat oda sıcaklığında (22-29 C°) bekletilerek *Artemia salina* larvalarının (Şekil 2.3.) yumurtalardan çıkmaları sağlanmıştır. Su tankının üstü açık bölmesi ışıklandırılarak, yumurtalardan ayrılan larvaların bu bölmeye göçü sağlanmıştır [34].



Şekil 2.3. *Artemia salina* larvaları

2.2.2.3. Testin Yapılışı

Işığa göçü sağlanan larvaların yoğun olarak bulunduğu bölgeden, 20 μ l' ye ayarlanmış mikropipetör yardımıyla suyla birlikte alınan larvalar, steromikroskop altında boş bir petri kabına damlatılmış ve 10 adet *Artemia salina* sayılmıştır. Daha sonra 1, 0.5, 0.25,....0.0048828 μ g/ml'lik konsantrasyonların hazır bulunduğu kuyucuklara ve içinde sadece 130 μ l suni deniz suyunun bulunduğu kontrol kuyucuklarına 10' ar adet organizma aktarılmıştır. 24 saat sonunda, yine steromikroskop yardımıyla, ölmüş olanlar hareketsiz olmalarına göre ayırt edilerek sayılmış ve kaydedilmiştir. Daha sonra veriler "LC₅₀" bilgisayar programıyla değerlendirilmiş ve LC₅₀ değerleri ile %95 güvenilirlik sınırları hesaplanmıştır [34]. Deneyler üç paralel olarak tekrarlanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

3.1.1. Bileşiklerin Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerleri

Mikrodilüsyon broth yöntemi kullanılarak, TP1-TP12 maddelerine ait farklı konsantrasyonlarda görülen antifungal aktivite etki sonuçları Çizelge 3.1’ de, antibakteriyal aktivite etki sonuçları da Çizelge 3.2’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Funguslar Üzerinde Denenen Kimyasalların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK- μ g/ml) Değerleri

FUNGUSLAR BİLEŞİKLER	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>G. candidum</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. albicans</i> OGÜ	<i>C. glabrata</i> OGÜ
TP1	2	4	4	4	4	4	4
TP2	1*	2	4	4	4	4	4
TP3	2	4	4	2*	2	4	4
TP4	4	4	4	4	4	4	4
TP5	0,5*	2	4	4	4	4	4
TP6	1*	4	4	4	4	4	4
TP7	4	4	4	4	4	4	4
TP8	2	4	4	2*	4	2*	2*
TP9	1*	4	4	4	2	4	4
TP10	2	4	4	4	2	4	4
TP11	2	4	2	4	4	2*	4
TP12	2	4	4	4	2	4	4
Flukonazol	2	4	4	4	2	4	4
Ketokonazol	4	2	2	4	4	4	4

(*) Antifungal pozitif kontrol olarak kullanılan Flukonazol ve Ketokonazolün MİK değerlerinden daha düşük olduğu belirlenen türevlerin MİK değerleri kırmızı ile verilmiştir

Antifungal ilaç olan Flukonazol ve Ketokonazol 2 veya 4 μ g/ml MİK değerlerine sahiptir (Çizelge 3.1). Çizelge 3.1.’ de de görüldüğü üzere bütün test edilen, değişen oranlarda tüm funguslara karşı antifungal aktivite göstermektedirler. Seri içerisinde nispeten en düşük aktivitenin *Candida albicans*’a karşı olduğu gözlenmektedir. TP8 olarak simgelenen türev (4 – sikloheksil –5-(1-fenoksietil) –3-[[3-tiyenil-5-(4-dimetilaminofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol) *G. candidum*, *C. glabrata* (klinik izolat) ve *C. albicans* (klinik izolat)’a karşı pozitif kontrol olarak seçilen Flukonazol ve Ketokonazol’ün etki dozunun altında etki göstermiştir. TP2, TP5, TP6 ve TP9,

olarak simgelenen türevler *C. tropicalis*'e karşı pozitif kontrolün etki dozunun altında etki göstermişlerdir. Ayrıca TP3 olarak simgelenen türev *G. candidum*'a, TP11 olarak simgelenen türev *C. albicans* (klinik izolat)'a karşı standart ajan olarak seçilen flukonazol ve ketokonazol'ün etki dozunun altında antifungal etki göstermiştir.

Çizelge 3.2. Bakteriler Üzerinde Denenen Kimyasalların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK- $\mu\text{g/ml}$) Değerleri

BAKTERİLER MADDELER	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>
TP1	125	250	125	62,5	125
TP2	125	250	125	62,5	125
TP3	62,5	125	250	62,5	125
TP4	62,5	62,5	125	62,5	62,5
TP5	125	62,5	125	62,5	125
TP6	62,5	62,5	62,5	62,5	125
TP7	250	250	250	250	125
TP8	125	125	125	125	125
TP9	62,5	125	125	125	62,5
TP10	125	250	125	125	62,5
TP11	125	250	125	62,5	62,5
TP12	125	250	125	125	62,5
Kloramfenikol	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62

Antibakteriyal aktivitesi test edilen 12 türevin hiçbiri pozitif kontrol olarak seçilen kloramfenikol'ün etki dozunun altında etki göstermemiştir (Çizelge 3.2). Kloramfenikol *E. coli*'ye karşı $62,5\mu\text{g/ml}$ de etkili olurken denenen bileşiklerden TP3, TP4, TP6 ve TP9 pozitif kontrol ile aynı dozda, diğer türevler ise kloramfenikol'ün etki dozunun 2 ya da daha çok kat üstünde etki gösterebilmişlerdir. Kloramfenikol *S. aureus*'a karşı $7,81\mu\text{g/ml}$ de etkili olurken denenen bileşiklerden hiçbiri pozitif kontrol ile aynı dozda ya da daha düşük dozda etkili olamamıştır. *B. cereus*, *P. aeruginosa* ve *M. luteus*'ta da yine *S. aureus*'da olduğu gibi denenen hiç bir türevin antibakteriyal aktivitesi, pozitif kontrol olarak seçilen kloramfenikol'ün antibakteriyal aktivitesinden daha yüksek çıkmamıştır.

3.2. Bileşiklerin “Brine-Shrimp Toksikite Testi” Yöntemiyle Belirlenmiş Toksikite Değerleri

Toksikite testinden elde edilen veriler, LD₅₀ adlı bilgisayar programıyla hesaplanmış ve LD₅₀ değerleri ile birlikte üst ve alt % 95 güvenilirlik sınırları ortaya konulmuştur. Sonuçların toksikite derecelendirilmeleri ise Çizelge 3.3. deki referans değerlerine göre yapılmıştır [60].

Kullanılan 12 maddeye ait toksikite testi sonuçları ise Çizelge 3.4.’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Toksikite derecesi değerlendirilmesinde kullanılan referans değerler [Brayn, et.al., 1997]

Toksikite Derecesi	LD₅₀ Limitleri
Oldukça Toksik	< 10 µg/ml
Toksik	> 10 µg/ml
Zararlı	> 100 µg/ml
Toksik Değil	> 1000 µg/ml

Çizelge 3.4. Brine-Shrimp Toxicity Assay Test sonuçları ile LD₅₀ değerleri

Madde	Kons. (µg/ml)	Ölü Org.Sayısı	LD ₅₀	Üst%95 Güv.Lim.	Alt%95 Güv.Lim	Toksisite Derecesi
TP1	125	0	470	710,00	250,50	Zararlı
	250	2				
	500	5				
	1000	6				
TP2	125	1	630	676,00	200,00	Zararlı
	250	3				
	500	4				
	1000	4				
TP3	125	1	653	-	210,00	Zararlı
	250	1				
	500	4				
	1000	5				
TP4	125	1	303	345,00	180,00	Zararlı
	250	2				
	500	10				
	1000	10				
TP5	125	0	430	626,66	290,00	Zararlı
	250	2				
	500	6				
	1000	8				
TP6	125	0	323	350,00	275,00	Zararlı
	250	1				
	500	10				
	1000	10				
TP7	125	1	1010	-	-	TOKSİK DEĞİL
	250	1				
	500	3				
	1000	4				
TP8	125	0	1100	-	-	TOKSİK DEĞİL
	250	0				
	500	1				
	1000	2				
TP9	125	0	1150	-	-	TOKSİK DEĞİL
	250	0				
	500	1				
	1000	1				
TP10	125	0	1100	-	-	TOKSİK DEĞİL
	250	0				
	500	1				
	1000	2				
TP11	125	0	1090	-	-	TOKSİK DEĞİL
	250	0				
	500	1				
	1000	3				
TP12	125	0	1050	-	-	TOKSİK DEĞİL
	250	0				
	500	1				
	1000	2				
DMSO	125	0	1050	-	-	TOKSİK DEĞİL
	250	0				
	500	1				
	1000	2				

