T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİMİKROBİYAL PEPTİD KONJUGASYONU, KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTE DEĞERLENDİRİLMESİ

Yiğit Can BAYCILI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Eş Danışman

Prof. Dr. Serap DERMAN

Temmuz, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİMİKROBİYAL PEPTİD KONJUGASYONU, KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTE DEĞERLENDİRİLMESİ

Yiğit Can BAYCILI tarafından hazırlanan tez çalışması 22.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Serap DERMAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Mustafa YAMAN, Üye
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Antimikrobiyal Peptid Konjugasyonu, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivite Değerlendirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Yiğit Can BAYCILI

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 4154 numaralı projesi ve TÜBITAK BİDEB 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

Bana her zaman destek veren aileme…

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans hayatımda her zaman yanımda olan, benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve her kararımı başarabileceğime inanan tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tanıdığım en idealist insanlardan biri olan, engin bilgi birikimini benimle her fırsatta paylaşan, beni her zaman daha iyisini yapabileceğime inandıran ve tez çalışmamda eş danışman olarak görev alan Sn. Prof. Dr. Serap DERMAN'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına ve bir bilim insanı olma yolunda ilk adımlarını atan bana verdiği emeklerinden ve desteklerinden ötürü Sn. Öğr. Gör. Dr. Pelin PELİT ARAYICI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tezimde emeği geçen Sn. Doç. Dr. Tülin ÖZBEK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında beni sürekli motive eden ve bana destek veren Sn. Dr. Tayfun ACAR'a ve Sn. Dr. Burcu UÇAR ACAR'a teşekkür ederim.

Bana dünyadaki tek gerçeğin sevgi olduğunu, beni her şeyden çok severek öğreten, her adımımda benimle kol kola yürüyen, bana kendimden fazla güvenen ve ilk öğretmenlerim olan, biricik annem Çiğdem BAYCILI'ya ve birtanecik babam Müfit BAYCILI'ya kucak dolusu teşekkürlerimi sunarım. Siz olmasaydınız buralara gelemezdim, bugün olduğum insan olamazdım, başardıklarımı başaramazdım.

Aynı laboratuvarı paylaştığım İrem ÇOKSU'ya bana yol arkadaşı olduğu için, Cansu GÜLCAN'a motivasyon kaynağım olduğu için ve Pelin SARAÇOĞLU'na hep yardımıma koştuğu için teşekkürü borç bilirim.

Beraber çalışma fırsatı bulduğum KMC 306 ve KMC 307'deki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yiğit Can BAYCILI

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xv
ÖZET xvi
ABSTRACT xviii
1 GİRİŞ
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER 5
2.1 Antibiyotikler 5
2.1.1 Antibiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi 5
2.1.2 Antibiyotik Türleri 6
2.1.3 Hücre Duvarı Sentez İnhibitörleri 7
2.1.4 Protein Sentezini İnhibe Eden Antimikrobiyaller 16
2.1.5 Nükleik Asit Sentezini İnhibe Eden Antimikrobiyaller 28
2.1.6 Antimetabolitler 29
2.1.7 Membran Bütünlüğünü Bozan Antimikrobiyaller 29
2.2 Antibiyotik Direnci 31
2.3 Peptidler 34
2.3.1 Antibiyotiklere Alternatif Olabilecek Antimikrobiyal Peptidler 34
2.3.2 Katyonik Antimikrobiyal Peptidler 35
2.3.3 Antimikrobiyal Katyonik Peptidlerin Yapıları ve Çalışma Prensipleri 37
2.3.4 Geleneksel Antibiyotikler Yerine Peptidlerin Kullanımındaki Avantajlar 41
2.4 Çapraz Bağlama Reaktifleri 42
2.4.1 Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri 43
2.4.2 Seçici Oldukları Gruplara Göre Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar 44
2.4.3 Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri 45

2.4.4 Seçici Oldukları Gruplara Göre Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar 47
2.4.5 Direkt (Zero Length) Çapraz Bağlama Reaktifleri 56
2.4.6 Karbodiimidler 56
3 DENEYSEL YÖNTEM **61**
3.1 Kullanılan Malzemelerin ve Cihazların Listesi 61
3.1.1 Kullanılan Cihazlar 61
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler 61
3.1.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 62
3.2 HF-18 Peptidinin Poliakrilik Asit Polimeri (PAA) ile Fiziksel Kompleksinin Hazırlanması 63
3.3 Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu 63
3.3.1 PAA- Peptid Konjugasyonuna Ait Hesaplamalar 63
3.3.2 Konjugatların Saflaştırılması 66
3.3.3 Peptid-Polimer Konjugatlarının Karakterizasyonu 67
3.4 Termal ve pH Stabilite 70
3.5 Antimikrobiyal Aktivite 70
4 DENEYSEL SONUÇLAR **72**
4.1 Peptid-Polimer Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu 72
4.2 Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu 73
4.2.1Konjugatlarının Sentezinde Kullanılacak Yöntemin Belirlenmesi 73
4.2.2 Peptid- PAA Konjugasyonları 74
5 SONUÇ ve ÖNERİLER **89**
KAYNAKÇA **98**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **113**

SİMGE LİSTESİ

Å	Angström
°C	Derece Santigrat
g	Gram
L	Litre
nm	Nanometre
µg/ml	Mikrogram / mililitre
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre
n	Mol

KISALTMA LİSTESİ

AMP	Antimikrobiyal Peptid
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) Karbodiimid Hidroklorid
GBS	Grup B Streptokok
KNS	Koagulaz Negatif Stafilokoklar
MDR	Çoklu İlaca Dirençli
MIC	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MRSA	Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus*
PAA	Poliakrilik Asit
PRSA	Penisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus*
RALS	Işık Saçılması
RI	Kırılma İndisi
UV	Ultraviolet
VISA	Vankomisine Orta Düzeyde Duyarlı *Staphylococcus Aureus*
VRE	Vankomisine Dirençli Enterekok
VRSA	Vankomisin Dirençli *Staphylococcus Aureus*

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1 Sentezlen konjugatın şematik gösterimi 3
Şekil 2. 1 Penisilin molekülü....7
Şekil 2. 2 Sefalosporinlerin genel gösterimi 12
Şekil 2. 3 Karbapenemlerin genel gösterimi....13
Şekil 2. 4 Örnek bir monobaktam molekülü 14
Şekil 2. 5 Örnek bir glikopeptid olan teikoplanin molekülü 15
Şekil 2. 6 Örnek bir glikopeptid olan vankomisin molekülü....15
Şekil 2. 7 Örnek bir makrolid olan eritromisin molekülü 16
Şekil 2. 8 Örnek bir makrolid olan klaritromisin molekülü 17
Şekil 2. 9 Örnek bir makrolid olan azitromisin molekülü....17
Şekil 2. 10 Örnek bir ketolid olan telitromisin molekülü....18
Şekil 2. 11 Örnek bir ketolid olan roksitromisin molekülü....18
Şekil 2. 12 Örnek bir linkozamid olan linkomisin molekülü....19
Şekil 2. 13 Örnek bir linkozamid olan klindamisin molekülü....20
Şekil 2. 14 Örnek bir streptogramin olan kuinopristin molekülü....21
Şekil 2. 15 Örnek bir streptogramin olan dalfopristin molekülü 21
Şekil 2. 16 Kloramfenikol molekülü....22
Şekil 2. 17 Örnek bir oksazolidino olan linezolid molekülü 22
Şekil 2. 18 Örnek bir aminoglikozid olan streptomisin molekülü....23
Şekil 2. 19 Örnek bir aminoglikozid olan kanamisin molekülü 23
Şekil 2. 20 Örnek bir aminoglikozid olan amikasin molekülü 23
Şekil 2. 21 Örnek bir aminoglikozid olan tobramisin molekülü 24
Şekil 2. 22 Örnek bir aminoglikozid olan netilmisin molekülü....24
Şekil 2. 23 Örnek bir aminoglikozid olan gentamisin molekülü 24
Şekil 2. 24 Örnek bir aminoglikozid olan sisomisin molekülü....25
Şekil 2. 25 Örnek bir aminoglikozid olan isepamisin molekülü....25
Şekil 2. 26 Örnek bir aminoglikozid olan neomisin molekülü....26
Şekil 2. 27 Örnek bir aminoglikozid olan paromomisin molekülü....26

Şekil 2. 28 Örnek bir aminoglikozid olan spektinomisin molekülü.....27
Şekil 2. 29 Tetrasiklin molekülü 27
Şekil 2. 30 Örnek bir glisilsiklin olan tigesiklin molekülü 28
Şekil 2. 31 Trimetoprim molekülü 29
Şekil 2. 32 Sülfonamid molekülü.....29
Şekil 2. 33 Polimiksin B molekülü 30
Şekil 2. 34 Polimiksin E (Kolistin) molekülü.....30
Şekil 2. 35 Daptomisin molekülü 31
Şekil 2. 36 Peptid (amid) bağının genel gösterimi 34
Şekil 2. 37 Peptid (amid) bağının kısmi çifte karakteri 34
Şekil 2. 38 α-sarmal peptidlerin şematik gösterimi. 37
Şekil 2. 39 Membran aktif AMP'lerin aktivite mekanizmalarının şematik gösterimi 38
Şekil 2. 40 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların genel gösterimi 44
Şekil 2. 41 Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların genel gösterimi 46
Şekil 2. 42 N-Süksinimidil 3 – (2-piridilditiyo) propiyonat 48
Şekil 2. 43 LC -SPDP.....48
Şekil 2. 44 Sülfo LC-SPDP.....48
Şekil 2. 45 SMPT 49
Şekil 2. 46 MBS 49
Şekil 2. 47 Sülfo MBS 49
Şekil 2. 48 SIAB (succinimidyl (4-iodoacetyl)aminobenzoate) 50
Şekil 2. 49 SMPB ((succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrate) 50
Şekil 2. 50 GMBS (N-γ-maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester) 50
Şekil 2. 51 MBS varlığında sentezlenen konjugatın reaksiyon mekanizması 51
Şekil 2. 52 MPBH.....52
Şekil 2. 53 PDPH 52
Şekil 2. 54 NHS-ASA.....53
Şekil 2. 55 SASD.....53
Şekil 2. 56 HSAB 53
Şekil 2. 57 ASIB.....54

Şekil 2. 58 APDP.....54
Şekil 2. 59 Benzofenon - 4 - iyodoasetamid.....54
Şekil 2. 60 Benzofenon - 4 - maleimid.....55
Şekil 2. 61 Karbonil grubunu hedef alan ve fotoreaktif fonksiyonel grup içeren heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olan ABH.....55
Şekil 2. 62 Arjinin grubunu hedef alan ve fotoreaktif fonksiyonel grup içeren bir heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olan APG.....56
Şekil 2. 63 EDC molekülü.....57
Şekil 2. 64 EDC kullanılarak sentezlenen biyokonjugat mekanizması.....58
Şekil 2. 65 EDC sülfo NHS kullanılarak yapılan konjugasyonun reaksiyon mekanizması.....59
Şekil 2. 66 CMC.....59
Şekil 2. 67 DCC.....60
Şekil 2. 68 DIC.....60
Şekil 2. 69 CDI.....60
Şekil 3. 1 2. Yöntemle sentezlenen Peptid-PAA konjugasyonunun hazırlanış şeması.....65
Şekil 3. 2 2. Yöntemle sentezlenen Peptid-PAA konjugasyonunun hazırlanış şeması.....65
Şekil 3. 3 Mambranlı santrifüj tüpü ile saflaştırmaya ait şematik gösterim.....66
Şekil 3. 4 Antimikrobiyal analizin şematik gösterimi.....71
Şekil 4. 1 1:1 Oranında hazırlanan peptid-PAA fiziksel kompleksine ait peptid kıyaslamalı floresans spektrumu.....72
Şekil 4. 2 1:1 Oranında hazırlanan peptid-PAA fiziksel kompleksine ait sayıca boyut dağılım grafiği.....73
Şekil 4. 3 Farklı 2 yöntemle sentezlenen n=9 oranındaki konjugata ait konjugat (üst faz) ve alt faz (reaksiyona girmeyen peptid) floresans ölçümlerine ait karşılaştırmalı spektrumlar.....74
Şekil 4. 4 Farklı 2 yöntemle sentezlenen A) n=1, 3, 5, 7, 9 oranındaki konjugatlara ait 280 nm'deki UV absorbansları B) n=9 konjugatına ait

zeta potansiyel sonuçları (mV) 74
Şekil 4. 5 n_{Peptid}/n_{PAA}= 1, 3, 5, 7 ve 9 oranlarında sentezlenen konjugatların 280 nm'de UV absorbans değerlerine ait grafik.....75
Şekil 4. 6 n_{Peptid}/n_{PAA} = 1 oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu.....76
Şekil 4. 7 n_{Peptid}/n_{PAA} = 3 oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu.....76
Şekil 4. 8 n_{Peptid}/n_{PAA} = 5 oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu 77
Şekil 4. 9 n_{Peptid}/n_{PAA} = 7 oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu 77
Şekil 4. 10 n_{Peptid}/n_{PAA} = 9 oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu 78
Şekil 4. 11 n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7 ve 9 oranlarındaki konjugatların kıyaslamalı floresans spektrumu.....78
Şekil 4. 12 n_{Peptid}/n_{PAA}= 1 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği.....80
Şekil 4. 13 n_{Peptid}/n_{PAA}= 3 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği.....80
Şekil 4. 14 n_{Peptid}/n_{PAA}= 5 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği.....81
Şekil 4. 15 n_{Peptid}/n_{PAA}= 7 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği.....81
Şekil 4. 16 n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği.....82
Şekil 4. 17 A) Serbest peptide ve **B)** PAA polimerine ait sayıca boyut grafiği.....82
Şekil 4. 18 n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 5, 7 ve 9 olan konjugatlara ait polimer kıyaslamalı GPC UV kromatogramı 84
Şekil 4. 19 n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 5, 7 ve 9 olan konjugatlara ait polimer kıyaslamalı GPC RALS kromatogramı 84
Şekil 5. 1 Konjugatların (n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 9) λ_{max} değerlerindeki floresans kayma.....91
Şekil 5. 2 Konjugatların (n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 9) peptid ve polimer kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri.....92
Şekil 5. 3 Konjugatların (n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 9) peptid kıyaslamalı boyut değerleri 93

Şekil 5. 4 Serbest peptid ve n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 7 ve 9 olan konjugatların pH'a bağlı % peptid konsantrasyon değişimleri.....94
Şekil 5. 5 Serbest peptid ve $n_{Peptid}/n_{PAA} = 9$ oranındaki konjugatın farklı sıcaklıklara (25, 30, 40, 60, 80, 100°C) a) 30 dakika ve b) 60 dakika maruz kaldığındaki % peptid konsantrasyon değişimleri 95
Şekil 5. 6 Serbest peptid ve $n_{Peptid}/n_{PAA} = 9$ oranındaki konjugatın farklı sıcaklıklara (25, 30, 40, 60, 80, 100°C) a) 30 dakika ve b) 60 dakika maruz kaldığındaki % peptid konsantrasyon değişimleri 97

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Geleneksel antibiyotiklerin, katyonik antimiktobiyal peptidler ile karşılaştırılması.....36

Tablo 2. 2 Membran aktif AMP'lerin aktivite mekanizmaları 40

Tablo 3. 1 Kullanılan kimyasal malzemeler 62

Tablo 4. 1 Sentezlenen konjugatların ve aynı oranlardaki serbest peptidlerin karşılaştırmalı λ_{max} değerleri.....79

Tablo 4. 2 Sentezlenen konjugatların, peptidin ve polimerin boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları.....83

Tablo 4. 3 n_{Peptid}/n_{PAA}= 7, 9 ve serbest peptidin kıyaslamalı pH ile değişen peptid konsantrasyonu (%) 85

Tablo 4. 4 n_{Peptid}/n_{PAA}= 7,9 ve serbest peptidin kıyaslamalı sıcaklık ile değişen peptid konsantrasyonu (%).....86

Tablo 4. 5 *E.coli*'ye ait Broth-Mikrodilüsyon analizi sonuçları……..87

Tablo 4. 6 *S.aureus*'a ait Broth-Mikrodilüsyon analizi sonuçları……87

Tablo 4. 7 n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 ve serbest peptidin kıyaslamalı MIC değerleri……88

ÖZET

Antimikrobiyal Peptid Konjugasyonu, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivite Değerlendirilmesi

Yiğit Can BAYCILI

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Eş-Danışman: Prof. Dr. Serap DERMAN

Patojenlerin neden olduğu bulaşıcı hastalıkların bir kısmı günümüzde, çok çeşitli antibiyotiklerle tedavi edilebilmektedir. Fakat dünya çapında büyük bir sorun olan antibiyotik direnci, klinik uygulamalar için yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinden daha hızlı yayılmaktadır. Dirençli bakteri suşlarının hızlı bir şekilde artması ve çoklu bakteri direncinin ortaya çıkması, halk sağlığı için önemli tehditler oluşturmaktadır ve alternatif yolların aranmasına neden olmaktadır. 2050 yılına kadar, küresel çapta, antibiyotiğe dirençli patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar sebebiyle yaklaşık 10 milyon insanın hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir. Bu sayı, çeşitli kanser türleriyle ilişkili mevcut ölümlerin sayısından daha fazladır. Ayrıca onaylanmış yeni antibiyotik sayısı da son 30 yılda önemli ölçüde azalmıştır. Sonuç olarak alternatif bir antimikrobiyal strateji bulmak zorunlu hale gelmektedir. Antibiyotik direncinden etkilenmeyen antimikrobiyal peptidler ise antibiyotiklere alternatif olabilme potansiyeline sahip kimyasallardır. Lakin

antimikrobiyal peptidler, enzimatik degredasyona açık moleküller olup, biyolojik sistemdeki kalış süreleri (yarılanma ömürleri) kısadır. Antimikrobiyal peptidlerin polimerler ile sentezlenen konjugatları, peptidi enzimatik degredasyonlardan koruyarak yarı ömrünü uzatır ve biyolojik aktivitesini arttırır.

Bu tez çalışmasında, *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği kanıtlanmış HF-18 peptidi, yarı ömrünün uzatılması için poliakrilik asit (PAA) polimeri ile konjuge edilmiştir. Konjugasyon 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid çapraz bağlayıcı varlığında, n_{peptid}/n_{PAA} = 1,3,5,7,9 oranlarında gerçekleştirilmiştir. Konjugasyonun gerçekleştiği, UV-Vis spektrofotometre, Floresans spektroskopisi, Zeta potansiyel ve Boyut ölçümleri ve GPC aracılığıyla kanıtlanmıştır. HF-18 peptidinin ve HF-18 peptidi ile poliakrilik asit konjugatının stabilite ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları karşılaştırmalı olarak yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, antimikrobiyal peptid, konjugasyon, HF-18 peptid.

ABSTRACT

Antimicrobial Peptide Conjugation, Characterization and Evaluation of Biological Activity

Yiğit Can BAYCILI

Department of Chemistry

MSc Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Co-supervisor: Prof. Dr. Serap DERMAN

Some of the infectious diseases caused by pathogens can now be treated with a wide variety of antibiotics. But antibiotic resistance, which is a major worldwide problem, is spreading faster than new antibiotics are developed for clinical applications. The rapid growth of resistant bacterial strains and the emergence of multiple bacterial resistance become a significant threat to public health and cause alternative routes to be sought. By 2050, it is estimated that around 10 million people will die globally from infections caused by antibiotic-resistant pathogens. This number is greater than the current number of deaths associated with various types of cancer. In addition, the number of new approved antibiotics has decreased significantly in the last 30 years. As a result, it becomes imperative to find an alternative antimicrobial strategy. Antimicrobial peptides that are not affected by antibiotic resistance are chemicals that have the potential to be an alternative to antibiotics. However, antimicrobial peptides are molecules that are open enzymatic degradation and therefore their residence time in the biological system (half-life) is short. Conjugates of antimicrobial peptides synthesized with polymers

protect the peptide from enzymatic degradation, prolonging its half-life and increasing its biological activity.

In this thesis study, HF-18 peptide, which has proven to have antimicrobial activity against *Staphylococcus aureu*s bacteria, was conjugated with polyacrylic acid (PAA) polymer to prolong its half-life. Conjugation was carried out in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide crosslinker at $n_{peptide}/n_{PAA}$ = 1,3,5,7,9 ratios. Conjugation has been proven by UV-Vis spectrophotometer, Fluorescence spectroscopy, Zeta Potential and Size analysis and GPC analysis. Stability and antimicrobial activity analysis of HF-18 peptide and HF-18 peptide and polyacrylic acid conjugate were made comparatively.

Keywords: Antimicrobial activity, antimicrobial peptide, conjugation, HF-18 peptide.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Antibiyotiklerin geliştirilmesi, 20. yüzyılda tüberküloz, zatürre, tifo ve menenjit gibi korkunç bulaşıcı hastalıklarla mücadelede önemli bir rol oynamıştır [1].

Tedavi edilemeyeceğine inanılan bakteriyel hastalıklar antibiyotiklerle etkin bir şekilde tedavi edildiği için antibiyotik çağı "antibiyotiklerin altın çağı" olarak da adlandırılmıştır. Maalesef "Antibiyotiklerin altın çağı" çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin evrimine yol açan kontrolsüz ve gelişigüzel antibiyotik kullanımı nedeniyle kısa sürede sona ermiştir [2]. Sadece Avrupa'da birden çok ilaca dirençli bakteriyel enfeksiyonlar nedeniyle her yıl 25.000 kişinin öldüğü ve bunun Avrupa Birliği Ekonomisi'ne yıllık 1.5 Milyar €'ya mal olduğu tahmin edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 2 milyondan fazla insanın antibiyotiğe dirençli bakteri ile enfekte olduğu ve sonuç olarak yılda 23.000 kişinin hayatını kaybettiği ve bunun ekonomiye 55-70 milyar $'a mal olduğu bilinmektedir [3].

S. aureus, 130 yıldan daha uzun süre önce saptanmış, bir patojen olup, süpüratif enflamasyonların etyolojik ajanı olarak tanınmıştır. Bu patojen, yumuşak doku enfeksiyonlarından, insan hayatını tehdit edebilecek endokardite (kalbin ve kalp kapakçıklarının enflamasyonu) ve osteomiyelite (enflamasyonun kemik dokuda hasar yaratması) kadar birçok hastalığa yol açabilir. 20. yüzyılın ortalarında penisilin ve metisilin gibi antibiyotiklerin keşfi gerçekleşmiş ve bu antibiyotikler S. aureus'a karşı aktivite göstermişlerdir. Ancak *S. aureus*'un antibiyotik direnci kazanması uzun sürmemiş, penisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (PRSA) ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tedavisi oldukça güç olmuştur [4]. Örneğin, eritromisin 1950'li yılların başında, penisiline alternatif olarak, *S. aureus* tedavisi için piyasaya sürülmüş lakin bir yıldan az bir süre sonra S. aureus bakteri izolatlarının %70'inin eritromisine direnç kazanması sebebiyle piyasadan çekilmiştir [5].

Son yirmi yılda, antibiyotik direncinden etkilenmeyen, potansiyel yeni antimikrobiyal ajanlar olarak nitelendirilen antimikrobiyal peptidlerin (AMP'lerin) tasarımı, antimikrobiyal aktiviteyi arttırmak için yeni yaklaşımlar olarak ilgi görmektedir.

AMP'ler, bağışıklık sisteminin önemli bileşenlerinden olup; canlı organizmalarda virüsler, bakteriler ve funguslar gibi patojenlere karşı savunma hattına katılan doğal moleküllerdir [6]. Bunlar çoğunlukla pozitif yüklü kısa zincirler olup, bazıları konak savunma sistemini modüle edip dolaylı olarak aktivite gösterirken, çoğu ise mikrobiyal patojenleri direkt olarak öldürür. Bu sebeple AMP'ler, halı hazırda klinik çalışmalarda; anti-enflamatuar, yara iyileşmesini destekleyen ajanlar olarak da değerlendirilmektedirler [7]. Yapılarındaki pozitif yüklü aminoasitler, negatif yüklü bakteri membranıyla elektrostatik olarak etkileşirken, hidrofobik gruplar ise membrandaki lipid gruplarıyla etkileşir ve bunun sonucunda farklı mekanizmalar ile aktivite gösterirler. Ancak AMP'lerin, uygulanabilir antibiyotiklere dönüşmesini sınırlayan bazı engeller mevcuttur. Bu engeller arasında; pozitif yüklerinden kaynaklı toksisite bulunur. Ayrıca biyolojik sistemde kolayca enzimatik degredasyona uğrayabildikleri için yarılanma süreleri yetersiz olup bütün bu etkenlerin sonucunda düşük aktivite göstermeleri yer alır [8, 9].

Biyomolekül özelliğinde olan doğal kaynaklı AMP'ler; sıcaklığa, pH'a, organik çözücülere ve hidrolize duyarlıdırlar. Peptid dizilerinin sentetik polimerler ile kimyasal olarak bağlanması, bu gibi sınırlamaları azaltıp AMP'leri pratik uygulamaya geçirebilir. Peptid dizisinin uygun polimer ile konjugasyonu, ortam ve peptid arasındaki etkileşimleri düzenleyip, peptidin kimyasal işlevselliği ile polimerin kimyasal stabilitesini ve işlenebilirliğini birleştirir ve aynı zamanda peptidin biyolojik sistemdeki yarılanma süresini uzatır [10].

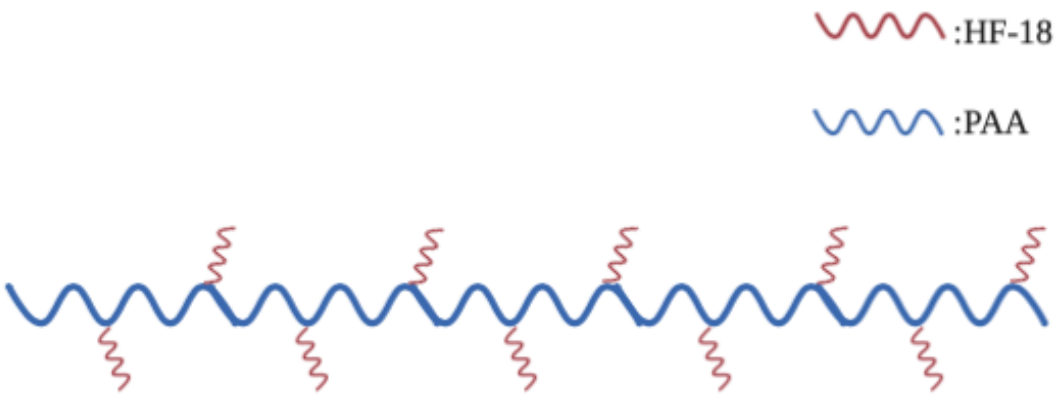
Literatürde AMP'lerin polimerler ile sentezlenen konjugatlarının, serbest peptide kıyasla daha düşük sitotoksite gösterdiği ve *in vivo* stabilitelerinin ise arttığı belirtilmiştir. Bu konjugasyonun gerçekleştirilmesi; geniş spektrumlu

antimikrobiyal uygulamalarda, yara örtülerinde ve kaplamalarda AMP'lerin kullanım potansiyellerini artırabilir [11].

1.2 Tezin Amacı

Tezin temel amacı, antibiyotik dirençli bakterilerden kaynaklanan enfeksiyon hastalıklarının önüne geçebilecek bir formülasyonun sentezi ve bu formülasyonun literatüre kazandırılmasıdır. Omurgalı ve omurgasız canlılarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunan AMP'ler [7] doğa tarafından çeşitli mikroorganizmalarla savaşmak için uzun zamandır kullanılsa da laboratuvarlarda sıklıkla çalışılmaya yeni başlanmıştır [12].

Bu çalışmada da doğal bir peptidden esinlenilip tedarik edilmiş olan HF-18 peptidinin PAA polimeri ile konjugatlarını sentezleyerek (Şekil 1.1) sıcaklık, pH gibi koşullara dayanıklı hale getirmek, yarılanma ömrünü uzatmak ve stabilitesini arttırmak hedeflenmektedir. İlk defa bu çalışmada PAA polimeri ile konjugatları sentezlenecek olan HF-18 peptidinin (Gly-Phe-Phe-Lys-Lys-Ala-Trp-Arg-Lys-Val-Lys-Lys-Ala-Phe-Arg-Arg-Val-Leu) karakterizasyonu ve antimikrobiyal aktivite tayini, serbest peptid ile karşılaştırmalı olarak yapılmıştır.



Şekil 1. 1 Sentezlen konjugatın şematik gösterimi

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında antimikrobiyal özellikteki sentetik peptidin PAA polimeri ile biyokonjugatlarının farklı oranlarda sentezlenmesi, bu biyokonjugatların

analizlerinin yapılması ve serbest peptid ile karşılaştırmalı olarak aktivitelerinin incelenmesi hedeflenmektedir.

HF-18 peptidinin amino gruplarının PAA polimerinin karboksilik asit grupları ile EDC varlığında çapraz bağlanması sonucunda, sentezlenen konjugatın fluoresans spektrumunun serbest peptide kıyasla kayma göstermesi ve konjugat pikinin GPC kromotogramında peptide göre daha erken çıkması beklenmektedir.

Sentezlenen konjugatın, serbest peptide oranla daha stabil olması ve aktivitesinin en az serbest peptid kadar olması beklenmektedir. Bu sayede de dünyada önemli bir sorun haline gelmiş olan antibiyotik direncinin üstesinden gelmek adına; geniş spektrumlu antimikrobiyal uygulamalarda, yara örtülerinde ve kaplamalarda kullanılabilecek olan alternatif bir formülasyonun literatüre kazandırılabileceği düşünülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Antibiyotikler

2.1.1 Antibiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi

Hastalıkları çeşitli kimyasallar kullanarak tedavi etmek, Eski Mısır, Babil, Uzak Doğu ve İnkalara kadar uzanmaktadır [13]. Geçmişteki bu tedavi yöntemleri arasında, açık yaralara veya kesiklere küf uygulamak, antibakteriyel olduğu bilinen turp, pırasa, sarımsak ve soğan yemek gibi ilkel yolları içerir.

Mikrobiyoloji dalının ilk günlerinden beri, bir organizmanın diğerinin büyümesi üzerine olan etkisi merak konusu olmuş ve bunun üzerine yoğun araştırmalar yapılmıştır. 1871 yılında bu alanda çalışmalarını yürüten Sir John Burdon-Sanderson, havaya maruz kalan bir ortamda bakteri oranının hızla arttığını gözlemledi. Eğer bu ortamda üzerinde *Penicillium* küfü olan bir et suyu mevcutsa, bu et suyunun üzerinde bakteri oranının daha az olduğunu da belirledi [14]. Sir John Burdon-Sanderson'ın yanı sıra, William Roberts, John Tyndall ve Joseph Lister gibi kişiler de *Penicillium* ile ilgili eş doğrultuda gözlemleri olduğunu bildirdiler [15, 16, 17].

Bir mikroorganizmanın büyümesinin diğer mikroorganizmalar tarafından terapötik olarak engellenebileceğini belirtme potansiyeline sahip en eski araştırma, Pasteur ve Joubert'in hava yoluyla taşınan organizmalar tarafından, *Bacillus anthracis* bakterisinin sebep olduğu şarbon hastalığının engellenmesinin mümkün olabileceğini keşfettiği yayındadır [18]. Kısacası antibiyozis, 19. Yüzyılın ortasında keşfedilmiştir.

Antimikrobiyal bir ajan arayışı sürerken, antiseptiklerin yaraya direkt olarak uygulanması dışındaki herhangi bir uygulamanın biyolojik sistem için zararlı olduğu da keşfedilmiştir. Alman bakteriyolog Paul Ehrlich, "Sihirli Mermi" diye adlandırdığı, asıl adı Arsfenamin/Salvarsan/Madde 606 olan arsenik bazlı bir

molekülün *Treponema pallidum* bakterisinin yol açtığı ve cinsel yolla bulaşan bir hastalık olan frengi hastalığına tedavi olabileceğini belirtmiştir [19].

Alexander Fleming, lizozim enziminin antibakteriyel aktivitesini keşfettiğinde Londra'daki St. Mary Hastanesi'nde çalışıyordu. Yanlışlıkla petri kaplarına doğru hapşırmasından sonra, mukusunun geldiği petri kaplarında herhangi bir koloni oluşmadığını fark ettiğinde, İnhibisyon Bölgesi terimini keşfeden ilk kişi oldu. Testlerini ilerlettiğinde ise lizozim enziminin çoğunlukla patojenik özellik göstermeyen organizmalara karşı aktivite gösterdiğini gözlemledi [20, 21].

1928 yılında, tatile çıkmasından sonra laboratuvarına dönen Alexander Fleming, bir kere daha tesadüf sonucu açıkta bıraktığı petri kabında üreyen *Penicillium notatum*'un (yeşil renkli küf mantarı) gram-pozitif bir bakteri olan *Staphylococci* ile küflendiğini, ancak küf ile bakteri arasında boş bir alan olduğunu fark etti. Bu boş alanın oluşma sebebinin oluşan küfün *Staphylococci*'yi parçalaması olduğuna kanaat getirdi.

Bu küfün bakterileri öldürebilme potansiyeline sahip olan süzüntüsü ise Penisilin olarak adlandırıldı. Böylece bilinen antibiyotik keşfedilmiş oldu [20].

2.1.2 Antibiyotik Türleri

Antimikrobiyaller, etki mekanizmalarına göre beş sınıfta toplanırlar:

İlk sınıf; hücre duvarı sentez inhibitörleri olarak adlandırılır ve beta-laktamlar ve glikopeptidler bu sınıftadır.

İkinci sınıf; protein sentez inhibitörleri olarak adlandırılır ve 50S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (makrolidler, ketolidler, linkozamidler, streptograminler, kloramfenikol, oksazolidinonlar) ve 30S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (aminoglikozidler, tetrasiklinler, glisilsiklinler) bu sınıftadır.

Üçüncü sınıf; nükleik asit sentez inhibitörleri olarak adlandırılır ve kinolonlar, rifamisinler ve metronidazoller bu sınıftadır.

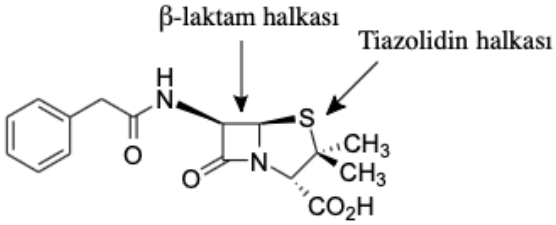
Dördüncü sınıf; antimetabolitler olarak adlandırılır ve trimetoprim-sülfametoksazol ve para-amino salisilik asit bu sınıftadır.

Beşinci sınıf; membran bütünlüğünü bozanlar olarak adlandırılır ve peptid antibiyotikler, antimikrobiyal peptidler ve ribozomal peptidler bu sınıfta yer alır [22].

2.1.3 Hücre Duvarı Sentez İnhibitörleri

2.1.3.1 β-laktamlar

β-laktam antibiyotikler, en yaygın reçete edilen ilaç listesinde ilk sırada gelen [23] antibiyotik sınıflarından biridir. Yirminci yüzyılın ortasında oraya çıkan bu antibiyotik sınıfı sayesinde bakteriyel bulaşıcı hastalıklarla mücadele büyük ölçüde değişmiştir. Günümüzde bu antibiyotikler, antibiyotik pazarının %65'ini oluşturmakla beraber, yıllık harcamaların yaklaşık olarak 15 milyar ABD doları olduğu hesaplanmıştır [24]. Prototip bir β-laktam olan penisilin (Şekil 2.1), bir tiazolidin halkası, bir β-laktam halkası ve bir yan grup içeren bir 6-aminopenisillanik asittir.



Şekil 2. 1 Penisilin molekülü

Bu tip antibiyotikler, geniş bir bakteri spektrumuna karşı aktivite gösterebildiklerinden, insana karşı toksisiteleri düşük olduğundan ve bakteriyel enfeksiyonları tedavi ederek sağlık üzerinde küresel açıdan olumlu bir etkiye sahip oldukları için, penisilin ve diğer-laktam antibiyotikler muhtemelen şimdiye kadar keşfedilmiş olan en önemli ilaç sınıfı olarak kabul edilmektedir [25, 26].

Bu sınıfta olan antibiyotikler; penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlardır.

- Penisilinler

Penisilinler doğal ve sentetik olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Doğal penisilinler en dar aktivite spektrumuna sahip olan sınıftır ve bu sınıfta, parenteral yol (terapötik ajanların (ilaçların) sindirim sistemi dışındaki tüm yollarla verilmesi) aracılığıyla tedavide kullanım amaçlı olan Penisilin G (benzilpenisilin) ve oral yol aracılığıyla tedavide kullanım amaçlı olan Penisilin V (fenoksimetilpenisilin) bulunmaktadır. Sulu kristal Penisilin G ana ilaçtır ve dört farklı tuz formunda mevcuttur. Bunlardan potasyum ve sodyum tuzu formları, saklama esnasında penisilin molekülünü stabilize etmek için tasarlanmış formülasyonlardır. Benzatin ve prokain tuzu formları ise daha yavaş emilim ve dolayısıyla daha uzun etki süresi için tasarlanmıştır. Penisilin G, hassas organizmalara karşı oldukça etkilidir ve doku penetrasyonu çok iyidir. Hem oral hem de parenteral formda bulunmasına karşın mide salgılarıyla kolayca inaktive olabilmesi sonucu sadece oral yol aracılığıyla çeşitli tedavilerde kullanılır. Penisilin G, beta-laktamaz üreten organizmalara karşı etki göstermez. Potasyum veya sodyum tuzu formundaki sulu kristalin Penisilin G, organizma üzerinde hızlı bir etki gösterir ve uygulamadan sonraki 30 dakika içinde en yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşır. Lakin 30-60 dakikalık kısa yarılanma ömrü, doz alımının sık olmasını gerektirir. Ancak yine bu nedenle sürekli veya sık aralıklı intravenöz tedavi (sıvı solüsyonların serum yoluyla doğrudan kan akımına verilmesi) aracılığıyla kullanımı mümkündür. Penisilin G'nin düşük konsantrasyonlarda bile yüksek aktivite göstermesi ve dar aktivite spektrumu, perinatal dönemde (21. gebelik haftası ile doğumdan sonraki bir aylık dönem) gelişen grup B streptokok (GBS) profilaksisinin tedavisi için muazzam bir ilaç yapmaktadır [27]. Potasyum tuzu formundaki kristal Penisilin G, intravenöz olarak verildiğinde uygulama yerinde bir yanma hissi yaratabilir; bu, sodyum tuzu formundaki kristal Penisilin G'de olmayan bir yan etkidir.

İntravenöz uygulama mümkün olmadığında, prokain tuzu formundaki penisilin veya benzatin tuzu formundaki penisilin kullanılabilir. Bu ilaçlar, sulu kristalin Penisilin G ile aynı antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahiptir, ancak yarı ömürleri daha uzundur. Penisilin G prokain ile birleştiğinde enjeksiyon yerinden daha yavaş emilen bir formülasyon meydana gelir. Bu formülasyon, ilacın kandaki kalış ve dolanımını uzatır. Prokain tuzu formundaki Penisilin G, günde iki ila üç

kez kas içinden verilebilir. Geleneksel olarak *Neisseria gonorrhoeae* ve *Streptococcus pneumoniae*'nin neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılır. Ancak her iki organizmanın direnç suşlarının ortaya çıkması, son yıllarda prokain tuzu formundaki penisilinin bu enfeksiyonlara karşı olan aktivitesini sınırlamıştır [28].

Benzatin penisilin (Bicillin LA), Penisilin G'nin yavaş salınan şekillerinden ikincisidir. Kas içinden verildiğinde penisilin haftalarca vücutta kalır ve bu ilacı ayakta tedavi için başarılı bir aday haline getirir. Benzatin penisilin, en yaygın olarak erken ve geç evre sifilis tedavisinde kullanılır.

Diğer bir doğal penisilin olan Penisilin V, mide ortamında stabil olduğundan doğal penisilinin oral yol aracılığıyla vücuda verilmesi istendiğinde tercih edilen ilaçtır. Penisilin V, ince bağırsaktan kolaylıkla emilmesine rağmen, nispeten düşük pik plazma seviyelerine ulaşır ve sadece duyarlı organizmaların neden olduğu hafif, lokal enfeksiyonlarda kullanılmalıdır [28]. Penisilin V halen streptokokal farenjit için tercih edilen ilaç olarak kabul edilmektedir [29].

Sentetik penisilinler, penisilinaz üreten bakterilerin keşfinden sonra üretilmeye başlanmıştır. Bu ilaç grubu, çeşitli organizmaların ürettiği penisilinazın penisilin molekülüne girmesini ve beta-laktam halkasını parçalamasını önleyen geniş bir yan zincirin penisilin molekülüne eklenmesiyle etkinliğini sağlar [28]. Bu nedenle, bu ilaçlar "antistafilokokal penisilinler" olarak kabul edilebilir.

Metisilin bu ilaçların prototipidir, ancak artık eski yaygınlığını kaybetmiştir. Bunun sebebi MRSA gelişiminin metisilini etkisiz hale getirmesi ve bu sebeple yan etkilerinin dışında neredeyse bir aktivite gösterememesidir. Bu kategoride halen Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan ilaçlar nafsilin, oksasilin, kloksasilin ve dikloksasilindir. Nafsilin sadece intravenöz kullanım için kullanılır. Kloksasilin ve dikloksasilin sadece oral ajanlar olarak kullanılır.

Bu ilaçların aktivite spektrumu, penisilinaz üreten bakteri kaynaklı deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak için uygundur. Hemolitik streptokokal farenjitte ve PRSA enfeksiyonlarının kanıtlandığı veya şüphelendiği pnömonide de (zatürre) yararlı olabilirler [30]. Dikloksasilin,

penisilinaz üreten stafilokoklara karşı özellikle etkilidir ve mastitis (göğüs iltihabı) için tercih edilen tedavidir çünkü oral uygulama diğer ilaçlara kıyasla nispeten yüksek biyoyararlanım sağlar [31].

Diğer bir sentetik penisilin grubu olan Aminopenisilinler gram-negatif bakterilere karşı aktivite gösteren ilk penisilin grubudur. Benzilpenisiline bir adet amino grubu eklenerek sentezlenen bu ilaç grubunun prototipi ampisilindir. Şu anda aminopenisilinler, Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık reçete edilen antibiyotik sınıfıdır. Penisilinin bu alt kategorisinde üç ilaç mevcuttur: ampisilin, amoksisilin ve bakampisilin.

Her üç ilaç da gram pozitif ve gram negatif organizmalara karşı neredeyse aynı geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir. Amoksisilin, oral yol aracılığı ile vücuda verildiğinde ampisilinden daha iyi emilir. Amoksisilin, daha yüksek serum seviyelerine ulaşır ve daha uzun yarılanma ömrüne sahiptir. Bu nedenlerle amoksisilin, genellikle oral yol aracılığı ile gerçekleştirilecek olan tedavilerde ampisilinin yerini almıştır. Ek bir avantaj olarak amoksisilinin ampisiline nazaran diyare (ishal) yapma oranı daha azdır [32]. Amoksisilin genel olarak 8 saatte bir uygulanan bir ilaç olup orta kulak iltihabı ve maksiller sinüzit için tercih edilen bir ilaçtır [33, 34].

Ampisilin hem parenteral hem de oral formülasyonlarda bulunan tek aminopenisilindir. Oral bir ilaç olarak mevcut olsa da genel olarak intravenöz yoluyla tedaviler için kullanılır [32]. Bakampisilinin ne ampisiline ne de amoksisiline göre terapötik bir avantajı yoktur ve ikisinden de daha pahalıdır. Tek avantajı doz aralıklarında görülmektedir [30]. Yarı ömrünün uzun olması nedeniyle, bakampisilin 12 saatlik aralıklarla verilebilir. Ampisilinden en az 6 saatte bir yeni bir doz alınması gerekir. Hem ampisilin hem de amoksisilin, bakteriyel endokardite karşı profilaksi için ve gastrointestinal ve genitourian prosedürlerden önce profilaksi için kullanılır.

- Sefalosporinler

Sefalosporinler (Şekil 2.2), 7-amino-sefalosporanik asit türevleri olup yapı olarak Penisilin ile yakından ilişkili olan ve beta-laktam halkaları içeren bir antibiyotik

grubudur. Seyreltik asitte nispeten kararlı olup ve penisilinaza karşı oldukça dirençlidirler. Tüm sefalosporinler Gram-pozitif *Coccus*'ların çoğuna karşı aktivite gösterirler. Sefalosporinler kuşaklarına göre sınıflandırılırlar ve toplamda beş kuşak sefalosporin bulunur [35, 36].

Birinci kuşakta; sefalotin, sefazolin, sefaleksin ve sefadroksil bulunur. Esas olarak gram-pozitif bakterilere karşı etkinlikleri mevcut olup gram-negatif bakteri etkinlikleri düşüktür. Sefalotin, kullanıma giren ilk sefalosporindir. Ancak nefrotoksisitesi nedeniyle günümüzde kullanılmamaktadır. Oral yolla tedavi için kullanıma uygunlardır. *Streptococcus pyogenes*'in sebep olduğu akut tonsillofarenjitlerde, deri enfeksiyonlarında, cerrahi enfeksiyonlarda ve profilaksisinde tercih edilmektedir. Sefaleksinin oral formu pediatride akut tonsillofarenjit vakalarının tedavisinde kullanılabilir. Sefaleksinin MIC değeri tonsillofarenjit vakalarında *Streptococcus pyogenes* için yeterlidir [36].

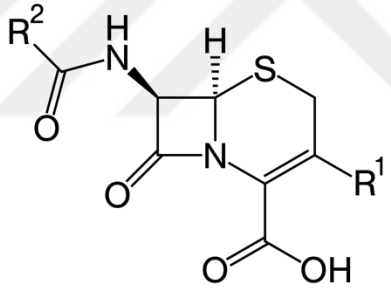
İkinci kuşakta; sefaklor, sefuroksim, sefotetan ve sefoksitin bulunur. Gram-negatif bakterilere karşı olan etkinlikleri birinci kuşağa nazaran daha fazladır. Ayrıca gram-pozitif bakterilere karşı da aktivite gösterirler ve oral yolla tedavi için kullanıma uygunlardır. Lakin beyin omurilik sıvısına yeteri kadar geçemezler. Günümüzde alt ve üst solunum yolu enfeksiyonlarına karşı tedavilerde, otit, sinüzit ve tonsillit tedavilerinde etkin olup; üriner sistem enfeksiyonlarında etkili olanlar özellikle profilakside (hastalığın tedavisinin aksine henüz hastalık meydana gelmeden hastalığın önlenmesi) tercih edilmektedir. Sefuroksimin hem parenteral yol ile tedavi amaçlı kullanılabilecek olan formu (sefuroksim sodyum), hem oral yol ile tedavi amaçlı kullanılabilecek olan formu (sefuroksim-aksetil) mevcuttur, kısmen anaeroplara da etkindir [36].

Üçüncü kuşakta; sefotaksim, seftazidim, seftriakson ve sefiksim bulunur. Gram-negatif bakterilere karşı etkinlikleri, gram-pozitif bakterilere karşı olandan daha fazladır. Yarı ömürleri uzundur (8-12 saat) ve bakterisidal etkiye sahiptirler. Sefatzidim, anti-psödomonal etkinliğe sahiptir. *S. aureus*'a karşı etkinlikleri yoktur. Kullanıma 1980'lerden sonra girmişlerdir. Bu grup içinde ülkemizde de

dünyada da en sık kullanılan seftriaksondur [37, 38]. Seftriakson parenteral yol ile tedavi amaçlı kullanılabilen bir sefalosporindir [36].

Dördüncü kuşakta; sefepim bulunur. Geniş bir spektruma sahiptir olup hem gram-pozitif bakterilere hem de gram-negatif bakterilere karşı etkinlikleri vardır. Gram-negatif bakterilerin dış zarlarına nüfuz edebilecek zwitter iyonlar içerirler. Beta laktamazlara karşı dirençlidirler. Febril nötropenide (Nötrofil sayısının düşmesiyle beraber ateşin çıkması) kullanılan bir ilaç olup anti-stafilokoksik etkinlikleri yoktur. MRSA'ya karşı etkisizdirler. Üçüncü kuşağa nazaran gram-pozitif bakterilere karşı etkinlikleri daha fazladır. Yalnızca parenteral olarak kullanılabilen bu kuşak, özellikle hematoloji servislerinde, febril nötropenik vakalarda, immun yetersizliklerin infeksiyon tedavilerinde yer alır [36].

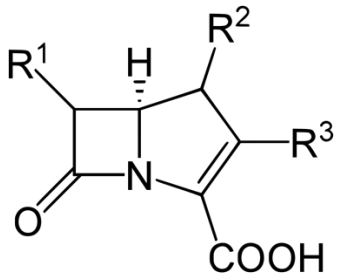
Beşinci kuşakta ise; seftarolin ve seftobiprole bulunur. Bu grup en yeni kuşaktır ve diğer kuşaklardan farkı MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde etkin olmalarıdır. Çocuklarda kullanımları FDA tarafından onaylanmamıştır [36].