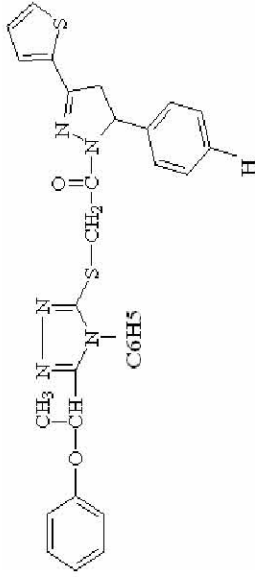
TP1-TP6 türevlerinin 100µg/ml–1000µg/ml arasında bulunan LD₅₀ değerleri, alt ve üst güvenlik sınırları itibariyle toksisite sınırları içerisinde yer alırken, TP7-TP12 türevleri ve DMSO' nun 1000µg/ml' nin üzerinde olan LD₅₀ değerleri ile toksisite sınırlarının dışında yer aldığı gözlenmiştir.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Patojen mikroorganizmalar kendilerine karşı artan miktarlarda kullanılan antimikrobik ajanlara karşı gün geçtikçe direnç kazanmaktadır. Gereksiz yere veya kontrolsüz olarak antibiyotik kullanımından doğan bu durum, halk sağlığını ve günümüz araştırmalarını zorlar bir duruma geldiğinden dünya genelinde bu konu üzerinde ciddi çalışmalar yapılmaktadır [1]. Günümüzde biyolojik kaynaklardan elde edilen ve şu an kullanımda olan doğal kimyasallara dayalı tedavilerin yukarıda belirtilen geniş spektrumlu direnç kazanmış mikroorganizmalara karşı zaman zaman yetersiz kaldıkları bildirilmektedir. Sonuç olarak, mikroorganizmaların direnç kazandığı doğal bileşiklerden, türevlendirilmiş yeni bileşiklerin sentezlenip *in vitro* ve *in vivo* koşullarda biyolojik etki testlerinden geçirilerek insanlar üzerinde uygulanabilirliğini araştırma yaklaşımı ortaya çıkmıştır [51,52].

Bu tez çalışmasında, yeni sentezlenen 12 adet triazol türevi bileşiğin *in vitro* şartlarda antimikrobiyal ve genel toksisite özellikleri araştırılarak ilaç potansiyelleri incelenmiştir. Sentezlenen türevlere ait kimyasal yapı bilgisi, antifungal-antibakteriyal aktivite sonuçları ve toksisite değerleri bir araya getirilerek, her bir türev için bir çizelge halinde analizi yapılmıştır (Çizelge 4.1–4.12). Her türevin biyolojik aktivite bulguları bir bütün halinde değerlendirilerek, ilaç potansiyeline sahip olup olmadıkları çizelgenin en alt kısmında sonuç bilgisi olarak verilmiştir (Çizelge 4.1–4.12). Çizelgeleri genel olarak özetleyecek olursak; TP7 (Çizelge 4.7), TP8 (Çizelge 4.8), TP9 (Çizelge 4.9), TP10 (Çizelge 4.10), TP11 (Çizelge 4.11) ve TP12 (Çizelge 4.12) bileşikleri incelendiğinde bu türevlerin toksik etkilerinin bulunmadığı, antifungal ve antibakteriyal etkilerinin en az kontroller kadar olduğu, dolayısıyla ilaç potansiyellerinin olabileceği düşünülmektedir. TP1 (Çizelge 4.1), TP2 (Çizelge 4.2), TP3 (Çizelge 4.3), TP4 (Çizelge 4.4), TP5 (Çizelge 4.5) ve TP6 (Çizelge 4.6) bileşikleri incelendiğinde antifungal ve antibakteriyal aktiviteye sahip olmalarına rağmen genel toksisitelerinin “zararlı seviyede” bulunmasından dolayı, bu deneysel veriler çerçevesinde bu türevlerinde ilaç olma potansiyellerinin olabileceği sonucuna varılmıştır. Çünkü bu zararlı etkinin *in-vitro* insan hücre kültürlerindeki

seviyelerinin araştırılmasıyla açıklık kazandırılması gerektiği düşünülmektedir. Brine-shrimp genel toksisite test sonuçları, rodentler (fare ve / veya rat) [48,49] ve memeli hücre kültürleriyle [50] yapılan toksisite test sonuçlarıyla karşılaştırıldığında; paralel toksisite sonuçları verdiği bilinmesine rağmen, bu tez kapsamında elde edilen ilaç potansiyel sonuçlarının *in vitro* insan hücre kültürlerinde ve organizmal modellerde de bir kez daha test edilmesi, insan hastalıklarının tedavisinde kullanılacağı için gerekli görülmektedir.

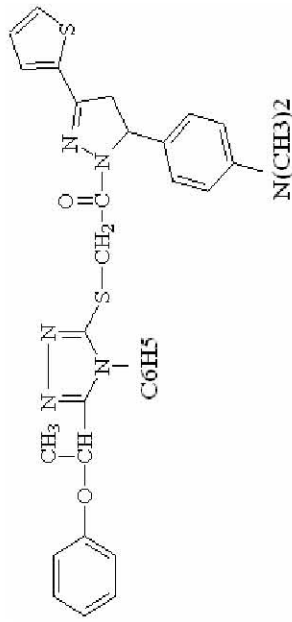


TP1

4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[(3-tiyenil-5-fenil-2-pirazolin-1-il)asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol

Çizelge 4. 1. TP1 bileşiğine ait toplu sonuçlar

		TP1'in Kimyasal Karakteristiği											
		Molekül Formülü		Molekül Ağırlığı									
TP1		C31H27N5O2S2		565,00									
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları													
	C. <i>tropicalis</i>	C. <i>krusei</i>	C. <i>albicans</i>	G. <i>candidum</i>	C. <i>utilis</i>	C. <i>albicans</i> OGÜ	C. <i>glabrata</i> OGÜ	E. <i>coli</i>	S. <i>aureus</i>	B. <i>cereus</i>	P. <i>aeruginosa</i>	M. <i>luteus</i>	
MIK	2	4	4	4	4	4	4	125	250	125	62,5	125	
Kloramfenikol	-	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62	
Ketokonazol	4	2	2	4	4	4	4	-	-	-	-	-	
Flukonazol	2	4	4	4	2	4	4	-	-	-	-	-	
Aktivite Sonuçları	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal						
Toksisite Sonuçları													
LD ₅₀		Üst %95 Güvenilirlik Limiti		Alt %95 Güvenilirlik Limiti								Toksisite Derecesi	
470,00 µg/ml		710,00		250,50								Zararlı	
SONUÇ													
TP1 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli yoktur													

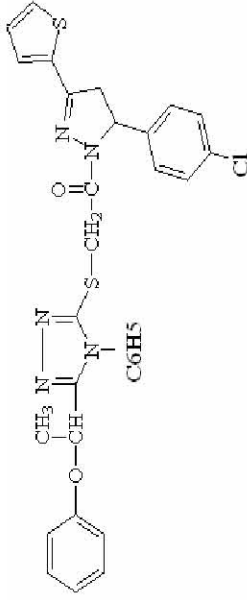


TP2

4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[[3-tiyenil-5-(4-dimetilaminofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol

Çizelge 4. 2. TP2 bileşiğine ait toplu sonuçlar

TP2'in Kimyasal Karakteristiği		Molekül Formülü		Molekül Ağırlığı								
C33H32N6O2S2		C33H32N6O2S2		608,00								
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları												
	C. <i>tropicalis</i>	C. <i>krusei</i>	C. <i>albicans</i>	G. <i>candidum</i>	C. <i>utilis</i>	C. <i>albicans</i> OGÜ	C. <i>glabrata</i> OGÜ	E. <i>coli</i>	S. <i>aureus</i>	B. <i>cereus</i>	P. <i>aeruginosa</i>	M. <i>luteus</i>
MİK	1	2	4	4	4	4	4	125	250	125	62,5	125
Kloramfenikol	-	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62
Ketokonazol	4	2	2	4	4	4	4	-	-	-	-	-
Flukonazol	2	4	4	4	2	4	4	-	-	-	-	-
Aktivite Sonuçları	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal				Antibakteriyal aktiviteleri yok	
Toksisite Sonuçları												
LD ₅₀	Üst %95 Güvenilirlik Limiti		Alt %95 Güvenilirlik Limiti		Toksisite Derecesi							
630,00	676,00		200,00		Zararlı							
SONUÇ	TP2 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli yoktur											