Şekil 2. 2 Sefalosporinlerin genel gösterimi

- Karbapenemler

Karbapenemler (Şekil 2.3) beta-laktam antibiyotik grubunun en geniş spektrumlu ve en potent üyeleri olup 1976'dan bu yana gündemdedirler. Karbapenemlerin beta-laktam halkasında tiyazolidinik ekinde 4. pozisyonda sülfon yerine karbon içermeleri onları diğer beta-laktam antibiyotiklerden ayırır. Karbapenem grubu antibiyotiklerin genişleme göstermesi, 1980'li yıllardan bu yana kullanılan imipenem ve meropenem, takiben 2001 yılından bu yana kullanılan ertapenem ve daha sonra doripenemin ve diğer üyelerin gruba dahil olması ile gerçekleşmiştir.



Şekil 2. 3 Karbapenemlerin genel gösterimi

Karbapenemler beta-laktamaz enzimine karşı dayanıklıdırlar. Lakin son dönemlerde karbapenemleri parçalayabileceği keşfedilmiş olan metallo-beta-laktamaz ve serin karbapenemazların ortaya çıkması bu grubun kullanımının verimliliği hakkında endişe uyandırmıştır [39, 40].

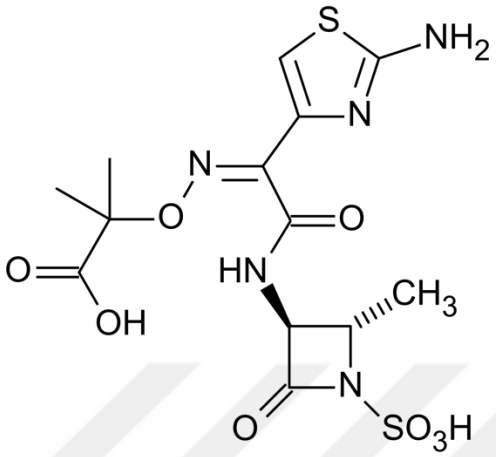
Gram pozitif organizmalara, gram negatif organizmalara ve anaeroplara karşı aktivite gösterebilen karbapenemlerin, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Enterococcus faecium* ve metisilin dirençli stafilokoklara karşı aktiviteleri mevcut değildir [41, 42].

Dış membran proteinlerinde gerçekleştireceği değişiklik sonucu *Pseudomonas aeruginosa,* karbapenemlere karşı dirençli hale gelebilir [43]. Türkiye'de kullanılan karbapenemler; imipenemler [44], meropenemler [41], ertapenemler [45] ve doripenemlerdir [46].

- Monobaktamlar

Monobaktam antibiyotikler (Şekil 2.4) sentetik olarak sentezlenen bileşiklerdir, ancak monosiklik 13-laktam bileşikleri doğada çeşitli toprak bakterilerinde bulunmuştur. Pazara sunulan ilk monobaktam, aztreonamdır. Bu ajan, gentamisine benzer bir antimikrobiyal spektruma sahiptir. Aztreonamın nefrotoksisitesi (böbrekte toksik kimyasallar ve ilaçların yol açtığı zehirleyici etkisi) yoktur lakin kendisi zayıf bir immünojeniktir ve kullanımı sonucu bazı pıhtılaşma bozukluklarının oluştuğu saptanmıştır. Aztreonam, direkt olarak kasa veya intravenöz olarak uygulanabilir ancak oral yolla tedavide emilimi oldukça zayıftır. Eliminasyonunun birincil yolu idrardır. Normal böbrek fonksiyonu olan hastalara 8 saatte bir verilebilir. Eğer kullanacak olan kişinin böbrek yetmezliği mevcutsa alınacak dozun ayarlaması gereklidir. Aztreonamın aktivite spektrumu

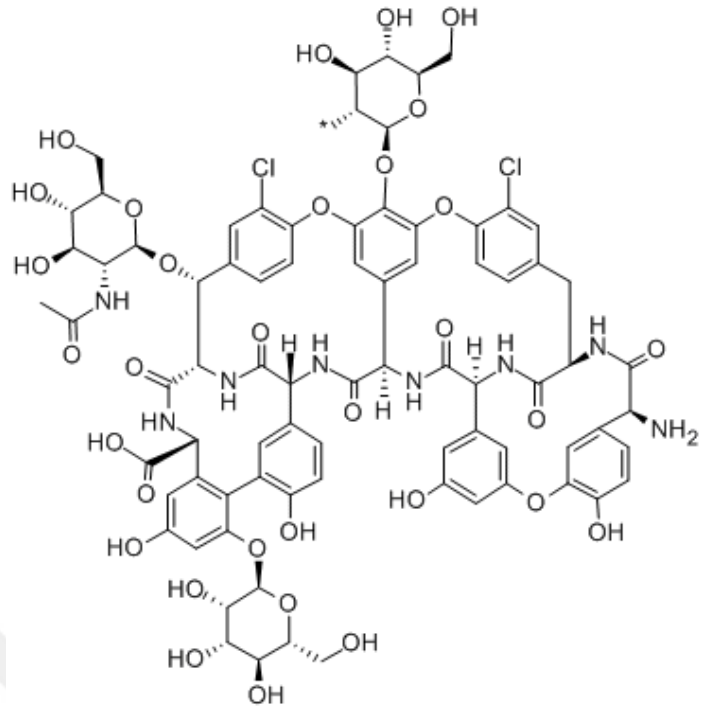
gram-negatif aerobikler ile sınırlıdır. Kullanımı için onaylanmış endikasyonlar arasında idrar yolu ve alt solunum yolu enfeksiyonları, karın içi ve jinekolojik enfeksiyonlar, septisemi ve organizmaların neden olduğu deri enfeksiyonları bulunur [47].



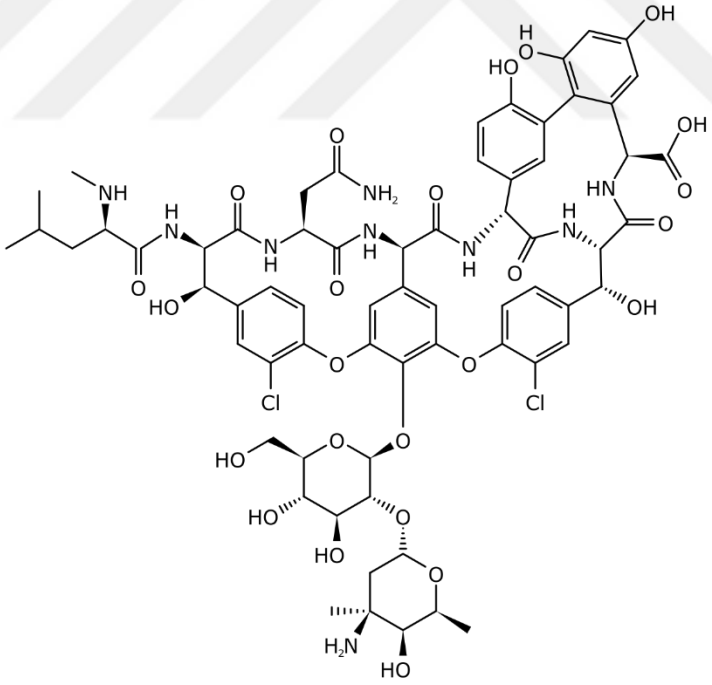
Şekil 2. 4 Örnek bir monobaktam molekülü

2.1.3.2. Glikopeptidler

Bu grupta, teikoplanin (Şekil 2.5) ve vankomisin (Şekil 2.6) gibi büyük polar moleküller bulunur. Glikopeptidler, gram negatif olan bakterilerin hücre çeperinden rahatlıkla geçemediklerinden ötürü, aktiviteleri aerob ve anaerob özellik gösteren gram pozitif bakterilerle sınırlıdır [48].



Şekil 2. 5 Örnek bir glikopeptid olan teikoplanin molekülü



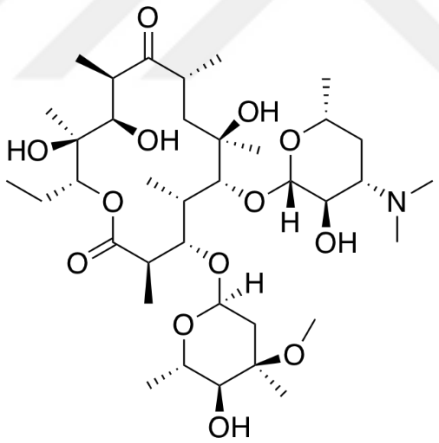
Şekil 2. 6 Örnek bir glikopeptid olan vankomisin molekülü

2.1.4 Protein Sentezini İnhibe Eden Antimikrobiyaller

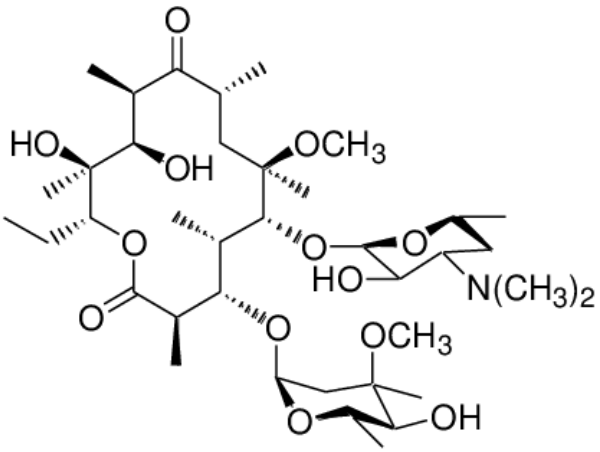
2.1.4.1 50S Ribozomal Alt Üniteye Bağlananlar

- Makrolidler ve ketolidler

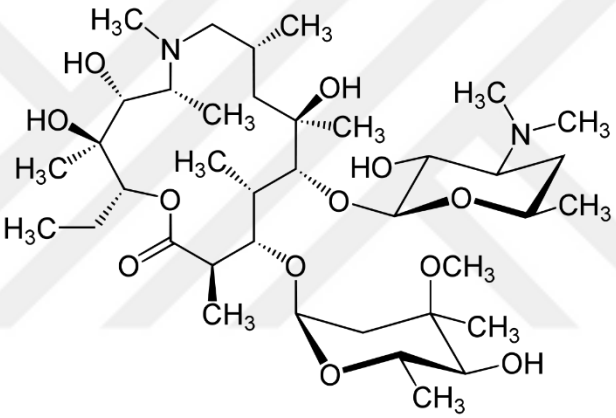
Makrolid grubu antimikrobiyaller [eritromisin (Şekil 2.7), klaritromisin (Şekil 2.8), azitromisin (Şekil 2.9)] ve ketolid grubu antimikrobiyaller [telitromisin (Şekil 2.10), roksitromisin (Şekil 2.11)], ribozomlara bağlanma sureti ile protein sentezini yavaşlatırlar. Aktiviteleri, gram pozitif bakterilere ve hücre içine yerleşen mikroorganizmalara karşıdır. MRSA, *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus* türleri ve penisiline dirençli *pneumoniae* grubuna karşı etkileri bulunmamaktadır. Hidrofobikliğe sahip olmaları sebebiyle gram negatiflerin hücre çeperinden penetre olamazlar [49]. Eritromisinin aktivitesi; *Neisseria* türlerine*, Bordetella pertussis, Treponema pallidum, Ureaplasma urealyticum* ve *Borrelia burgdorferi* gibi türlere karşıdır. Klaritromisinin etki spektrumu eritromisine benzer ancak, bazı bakterilere karşı etkinliği daha fazladır [50].



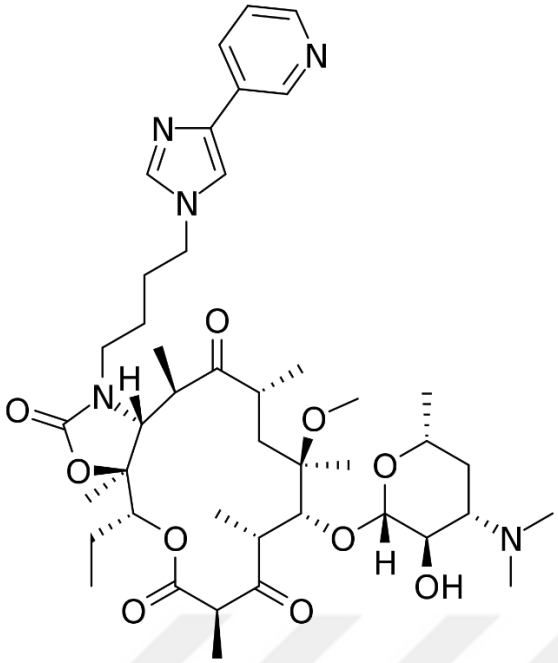
Şekil 2. 7 Örnek bir makrolid olan eritromisin molekülü



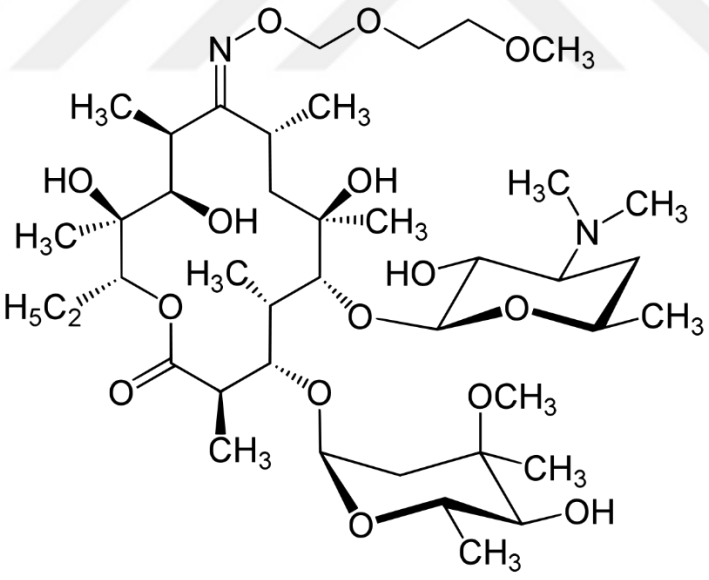
Şekil 2. 8 Örnek bir makrolid olan klaritromisin molekülü



Şekil 2. 9 Örnek bir makrolid olan azitromisin molekülü



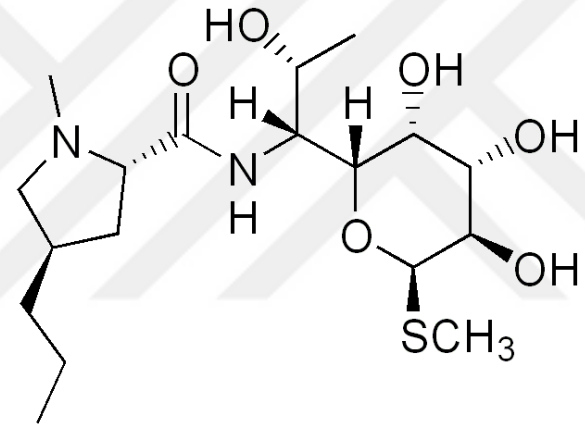
Şekil 2. 10 Örnek bir ketolid olan telitromisin molekülü



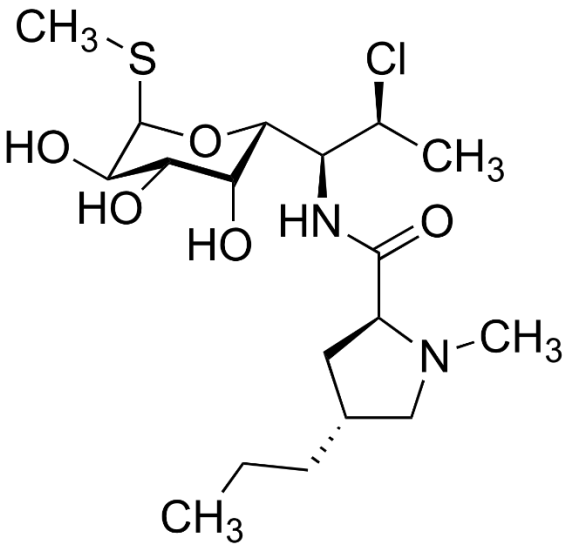
Şekil 2. 11 Örnek bir ketolid olan roksitromisin molekülü

- Linkozamidler

Linkozamidler; linkomisin (Şekil 2.12) ve klindamisindir (Şekil 2.13). Klindamisin, linkomsine oranla daha yüksek antibakteriyal etkinliğe sahiptir. Etki spektrumları ve mekanizmaları makrolid grubu antibakteriyellere benzemektedir. Gram pozitiflere, anaeroblara, bir kısım mikoplazma türlerine ve bir hücreli ve ökaryotik canlıları içeren bir Protista alt âlemi olan protozoonlara karşı etkilidirler. *B. fragilis*'e karşı en çok etki gösteren antibiyotik klindamisindir. *Enterobacteriaceae* üyelerine karşı herhangi bir aktivite göstermez. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türleri linkozamidlere karşı doğal olarak direnç gösterir [51].



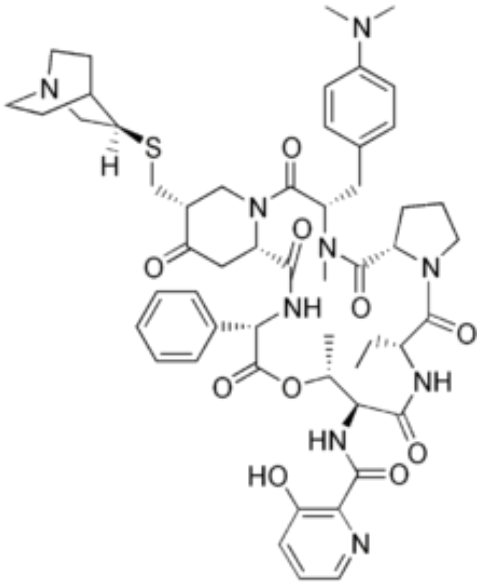
Şekil 2. 12 Örnek bir linkozamid olan linkomisin molekülü



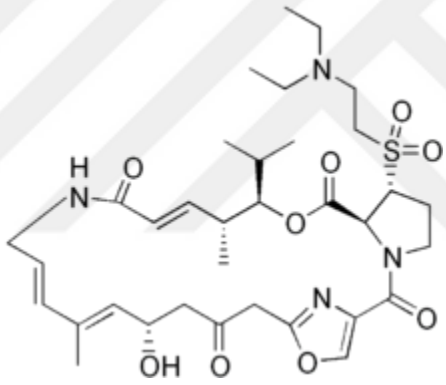
Şekil 2. 13 Örnek bir linkozamid olan klindamisin molekülü

- Streptograminler

Kuinopristin (streptogramin A) (Şekil 2.14) ve dalfopristin (streptogramin B) (Şekil 2.15) ribozomun üzerine, makrolid ve linkozamidlerin bağlandığı bölgeden bağlanır. Bu nedenle bu üç grubun arasında çapraz direnç (bir antibiyotiğe karşı duyarlılığını kaybetmiş bakteri veya bakteri topluluklarının, o antibiyotiğe yakın kimyasal yapıya veya benzer etki mekanizmasına sahip diğer antibiyotiklere karşı da dirençli olması durumu) görülmesi olasılığı fazladır. MRSA, *Corynebacterium* türleri, *Clostridrium perfringens, Neisseria meningitidis, M. catarrhalis, Legionella pneumophilia* ve *Mycoplasma pneumoniae*'ya karşı aktivite gösterir. Vankomisine dirençli *Enterococcus Faecium*'a karşı bakteriyostatik etkili (bakterileri öldürmek yerine, büyüme veya üremelerini yavaşlatma), *Enterococcus Faecalis*'e karşı etkisizdir [48, 52].



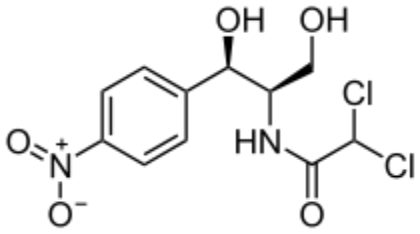
Şekil 2. 14 Örnek bir streptogramin olan kuinopristin molekülü



Şekil 2. 15 Örnek bir streptogramin olan dalfopristin molekülü

- Kloramfenikol

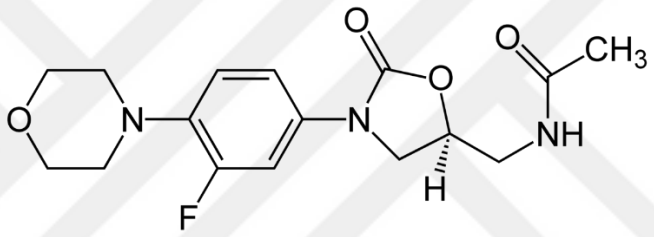
Geniş spektrumlu bir antibiyotik türüdür (Şekil 2.16). *H. influenzae*, *N. meningitidis*, stafilokok ve *pneumoniae* grubu bakterilere karşı bakterisidal etkisi mevcuttur. *B. fragilis* dâhil olmak üzere anaerob bakterilere karşı en etkili antimikrobiyal ajanlardandır. Lakin kullanımı sonucu ciddi yan etkilere yol açması nedeniyle tedavide ilk tercih olarak kullanılmaz [53, 54].



Şekil 2. 16 Kloramfenikol molekülü

- Oksazolidinonlar

Linezolid (Şekil 2.17), bu grubun önemli bir üyesidir. Bakteriyostatik etkisi mevcuttur. MRSA'ya, VRE'ye, *L. pneumophilia*'ya, *Chlamydophila pneumoniae*'ya, H. influenzae'ye, *Nocardia* türlerine karşı etki gösterir [48, 55].

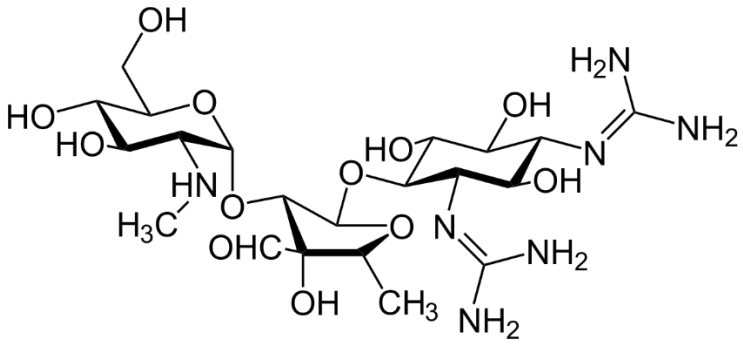


Şekil 2. 17 Örnek bir oksazolidino olan linezolid molekülü

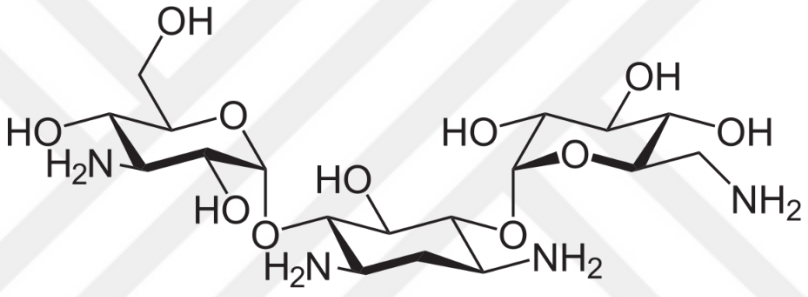
2.1.4.2 30S Ribozomal Alt Üniteye Bağlananlar

- Aminoglikozidler

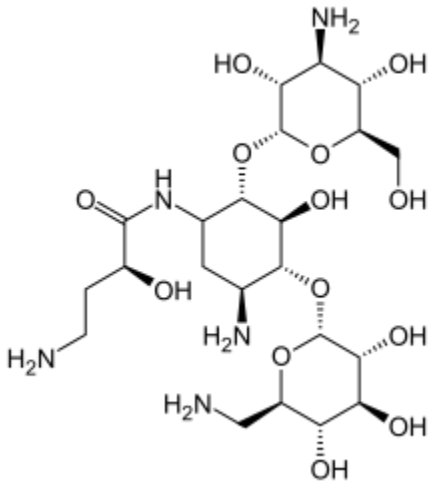
Bu grupta streptomisin (Şekil 2.18), kanamisin (Şekil 2.19), amikasin (Şekil 2.20), tobramisin (Şekil 2.21), netilmisin (Şekil 2.22), gentamisin (Şekil 2.23), sisomisin (Şekil 2.24), isepamisin (Şekil 2.25), neomisin (Şekil 2.26), paromomisin (Şekil 2.27) ve spektinomisin (Şekil 2.28) yer almaktadır. Bakterisidal etki gösterirler. Aktivite spektrumlarında, gram negatif özellikte ve aerobik basiller, stafilokoklar ve mikobakteriler vardır. Anaerob özellikteki bakterilere ve gram pozitif basillere etki göstermezler [56, 57]. Beta-laktam sınıfı antibiyotikler ile birlikte kullanıldıklarında sinerjistik etkileri vardır [58]. Gentamisinin, tobramisinin ve amikasininin etkinlik spektrumları birbirlerine benzer [57].



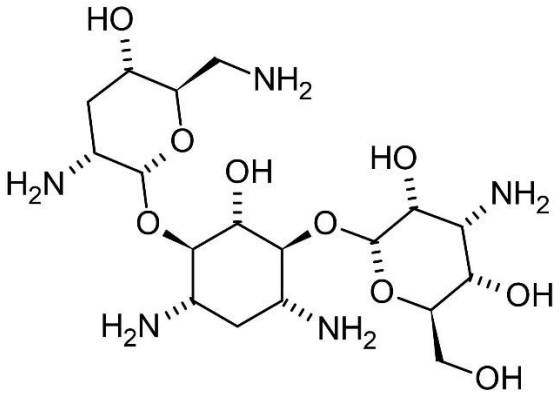
Şekil 2. 18 Örnek bir aminoglikozid olan streptomisin molekülü



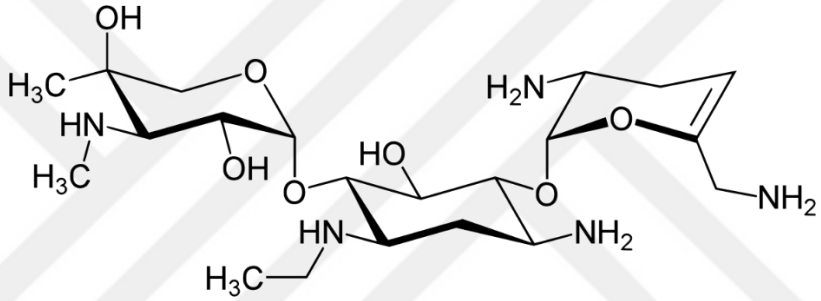
Şekil 2. 19 Örnek bir aminoglikozid olan kanamisin molekülü



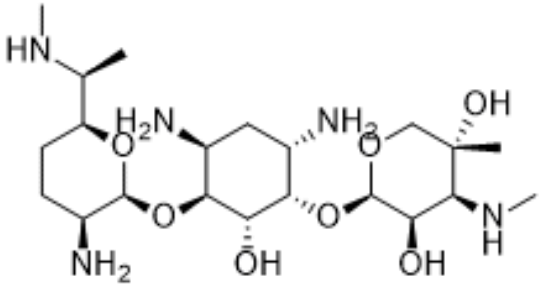
Şekil 2. 20 Örnek bir aminoglikozid olan amikasin molekülü



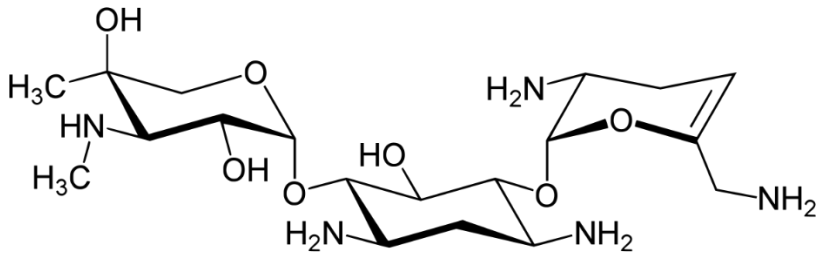
Şekil 2. 21 Örnek bir aminoglikozid olan tobramisin molekülü



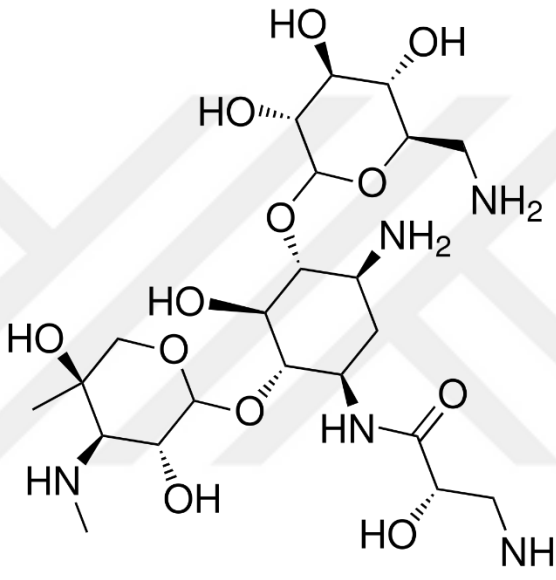
Şekil 2. 22 Örnek bir aminoglikozid olan netilmisin molekülü



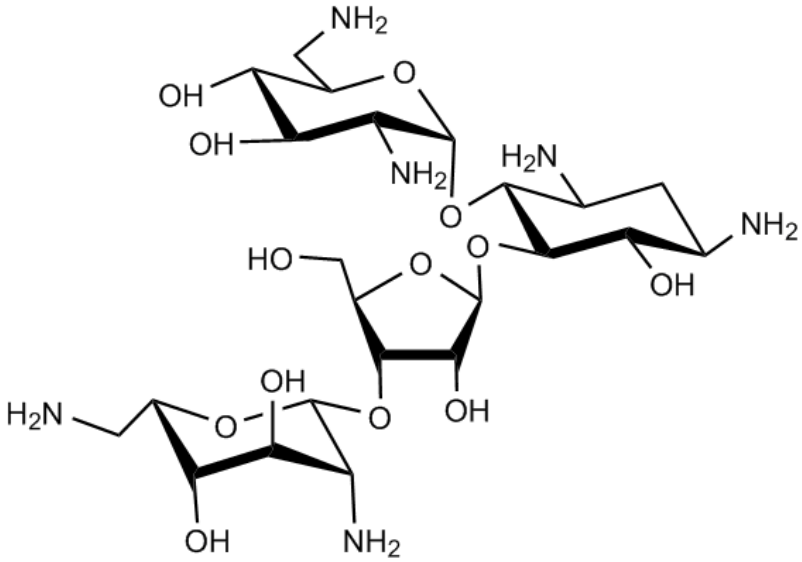
Şekil 2. 23 Örnek bir aminoglikozid olan gentamisin molekülü



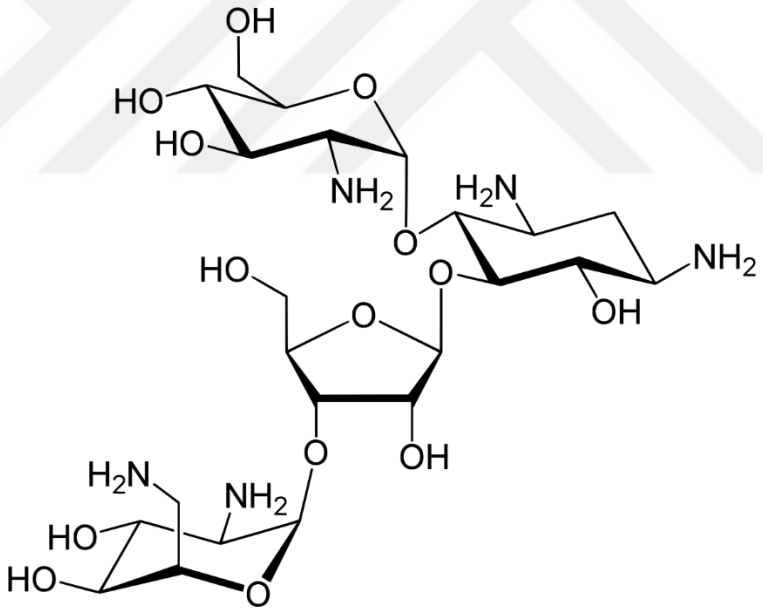
Şekil 2. 24 Örnek bir aminoglikozid olan sisomisin molekülü



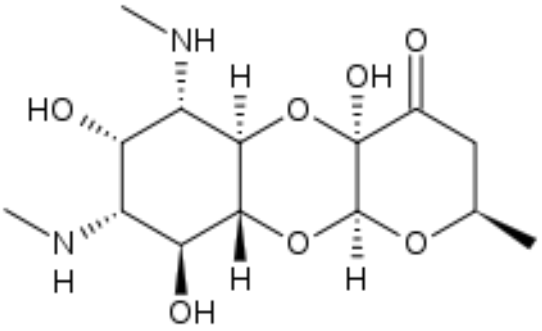
Şekil 2. 25 Örnek bir aminoglikozid olan isepamisin molekülü



Şekil 2. 26 Örnek bir aminoglikozid olan neomisin molekülü



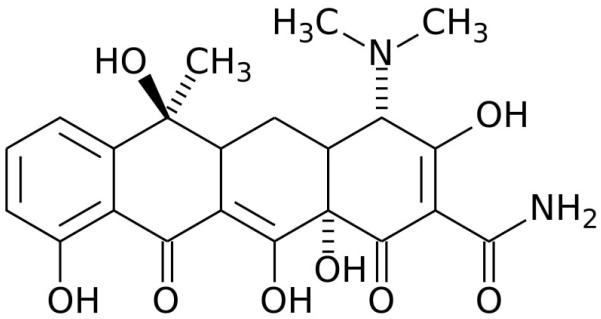
Şekil 2. 27 Örnek bir aminoglikozid olan paromomisin molekülü



Şekil 2. 28 Örnek bir aminoglikozid olan spektinomisin molekülü

- Tetrasiklinler

Spektrumları geniş bir antibiyotik grubu olan tetrasiklinler (Şekil 2.29), bakteriyostatik etki gösterirler. Gram pozitiflere ve gram negatiflere, çoğu anaerobik bakterilere, klamidyaya, mikoplazmalara ve bazı parazitlere karşı etkinlik gösterirler [53, 59, 60]. Gram negatif bakterilerin çoğunda tetrasiklin direnci görülebilir [60].

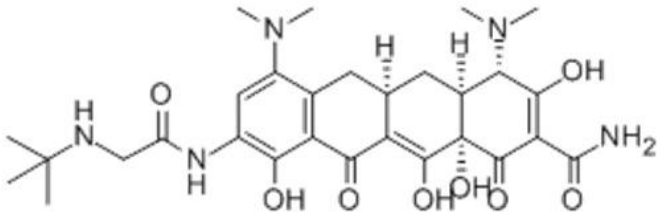


Şekil 2. 29 Tetrasiklin molekülü

- Glisilsiklinler

Tetrasiklin molekülü üzerinde gerçekleştirilen yapısal değişiklikler sonucu elde edilen yarı sentetik tetrasiklin analoglarıdır (Şekil 2.30). Tetrasiklinlerden daha stabil olup, ribozomlara tetrasiklinlerden daha yüksek bir afinite ile bağlanırlar ve tetrasiklinleri etkisiz hale getiren direnç mekanizmalarından etkilenmezler [61,

62]. Geniş bir aktivite spektrumu olan tigesiklin bu antibiyotik grubundadır ve çoğu gram pozitif bakteriye ve gram negatif bakteriye karşı etkilidir. Ayrıca MRSA'ya ve VRE'ye karşı yüksek aktiviteleri mevcuttur [61-63].



Şekil 2. 30 Örnek bir glisilsiklin olan tigesiklin molekülü

2.1.5 Nükleik Asit Sentezini İnhibe Eden Antimikrobiyaller

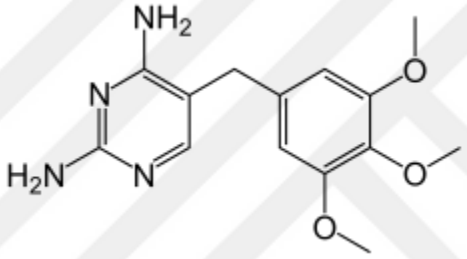
2.1.5.1 Kinolonlar

DNA ikileşmesini, DNA giraz enzimini inhibe ederek engellerler. Nalidiksik asit, oksolinik asit, sinoksasin, piromidik asit, pipemidik asit ve flumekin gibi kinolon türevleri birinci kuşak kinolonlardan olup, bu grup gram negatif bakterilere karşı etkilidirler ancak gram pozitif bakterilere karşı herhangi bir etkileri yoktur [64]. Sistemik enfeksiyonlarda kullanılmaları serum düzeylerinin düşük olması sebebiyle uygun değildir ancak yüksek idrar konsantrasyonlarına ulaşabildiklerinden ötürü üriner sistem enfeksiyonlarında kullanımları fazladır. Üriner sistem enfeksiyonlarındaki kontrolsüz kullanımları sonucu bakteriler tarafından direnç gelişimi mevcuttur [65]. İkinci kuşak Kinolonlar ise; siprofloksasin, ofloksasin ve norfloksasin olup bunların gram negatif bakterilere karşı olan etkinlikleri birinci kuşağa nazaran daha iyidir ve birinci kuşak kinolonlara ek olarak gram pozitif bakterilere karşı da etkinlikleri vardır. Siprofloksasinin güçlü bir anti-psödomonal etkisi de vardır [64, 66]. Levofloksasin, üçüncü kuşak kinolonlardan olup, *pneumoniae* grubu bakterilere karşı yüksek etkinlikleri vardır [64, 67]. Dördüncü kuşak, moksifloksasini ve gemifloksasini içerir ve bu kuşak *pneumoniae* grubu bakterilere karşı yüksek etkinliğe sahiptir [67].

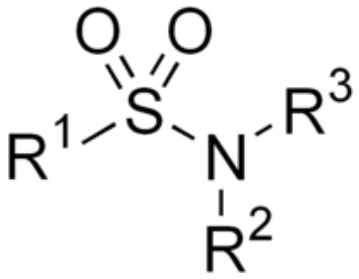
2.1.6 Antimetabolitler

2.1.6.1 Trimetoprim ve Sülfametoksazol

Trimetoprimler (Şekil 2.31), bakterinin DNA sentezinde önemli bir yer alan folik asitin sentezi esnasında önemli bir rol oynayan dihidrofolat redüktaz adlı enzimi inhibe ederler. Sülfonamid (Şekil 2.32), tetrahidropiteroik asit sentetaz enzimi inhibisyonunu gerçekleştirir ve bu sayede bakterideki DNA sentezi engellenmiş olur. Bu iki ajan beraber kullanıldığında ortaya çıkan bakteriyostatik etki sayesinde antimikrobiyal aktivite sağlanır. Böbrek dokusuna yüksek konsantrasyonlarda geçebilmeleri ve enflamatuvar görevinde olan olan *E. Coli*'ye, *Klebsiella pneumoniae*'ye ve *P. mirabilis'e* karşı etki göstermeleri sebebiyle, üriner sistemin enfeksiyonlarında tercih edilen antibiyotiklerdendirler [68-71].



Şekil 2. 31 Trimetoprim molekülü



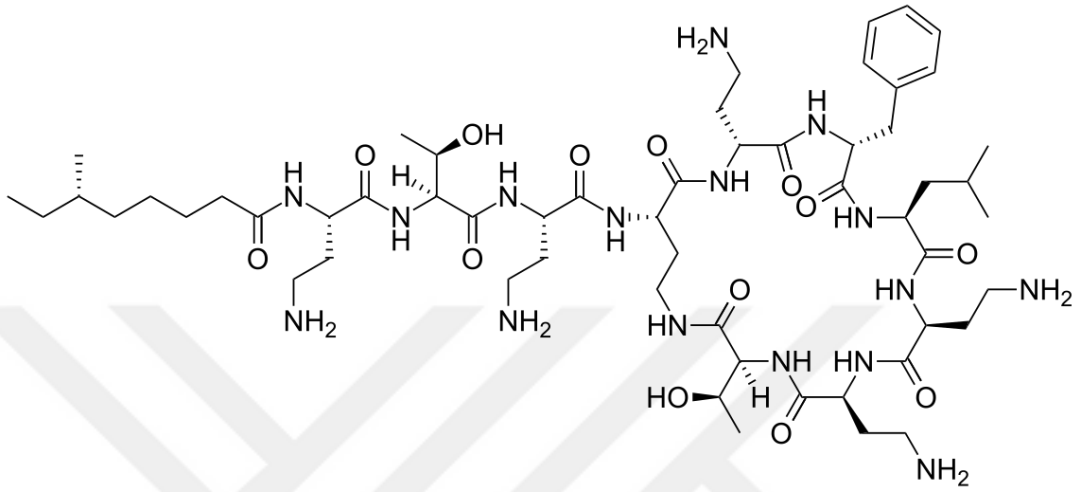
Şekil 2. 32 Sülfonamid molekülü

2.1.7 Membran Bütünlüğünü Bozan Antimikrobiyaller

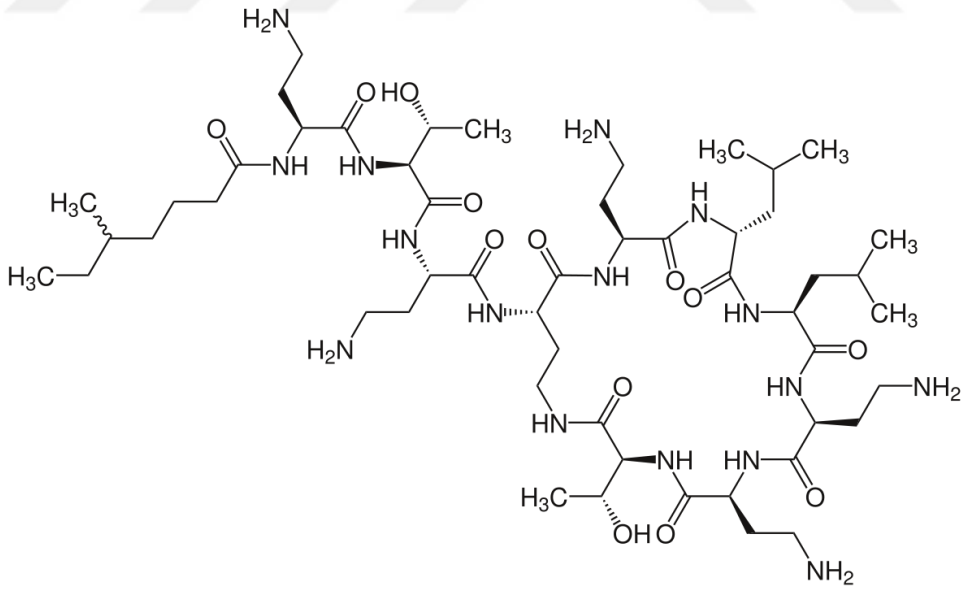
2.1.7.1 Polimiksinler

İnsanların kullanımı için olan polimiksinler, polimiksin B (Şekil 2.33) ve polimiksin E (Şekil 2.34) (kolistin) ile sınırlıdır. Tedavisi oldukça zor olan çoklu dirençli *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türleri gibi gram negatif bakterilerin sebep

olduğu enfeksiyonların tedavisi için son seçenek olarak kullanılmalıdır. *Proteus* ve *Providencia* türleri, *Morganella morganii*, *S. marcescens* ve *B. cepacia* polimiksinlere karşı hızlı direnç geliştirebilir. Gram pozitif bakteriler, *Neisseria* türleri, *M. catarrhalis*, *H. pylori*, *Vibrio* türleri ve *Brucella* türleri doğal olarak bu antibiyotiğe karşı direnç gösterir [72, 73].



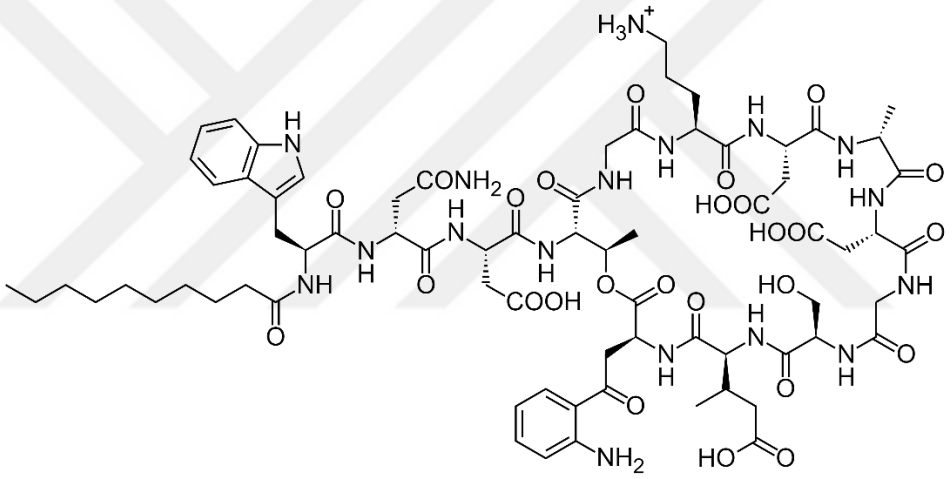
Şekil 2. 33 Polimiksin B molekülü



Şekil 2. 34 Polimiksin E (Kolistin) molekülü

2.1.7.2 Daptomisin

Kullanılmaya yeni başlanan siklik lipopeptid ajanların ilk üyesidir (Şekil 2.35). Bakterilerin duvarında fazlaca bulunan lipoteikoik asidin içinde transmembran kanallar oluşturur ve bu sayede bakteri membranının sentezini önlemiş olur. Bakterisidal etkisi mevcuttur. Metisiline dirençli stafilokoklar, vankomisine dirençli enterokoklar gibi gram pozitif koklara; *Lactobacillus, Pediococcus* ve *Leuconostoc* türleri gibi vankomisine dirençli bakterilere, *Bacillus* ve *Corynebacterium* türlerine ve anaeroblara (peptostreptokoklar, *Clostridium difficile* ve diğer klostridiumlar) karşı aktivitesi mevcuttur. Komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile *S. aureus* bakteriyemisinde (bakterilerin kan dolaşımındaki varlığı) kullanımı onaylanmıştır [74, 75].



Şekil 2. 35 Daptomisin molekülü

2.2 Antibiyotik Direnci

Mikroorganizmalar yeryüzündeki ilk canlılardan biridir. Bu, mikroorganizmaların değişmekte olan koşullara son derece iyi bir şekilde uyum sağlayabilmelerinden ötürüdür. Bu yetenekleri sayesinde geliştirilen her yeni antibiyotikten kaçacak bir yol bulmaktadırlar. Bu, ortaya enfeksiyonlarla insanların savaşındaki en önemli engel olan antibiyotik direncini ortaya çıkarmaktadır [76].

Penisilinin keşfi büyük umutlar doğurmuş ancak 1940 yılında E.P. Abraham ve E. Chain'in penisilinaz keşfi bu umutları kırmıştır [77]. Bu keşiften sonra da birçok yeni antibiyotik geliştirilmiş ancak mikroorganizmalar bulunan hemen hemen her yeni antibiyotiğe yeni bir yolla direnç geliştirebilmeyi başarmışlardır. Günümüzde birçok gram negatif bakteri ve gram pozitif görülen antibiyotik direnci, enfeksiyonların tedavisinde büyük zorluklar yaratmaktadır [76, 78].

Günümüzde çeşitli antibiyotiklerin kullanımının artması, immun sistemi zarar görmüş hastaların sayısındaki artma, yoğun bakım ünitelerinin miktarındaki artma, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı ve bunlara benzeyen nedenlerden ötürü, antibiyotik direnci gösteren mikroorganizma sayısı giderek fazlalaşmaktadır. Antibiyotiklere alternatif olabilecek potansiyelde antimikrobiyal ajan/strateji, antibiyotik direncine sahip mikroorganizmaların neredeyse tüm dünyaya yayılmasından ötürü acil bir ihtiyaç haline gelmiştir. Gram pozitiflerin ve gram negatiflerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde bu dirençten ötürü ciddi sorunlar yaşandığından yine bu bakterilerle enfekte olmuş hastaların hastanede yatış süreleri uzamakta, sağlık hizmeti giderleri artmakta ve en önemlisi morbidite oranı ciddi olarak artmaktadır [79].

Bahsedilen bu direnç sorunu yoğunlukla hastanelerde daha fazladır. Bunun sebebi hastanelerdeki antibiyotik kullanımın fazla olmasıdır [80, 81]. Ülkemizdeki hastanelerde en sık direnç sorunu yaşanan mikroorganizmalar; gram negatiflerden, *E. Coli, K. pneumoniae, Enterobacter spp, P. Aeruginosa ve Acinetobacter spp,* gram pozitiflerden; *S. Aureus, Koagulaz negatif stafilokoklar (KNS) ve Enterokoklar*'dır [82, 83].

Bahsedilen bu direnç; bir mikroorganizma türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmaları ile dirençli hale gelmesi olarak tanımlanabilir. Kazanılmış antibiyotik direnci ya mikroorganizma kromozomunda oluşan mutasyonlarla ya da dirençli bir mikroorganizmanın direnç genini duyarlı mikroorganizmalara aktarması ile ortaya çıkar. Mikroorganizmalarda kazanılmış antibiyotik direncinin mekanizmaları üçe ayrılır. Bunlar; antibiyotiğin hedef bölgeye ulaşmasının

engellenmesi (içeri girmesini güçleştirerek ya da dışarı atılımını hızlandırarak), antibiyotiğin etkilediği hedef noktanın değiştirilmesi ve antibiyotiğin sentezlenen bir enzimle inaktive edilmesidir [80, 84].