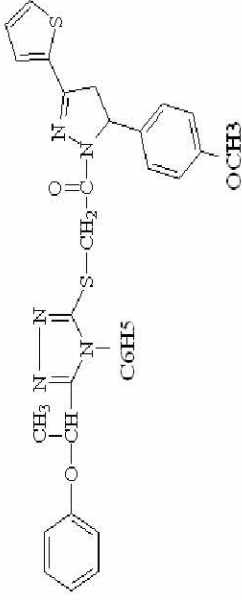


TP4

4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-klorofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol

Çizelge 4. 4. TP4 bileşiğine ait toplu sonuçlar

		TP4'in Kimyasal Karakteristiği										
Molekül Formülü		Molekül Ağırlığı										
C31H26ClN5O2S2		599,50										
		Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları										
	C. <i>tropicalis</i>	C. <i>krusei</i>	C. <i>albicans</i>	G. <i>candidum</i>	C. <i>utilis</i>	C. <i>albicans</i> OGÜ	C. <i>glabrata</i> OGÜ	E. <i>coli</i>	S. <i>aureus</i>	B. <i>cereus</i>	P. <i>aeruginosa</i>	M. <i>luteus</i>
MİK	4	4	4	4	4	4	4	62,5	62,5	125	62,5	62,5
Kloramfenikol	-	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62
Ketokonazol	4	2	2	4	4	4	4	-	-	-	-	-
Flukonazol	2	4	4	4	2	4	4	-	-	-	-	-
Aktivite Sonuçları	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal					
Antibakteriyal aktiviteleri yok												
		Toksisite Sonuçları										
LD ₅₀		Üst %95 Güvenilirlik Limiti		Alt %95 Güvenilirlik Limiti		Toksisite Derecesi						
303,00		345,00		180,00		Zararlı						
TP4 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli yoktur												
SONUÇ												

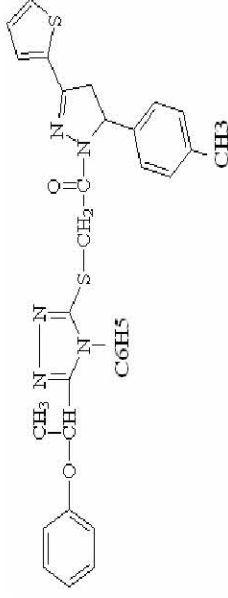


TP5

4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-metoksifenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol

Çizelge 4. 5. TP5 bileşiğine ait toplu sonuçlar

TP5'in Kimyasal Karakteristiği													
Molekül Formülü		Molekül Ağırlığı											
TP5		595,00											
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları													
	C. tropicalis	C. krusei	C. albicans	G. candidum	C. utilis	C. albicans	C. glabrata	C. OGÜ	E. coli	S. aureus	B. cereus	P. aeruginosa	M. luteus
MİK	0,5	2	4	4	4	4	4	4	125	62,5	125	62,5	125
Kloramfenikol	-	-	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62
Ketokonazol	4	2	2	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-
Flukonazol	2	4	4	4	2	4	4	4	-	-	-	-	-
Aktivite Sonuçları	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal					
Toksisite Sonuçları													
LD ₅₀	Üst %95 Güvenlilik Limiti		Alt %95 Güvenlilik Limiti		Toksisite Derecesi								
430,00	626,66		290,00		Zararlı								
SONUÇ	TP5 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli yoktur												

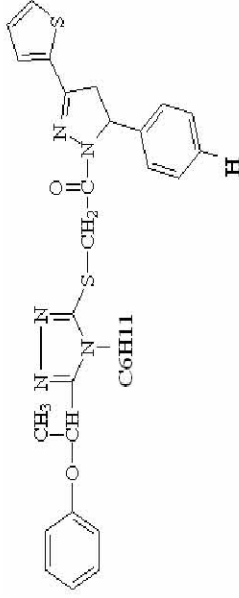


TP6

4-fenil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-metilfenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol

Çizelge 4. 6. TP6 bileşiğine ait toplu sonuçlar

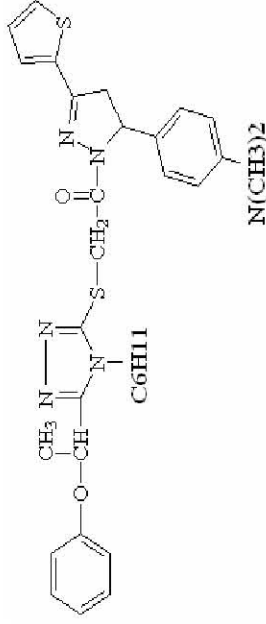
TP6'in Kimyasal Karakteristiği		Molekül Formülü		Molekül Ağırlığı								
		C ₃₂ H ₂₉ N ₅ O ₂ S ₂		579,00								
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları												
	C. <i>tropicalis</i>	C. <i>krusei</i>	C. <i>albicans</i>	G. <i>candidum</i>	C. <i>utilis</i>	C. <i>albicans</i> OGÜ	C. <i>glabrata</i> OGÜ	E. <i>coli</i>	S. <i>aureus</i>	B. <i>cereus</i>	P. <i>aeruginosa</i>	M. <i>luteus</i>
MİK	1	4	4	4	4	4	4	62,5	62,5	62,5	62,5	125
Kloramfenikol	-	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62
Ketokonazol	4	2	2	4	4	4	4	-	-	-	-	-
Flukonazol	2	4	4	4	2	4	4	-	-	-	-	-
Aktivite Sonuçları	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antibakteriyal aktiviteleri yok				
Toksisite Sonuçları												
LD ₅₀	Üst %95 Güvenilirlik Limiti		Alt %95 Güvenilirlik Limiti		Toksisite Derecesi							
323,00	350,00		275,00		Zararlı							
SONUÇ												
TP6 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli yoktur												



TP7

Çizelge 4. 7. TP7 bileşiğine ait toplu sonuçlar

		TP7'in Kimyasal Karakteristiği										
		Molekül Formülü					Molekül Ağırlığı					
TP7		C ₃₁ H ₃₃ N ₅ O ₂ S ₂					571,00					
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları												
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>G. candidum</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. albicans</i> OGÜ	<i>C. glabrata</i> OGÜ	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>
MİK	4	4	4	4	4	4	4	250	250	250	250	125
Kloramfenikol	-	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62
Ketokonazol	4	2	2	4	4	4	4	-	-	-	-	-
Flukonazol	2	4	4	4	2	4	4	-	-	-	-	-
Aktivite Sonuçları	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antibakteriyal aktiviteleri yok				
Toksosite Sonuçları												
	LD ₅₀	Üst %95 Güvenilirlik Limiti					Alt %95 Güvenilirlik Limiti					Toksosite Derecesi
	1010,00	-					-					TOKSİK DEĞİL
SONUÇ	TP7 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli vardır											

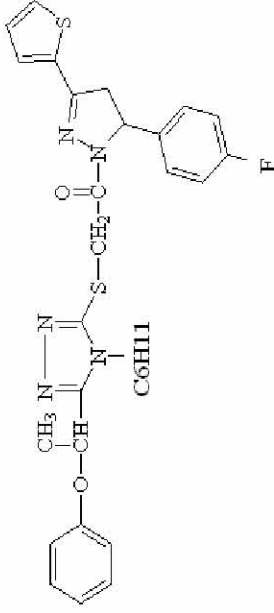


TP8

4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-dimetilaminofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol

Çizelge 4. 8. TP8 bileşiğine ait toplu sonuçlar

TP8'in Kimyasal Karakteristiği		Molekül Formülü		Molekül Ağırlığı									
		C33H38N6O2S2		614,00									
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları													
MİK	C. tropicalis	C. krusei	C. albicans	G. candidum	C. utilis	C. albicansOGÜ	C. glabrataOGÜ	E. coli	S. aureus	B. cereus	P. aeruginosa	M. luteus	
													Antifungal
2	4	4	4	2	4	2	2	125	125	125	125	125	
-	-	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62	
4	2	2	2	4	4	4	4	-	-	-	-	-	
2	4	4	4	4	2	4	4	-	-	-	-	-	
Aktivite Sonuçları													
LD ₅₀		Üst %95 Güvenilirlik Limiti		Alt %95 Güvenilirlik Limiti								Toksosite Derecesi	
1100,00		-		-		-						TOKSİK DEĞİL	
SONUÇ													
TP8 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli vardır													

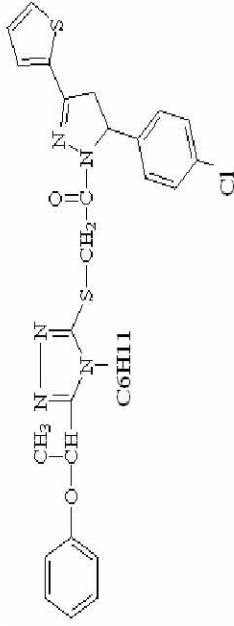


TP9

4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-florofenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol

Çizelge 4. 9. TP9 bileşiğine ait toplu sonuçlar

TP9'in Kimyasal Karakteristiği		Molekül Formülü		Molekül Ağırlığı								
		C31H32FN5O2S2		589,00								
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları												
MİK	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>G. candidum</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. albicans</i> OGÜ	<i>C. glabrata</i> OGÜ	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>
	1	4	4	4	2	4	4	62,5	125	125	125	62,5
Kloramfenikol	-	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62
Ketokonazol	4	2	2	4	4	4	4	-	-	-	-	-
Flukonazol	2	4	4	4	2	4	4	-	-	-	-	-
Aktivite Sonuçları	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal					Antibakteriyal aktiviteleri yok
Toksisite Sonuçları												
LD ₅₀		Üst %95 Güvenilirlik Limiti		Alt %95 Güvenilirlik Limiti		Toksisite Derecesi						
1150,00		-		-		TOKSİK DEĞİL						
SONUÇ	TP9 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli vardır											

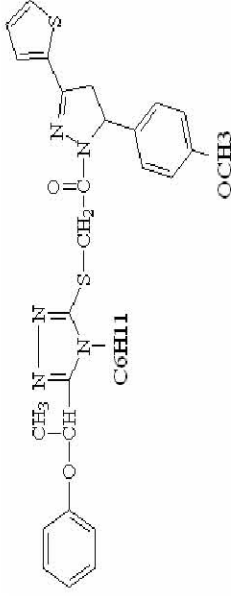


TP10

4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-(4-klorofenil)-2-pirazolin-1-yl]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol

Çizelge 4. 10. TP10 bileşiğine ait toplu sonuçlar

TP10'in Kimyasal Karakteristiği		Molekül Formülü		Molekül Ağırlığı							
C ₃₁ H ₃₂ ClN ₅ O ₂ S ₂		C ₃₁ H ₃₂ ClN ₅ O ₂ S ₂		605,50							
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları											
MİK	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>G. candidum</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. glabrata</i> OGÜ	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>
Kloramfenikol	2	4	4	4	4	4	125	250	125	125	62,5
Ketokonazol	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62
Flukonazol	4	2	2	4	4	4	-	-	-	-	-
Aktivite Sonuçları	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	Antifungal	-	-	-	-	-
Toksikite Sonuçları											
LD ₅₀	Üst %95 Güvenilirlik Limiti		Alt %95 Güvenilirlik Limiti		Toksikite Derecesi						
1100,00	-		-		TOKSİK DEĞİL						
SONUÇ	TP10 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli vardır										



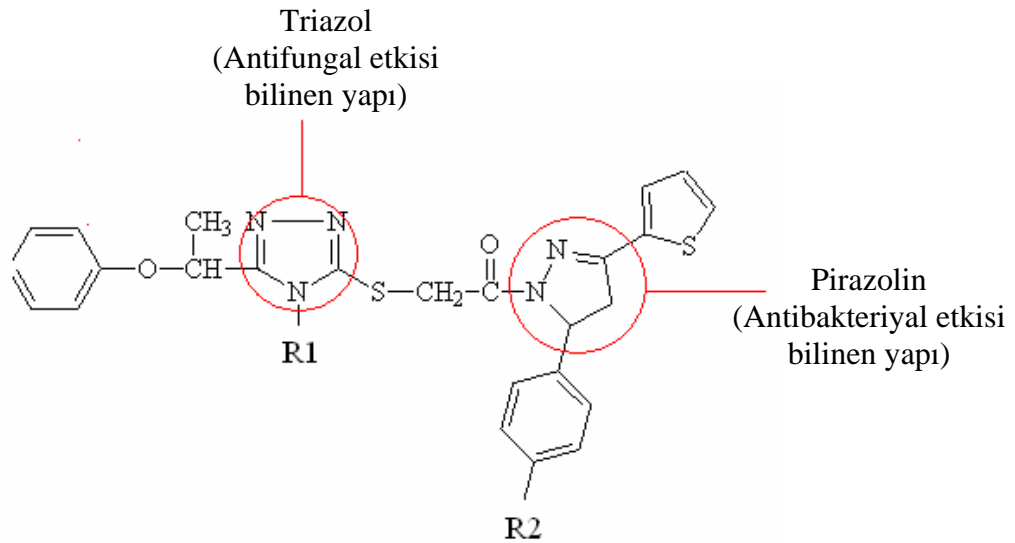
TP11

4-sikloheksil-5-(1-fenoksietil)-3-[[3-tiyenil-5-(4-metoksifenil)-2-pirazolin-1-il]asetil]tiyo-4H-1,2,4-triazol

Çizelge 4. 11. TP11 bileşiğine ait toplu sonuçlar

TP11'in Kimyasal Karakteristiği		Molekül Formülü		Molekül Ağırlığı								
TP11		C32H35N5O3S2		601,00								
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları												
MİK	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>G. candida</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. albicans</i> Ü	<i>C. glabrata</i> OGÜ	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>
Kloramfenikol	2	4	2	4	4	2	4	125	250	125	62,5	62,5
Ketokonazol	-	-	-	-	-	-	-	62,5	7,81	31,25	31,25	15,62
Flukonazol	4	2	2	4	4	4	4	-	-	-	-	-
Aktivite Sonuçları	2	4	4	4	2	4	4	-	-	-	-	-
Toksisite Sonuçları												
LD ₅₀	Üst %95 Güvenilirlik Limiti		Alt %95 Güvenilirlik Limiti		Toksisite Derecesi							
1090,00	-		-		TOKSİK DEĞİL							
SONUÇ	TP11 olarak simgelenen türevin bu deneysel sonuçlara göre ilaç olma potansiyeli vardır											

Triazol halka sistemi üzerine yapılan çalışmalar 19. yy' ın sonlarına doğru başlamış ve günümüze kadar yoğunlaşarak süre gelmiştir [11]. Yapılan çalışmalarda triazol halkası taşıyan bileşiklerin yüksek düzeyde antifungal aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir [52]. Pirazolin halkası taşıyan türevlerin ise yüksek antibakteriyal aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir [51]. Çalışmamızda kullandığımız ve yeni sentezlenmiş 12 adet pirazolin halka sistemi taşıyan triazol türevi bileşiğin, her iki yapıyı da bünyesinde bulundurması itibariyle yüksek düzeyde antifungal ve antibakteriyal aktivite göstermesi beklenmektedir (Şekil 4.1). Ancak sentezlenen türevlerin tümüne genel olarak bakıldığında kullanılan antifungal kontrol sonuçlarına göre eşit veya yüksek antifungal etki bulduklarını, buna karşılık antibakteriyal kontrol sonuçlarına göre ise eşit veya düşük seviyede antibakteriyal etkiye sahip oldukları gözlemlenmiştir.