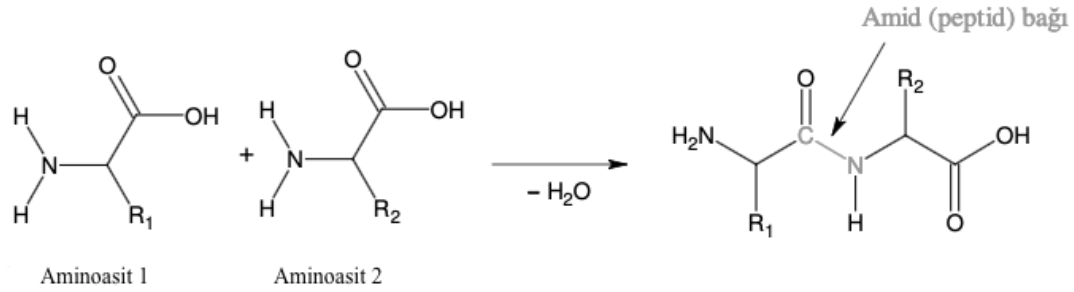
S. aureus, dünyadaki toplumsal ve hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen etkenlerinden biri olup, yoğun bakım ünitelerinde MRSA kaynaklı enfeksiyonların gitgide arttığı raporlanmıştır [78, 85]. Son yıllarda, MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde önemli değişiklikler olmuştur. Bu değişikliklerden ilki; *S. aureus* izolatlarında (enfekte olmuş bir kişiden veya doğal ortamdan elde edilmiş, laboratuvar kökenli olmayan, mikrobiyal veya viral anlamda saf bir numune) görülen metisilin direncindeki artıştır. Yapılan çalışmalarda, yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının %80'inin metisiline karşı dirençli olduğu saptanmıştır [78]. Değişikliklerden ikincisi ise, birtakım MRSA izolatlarındaki vankomisin duyarlılığının azalmasıdır. Bahsedilen izolatlardaki vankomisin MIC değeri, 2 μg/ml'den küçük olsa da, vankomisin ile elde edilen klinik sonuçlar başarısızdır. Üçüncü değişiklik ise, yaşanan MRSA sorununun hastanelerin ardından topluma da yayılmaya başlamasıdır [79, 86].

Günümüzde MRSA enfeksiyonlarına yönelik tedavilerde sıklıkla kullanılan antibiyotik grubu, içinde vankomisini ve teikoplanini de bulunduran glikopeptidlerdir. Glikopeptidler dışında, oksazolidinonlardan olan linezolid, daptomisin ve glisilsiklinlerden olan tigesiklin gibi antibiyotikler türevleri de kullanılır. Maalesef stafilokoklarda gözlenen ve geleneksel antibiyotiklere karşı gelişmiş olan direnç, MRSA enfeksiyonlarına yönelik tedavilerde sıklıkla kullanılan glikopeptid grubuna ve yeni antibiyotiklere karşı da gelişmeye başlamıştır. 1996 yılında VISA izolatları bundan 6 yıl sonra da VRSA izolatları görülmüştür. Yeni bir antibiyotik olan linezolid ise 2000 yılında klinik olarak kullanılmaya başlanmış ancak bundan sadece bir yıl sonra linezolid dirençli ilk MRSA izolatına rastlanlmıştır [87]. Daptomisin ise 2003 yılında klinik olarak kullanılmaya başlanmış lakin 2005 yılında daptomisin direnci görülmüştür [88].

Bahsedilen bu direncin önüne geçilebilmesi için yeni stratejiler aranmaktadır [89].

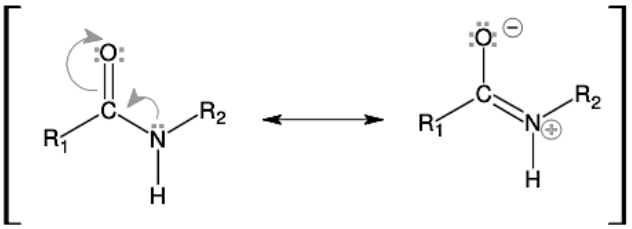
2.3 Peptidler

Peptidler, farklı içeriklere sahip aminoasitlerin birbirlerine belirli bir düzende amid bağları (Şekil 2.36) ile bağlanmaları sonucu oluşan, zincir yapıdaki biyopolimerlerdir. Peptid bağı olarak da adlandırılan amid bağı ise bir aminoasitin karboksil grubunda bulunan karbon atomuyla, diğer bir aminoasitteki amino grubunda bulunan azot atomu arasında oluşan kovalent bağdır.



Şekil 2. 36 Peptid (amid) bağının genel gösterimi

Peptid bağının rezonans hibritleri arasında oluşturduğu denge sebebiyle kısmi çift bağ karakteri taşımakta olup (Şekil 2.37) peptid bağı, herhangi bir kovalent tekli bağdan daha kuvvetlidir [90].



Şekil 2. 37 Peptid (amid) bağının kısmi çifte karakteri

2.3.1 Antibiyotiklere Alternatif Olabilecek Antimikrobiyal Peptidler

Antimikrobiyal peptidler, diğer adlarıyla konakçı savunma peptidleri, mikroorganizmaların, eklembacaklıların ve hatta bitkilerinde doğal bağışıklık sistemlerinin bir parçası olup [91], farklı patojeniklere ve mantarlara karşı

kullanabilecek potansiyele sahip yeni nesil antibiyotikler olarak bilinmektedirler. AMP'ler, bakteriler üzerindeki çok yönlü etkileri sayesinde tedavisi çok zorlayıcı olan MDR enfeksiyonlarına karşı etkili olabilecek yeni antibiyotik özelliğe sahip ilaçlar geliştirmek için potansiyel adaylardır ve geleneksel antibiyotiklere alternatif olabilirler [92].

2.3.2 Katyonik Antimikrobiyal Peptidler

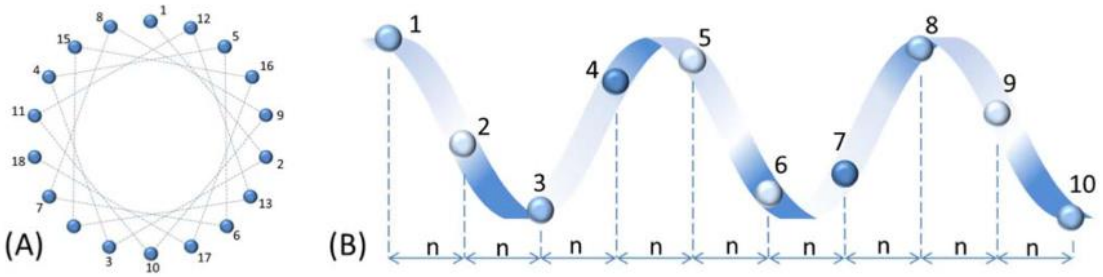
Katyonik peptidler, mikroorganizmaları öldürebilme yeteneği olan moleküller olup, çoğu 11 ve 50 aminoasit arasında sekanslardan oluşmuştur. 140'tan fazla doğal katyonik peptid dizisinin uzunluğu, bu aminoasit sayısı aralığındadır. Katyonik peptidleri diğer peptidlerden ayıran iki özellik mevcuttur. Bu iki özellik, arginin ve lizin aminoasitleri (bahsedilen bu aminoasitler nötral pH'da pozitif yüklüdürler) içerdikleri için en az +2 olmak üzere 4, 5 veya 6'ya kadar ulaşabilen net pozitif yüke sahip olmaları ve uygun koşullar altında üç boyutlu olduklarından ötürü polar olmayan aminoasit yan zincirleri içeren bir hidrofobik kısımları ve polar ve pozitif yüklü bir hidrofilik kısım içermeleridir. Yani kısacası amfipatik özellikleri mevcuttur [91, 92]. Tablo 2.1'de katyonik antimikrobiyal peptidlerin antibiyotikler ile karşılaştırması verilmiştir.

Tablo 2. 1 Geleneksel antibiyotiklerin, katyonik antimiktobiyal peptidler ile karşılaştırılması [93]

Özellik	Geleneksel Antibiyotikler	Katyonik Antimiktobiyal Peptidler
Aktivite Spektrumu	Bakteriyel enfeksiyonlar	Bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlar, septisemi, iltihap
Etki Mekanizmaları	Özel mekanizmalar	Özel olmayan, daha çok yüklere dayalı mekanizmalar
Hedef Aldıkları Molekül	Genel olarak tek baskın hedef molekülü veya tek baskın hedef sınıfı, örneğin: Penisilin bağlayıcı proteinler	Nispeten daha az spesifik hedef, örneğin: Herhangi bir hücredeki bütün organeller
Ek Aktiviteleri	Yok	Antiendotoksik ve bağışıklık güçlendirici etki
Farmakokinetikleri	Değişiklik göstermekle beraber haftada bir antimikrobiyaller geliştirilmektedir	Proteolitik bozunma nedeniyle kısa sistemik yarı ömüre sahiptirler
Toksikolojileri	İlaç sınıflarının içindeki en güvenli sınıflardan biri	Bilinen topikal veya sistemik toksikoloji çalışması yok
Üretim Maliyetleri	Ucuz, örneğin: Gramı 0.08$	Pahalı, örneğin: Gramı 50-400$

2.3.3 Antimikrobiyal Katyonik Peptidlerin Yapıları ve Çalışma Prensipleri

Bugüne kadar bildirilmiş ve üzerinde çalışılmış olan çoğu AMP, bulundurdukları sekonder yapılara göre dört sınıfa ayrılırlar. Bu sınıflar; β-levha, α-sarmal (Şekil 2.38), genişletilmiş (extended) ve döngü (loop) olarak adlandırılır. Bu gruplar arasında en yaygın olanlar; α-sarmal ve β-levha olup [94], en çok çalışılan α-sarmal'dır. Bu yapıdaki peptidlerde, iki ardışık aminoasit arasındaki mesafe 0.15 nm olup, üstten görünümde aralarındaki açı 100 derecedir (Şekil 38A). Bu türün yaygın olarak bilinen örnekleri; protegrin, magainin ve indolisindir [95].



Şekil 2. 38 α-sarmal peptidlerin şematik gösterimi [96].

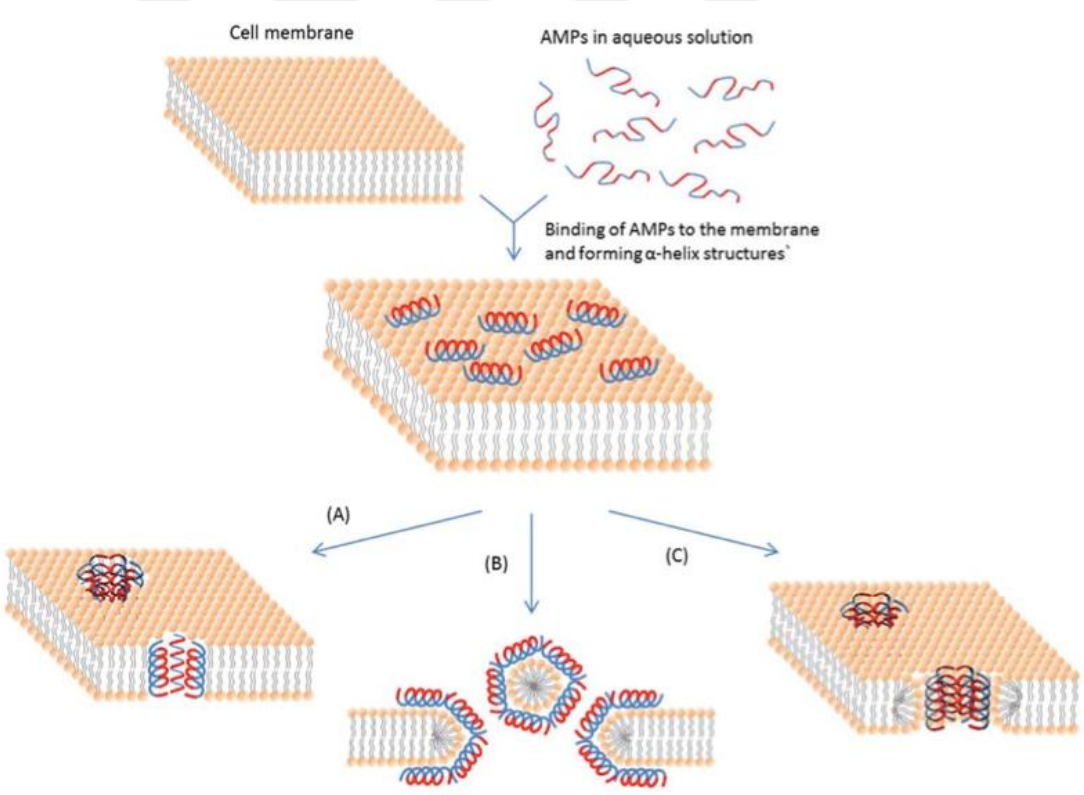
(A) AMP'nin sarmal tekerlek (helical wheel) methodu ile yukarıdan gösterimi. İki ardışık aminoasit arasındaki açı 100 derece, noktalı çizgiler iki ardışık aminoasiti birbirine bağlar. (B) Peptidin yandan görünümü. İki ardışık aminoasit arasındaki mesafe, "n" 0.15 nm.

Bazı AMP'ler ise bu dört sınıfa da ait değilken [97], bazı AMP'ler ise iki farklı yapısal bileşen içerebilir [98]. Birçok peptid ise aktif yapılarını yalnızca hedef hücre ile etkileşime girdiklerinde oluşturur. Mesela indolisin, sulu çözeltide küresel ve amfipatik konformasyonda iken, lipid çift tabakayı taklit edebilen bir ortama konulduğunda aktif konformasyonu olan kama-şekline dönüşür [99]. Geleneksel antibiyotiklerin aksine AMP'ler mikroorganizmalarda bulunan, hücre membranındaki lipopolisakkarid katmanını sahip oldukları katyonik yük aracılığıyla hedefler ve hücre membranı ile temastan saniyeler sonra mikroorganizmayı öldürebilir. AMP'ler membran bütünlüğünü bozarak (negatif yüklü hücre membranı ile etkileşim aracılığıyla), belirli hücre içi kimyasallar ile

etkileşime girerek veya proteinleri, DNA ve RNA sentezini inhibe ederek mikroorganizmaları öldürür [100, 101].

2.3.3.1 Membran Aktif Antimikrobiyal Peptidler

Bir peptid hücre içindeki bir kimyasalla etkileşime girdiğinde aktivite gösterse dahi öncelikle membran ile etkileşime girmek durumundadır [102] ve bu etkileşim hedef olabilecek hücrelerin spektrumunu belirler. Membran aktif AMP'ler amfipatik olup hem katyonik hem de hidrofobiklerdir. Katyonik yüklü kısım, negatif yüklü hücre membranı ile elektrostatik bir etkileşim kurarken hidrofobik kısım peptidin hücre içine girmesini sağlar [103]. Şekil 2.39'da membran aktif AMP'lerin aktivite mekanizmaları şematik olarak gösterilmiş, Tablo 2.2' de de açıklanmıştır.



Şekil 2. 39 Membran aktif AMP'lerin aktivite mekanizmalarının şematik gösterimi [104].

Barrel-Stave modeli (A), AMP’ler kendilerini mikroorganizmaya dik olarak yerleştirirler. Carpet modeli (B), membranın bazı kısımları AMP’lerin hidrofobik kısımları içeri bakacak şekilde AMP molekülleri ile kaplanır ve bu membranlarda gözeneklerin oluşmasına sebebiyet verir. Toroidal Pore modeli (C), Barrel-stave modeline benzer, ancak AMP'ler her zaman membranın fosfolipid baş grupları ile temas halindedir. Şekildeki mavi kısımlar AMP’lerin hidrofobik kısımlarını, kırmızı kısımlar ise hidrofobik kısımlarını gösterir.

Tablo 2. 2 Membran aktif AMP'lerin aktivite mekanizmaları

Etkileşim	Mekanizma
Carpet-Like Modeli	Peptid ilk önce membrana temas eder ve membranın küçük bir alanını kaplar. Daha sonra AMP molekülleri, gözenek oluşması için çift katlı lipid tabakasına nüfuz eder [105-107].
Membran İnceltme Modeli	AMP'ler kendilerini çift katlı lipid katmanının arasına yerleştirirler. Bu aradaki boşluk, komşu lipid moleküllerini boşluğu doldurmak üzere içine çeker ve komşu kısımlarda incelme oluşur [108-110].
Agregat Modeli	AMP'ler membrana, membran yüzeyine paralel olaracak şekilde yapışır. Daha sonra AMP'ler küre benzeri yapılar oluşturmak için kendilerini membrana dik olarak yerleştirir ve membrandan içeri girer [105, 111-113].
Toroidal-Pore Modeli	AMP'ler, hidrofobik kısımları lipit çift katmanın arasındaki merkez kısmıyla etkileşime girecek, hidrofilik kısımları ise oluşacak olan gözeneklerin iç kısımlarına bakacak şekilde dikey olarak hizalanır [113].
Barrel-Stave Modeli (Çubuk-Varil Modeli)	Öncelikle hücre zarına paralel olacak şekilde AMP molekülleri çubuk halinde kendilerini membranın üstüne yerleştirir. Arından varil benzeri şekiller oluşur ve AMP'ler membran çift katlı lipid tabakasının düzlemine dik hale gelir ve içine yerleşir [114, 115].

2.3.3.2 Hücre İçi Aktivite Gösteren Antimikrobiyal Peptidler

Eski çalışmalarda, mikroorganizmanın hücre membranının AMP tarafından bütünlüğünün bozulması birincil öldürme mekanizması olduğu sanılırken bazı

AMP'lerin membran bütünlüğünü bozmadan aktivite gösterebilmeleri bunun doğru olmadığını kanıtlamıştır [116].

2.3.4 Geleneksel Antibiyotikler Yerine Peptidlerin Kullanımındaki Avantajlar

Terapötik peptidlerin geleneksel antibiyotikler yerine kullanılmasındaki en büyük motivasyon, kullanım şekillerindeki çeşit potansiyeli olmuştur. Peptidler tek başlarına antimikrobiyal ajan olarak, diğer antibiyotikler ile birlikte sinerjik etki oluşturmak için veya immunomödülatör (bağışıklık sisteminin bir tehdide karşı olan davranışını genellikle olumlu yönde değiştirerek, bağışıklık fonksiyonunu destekleyebilen maddeler) veya endotoksinleri (çeşitli patojenlerde bulunan ve sağlığa zararlı olan maddeler) nötralize edebilecek ajanlar olarak kullanılabilirler [93]. Ayrıca gram-pozitif bakterilere ve gram-negatif bakterilere karşı olan yüksek aktiviteleri ve bu aktivite spektrumunun virüs ve mantarlara kadar genişleyebilmesi sebebiyle yüksek etkiye sahip kimyasallardır. Ayrıca geleneksel antibiyotiklere kıyasla normal ve MDR bakterileri öldürmekte çok daha hızlı ve daha güçlüdürler [94]. Peptidlerin etkileri MRSA ve MDR *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç mekanizmaları tarafından engellenmez [95]. Geleneksel antibiyotikler ile beraber kullanıldıklarında peptidler, sinerjistik bir etki meydana gelebilir. Bu da bakterileri öldürmedeki başarının artmasını sağlar. Örnek vermek gerekirse, penisilinin, pediosin ve nişin içeren ampisilinin Z ile olan kombinasyonu, tek başına antibiyotik kullanımına kıyasla sırasıyla çok daha düşük minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) ile *Pseudomonas fluorescens*'in öldürülmesine yol açar [50].

AMP'lerin sentetik sentezlerinde amino asitler kullanıldığından, yapılarını değiştirmek ve kütüphane yapımı kolaydır [117]. Bahsedilen sentetik sentezler, kimyasal sentez ile [118] veya rekombinant ekspresyon sistemleri [119, 120] kullanarak yapılabilir. Bu yapay AMP sentezi, mevcut AMP'lerin değiştirilmesi ve yeni sentetik AMP'lerin tasarlanması için kullanılabilir. Bu tür modifikasyonlar sayesinde AMP'lerin hedefleri değiştirilebilir ve AMP'lerin proteazlara karşı stabilitesi geliştirilebilir [121].

2.4 Çapraz Bağlama Reaktifleri

Çapraz bağlama reaktifleri olarak bilinen moleküller veya diğer adlarıyla çapraz bağlayıcılar, kimyasal reaksiyonlarda çeşitli moleküllerin birbirlerine kovalent yollarla bağlanmasına yarayan ve kullanım kasıtlarına göre farklı türleri olan kimyasal ajanlardır. Çapraz bağlama reaktifleri, biyolojik moleküllerin işaretlenmesinden, kovalent olarak bağlanmasından veya moleküllerin başka moleküllere bağlanması, hedeflenmesinden ve dağıtımından sorumlu olabilirler. Çapraz bağlama reaktifleri kullanılarak; farklı iki molekül birbirlerine intermoleküler olarak veya tek bir molekül, kendi içinde intramoleküler olarak bağlanılabilir. Çapraz bağlama reaktifleri, homobifonksiyel ve heterobifonksiyonel olarak ikiye ayrılırlar. Homobifonksiyonel çağraz bağlama reaktiflerinde, aktif bağın sağında ve solunda bulunan R grupları aynıdır ve iki eş fonksiyonel R grubu taşırlar. Heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinde ise aktif bağın sağında ve solunda bulunan R grupları farklıdır ve farklı fonksiyonel R grubu taşırlar [122].

Çapraz bağlama reaktifleri kullanılarak bağlanan molekül/moleküller arasında, kullanılan çapraz bağlama reaktifinin türüne göre 0-20 Å (1 Å = $1x10^{-10}$ m) aralığında bir kimyasal yapı bulunur. Bu yapıya arabulucu (spacer) adı verilir. Arabulucunun uzunluğunun 0 Å olduğu çapraz bağlama reaktifleri, “Direkt Çapraz Bağlama Reaktifleri” olarak adlandırılırlar. İçerisinde arabulucu bulunduran bağlayıcıların, bulundurmayanlara nispeten avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlardan kısaca bahsetmek gerekirse; farklı uzunluklarda olan arabulucu mesafesi sayesinde, kovalent olarak bağlanmış olan peptid taşıyıcı molekülün yüzeyinde daha serbest ve daha çıkık olabilir. Bu sayede peptidin ulaşabileceği yer artar ve doğru orantılı bir şekilde antijen özelliği de artar. Arabulucu olarak bahsedilen kimyasal yapı, farklı immunolojik cevapların oluşmasını engellemek amacıyla en çok 6 metilen zinciri içerebilir ve metilen dışında herhangi bir fonksiyonel grup içermemektedir. Çapraz bağlayıcılar yardımıyla kovalent olarak bağlanan konjugatlar, bulundurdukları moleküllerin biyolojik aktivitesini de gösterirler [123].

2.4.1 Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktifleri olarak adlandırılan çapraz bağlayıcılar (Şekil 2.40), arabulucu molekülünün sağında ve solunda aynı R grubunu içeren çapraz bağlayıcılardır [122].

Homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin kullanımı esnasında iki basamaklı reaksiyon adı verilen bir reaksiyon türü kullanılır. Bunun sebebi homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktifleriyle gerçekleşen konjugasyon reaksiyonlarında birtakım belirsizliklerin bulunmasıdır. Bu belirsizlikler [122]:

-Çapraz bağlama reaktifi ile aktivasyonu gerçekleştirilen polimerin kendisi ile çapraz bağlanabilmesi (intramoleküler konjugat),

-Başka bir çapraz bağlama reaktifinin, yukarıda bahsedilen intramoleküler konjugatı aktifleştirmesi ve aynı molekülün dimerlerinin, trimerlerinin veya oligomerlerinin oluşabilmesi,

-Bahsedilen sebeplerden ötürü de sentezlenen konjugatların belirsiz, tanımlanamaz olması gibi durumlardır.

Bu gibi istenmeyen durumların oluşmasını ve farklı ara ürünlerin oluşmasını engellemek adına geliştirilen iki basamaklı reaksiyon prosedürü, öncelikle taşıyıcı görevi görecek olan polimer molekülünü çapraz bağlama reaktifi ile aktifleştirmek, reaksiyona giremeyen çapraz bağlama reaktifini ve sentezlenmiş olabilecek yan ürünleri uzaklaştırmak, aktif polimeri saflaştırmak ve ardından bağlanılması istenen ikinci molekülü reaksiyon ortamına vermek gibi bir dizi adım içerir [122].



Şekil 2. 40 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların genel gösterimi

2.4.2 Seçici Oldukları Gruplara Göre Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Konjugasyon sentezinde sıklıkla kullanılan homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktifleri, hedef aldıkları fonksiyonel gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda belirtilmiştir [123]:

A) Amino grubunu hedef alan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar

- NHS esterler
- Bis-imidoesterleri
- Bis-aldehitleri
- Bis-izosiyonatları ve izosiyonatlar
- Diflorobenzen türevleri

Amino grubunu hedef alan çapraz bağlayıcılar, amino grubu (-NH_2) içeren peptid, protein gibi makromoleküllerin çapraz bağlanmasında kullanılırlar.

B) Sülfidril grubunu hedef alan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar

- Bis-maleimid
- Disülfid oluşturan reaktifler
- Bis-alkil halojenürler

C) Karboksil grubunu hedef alan çapraz bağlayıcılar

Karboksil grubu nükleofilik yapıdadır, buna karşılık nötr veya bazik pH değerlerine doğru pH arttıkça reaktifliği, amino veya tiyol gibi fonksiyonel gruplar

ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Asidik koşullar hakim olduğunda ise (pH=3 ve 5 arası, karboksil grubunun pKa değerleri arasındadır) amino ve tiyol gibi fonksiyonel grupların proton kazanmış formları (NH_3^+, SH) baskın olacağından ilgili fonksiyonel grupların reaktiflikleri azalacak ve karboksil grubu, reaksiyon için tercih edilecektir. β–Karbonil diazo fonksiyonel grubuna sahip bileşikler, bahsedilen şartlar altında konjugasyon reaktifi olarak kullanılmaktadır. Bahsi geçen β–Karbonil diazo bileşikleri fotoaktive edilebilen bileşikler olup, ardından ışıksız ortam koşularında nükleofiller ile reaksiyona girebilmektedirler. Konjugasyon reaksiyonlarında sıklıkla kullanılan karboksil grubunu hedefleyen homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktifleri, diazo bileşikleridir [123, 124].

2.4.3 Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktifleri olarak adlandırılan çapraz bağlayıcılar (Şekil 2.41), arabulucu molekülünün sağında ve solunda farklı R grubunu içeren çapraz bağlayıcılardır [122, 123].

İki farklı fonksiyonel grup içerdikleri için, birbirinden tamamen farklı iki molekülün kovalent olarak bağlanabilmesini sağlarlar. Homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktifleri başlığı altında anlatılan; Amino grubunu hedef alan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar, Sülfidril grubunu hedef alan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar ve Karboksil grubunu hedef alan çapraz bağlayıcılar gibi moleküller, heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıdaki arabulucunun sağında ve solunda ayrı ayrı bulunabilecekleri için istenilen modifikasyon yapılabilir. Bu sayede de konjuge edilmesi istenilen molekülün, istenilen kısmında konjugasyon gerçekleştirilebilir ve reaksiyon üzerindeki kontrol artar [122, 123].

Bu çapraz bağlama reaktifleri kullanılarak yapılan konjugasyon reaksiyonları da birden fazla basamaktan oluşur. Öncelikle protein, peptid veya bunlara benzer makromolekül, çapraz bağlama reaktifinin daha reaktif olan kısmı tarafından modifiye edilir. Modifiye olmuş olan makromolekül saflaştırılır (jel filtrasyon, diyaliz, vb.). İkinci molekül eklenmeden önce, aktifleştirilmiş ara-ürünün stabilitesini kaybetmemesi adına çoğu heterobifonksiyonel çapraz bağlama

reaktifi, sulu ortamlarda kararlı kalabilecek çeşitli fonksiyonel gruplar içermektedirler. Örnek vermek gerekirse; NHS – ester maleimidlerde, molekülün NHS kısmı molekül aktifleştirmede rol alırken maleimid kısmı ise ara-ürünün stabilitesini korumaktadır. Modifiye makromolekül saflaştırıldıktan sonra ikinci molekül ortama tanıtılır [122].

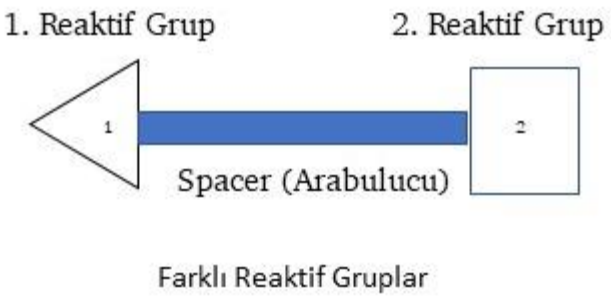
Bahsedilen çok basamaklı reaksiyonun gerçekleştirilmesi sayesinde heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı kullanılarak yapılan konjugasyon reaksiyonlarında;

Sentezlenen konjugatın molekül boyutunda ve içerdikleri bileşenlerin oranlarında daha fazla kontrol,

İki farklı fonksiyonel grup içermeleri sebebiyle daha çeşitli konjugasyonlar yapabilme olasılığı,

Fotoreaktif fonksiyonel grup içermeleri halinde daha kontrollü bir aktivasyon stratejisi vardır.

Homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinde de olduğu gibi, heterbifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinde de arabulucu bulunur ve bazı zamanlarda ise bulundurdukları arabulucunun özelliklerine ve/veya uzunluğuna göre reaksiyonlarda kullanılırlar [122].



Şekil 2. 41 Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların genel gösterimi

2.4.4 Seçici Oldukları Gruplara Göre Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların sıklıkla kullanılan ve belirli fonksiyonel grupları hedef alan örnekleri aşağıda verilmiştir [124].

- Amino ve Süldifril Gruplarını Hedef Alan Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar
- Karbonil ve Sülfidril Gruplarını Hedef Alan Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar
- Amino Grubunu Hedef Alan ve Fotoreaktif Fonksiyonel Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar
- Sülfidril Grubunu Hedef Alan ve Fotoreaktif Fonksiyonel Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar
- Karbonil Grubunu Hedef Alan ve Fotoreaktif Fonksiyonel Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar
- Arjinin Grubunu Hedef Alan ve Fotoreaktif Fonksiyonel Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

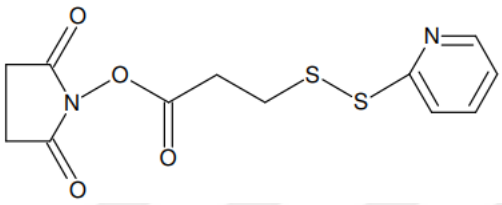
2.4.4.1 Amino ve Süldifril Gruplarını Hedef Alan Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktifleri arasında sıklıkla kullanılan çapraz bağlama reaktiflerinden biri olan bu grupta, amino grubunu hedef alan kısım genellikle NHS Ester fonksiyonel grubu olup, sülfidril grubunu hedef alan kısım farklı fonksiyonel gruplar içerebilir [122].

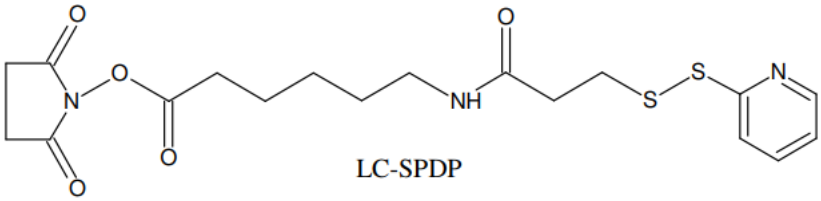
Amino grubunu hedef alan uç genellikle açillendirme ajanı olup, primer aminler ile nükleofilik katılma reaksiyonuna girmesi sonucu yapıdan ayrılarak amid bağı oluşturur. Sülfidril grubunu hedef alan uç ise genellikle alkillendirme ajanı olup, sülfidril fonksiyonel grubu içeren moleküller ile tiyoeter veya disülfid bağı oluşturup ilgili moleküle bağlanır [122, 123].

Amino ve süldifril gruplarını hedef alan heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların bir çok türü olup sıklıkla kullanılan SPDP [N-Süksinimidil 3-(2-piridilditiyo)propiyonat]'dır (Şekil 2.42).

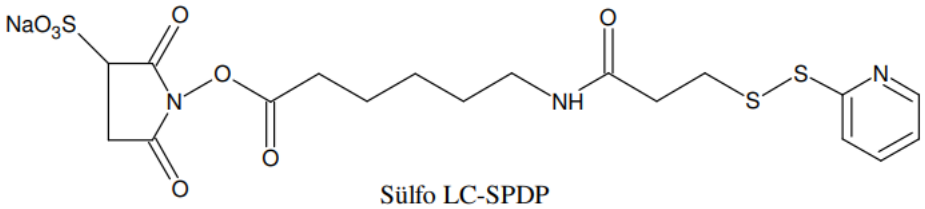
Sıklıkla kullanılan amino ve süldifril gruplarını hedef alan heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılardan bazıları şekil 2.43 ve şekil 2.50 arasında verilmiştir [122]. Şekil 2.51'de ise MBS varlığında sentezlenen konjugatın reaksiyon mekanizması verilmiştir [123]



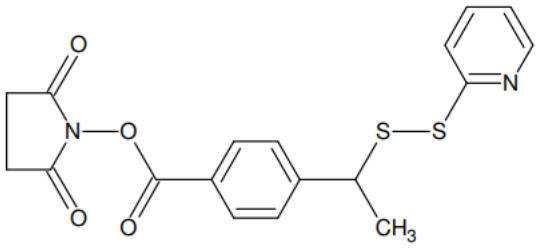
Şekil 2. 42 N-Süksinimidil 3 – (2-piridilditiyo) propiyonat



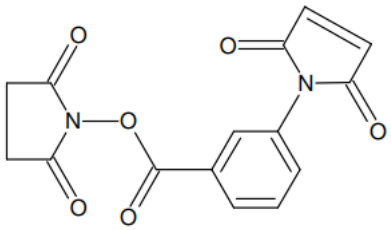
Şekil 2. 43 LC-SPDP



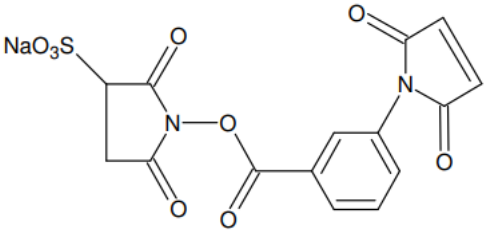
Şekil 2. 44 Sülfo LC-SPDP



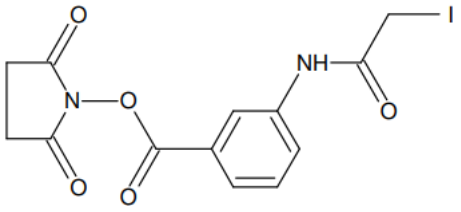
Şekil 2. 45 SMPT (4-succinimidyloxycarbonyl-alpha-methyl-α(2-pyridyldithio)toluene)



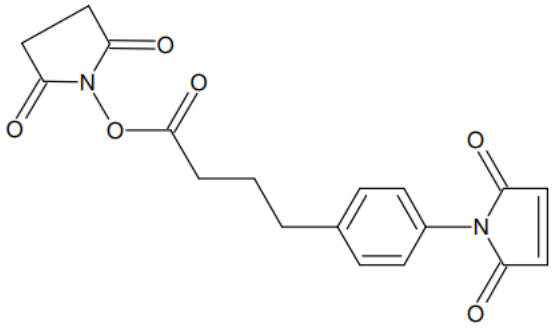
Şekil 2. 46 MBS



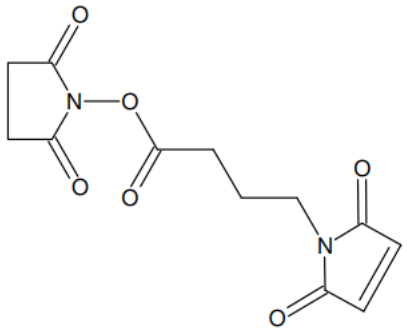
Şekil 2. 47 Sülfo MBS



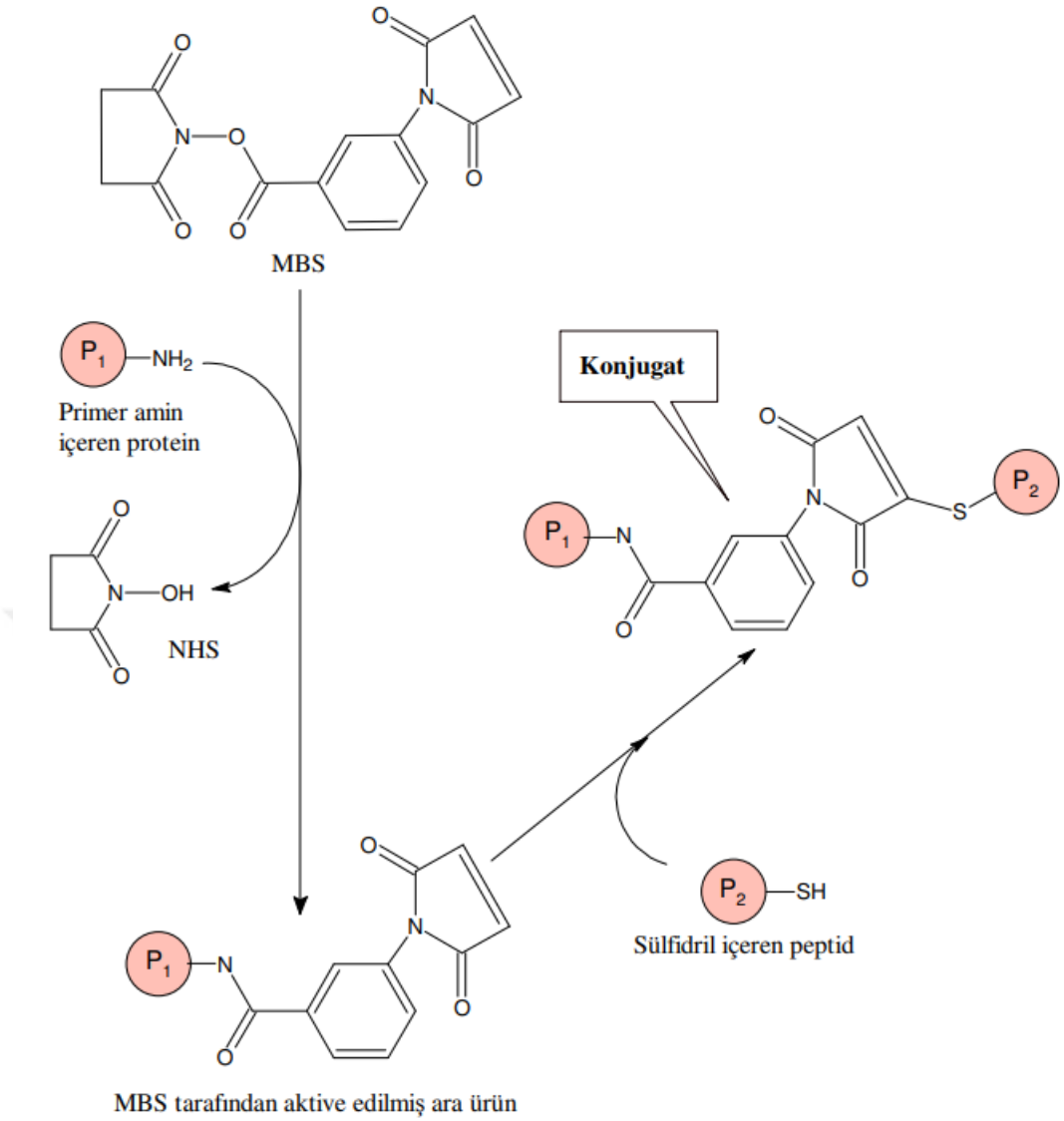
Şekil 2. 48 SIAB (succinimidyl (4-iodoacetyl)aminobenzoate)



Şekil 2. 49 SMPB ((succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrate)



Şekil 2. 50 GMBS (N-γ-maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester)



Şekil 2. 51 MBS varlığında sentezlenen konjugatın reaksiyon mekanizması [123]

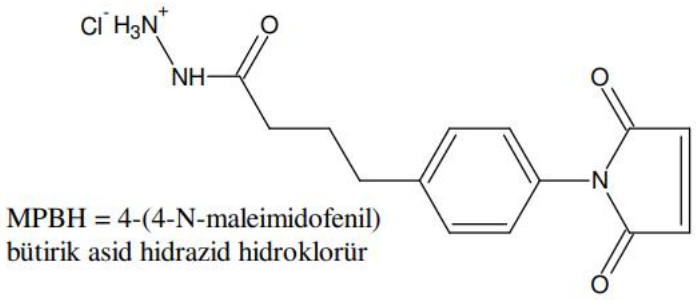
2.4.4.2 Karbonil ve Sülfidril Gruplarını Hedef Alan Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Karbonil ve sülfidril gruplarını hedef alan heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların kullanımındaki avantajlardan biri, glikoproteinleri sülfidril fonksiyonel grubu içeren moleküller ile bağlayabilmeleridir. Proteinlerdeki polisakkaridler ve sülfidril grupları arasındaki mesafe çok olduğundan, bu iki fonksiyonel grup arasındaki konjugasyon aktivasyon merkezine veya bağlanma bölgesine uzakta bir bölgede yönlendirilmekte ve böylelikle protein aktivitesi korunmaktadır.

Karbonil grubunu hedef alan uç genellikle hidrazid fonksiyonel gruplarından oluşur ve aldehid fonksiyonel grupları ile hidrazon bağı oluştururlar.

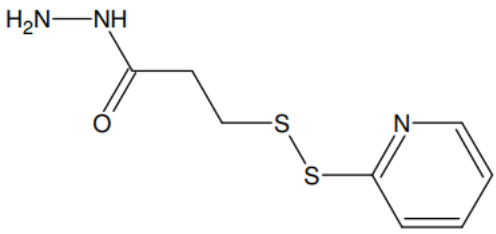
Sülfidril grubunu hedef alan uç ise piridil disülfid veya maleimid fonksiyonel gruplarını içerebilir [122].

Karbonil ve sülfidril gruplarını hedef alan heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların bazıları şekil 2.52 ve şekil 2.53'te verilmiştir.



MPBH = 4-(4-N-maleimidofenil) bütirik asid hidrazid hidroklorür

Şekil 2. 52 MPBH



PDPH = 3-(2-Piridilditiyo) propiyonil hidrazid

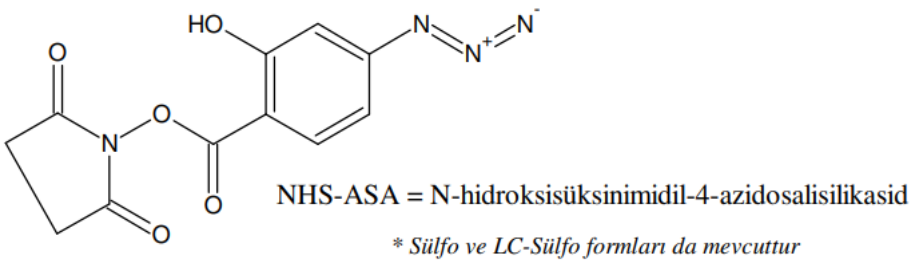
Şekil 2. 53 PDPH

2.4.4.3 Amino Grubunu Hedef Alan ve Fotoreaktif Fonksiyonel Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

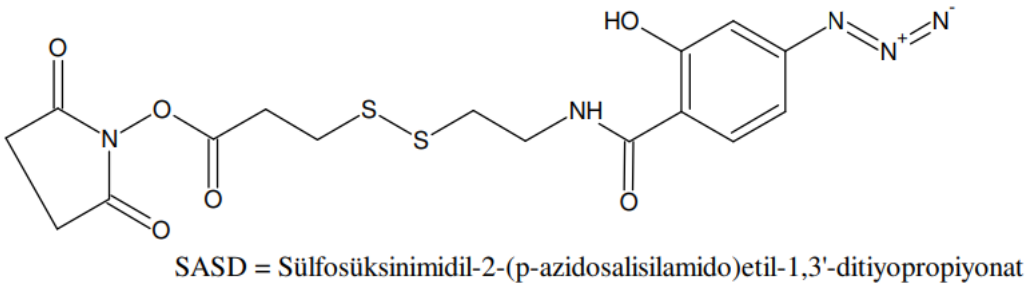
Çapraz bağlama reaktiflerinin önemli altgruplarından biri de, bir tarafında fotoreaktif fonksiyonel, yani konjuasyon reaksiyonunu ışık ile aktifleştirildiğinde başlatan kimyasallar içeren çağraz bağlayıcılardır. Fotoreaktif fonksiyonel grup içeren çapraz bağlayıcılar, ışıksız ortamlardaki sulu çözeltide stabil bir şekilde muhafaza edilebilir ve kullanılmak istendikleri esnada, hangi dalgaboyundaki ışık ile aktifleştiriliyorlarsa o dalgaboyundaki ışık kaynağına maruz bırakılıp aktifleştirilebilirler. Bu da çok daha kontrollü bir konjugasyon reaksiyonuna yol

açar. Fotoreaktif olmayan kısımda ise kendiliğinden aktivite gösteren bir kimyasal bulunabilir [122].

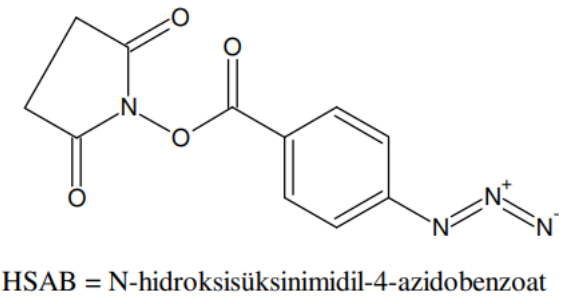
Amino grubunu hedef alan ve fotoreaktif fonksiyonel grup içeren heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinden bazıları şekil 2.54 ve şekil 2.56 arasında verilmiştir [122].



Şekil 2. 54 NHS-ASA



Şekil 2. 55 SASD

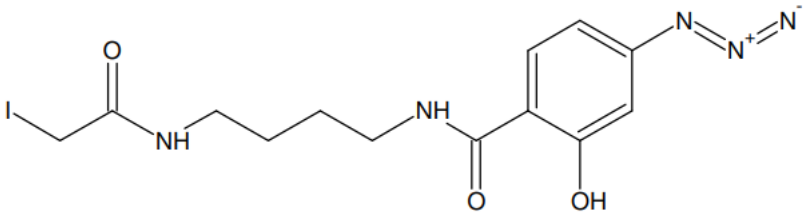


Şekil 2. 56 HSAB

2.4.4.4 Sülfidril Grubunu Hedef Alan ve Fotoreaktif Fonksiyonel Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

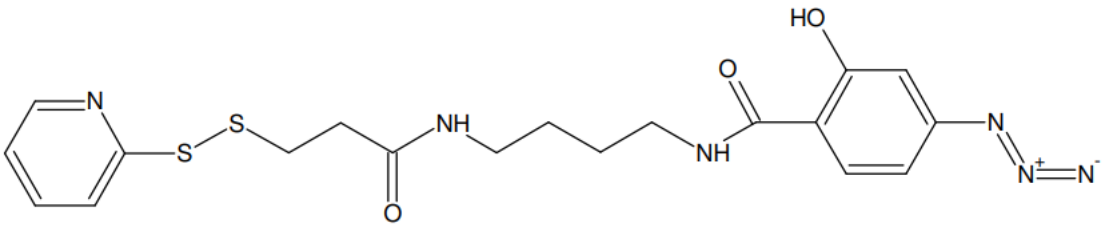
Sülfidril hedefleyen uç piridildisüflfid, maleimidler ve iyodoasetil türevi kimyasal grupları içerir. Fotoreaktif uç ise, benzofenon, arilazid ve benzeri gibi gruplardan oluşabilir [122].

Sülfidril grubunu hedef alan ve fotoreaktif fonksiyonel grup içeren heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinden bazıları şekil 2.57 ve şekil 2.60 arasında verilmiştir.