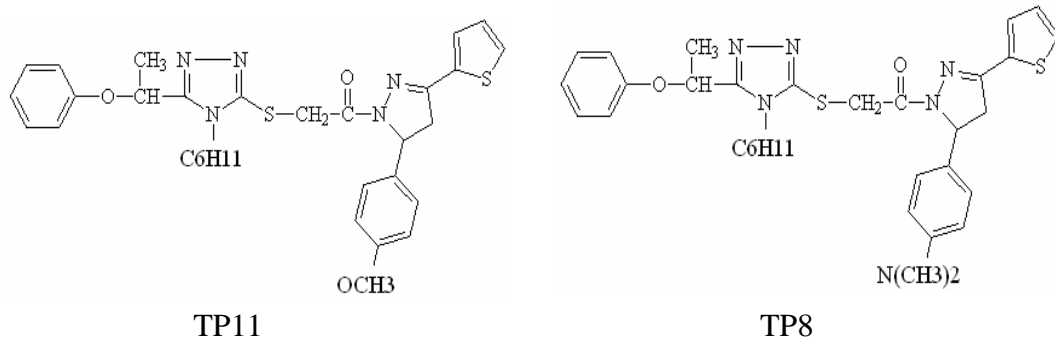
Şekil 4.1. Triazol türevi bileşiklerin genel formülleri.

Not: kırmızı halkaların dışında kalan kısımlar kimyasal sentez esnasında türev oluşturabilmek için eklenen kısımlardır, R1 ve R2 ise deneysel substituentlerin eklendiği kısımları göstermektedir.

Sentezlenen 12 türev ile ilgili yapılan aktivite çalışmalarında türevlerin hepsinin standart antibakteriyal pozitif kontrol olan Kloramfenikol ile aynı ya da daha düşük düzeylerde aktivite gösterdiği gözlenirken, bu 12 türevin antifungal aktivitelerinin pozitif kontrol olarak kullanılan Ketokonazol ve Flukonazol'

ünkine göre aynı veya daha yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. Örneğin; TP1, TP2, TP5, TP7, TP8, TP10, TP11 ve TP12 bileşikleri seçilen bakteri türlerine karşı pozitif kontrol olan Kloramfenikol' e göre daha yüksek konsantrasyonlar da etkiliyken; TP3, TP4, TP6 ve TP9 bileşikleri *E. coli*' ye kontrolün etkin olan konsantrasyonuyla aynı değerinde etkili olmuştur.

Çalışma esnasında kullanılan bileşikleri, yapı-etki ilişkisi açısından incelersek; Triazol halka sistemi üzerindeki substituentlerin aktiviteye belirgin bir katkısı gözlenmezken; pirazolin üzerindeki substituentlerin aktiviteye etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1 – 4.12). Özellikle pirazolin' in 5. konumundaki fenil halkası üzerinde bulunan dimetilamino ($N(CH_3)_2$) grubunun aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2; Çizelge 4.7 – 4.12).



Şekil 4.2. Biyolojik aktivite oluşturan türevler farklı R2 ve aynı R1 radikal gruplarına sahip pirazolin eklenmiş triazol türevleri aktivite gösteren yapılar

Son yıllarda tanı ve tedavi alanındaki gelişmelere paralel olarak mantar enfeksiyonlarının insidansında artış gözlenmektedir. İmmun sistemi baskılanan hastalarda konak savunmasında oluşan önemli değişiklikler, enfeksiyonlara duyarlılığı artırırken, enfeksiyonların gelişmesini kolaylaştırmaktadır [61]. İnsanlarda görülen fırsatçı mantar enfeksiyonlarına neden olan mantar türlerinin çeşitliliğinde artış olmasına rağmen hala en sık etken *Candida* türleridir. Sağlıklı kişilerin normal florasında bulunan *Candida*'lar fırsatçı mantarlar olup, özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde önemli bir mortalite nedeni olarak günümüzde önem taşımaktadır [62]. Durum böyle olunca çalışmamızda *Candida* türlerinin tercih edilmesi kaçınılmaz olmuştur. Ülkemizdeki yapılan çeşitli çalışmalarda *Candida* suşlarının çeşitli antifungallere karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Bu çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılan flukonazole karşı

MİK duyarlılık oranları 2-8 µg/ml bildirilmiştir [54,63-66]. Yaptığımız çalışmada ise türevlerin MİK değerlerinin 0,5–4 µg/ml arasında çıkması türevlerimiz pozitif kontrol olarak kullanılan flukonazol' eoranla daha yüksek antifungal aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. *C. glabrata'* nin azollere karşı doza bağlı duyarlı veya dirençli olması ile *C. krusei'* nin azollere karşı doğal dirençli oluşu bu organizmaları önemli bir tehdit haline getirmektedir. Ve bilindiği üzere *C. glabrata* Flukonazole karşı direnç geliştirmiş durumdadır [67]. Bu tez çalışma sonuçları *C. glabrata* ile *C. krusei* karşı kullanılan bazı türevlerin en az kontroller kadar etkin olduğunu ortaya çıkartmıştır.

Yeni antifungal ilaçların tasarlanabilir olması, fungal enfeksiyonlar ile oluşan mortaliteyi azaltmayı amaçlayan çok sayıda çalışmanın yapılmasını sağlamıştır [68]. Sentetik azol yapılı antifungal ilaçlar ise, halen sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif tedavi seçeneğidir. Flukonazol ve ketokonazol, azol yapılı iki antifungal ilaçtır. Flukonazol, sistemik kandidiyazis tedavisinde ümit verici şekilde kullanılmakta ve nütropenik olmayan hastalarda sistemik kandidiyazis tedavisinde önerilmektedir. Ketokonazol ise, immün sistemi baskılanmış hastalarda etkisiz olması nedeniyle önerilmemektedir [70-72]. Çalışmamızda kullandığımız bileşikler genel itibariyle azol türevleri olduğu için; kontrol olarak yine azol grubu bileşikler olan Flukonazol ve Ketokonazol tercih edilmiştir. Çizelgelerde MİK testi değerleri funguslar açısından göz önüne alındığında, tüm bileşiklerin oldukça iyi düzeyde antifungal etkiye sahip oldukları anlaşılmaktadır. Örneğin TP2 bileşiği *C. tropicalis'* e, TP3 bileşiği *G. candidum'* a, TP5 bileşiği *C. torpicalis'* e, TP6 bileşiği *C. tropicalis'* e, TP8 bileşiği *G. candidum*, *C. albicans* (klinik izolat) ve *C. glabrata* (klinik izolat), TP9 bileşiği *G. candidum'* a ve TP11 bileşiği *C. abicans* (klinik izolat)'a karşı pozitif kontrol olarak kullanılan flukonazol ve ketokonazol'e kıyasla daha düşük konsantrasyonlar da daha fazla antifungal etki göstermişlerdir. Çizelge 4.13' de de görüldüğü üzere pozitif kontrol olarak seçilen Flukonazol ve Ketokonazol'ün antifungal aktivite MİK değerleri 2-4 µg/ml arasında olmasına karşılık türevlerin genel MİK değerleri 0.5-4 µg/ml arasındadır. Görüldüğü üzere bileşiklere ait MİK değer aralığı 2 µg/ml'nin de altına inerek 0.5 µg/ml gibi çok az miktarlarda

antifungal etkiye sahiptirler. Bu da bileşiklerin antifungal açıdan oldukça kuvvetli kimyasallar oldukları anlamına gelmektedir.

Çizelge 4.13. Aktiviteleri standart ajan olarak seçilen Flukonazol ve Ketokonazol göre daha yüksek çıkan türevler

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>G. candidum</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. albicans</i> OGÜ	<i>C. glabrata</i> OGÜ
TP2	1	2	4	4	4	4	4
TP3	2	4	4	2	2	4	4
TP5	0,5	2	4	4	4	4	4
TP6	1	4	4	4	4	4	4
TP8	2	4	4	2	4	2	2
TP9	1	4	4	4	2	4	4
TP11	2	4	2	4	4	2	4
Flukonazol	2	4	4	4	2	4	4
Ketokonazol	4	2	2	4	4	4	4

Bileşikler antifungal aktivitelerini bildiren MİK değerlerine ve referans değerlerden biri olan Flukonazol' e göre, en etkin olanından en az etkili olanına göre kıyaslandığında sıralama şöyle olmaktadır; TP8 > TP7 > TP11 = TP5 = TP2 > TP9 = TP3 > TP10 = TP11 > TP1 > TP6 > TP4. Ketokonazol' e göre bileşiklerin aktiviteleri en etkinden en az etkin olana göre sıralandığında ise TP8 > TP3 > TP11 > TP9 = TP10 = TP12 > TP5 = TP2 > TP1 = TP6 > TP4 = TP7 sonucu ortaya çıkmaktadır. Çizelge 4.14'de mikroorganizmalar kendilerini etkileyen bileşiklerin en düşük ve en yüksek MİK değerleri ile birlikte görülmektedir. Özellikle TP8'in, *C. tropicalis*, *G. candidum*, *C. Glabrata* ve *C. albicans*' a karşı Flukonazol ve Ketokonazol' ün MİK değerlerinin altında etkiye sahip olması daha iyi antifungal yapı olabileceği sonucunu ortaya koymuştur.