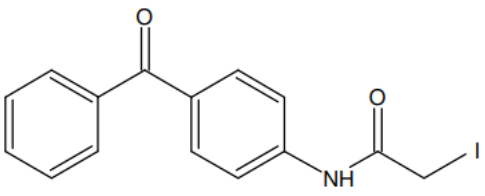
ASIB = 1-(p-Azidosalisilamido)-4-(iyodoasetamido)bütan

Şekil 2. 57 ASIB



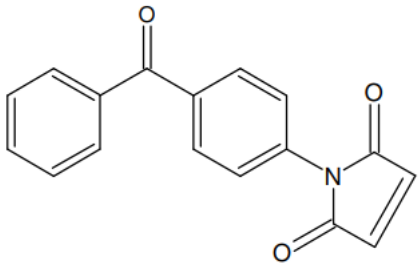
APDP = N-(4-(p-Azidosalisilamido)bütil)-3'-(2'-piridilditiyo)propiyonamid

Şekil 2. 58 APDP



Benzofenon-4-iyodoasetamid

Şekil 2. 59 Benzofenon – 4 - iyodoasetamid

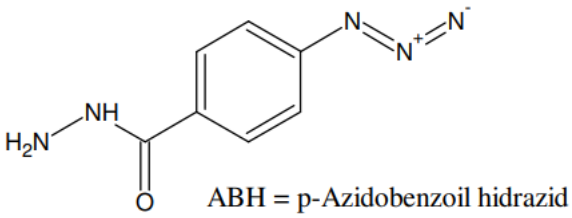


Şekil 2. 60 Benzofenon - 4 - maleimid

2.4.4.5 Karbonil Grubunu Hedef Alan ve Fotoreaktif Fonksiyonel Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Karbonil grubunu hedef alan uç, sıklıkla hidrazid içerir. Fotorektif uçta ise fenil azid fonksiyonel grubu içerebilir [122].

Sıklıkla kullanılan bir karbonil grubunu hedef alan ve fotoreaktif fonksiyonel grup içeren heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olan ABH, Şekil 2.61'de verilmiştir.

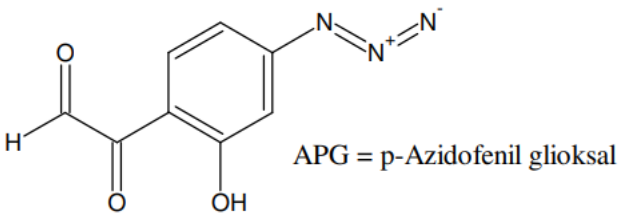


Şekil 2. 61 Karbonil grubunu hedef alan ve fotoreaktif fonksiyonel grup içeren heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olan ABH

2.4.4.6 Arjinin Grubunu Hedef Alan ve Fotoreaktif Fonksiyonel Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Arjinin molekülünde bulunan guanido grubu, diketonlar kullanılarak hedeflenebilmektedir. 1,2-Dikarbonil reaktifleri varlığında bazik ortam koşullarında guanidil ucu ile kondenzasyon reaksiyonu sonucu Shiff bazına benzeyen moleküller oluşur [122].

Şekil 2.62'de, arjinin grubunu hedef alan ve fotoreaktif fonksiyonel grup içeren bir heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olan APG gösterilmiştir.



Şekil 2. 62 Arjinin grubunu hedef alan ve fotoreaktif fonksiyonel grup içeren bir heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olan APG

2.4.5 Direkt (Zero Length) Çapraz Bağlama Reaktifleri

Zero length çapraz bağlama reaktifleri olarak da adlandırılan direkt çapraz bağlayıcılar herhangi bir arabulucu olmaksızın birbirine bağlanmış olan iki reaktif içerirler. Bu da, iki molekülün konjugasyonunda direkt çapraz bağlayıcılar kullanılırsa, moleküller arasında herhangi bir arabulucu olmayacağını gösterir. Bu sebepten ötürü de istenmeyen antikor oluşumları engellenmiş olur.

Direkt çapraz bağlama reaktifleri;

-Primer amino ve karboksilik asit grupları arasında amid bağı oluşturarak,

-Fosfat grupları ve primer aminler arasında fosfoamid bağı oluşturarak,

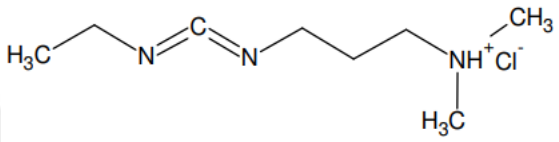
-Aldehitler ile amino gruplarının shiff bazının indirgenmesiyle sekonder veya tersiyer amin bağları oluşturarak, iki molekülü birbirlerine bağlarlar [122].

2.4.6 Karbodiimidler

Biyokonjugasyon reaksiyonlarında en sık kullanılan çapraz bağlayıcılardan olan karbodiimidlerin, suda çözünen ve çözünmeyen formları bulunur. Biyokonjugasyon reaksiyonlarında sıklıkla suda çözünen karbodiimidler tercih edilir. Amid bağı oluşumu sonucu karboksilik asit ve aminlerin birbirlerine, fosfoamid bağı oluşumu sonucu ise fosfat ve amino gruplarının ise birbirlerine kovalent olarak bağlanmasını sağlarlar. Suda çözünmeyen karbodiimidler, organik çözeltilerin kullanılacağı reaksiyonlarda tercih edilir [122].

- EDC

1–Etil–3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (Şekil 2.63), biyokonjugasyon reaksiyonlarında sıklıkla kullanılmakta olan bir karbodiimiddir. Sulu çözeltilerde çözünebilmesi sebebiyle reaksiyon ortamına direkt olarak eklenebilme avantajına sahiptir. Reaksiyona girmeyen ve ortamda serbest halde bulunan EDC, konjugasyonda bir ara ürün olan üre türevinde de çözülebilir olduğundan ortamdan diyaliz veya jel filtrasyon gibi metotlarla kolayca uzaklaştırılabilir [125]. Sulu ortamlarda stabil olmadığından EDC buzlukta saklanmalıdır [122].



Şekil 2. 63 EDC molekülü

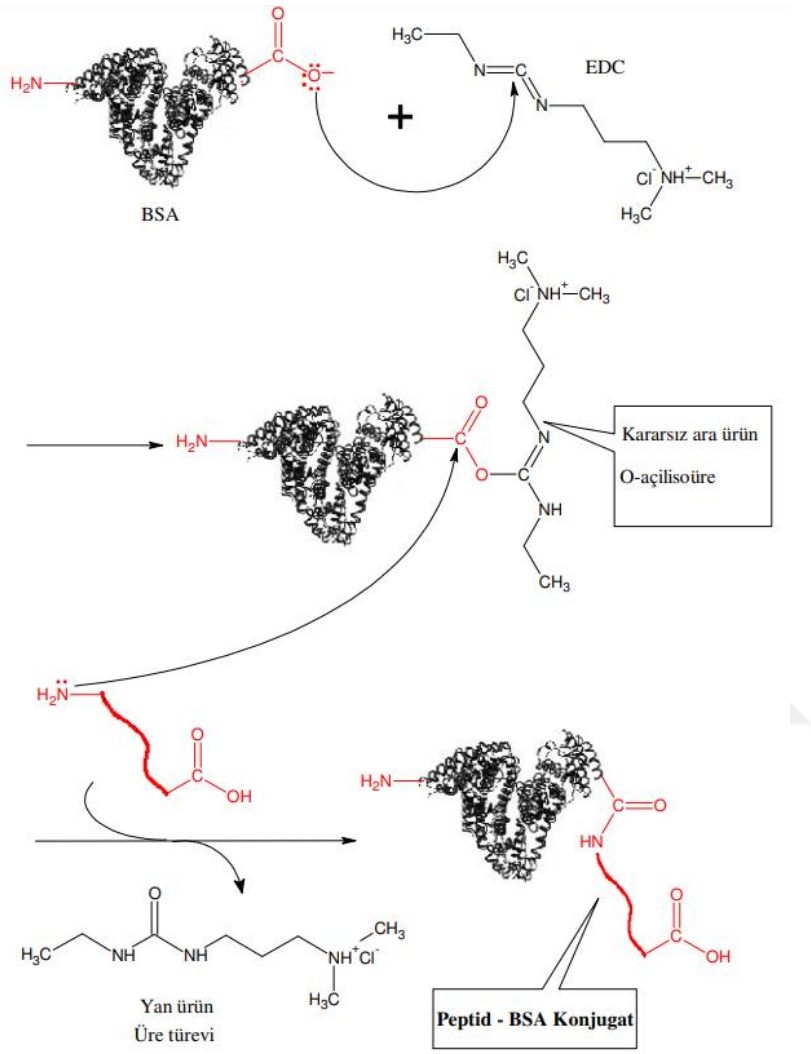
Primer aminler ile karboksil gruplarının konjugatında O-açilisoüre aktif ara ürünü oluşur. Ardından bu ara ürün, nükleofilik özellik gösteren primer aminlerle reaksiyona girer ve amid bağı oluşturur. Reaksiyonda farklı nükleofilik moleküller de reaktif olabilir. Örneğin, sülfidril grubu da oluşan ara ürüne saldırabilir ancak bunun sonucunda oluşacak olan tiyoester bağı, amid bağı kadar kararlı olmayacaktır [122].

EDC kullanılan biyokonjugasyon reksiyonlarında, moleküllerin intramoleküler bağlanması da olabilmektedir. Amino grubu ve karboksil grubu içeren bir makromolekül mevcutsa, EDC tarafından aktive edilmiş karboksil grubu aynı moleküldeki amino grubuna saldırabilir. Bunun sonucunda da, iki molekülü içeren konjugatların yanında oligomerler de oluşabilir. EDC'nin yüksek verim ile çalışabilmesi için gerekli olan pH değeri 4,8 ile 5,2 arasındadır [125].

EDC ile yapılacak biyokonjugasyonlarda, pH kontrolünün sağlanabilmesi için çözücü olarak tampon çözeltiler kullanılır. Nötr pH değerlerinde sentezlenecek olan biyokonjugatlar için 0,1 M fosfat tamponu kullanılması uygundur. Amino

grupları veya karboksilat içeren tampon çözeltileri, EDC ile farklı etkileşimlere yol açacağı için kullanılmamalıdır [125].

Şekil 2.64' de EDC kullanılarak sentezlenen konjugatların reaksiyon mekanizması verilmiştir.

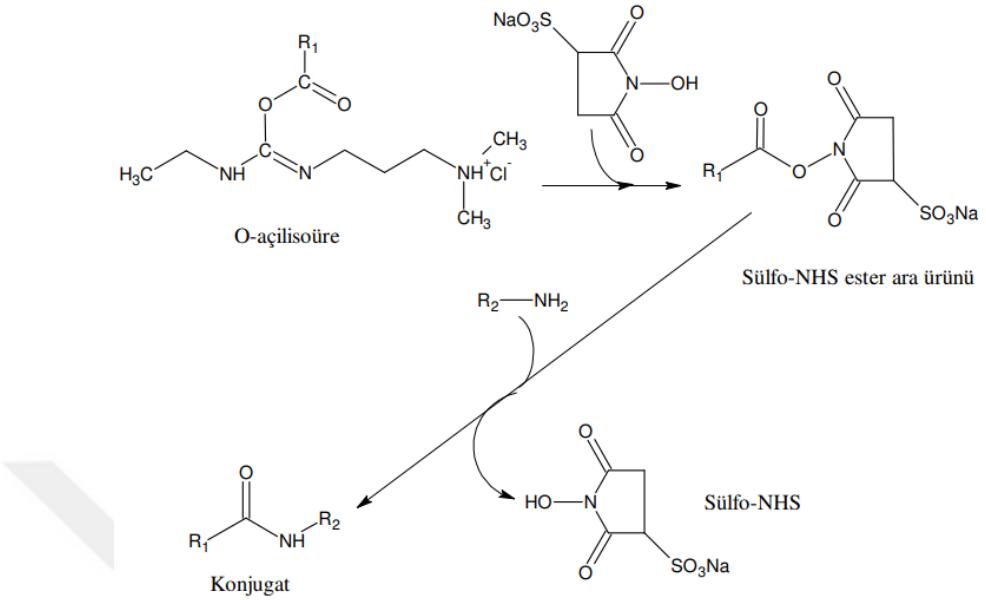


Şekil 2. 64 EDC kullanılarak sentezlenen biyokonjugat mekanizması [123]

- EDC Sülfo NHS

Suda çözünebilen karbodiimid çapraz bağlayıcıları, kaboksil fonksiyonel gruplarıyla aktif ester ara ürünü oluşturabilmek adına sülfo NHS ile beraber kullanılabilirler [122]. Oluşan O-açilisoüre aktif ara ürünü ile reaksiyone giren sülfo NHS sayesinde aktif ester ara ürünü oluşur. Aktif ester ara ürünü ile primer

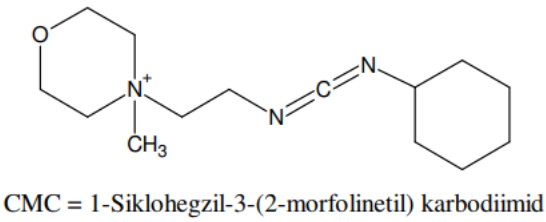
amino gruplarının reaksiyonu da amid bağı oluşturur [125]. Şekil 2.65' de, EDC sülfo NHS kullanılarak yapılan konjugasyonun reaksiyon mekanizması verilmiştir.



Şekil 2. 65 EDC sülfo NHS kullanılarak yapılan konjugasyonun reaksiyon mekanizması [123]

- CMC

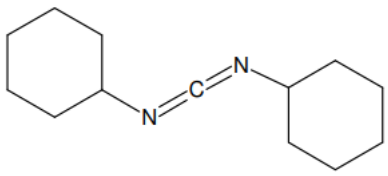
1 – Siklohegzil – 3 - (2-morfolinetil) karbodiimid (Şekil 2.66), yapısında bulundurduğu morfolin fonksiyonel grubunun sayesinde suda çözünebilen bir çapraz bağlayıcıdır. Karboksil ve amino gruplarını kovalent olarak birbirlerine bağlar.



Şekil 2. 66 CMC

- DCC

Disiklohegzilkarbodiimid (Şekil 2.67), suda çözünemeyen bir çapraz bağlayıcıdır. Bu sebepten ötürü organik çözücülerin kullanılacağı reaksiyonlarda, 80°C'ye kadar kullanılabilir [122].

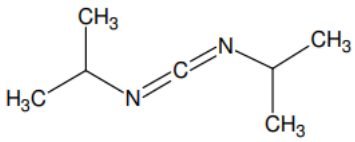


DCC = N,N' Disiklohegzil karbodiimid

Şekil 2. 67 DCC

- DIC

Diizopropilkarbodiimid (Şekil 2.68), suda çözünemeyen bir çapraz bağlayıcıdır [122].

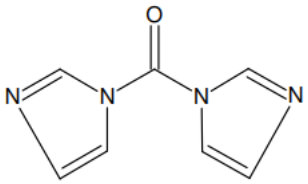


DIC = Diizopropil karbodiimid

Şekil 2. 68 DIC

- N,N-Karbonildiimidazol

N,N-Karbonildiimidazol (Şekil 2.69), iki tane açilimidazol fonksiyonel grubu içeren bir çapraz bağlayıcı olup bahsedilen bu açilimidazoller, reaksiyon esnasında ikiye ayrılır [122].



CDI = N,N'-Karbonildiimidazol

Şekil 2. 69 CDI

3
DENEYSEL YÖNTEM

3.1 Kullanılan Malzemelerin ve Cihazların Listesi

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

• Hanna precision pH Metre

• XB 220A SCS Precisa Analitik Terazi

• Sartorius CP225D Analitik Terazi

• Heraeus Biofuge Stratos Santrifüj Cihazı

• Heildolph MR3001 Isıtıcı ve Karıştırıcı

• IKAMAG Manyetik Karıştırıcı

• Eppendorf Otomatik Pipet

• SEC (Viscotek/TDA 302)

• Malvern Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 Zetapotansiyel ve Partikül Boyut Ölçümü Cihazı

• PTI QM-4/2003 Floresans Spektrofotometre

• Shimadzu UV1601 UV-VIS Spektrofotometre

• Milipore Ultra Saf Su Cihazı

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Aşağıda listelenmiş olan kimyasal malzemeler tedarik edildikleri gibi kullanılmışlardır, herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

Tablo 3. 1 Kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal	Alınan firma	Katalog no
HF-18 peptidi	Genscript	U2903GE190
Poly(acrylic acid) Mw ~100,000, 35 wt. % in H2O	Sigma Aldrich	9003-01-4
EDC	ABCR	AB181824
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH_2PO_4)	Sigma Aldrich	7558-80-7
Disodyum hidrojen fosfat, ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	Sigma Aldrich	7582-85-6
Sodyum klorür, (NaCl)	Sigma Aldrich	7647-14-5
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Sigma Aldrich	1310-73-2
Hidroklorik asit, (HCl)	Sigma Aldrich	7647-01-0
Sodyum azid, (NaN_3)	Sigma Aldrich	26628-22-8

3.1.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

0.01 M PBS Tamponu (pH 7.2)

2,6807g $Na_2HPO_4.7H_2O$ (Mw=268.07 g/mol) tartılır ve 500 mL ultra saf suda çözülür. Daha sonra 1.56g $NaH_2PO_4.2H_2O$ (Mw=156.01 g/mol) tartılarak 450 mL ultra saf suda çözülür. Hazırlanan NaH_2PO_4 çözeltisi 1 L' lik balon joje içerisindeki Na_2HPO_4 çözeltisi ile karıştırılır. Ardından jojede bulunan karışıma 8,766 g NaCl

eklenilir ve karıştırılır. pH 7,2 olacak şekilde ayarlamalar yapılır. Çözeltinin hacmi saf su ile 1L'ye tamamlanır. Ardından gözenek büyüklüğü 0,45 μm olan şırınga filtreden süzülür.

0.01 M PBS Tamponu (pH 5)

2,6807g $Na_2HPO_4.7H_2O$ (Mw=268.07 g/mol) tartılır ve 500 mL ultra saf suda çözülür. Daha sonra 1.56g $NaH_2PO_4.2H_2O$ (Mw=156.01 g/mol) tartılarak 450 mL ultra saf suda çözülür. Hazırlanan NaH_2PO_4 çözeltisi 1 L' lik balon joje içerisindeki Na_2HPO_4 çözeltisi ile karıştırılır. Ardından jojede bulunan karışıma 8,766 g NaCl eklenilir ve karıştırılır. pH 5 olacak şekilde ayarlamalar yapılır. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlanır. Ardından gözenek büyüklüğü 0,45 μm olan şırınga filtreden süzülür.

3.2 HF-18 Peptidinin Poliakrilik Asit Polimeri (PAA) ile Fiziksel Kompleksinin Hazırlanması

HF-18 peptidi ile poliakrilik asit polimeri (PAA) kullanılarak, 1 mg/mL peptid ve 1 mg/mL PAA içeren bir fiziksel kompleks sentezlenmiştir.

3.3 Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu

3.3.1 PAA- Peptid Konjugasyonuna Ait Hesaplamalar

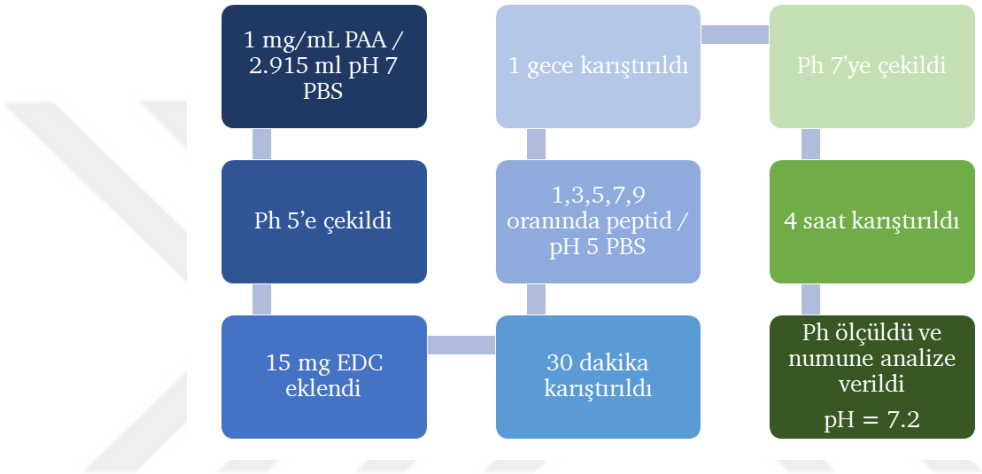
Tez kapsamındaki deneysel çalışmalarda PAA polimeri ile HF-18 peptidinin konjugasyonunu gerçekleştirmek için iki farklı yöntem kıyaslanmıştır.

Deneysel çalışmalarda HF-18 peptidi ile 2 farklı sentez yöntemi denendi bunlardan en iyi sonuç alınan yöntemle $n_{pep}/n_{polimer}$ oranı = 1, 3, 5, 7 ve 9 olacak şekilde 5 farklı artan peptid oranında konjugat sentezi yapıldı. Konjugatların oluşum mekanizmaları, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri Floresans, UV-VIS Spektrofotometre, Zetasizer ve GPC cihazları kullanarak incelendi.

1. Yöntem

1 mg/ml'lik Poliakrilik asit çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan 1 mg/ml'lik Poliakrilik asit çözeltisi, her bir konjugat için ayrı ayrı olmak üzere pH 7.2'deki PBS tamponu ile karıştırıldı. Karışımın ardından pH değerleri EDC' nin ortam gereklilikleri

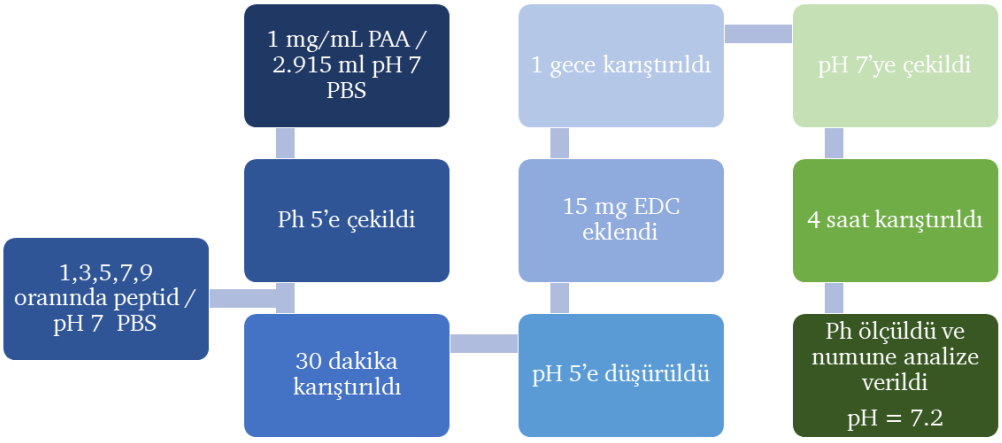
sebebiyle 5'e çekildi. Her bir karışımın üzerine 15 mg EDC eklendi. Polimerdeki karboksilik asit uçlarının aktivasyonu için 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldı. Karışımların üzerine 1, 3, 5, 7 ve 9 oranlarında hesaplanan miktarlarda peptidler eklendi. Konjugatlar bir gece boyunca 4 °C'de karıştırıldı. Ertesi gün pH değerleri 7.2' ye çekilerek reaksiyon sonlandırıldı ve 4 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyonun sonlanmasının ardından pH değerleri ölçüldü ve konjugatlar analiz edilmeye başlandı. 1. Yöntem ile yapılan konjugat sentezinin adımları Şekil 3.1'de verildi.



Şekil 3. 1 1. Yöntemle sentezlenen Peptid-PAA konjugasyonunun hazırlanış şeması

2. Yöntem

1 mg/ml'lik Poliakrilik asit çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan 1 mg/ml'lik Poliakrilik asit çözeltisi, her bir konjugat için ayrı ayrı olmak üzere pH 7'deki PBS tamponu ile karıştırıldı ve pH değerleri 7.2' ye çekildi. Karışımların üzerine 1, 3, 5, 7 ve 9 oranlarında peptidler eklendi ve 30 dakika karıştırıldı. pH değerleri EDC'nin ortam gereklilikleri sebebiyle 5'e çekildi. Her bir karışımın üzerine 15 mg EDC eklendi. Konjugatlar bir gece boyunca 4 °C'de karıştırıldı. Ertesi gün reaksiyonun bitmesi adına konjugatların pH değerleri 7.2'ye çekildi ve 4 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyonun sonlanmasının ardından pH değerleri ölçüldü ve konjugatlar analiz edilmeye başlandı. 2. Yöntem ile yapılan konjugat sentezinin adımları Şekil 3.2'de verildi.



Şekil 3. 2 2. Yöntemle sentezlenen Peptid-PAA konjugasyonunun hazırlanış şeması

Konjugasyon için; PBS ve polimer konsantrasyonu sabit tutulmuştur ve farklı peptid konsantrasyonlarındaki çözeltiler ile çalışılmıştır. HF-18 peptidi için 5 farklı orana (n=1, 3, 5, 7 ve 9) sahip konjugat sentezlenmiştir. Konjugat oranlarının sentezinde kullanılan hesaplamalar aşağıda gösterilmiştir.

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep}.M_{PAA}}{c_{PAA}.M_{pep}} = 1; 3; 5; 7; 9$$

PAA'nın çözelti içerisindeki konsantrasyonu 1mg/ml olarak çalışılmıştır.