Çizelge 4.14. Mikroorganizmalar ve kendilerini etkileyen bileşiklerin en düşük ve en yüksek MİK değerleri

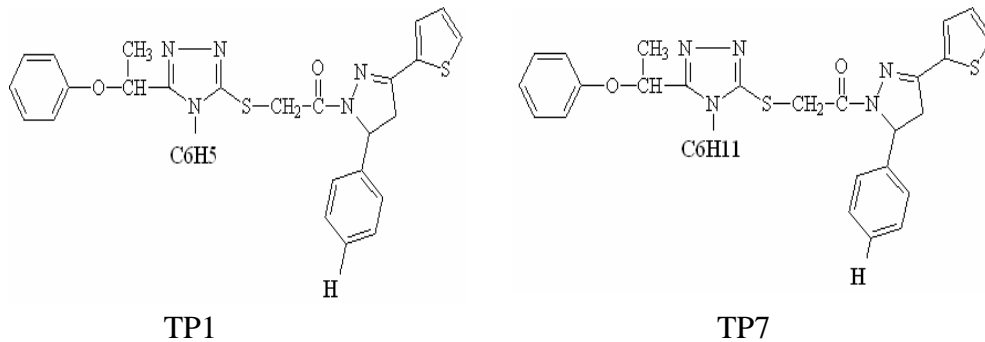
	*EYED($\mu\text{g/ml}$) / Bileşik no	**EDED($\mu\text{g/ml}$) Bileşik no	Kontrol ($\mu\text{g/ml}$) Kloramfenikol	Kontrol ($\mu\text{g/ml}$) Flukonazol	Kontrol ($\mu\text{g/ml}$) Ketokonazol
<i>E.coli</i>	250 / 7	62,5 / 3,4,6,9	62,5	-	-
<i>S.aureus</i>	250 / 1,2,7,10,11,12	62,5 / 4,5,6	7,81	-	-
<i>B.cereus</i>	250 / 3,7	62,5 / 6	31,25	-	-
<i>M.luteus</i>	125 / 1,2,3,5,6,7,8	62,5/4,9,10,11,12	15,62	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	250 / 7	62,5 / 1,2,3,4,5,6,11	31,25	-	-
<i>C.albicans</i>	4 / 1,2,3,4,5 6,7,8,9,10,12	2 / 11	-	4	2
<i>G.candidum</i>	4 / 1,2,4,5,6, 7,9,10,11,12	2 / 3,8	-	4	4
<i>C.tropicalis</i>	4 / 4,7	0,5 / 5	-	2	4
<i>C.krusei</i>	4 / 1,3,4,6,7,8, 9,10,11,12	2 / 2,5	-	4	2
<i>C.utilis</i>	4 / 1,2,4,5,6,7,8,11	2 / 3,9,10,12	-	2	4
<i>C.albicans</i> (<i>linik</i> <i>izolat</i>)	4 / 1,2,3,4,5,6, 7,9,10,12	2 / 8,11	-	4	4
<i>C.glabrata</i> (<i>linik</i> <i>izolat</i>)	4 / 1,2,3,4,5,6, 7,9,10,12	2 / 8	-	4	4

*EYED: En Yüksek Etkin Doz **EDED: En Düşük Etkin Doz

İlaçların yan etkileri, aslında toksik etkileridir. Kimyasal maddelerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu toksik etkiler akut ve kronik olarak gelişir. Bir maddenin akut toksisitesinin değerlendirilmesinde LD₅₀ tayini sıklıkla başvurulan bir toksikoloji değerlendirme yöntemidir [32]. LD₅₀ düzeyinin tespitinde kullanılan toksisite testlerinden olan *Artemia salina* toksisite testi farklı

mikotoksinlere karşı geniş bir yelpazede duyarlılık gösterirler [33]. Bu larvalar, günümüzde biyolojik aktiviteleri araştırılan örneklerin sitotoksitelerinin tayininde, oldukça geniş bir şekilde kullanılmaktadır [34]. Toksisitenin öngörülmesi açısından kullanışlı bir testtir. Ayrıca fungal toksinlerin, bitkisel ekstraktların, ağır metallerin, cyanobacteria toksinlerinin pestisitlerin ve diş hekimliğinde kullanılan bazı maddelerin, sitotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır [35-44]. *Artemia salina* ile yapılan bu testin modifiye edilmiş şekli ile alınan sonuçlar, memeli hücre kültürleri ile yapılan toksisite testlerinde alınan sonuçlarla karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir [50]. Yeni sentezlenmiş 12 adet trizol türevinin *Artemia salina* sitotoksisite testi ile taranması sonucunda maddelerden ilk altı (TP1-TP6) tanesinin zararlı olduğu anlaşılırken, son altı (TP7-TP12) tanesinin toksik olmadığı anlaşılmıştır. Günümüzde çeşitli bakteri ve fungus kültürlerinde antimikrobik özelliği olan değişik maddeler elde edilmiş ve bunların bir kısmı klinik de denenmesine rağmen, oldukça toksik olmaları nedeniyle kullanım şansı bulamamışlardır.

Yapılan toksisite çalışmaları; bileşiklerin toksisitelerinin, 4.konumda meydana gelen değişikliklerden direk etkilediğini göstermiştir. Fenil (C_6H_5) grubu içeren türevlerin tamamı toksik iken; sikloheksil (C_6H_{11}) grubu içeren diğer altı türevin toksik olmadığı gözlenmiştir. Diğer yandan bileşiklerin pirazolin halka sistemi üzerindeki grup değişikliklerinin toksisiteye herhangi bir katkısının olmadığı gözlenmiştir. Bu durumu örnek bir çift türev üzerinden açıklarsak; fenil (C_6H_5) grubu içeren TP1 bileşiğine ilişkin veriler incelendiğinde bu bileşiğin “zararlı” olduğu gözlenirken, sikloheksil (C_6H_{11}) grubu içeren TP7’ nin toksik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Fenil ve sikloheksil gruplarına bağlı olarak toksisite sonuçlarının yorumlanması

12 türeve ait toksisite sonuçları incelendiğinde 4. konumda fenil (C₆H₅) grubu taşıyan ilk altı (TP1-TP6) türevin toksik olduğu anlaşılırken, sikloheksil (C₆H₁₁) grubu taşıyan diğer altı (TP7-TP12) grubun toksik olmadıkları anlaşılmıştır.

Sonuç olarak; mikrodilüsyon broth yöntemiyle 7 değişik fungusa karşı, yapay 12 bileşiğin antifungal etkisi araştırılmış; bütün türevlerin pozitif kontrol olan flukonazol ve ketokonazol'ün etki değerlerine eşit veya daha yüksek antifungal aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. Mikrodilüsyon broth yönteminin 5 değişik bakteriyle yapılan antibakteriyal analizinde ise; tüm türevler kloromfenikol'ün aktivite değerine eşit bir etki gösterirken, daha güçlü bir antibakteriyal etki gösteren türev bulunamamıştır. Brine-shrimp toksisite testi ile 7 fungus ve 5 bakteriye karşı yapay 12 bileşiğin toksisitesi araştırıldığı da türevlerden ilk (TP1-TP6) altısının zararlı toksik etkiye sahip olduğu gözlenirken, diğer (TP7-TP12) altısı toksik etkiye sahip değildir. TP8 türevi en yüksek aktiviteye sahip olup aynı zamanda da toksik değildir. Azol türevi bileşiklerinin, yapılan mikrobiyal revers mutasyon testleri, *in vitro* - *in vivo* kromozom aberasyon çalışmaları ve genetik toksisite çalışmaları sonucunda oldukça düşük düzeylerde mutajenite gösterdiği tespit edilmiştir [73,74]. Yine aynı çalışmada; azol türevi bileşiklerin memeliler üzerinde yapılmış akut toksisite testlerinde, toksisite düzeylerinin çok toksikten toksik olmayana kadar geniş bir aralığa yayıldığı ve genelde düşük düzeylerde toksik oldukları gösterilmekle birlikte; bu verilerin, diğer türevler içinde geçerli olabileceğine dair bir ilişki kurulabileceği vurgulanmıştır [73,74]. Bu durum bu çalışmada test edilen maddelerin pratikte kullanım için uygun olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda kullandığımız azol türevi bileşikler her ne kadar yüksek düzeyde antifungal aktivite gösteriyor olsalar da; bu ve benzeri bileşiklerin ilaç olma potansiyellerinin daha iyi anlaşılabilmesi için ilave biyolojik aktivite testlerinin yapılması ve daha ileri düzeydeki çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ergenç, N., Gürsoy, A. ve Ateş, O., *Farmasötik Kimya Ders Kitabı*, İ.Ü.Basımevi ve Film Merkezi, **43**- 275, (1997).
- [2] Turan-Zitouni, G., Kaplancıklı, Z.A. ve Güven, K., *N-(Chroman-4-ylidine) Aryloxyacetohydra Zones: Synthesis and Antimicrobial Activity*, II Farmaco, **52 (10)**, 631-633, (1997).
- [3] Novelli, F., Recine, M., Sparatore, F. ve Juliano, C., *Triorganotin compounds as antimicrobial agents*, II Farmaco, **54**, 237-241, (1999).
- [4] Shivarama, H.B., Akberali, P.M. ve Shivananda, M.K., *Studies on Arylfuran Derivatives Part X. Synthesis and Antibacterial Properties of Arylfuryl- Δ^2 - Pyrazolines*, II Farmaco, **55**, 256-263, (2000).
- [5] Shivarama, H.B., Akberali, P.M. ve Shivananda, M.K., *Studies on Nitrophenylfuran Derivativespart XII. Synthesis, Characterization, Antibacterial & Antiviral Activities of Some Nitrophenylfurfurylidine-1,2,4-Triazole [3,4-B]- 1,3,4 Thiadiazines*, II Farmaco, **56**, 919-927, (2001).
- [6] Şahin, G., Palaska, E., Ekizoğlu, M. ve Özalp, M., *Synthesis and Antimicrobial Activity of some 1,3,4-oxadiazole derivatives*, II Farmaco, **001**, 1-4, (2001).
- [7] Ulusoylu, M., Soyoğul, U., Gürkan, E. ve Tuzlacı, E., *Centaurea iberica bitkisinin biyolojik aktivite tayinleri*, XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Kitabı, **670 (17)**, 287-290, (2001).
- [8] Turan-Zitouni, G., Sıvacı, D.M., Kaplancıklı, Z.A. ve Özdemir, A., *Synthesis and Antimicrobial Activity of some Pyridiniyliminothiazoline Derivatives*, II Farmaco, **57**, 569-572, (2002).
- [9] Raffa, D., Daidone, G., Plescia, F., Schillaci, D., Maggio, B. ve Torta, L., *Synthesis and antifungal activity of new N-(1-phenyl-4-carbetoxypyrazol-5-yl)-N-(indazol-3-yl) and N-(indazol-5-yl)-2-iodobenzamides*, II Farmaco, **57**, 183-187, (2002).
- [10] Turan-Zitouni, G., Demirayak, S., Özdemir, A., Kaplancıklı, Z.A. ve Yıldız, M.T., *Synthesis of some 2-[(benzazole-2-yl)thioacetylamino]thiazole derivatives and their antimicrobial activity*

and toxicity, European Journal of Medicinal Chemistry **39**, 267-272, (2003).

- [11] Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A. ve Sibley, C.M., *Current and Emerging azole Antifungal Agents.*, *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 40-79, (1999).
- [12] Akgün, H., Balkan, A., Bilgin, A.A., Çalış, U., Dalkara, S., Erdoğan, H., Erol, D.D., Ertan, M., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç, S. ve Şafak, C., *Farmasötik Kimya*, Cilt II, 991-1000, (2000).
- [13] Kayaalp, S.O., *Rasyonel tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Hacettepe-taş Kitapçılık Ltd.Şti., 175-199, (2000).
- [14] Uzun, O., *Nozokomiyal Hematojen Kandidiazis, Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu*, Eskişehir 21-22 Haziran, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **43**, 117-124, (2002).
- [15] Bilgehan, H.S., *Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir, 1981.
- [16] Levinson, W. ve Jawetz, E., (Mikrobiyoloji Çeviri Kurulu ; Dündar, I.H., Erken, E., Kılıç, B., Memişoğlu, H.R., Özcan, K., Özgünen, T. ve Yarkin, F.,) *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji*, Barış Kitabevi, İstanbul, (1997).
- [17] Kingsburg, D.T. ve Wagner, E.W *The National Sereis Medical for Independent Study, 2nd edition microbiology*, (1990).
- [18] Dalgıç, N., İnce, E., Çiftçi, E., Öncel, S., Bingöler, E.B. ve Doğru, U., *Candida albicans menenjiti: olgu sunumu*, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, **25(1)**, 125-128, (2005).
- [19] Baykara, N., N. Benzolan, T. Kuzucuoğlu, F. Baskadem, Katı, I. ve Z. Arıkan, “*Yoğun Bakım Ünitesinde gelişen Candida tropicalis fungemisi*”, 29. Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kongresi, Kongre özet kitabı, 512, Mersin, (1995).
- [20] Durmaz, B., *Hastane Enfeksiyonlarında Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarının Rolü*, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. –Malatya, 1-11, (2001).

- [21] Akgün, H., Balkan, A., Bilgin A.A., Çalış, U., Dalkara, S., Erdoğan, H., Erol; D.D., Ertan, M., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç ve S., Şafak, C., *Farmasötik Kimya*, Cilt II, 991-1000, (2000).
- [22] Çaylı, N., *Bazı Kimyasal Maddelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması*, Lisans Tezi, A.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 44s., (2000).
- [23] Bökesoy, T.A., Çakıcı, I. ve Melli, M., *Farmakoloji Ders Kitabı* , Türk Farmakoloji Derneği, 521-635, (2000).
- [24] Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Göral, G. ve Helvacı, S., *Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji*, Onur Yayıncılık, 20- 27, (1992).
- [25] Beşe, M., *Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri*, 45-47, (1989).
- [26] Foster, W.J. ve Woodruff, H.B., *Microbiological Aspects of Penicillin: I. Methods of Assay*. J Bacteriol., 187–202, (1943).
- [27] Fishbein, M.C., Meerbaum, S., Rit, ., Rondo, U., Kanmatsuse, K., Mercier, J.C., Corday, E. ve Ganz, W., *Early faz acute myocardial infarct size quantification : validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique*. Am heart J;**101**, 593-600, (1981).
- [28] Klein, H.H., Puschmann, S. ve Schaper, W., *The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction*. Virchows arch; **393**, 287-297, (1981).
- [29] Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. ve Winn, W.C., *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott-Raven Pub, 5th. Edition, Philadelphia,USA, 85-856, (1997).
- [30] Vanden-Berge, D.A. ve Vlietinck, A.J., *Screening Methods for Antimicrobial and Antiviral Agents from Higher Plants, Methods in Plant Biochemistry*, (Eds: HARBORNE, J.B., DEY, P.M.) Academic Pres, London, England, 40-61, (1993).
- [31] Hadacek, F. ve Greger, H., *Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice*, Phytochem. Anal., **11**, 137-147, (2000).

- [32] Dökmeci, I., *Toksikoloji – Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi*, Nobel Tıp Kitabevleri, 1-50, (1994).
- [33] Harwig, J. ve Scott, P.M., *Brine Shrimp (Artemia salina L.) Larva as a Screening System for Fungal Toxins*, Research Laboratories, Food and Drug Directorate, Department of National Health and Welfare, Tunney's Pasture, Ottawa. Canada, 1011-1016, (1971).
- [34] Choudhary, I.M. ve Thomsen, W.J., *Bioassay Techniques For Drug Development*, Harwood Academic Publishers, 8-10, (2001).
- [35] Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P. ve Phillipson, J.D., *A Microwell Cytotoxicity Assay Using Artemia salina*. *Plant Med.*, **59**, 250-252, (1993).
- [36] Harwig, J. ve Scott, P., *Brine shrimp (Artemia salina L.) larvae as a Screening Fungal Toxins*, *Appl. Microbial.*, **21**, 1011-1016, (1971).
- [37] Mc Lauglin, J.L., Chang, C.J. ve Smith, D.L., *Bench top Bioassay For the Discovery of Bioactive Natural Products: an update*, *Studies in Natural Products Chemistry* (Edited by: AU Rahman). Elsevier, 383-409, (1991).
- [38] Ulusoylu, M., Soyogul, U., Gurkan, E. ve Tuzlacı, E., *Centaurea iberica bitkisinin biyolojik aktivite tayinleri*, XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Kitabı, **670 (17)**, 287-290, (2001).
- [39] Martinez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A. ve Diaz-mayans, J., *Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp Artemia partenogenetica*, *Aquaculture*, **172**, 315-325, (1998).
- [40] Jaki, B., Orjala, J., Bürji, H.R. ve Sticher, O., *Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality and cytotoxicity*, *Pharm. Biol.*, **37**, 138-143, (1999).
- [41] Barahona, M.V. ve Schez-fortun, S., *Toxicity of carbamates to the brine shrimp Artemia salina and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl Toxicity*, *Env. Pollut.*, **104**, 469-476, (1999).
- [42] Pelka, M., Danzl, C., Distler, W. ve Petschelt, A., *A new screening test toxicity testing of dental materials*, *Jr. Dent*, **28**, 341-345, (2000).

- [43] Gürkan, E., Tüzün, O.T., Hırlak, F. ve Sarıyar, G., *Bazı Papaver alkaloidlerinin Brine shrimp yöntemiyle sitotoksosite tayinleri*, XII.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, **670**, 17, 66, (2000).
- [44] Uğur, M.S., Gürkan, E. ve Tuzlacı, E., *İstanbul çevresinde yetişen bazı bitkilerin fibrinolitik etkileri*, XII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Kitabı, **670 (17)**, 68, (2000).
- [45] Sleet, R.B. ve Brendel, K., *Improved methods for harvesting and caunting synchronous populations of Artemia nauplii for use in developmental toxicology*, Ecotoxicol, Env. Safety, **7**, 435-446, (1983).
- [46] Sanchez-fortun, S., Sanz, F. ve Barahona, M.W., *Acute toxicity of several organophosphorous insecticides and protection by cholinergic antagonists and 2-PAM on Artemia salina larvae*, Arch Environ Contam Toxicol, **31 (3)**, 391-398, (1996).
- [47] Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G. ve Didelupis, G.D., *Toxicity of several important agricultural antibiotics to Artemia*, Wat. Res., **31**, 1801-1806, (1997).
- [48] Calleja, M.C. ve Persoone, G., *Cyst-based toxicity tests IV. the potential of ecotoxicological tests fort he prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme*, ATLA **20**, 396-405, (1992).
- [49] Lagarto, P.A., Silva, Y.R., Guerra, S.I. ve Iglesias, B.L., *Comparative study of the assay of Artemia salina L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute Toxicity of plant extracts*, Drug Research and Development Center (CIDEM), Biologic Research Department,Ciudad de La Habana,Cuba, 395-400, (2001).
- [50] Lewan, L., Andersson, M. ve Morales-gomez, P., *The use of Artemia salina in Toxicity testing*, ATLA, **20**, 297-301, (1992).
- [51] Turan-Zitouni, G., Özdemir, A. ve Güven, K., *“Synthesis of some 1-[(N,N-disubstitutedthiocarbamoylthio)acetyl]-3-(2-thienyl)-5-aryl-2-*

- pyrazoline derivatives and investigation of their antibacterial and antifungal activities*”, Archiv der Pharmazie-Pharmaceutical and Medicinal Chemistry **338(2-3)**, 96-104, (2005).
- [52] Turan-Zitouni, G., Kaplancıklı, Z. A., Yıldız, M. T., Chevallet, P. ve Kaya, D., “*Synthesis and antimicrobial activity of 4-phenyl/cyclohexyl-5-(1-phenoxyethyl)-3-[N-(2-thiazolyl)acetamido] thio - 4h-1,2,4 -triazole derivatives*”, Eur. J. Med. Chem. **40**, 607-613, (2005).
- [53] Koneman, E. W., Allen, S. D. ve Winn, W. C., *Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott Raven Pub, Philadelphia, pp. 86-870, (1999).
- [54] Nccls. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*; Approved Standart-Second Edition. NCCLS document M27-A2, Pennsylvania USA, (2002)
- [55] Vanden-Berge, D. A. ve Vlietinck, A. J., *Screening Methods for Antimicrobial and Antiviral Agents from Higher Plants*, Methods in Plant Biochemistry, (Eds: HARBORNE, J.B., DEY, P. M.) Acedemic Press, London, England, 37-53, (1991) .
- [56] Beşe, M., *Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri*, Kardeşler Basımevi, İstanbul, (1990) .
- [57] Elof, J. N., *A Sensitive Quick Microplate Method to Determine the Minimal İnhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria* , Planta Med., **64**, 711-713, (1998) .
- [58] Arda, M., *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 212-240, (1989).
- [59] Zgoda, J.R. ve Porter. J.R., *A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi*, Pharm. Microbiol., **39**, 221-225, (2001).
- [60] Brayn, B., Timothy, M. ve TORE, S., *General and Applied Toxicology* , 2nd. Edition , 1, 52, (1997).

- [61] Anaissie, E., *Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer and review*. Clin Infect Dis ;14(Suppl 1), 43-53, (1992).
- [62] Wingard, J. R., *Importance of candida species other than C. albicans as pathogens in oncology patients*, Clin Infect Dis, 20, 115-25, (1995).
- [63] Kuştimur, S., Kalkancı, A., Mansuroğlu, H. ve Yalınay, C. M., *Candida'ların disk diffüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazol'e duyarlılıklarının değerlendirilmesi*. Türk Mikrobiyoloji Cem. Derg; **32**, 92-96, (2002).
- [64] Kuştimur, S., Kalkancı, A. ve Mansuroğlu, H., *Candida türlerinin flukonazole duyarlılıklarının saptanmasında iki farklı mikrodilüsyon yönteminin karşılaştırılması*. İnfeksiyon Derg; **15(3)**, 349-351, (2001).
- [65] Şener, G., Karapınarlı, K., Çelik, C., Türker, M. ve Kurultay, N., *Candida suşlarının amfoterisin B ve flukonazol duyarlılığının belirlenmesi*. İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Derg; **39(1)**, 33-37, (2001).
- [66] Kiraz, N., Erturan, Z., Uzun, M., Durmaz, G., Us, T., Akgün, Y. ve Anğ, Ö., *Üçyüz Candida albicans suşunun amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve mikonazole duyarlılıklarının araştırılması*. Klimik Derg; **11(3)**, 116-8, (1998).
- [67] Yücel, A. ve Kantarcıoğlu, A.S., *Antifungal usage in systemic mycotic infections and susceptibility tests: A general guide*. Cerrahpaşa J Med., **33**, 261-280, (2002).
- [68] Gölle, H., Öztürk, A. ve Yuluğ, N., *Sistemik infeksiyonlardan izole edilen Candida'ların çeşitli antifungal ajanlara duyarlılık oranları*. İnfeksiyon Derg; **15**, 221-224, (2001).
- [69] Richardson, M. D., *Systemic fungal infections*. Care Crit Ill; **10**, 258-61, (1994).
- [70] Bodey, G. P., Bowden, R. A. ve B.Schner, T., et al. *International Conference for the development of a consensus on the management*

- and prevention of severe candidal infections. *Clin Infect Dis*; **25**, 43-59, (1997).
- [71] Hay, R. J., Overview of the treatment of disseminated fungal infections. *J Antimicrob Chemother*; 28 (Suppl B): 17-25, (1991).
- [72] Walsh, T. J. ve Pizzo, A., Treatment of systemic fungal infections: Recent progress and current problems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 7: 460-75, (1988).
- [73] Anonymous, I., *Benzothiazole-based Thiazoles Category Justification and Testing Rationale*, Rubber and Plastic Additives Panel, November, (2001).
- [74] Filipov, N.M. ve Lavrance D.A., *Developmental Toxicity of a Triazole Fungicide: Consideration of Interorgan Communication*, Wadsworth center New York State department of Health, P.O.509, Empire State Plaza, Albany New York, **62**, 185-186, (2001).