• n_{pep}/n_{PAA} =1 olan 6 ml Peptid-Poliakrilik Asit konjugatı için hazırlanan çözelti;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep}.M_{PAA}}{c_{PAA}.M_{pep}} \Rightarrow 1 = \frac{\frac{xmg}{6ml}.100000}{2264.\frac{6mg}{6ml}} \Rightarrow \text{x}$$

$$= 0.1358 \text{ mg peptid, 6 ml'de}$$

• n_{pep}/n_{PAA} =3 olan 6 ml Peptid-Poliakrilik Asit konjugatı için hazırlanan çözelti;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep}.M_{PAA}}{c_{PAA}.M_{pep}} \Rightarrow 3 = \frac{\frac{xmg}{6ml}.100000}{2264.\frac{6mg}{6ml}} \Rightarrow \text{x}$$

$$= 0.4074 \text{ mg peptid, 6 ml'de}$$

• n_{pep}/n_{PAA} =5 olan 6 ml Peptid-Poliakrilik Asit konjugatı için hazırlanan çözelti;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep}.M_{PAA}}{c_{PAA}.M_{pep}} \Rightarrow 5 = \frac{\frac{xmg}{6ml}.100000}{2264.\frac{6mg}{6ml}} \Rightarrow \text{x}$$

$$= 0.679 \text{ mg peptid, 6 ml'de}$$

• n_{pep}/n_{PAA} =7 olan 6 ml Peptid-Poliakrilik Asit konjugatı için hazırlanan çözelti;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep}.M_{PAA}}{c_{PAA}.M_{pep}} \Rightarrow 7 = \frac{\frac{xmg}{6ml}.100000}{2264.\frac{6mg}{6ml}} \Rightarrow \text{x}$$

$$= 0.9506 \text{ mg peptid, 6 ml'de}$$

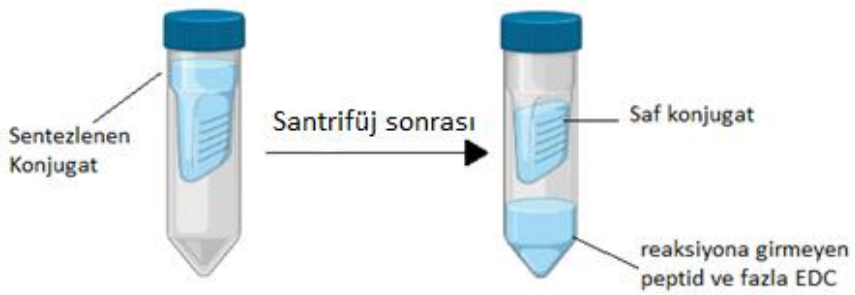
• n_{pep}/n_{PAA} =9 olan 6 ml Peptid-Poliakrilik Asit konjugatı için hazırlanan çözelti;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep}.M_{PAA}}{c_{PAA}.M_{pep}} \Rightarrow 9 = \frac{\frac{xmg}{6ml}.100000}{2264.\frac{6mg}{6ml}} \Rightarrow \text{x}$$

$$= 1.222 \text{ mg peptid, 6 ml'de}$$

3.3.2. Konjugatların Saflaştırılması

Farklı boyutlarda olan molekülleri birbirlerinden ayırma özelliğe sahip mebranlar bulunduran santrifüj tüpler, kimyasalların ortamda bulunmaması istenen küçük moleküllerin uzaklaştırılmasında ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Bunun için saflaştırılması istenen kimyasal, membran bulunduran santrifüj tüpüne eklenir ve tüp santrifüje maruz bırakılır. Devir sonucu tüpün içinde bulunan membranın gözeneklerinden daha küçük boyuttaki moleküller tüpün alt fazına geçer. Membrandan daha büyük boyuta sahip molekül/moleküller ise üst fazda kalırlar. Bu sayede membranlı santrifüj tüpü kullanılarak kimyasal saflaştırılır ve konsantre edilir (Şekil 3.3) [126].



Şekil 3. 3 Membranlı santrifüj tüpü ile saflaştırmaya ait şematik gösterim

3.3.3. Peptid-Polimer Konjugatlarının Karakterizasyonu

3.3.3.1 UV-Vis Spektrofotometre Ölçümleri

Çoğu biyomolekül UV ışık absorpsiyonu yapar. Biyomoleküllerin UV ışığı absorplama özellikleri; bulundukları çözeltilerin konsantrasyon ve saflık tayini analizlerinde kullanılır. Bir biyomolekül olan proteinler, ultraviyole bölgede iki farklı absorbansa sahip olup, bunlardan biri 215- 230 nm'dedir ve peptid bağı absorpsiyonundan kaynaklanır. Diğer absorpsiyon bölgeleri ise 280 nm'de, yapılarında bulunan aromatik amino asitlerin (triptofan, tirozin ve fenilalanin) absorbansından kaynaklanır. Proteinlerin UV ışık absorplama özelliği kullanılarak protein çözeltilerinin konsantrasyonları hesaplanabilir. Bu hesaplama da UV-Vis spektroskopisi oldukça yaygın kullanılmaktadır [127]. Protein çözeltilerinin 280 nm'deki absorbans değerleri ile derişimleri arasındaki doğru orantılı ilişkiden yararlanılarak protein çözeltilerinde konsantrasyon tayini yapılmaktadır.

3.3.3.2 Floresans Spektrofotometre Ölçümleri

Spektroskopik yöntemler, elektromagnetik dalgalar ile molekül etkileşimini araştıran deneysel tekniklerin başında gelmektedir. Floresans spektroskopisi, maddelerin floresans özelliği üzerine kurulmuştur. Bu spektroskopi yöntemi sayesinde, ilgili madde çok büyük bir hassaslık oranında analiz edilebilir. Floresans spektroskopi yöntemi yüksek seçicilikte çalışmak ile birlikte, floresans özellik gösteren maddelerin az sayıda olması, floresans spektroskopisi yöntemi için büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır. Proteinlerin ve peptidlerin yapısında bulunan amino asitlerden; triptofan, tirozin ve fenilalanin en yüksek floresansa sahip olup, bu üçünün arasından triptofan en yüksek floresansa sahiptir.

Tez çalışmasında kullanılan HF-18 peptidinde triptofan (Trp, W) ve fenilalanin (Phe, F) bulunduğu için konjugasyonun saptanmasında floresans spektroskopisi kullanılmıştır.

Serbest haldeki peptid dizisinde daha açıkta bulunan triptofan amionasiti, sulu ortamla etkileşim içerisinde olup ve daha düşük enerjiye sahip olan ışımalar aracılığıyla uyarılabilir. Konjugasyonun tamamlanmasının ardından, triptofan

sulu ortamdan uzaklaşması ve hidrofobik bölgeye girmesi sonucu, uyarma için gereken enerji artacaktır.

$$E = \frac{hc}{\lambda} \tag{3.1}$$

Yukarıdaki eşitlikten de görülebileceği gibi, uyarım için gerekli olan enerji artarsa, dalga boyu küçülür. Bu da λ_{max} değerinin küçük dalga boyuna doğru kayması anlamına gelir. Bir molekülün uyarıldığı dalga boyu kaydığında, yaptığı floresans ışımanın λ_{max} değeri de buna bağlı olarak küçülür ve blue shift verir [128, 129]. Yapılan tez çalışmasında, ilk olarak farklı oranlardaki serbest peptid moleküllerinin λ_{max} değerleri floresans spektroskopisi yardımıyla belirlenmiştir. Ardından sentezlediğimiz konjugatlarda bulunan triptofan aminoasitinin konformasyon değişikliği sebebiyle gözlenen λ_{max} değerinde gözlenen kaymalar yardımı ile konjugasyonun oluşumu gözlenmiştir. Sentezlenen konjugatların, konjugasyon başlangıcında kullanılan serbest peptid miktarı ile kıyaslanarak ölçülen floresans spektrumları, 0,5 nm slit aralığında ve 280 nm'de uyarma yapılarak ölçülmüştür.

3.3.3.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Boyutlarından birinin 1 nm – 1 μm arasında olan peptid, protein, polimer, vb. bir maddenin, bir çözücüde çözünmesi sonucu oluşan çözeltiye, kolloidal süspansiyon denir. Bir kolloidal sistemin önemli özellikleri arasında, partikül boyutları ve yüzey özellikleri bulunur. Peptid, protein, polimer gibi maddelerin bulunduğu çözeltilerin boyut analizleri, Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılarak yapılır.

Yapılan tez çalışmasında, zeta potansiyel ölçümü için; pH=7.2' de anyonik olan PAA polimeri ve katyonik olan HF-18 peptid molekülü temel alınmıştır. PAA ve peptid biyokonjugatının partikülleri, ortamda bulunan iyonlarla girdikleri elektrostatik etkileşimler sonucu pozitif iyonları çekerler ve negatif iyonları da iterler. Partikül yüzeyinin hemen dışında bulunan pozitif iyonların yüzeye sıkıca bağlı oldukları ve Stern katmanı olarak adlandırılan bir tabaka oluştururlar. Stern katmanından sonra, iyonların hareket edebildiği bir difüz bölgesi vardır. Bu difüz

bölgesinde; hayali olarak var olduğu düşünülen bir kayma düzlemi mevcuttur ve bu düzlemin içindeki pozitif iyonlar, partikül ile beraber hareket etmeye zorlanırken, dışında kalan iyonlar ise bağımsız olarak hareket edebilmektedirler. Molekülün Stern katmanındaki elektrik potansiyeline Stern potansiyeli, kayma düzlemindeki elektrik potansiyeline ise Zeta Potansiyeli denir.

3.3.3.4 GPC Analizi

Kromatografi, fizikokimyasal bir metot olup birçok biyolojik ve kimyasal molekülün incelenmesinde kullanılır. Analiz edilecek madde göz önünde bulundurularak farklı dolgu maddeleri bulunduran kolonlar kullanılır ve bu kolonlar yardımıyla kimyasallar birbirinden ayrılır [130].

Moleküler Eleme Kromatografisi, peptidlerin, proteinlerin veya polimerlerin fiziksel etkileşimler sonucu molekül ağırlıklarına, boyutlarına ve şekillerine göre kromatografi yardımıyla ayrılmasında kullanılır.

Sentezlenen konjugatlar gözenek boyutu 0.45 μm olan şırınga filtresinden süzülmüştür ve GPC cihazında analize verilmişlerdir. Ölçümler 25 °C sıcaklıkta, 0.9 akış hızında, 100 μL enjeksiyon hacminde ve Shim-pack Diol-300 (500 mmL $\times$ 7.9 mmI.D., 5 μm) kolonunda UV (280 nm'de), kırılma indisi ve ışık saçılması dedektörü kullanılarak gerçekleşmiştir. Mobil faz olarak pH 7.2 PBS tamponu kullanılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan peptidin ve polimerin boyutları ve molekül ağırlıkları birbirinden farklı olduğundan, farklı boyutlarda moleküllerin karışması sonucu oluşan çözeltideki moleküllerin hidrodinamik çapları ve hidrodinamik hacimleri birbirinden farklıdır. Kullanılan peptid molekülü polimerden daha küçük olduğundan, kolonun gözeneklerinde daha fazla zaman geçireceklerinden kolondan geç çıkacaklardır. Molekül boyutu daha büyük olan polimer molekülü ise kolondaki gözeneklerle daha az etkileşeceği için kolondan daha hızlı çıkacaktır. Molekül boyutları ve çıkış süreleri ters orantılı olan bu ayırma yönteminin sonucunda elde edilen moleküller, UV ve ışık saçılması dedektörleri yardımıyla kromotograma dönüştürüleceklerdir [131].

3.4 Termal ve pH Stabilite

Serbest peptidlerin biyouyumlu polimerlere bağlandığında stabilitelerinin arttığı bilinmektedir. Bu, peptidin serbest haline oranla molekül ağırlığının artması ve konjugasyonda kullanılan polimerin adeta bir kalkan gibi peptidi dış etkenlere (sıcaklık, pH, enzimatik aktivite, vb.) karşı korumasından [132-133] ve/veya kullanılan polimerin peptid ile ortam arasındaki ilişkiyi regüle etmesi [134] sonucu mümkün olabilir.

Çalışmamızda sentezlenen n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 7 ve 9 olan konjugatların pH ve termal stabiliteleri serbest peptid ile kıyaslanarak belirtilmiştir.

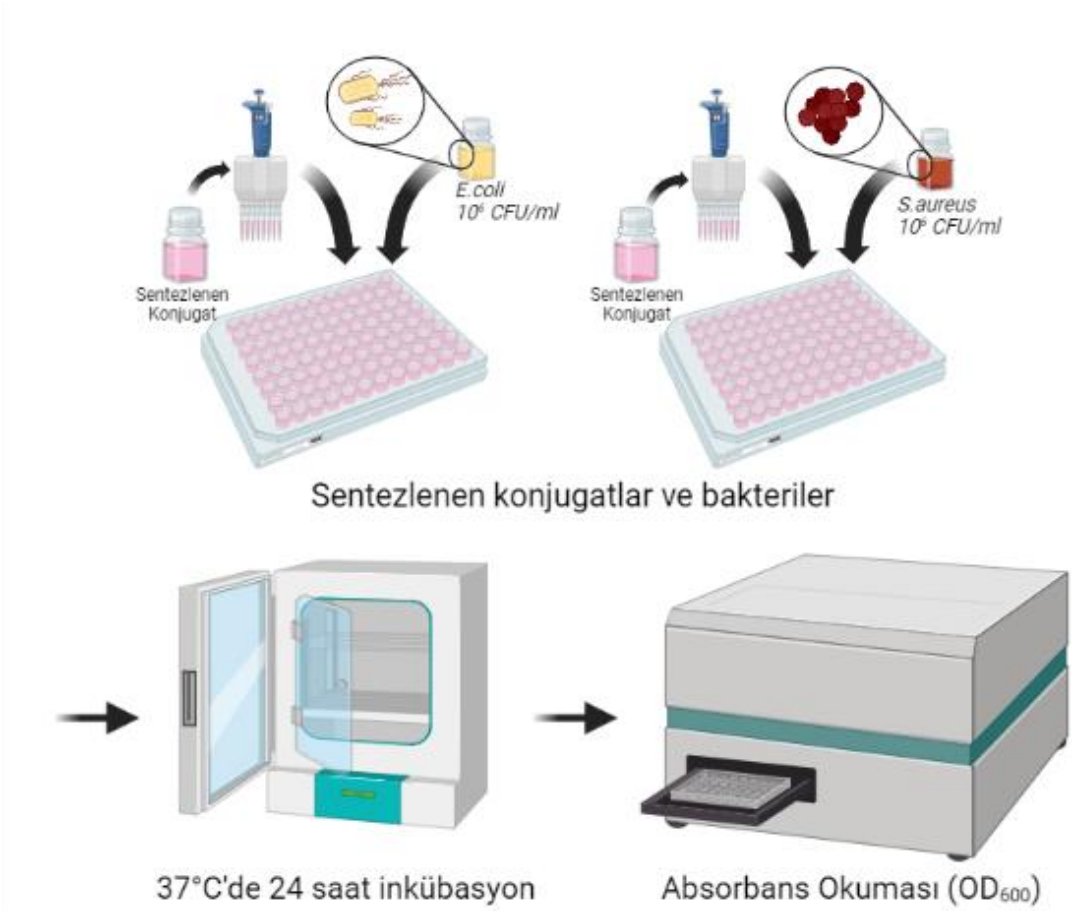
Serbest peptid ve n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 7 ve 9 olan konjugatların sulu çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin pH değerleri 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanılarak 2-11 aralığına ayarlanmıştır [136]. Absorbans değerleri 25±0.1°C'de UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 280 nm dalgaboyunda ölçülmüştür ve peptid konsantrasyonlarındaki değişim hesaplanarak stabiliteleri incelenmiştir.

Serbest peptid ve n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 7 ve 9 olan konjugatların termal stabiliteleri; sulu çözeltileri kullanılarak 30 ve 60 dakika boyunca oda sıcaklığı, 30°C, 40°C, 60°C, 80°C ve 100°C' lik sıcaklığa maruz bırakılarak kıyaslanmış ve peptid konsantrasyonlarındaki değişim hesaplanarak stabiliteleri incelenmiştir.

3.5 Antimikrobiyal Aktivite

Broth-Mikrodilüsyon Yöntemi ile yapılan antimikrobiyal aktivite analizinde, oda şartlarındaki n_{Peptid}/n_{PAA} 9 oranındaki serbest peptid (0.080 mg/mL) ve sentezlenen konjugat (serbest peptide eşdeğer peptid içeren konjugat), pH'ı 2'ye ayarlanmış n_{Peptid}/n_{PAA} 9 oranındaki serbest peptid ve sentezlenen konjugat ve 100 °C'ye maruz bırakılmış n_{Peptid}/n_{PAA} 9 oranındaki serbest peptid ve sentezlenen konjugat, kıyaslamalı olarak analiz edilmiştir. Farklı hacimlerde numuneler (100, 50, 25, 12,5 μL) 96 kuyulu plakanın kuyularına aktarılmıştır. Ardından kuyulara 100 μL ve 10^6 CFU/ml bakteri süspansiyonu eklenir, hacim 200 μL'ye besiyeri ile tamamlanmıştır. 37°C'de bir gece bekletilip 24 saatin ardından ortamdaki

bakterilerin büyümesi 600 nm'de (OD_{600}) absorbans ölçümü ile tayin edilmiştir (Şekil 3.4) [137-138].

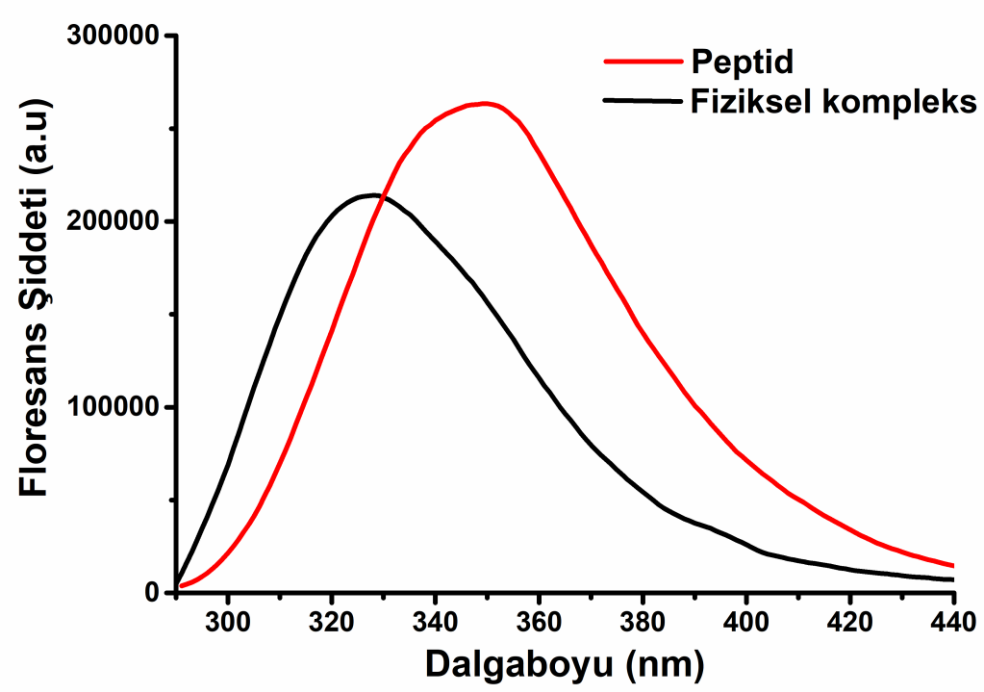


Şekil 3. 4 Antimikrobiyal analizin şematik gösterimi

4
DENEYSEL SONUÇLAR

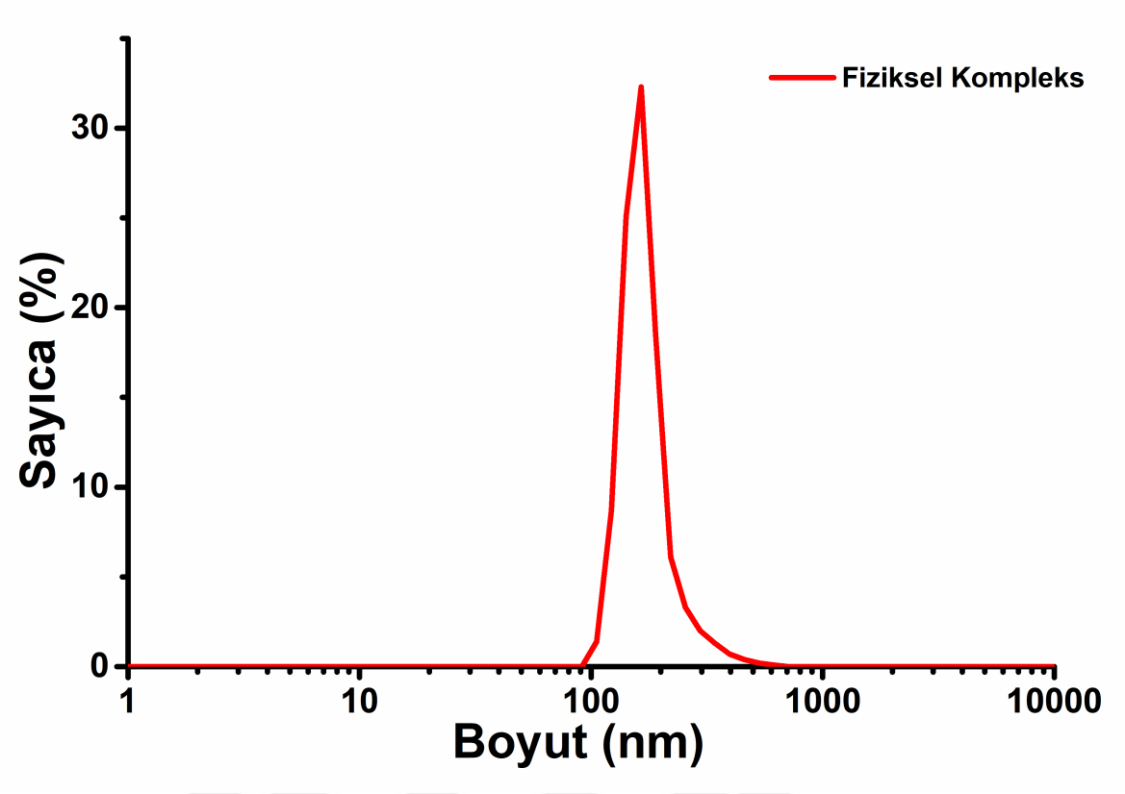
4.1. Peptid-Polimer Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

HF-18 peptidi ile PAA'nın pH=7,2 değerinde ve 1 mg/ml konsantrasyona sahip fiziksel kompleks çözeltisi hazırlanmıştır, oluşan kompleksin floresans spektrumu, komplekste kullanılan miktarda serbest peptidin floresans spektrumu ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4. 1 1:1 Oranında hazırlanan peptid-PAA fiziksel kompleksine ait peptid kıyaslamalı floresans spektrumu

Fiziksel kompleksin ZetaSizer analiz sonucunda boyutu 174.0 nm ve zeta potansiyeli -33.2 ± 0,321 mV olarak ölçülmüştür. 1:1 oranında hazırlanan peptid-PAA fiziksel kompleksine ait sayıca boyut grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

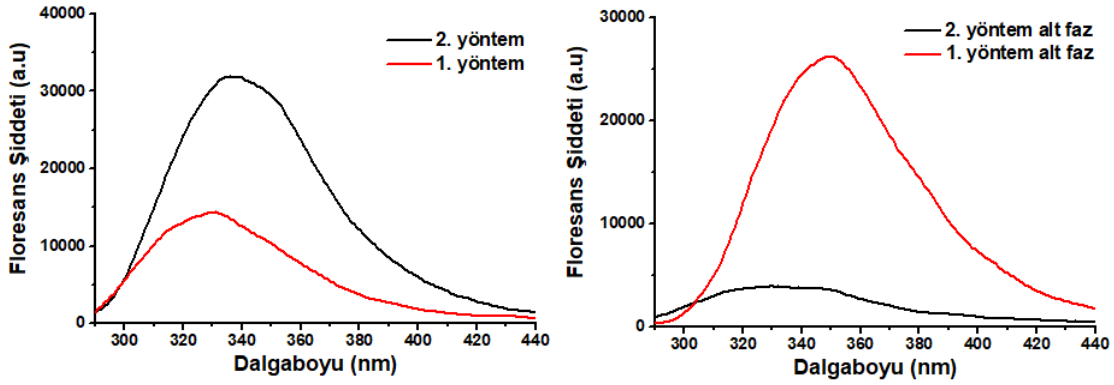


Şekil 4. 2 1:1 Oranında hazırlanan peptid-PAA fiziksel kompleksine ait sayıca boyut dağılım grafiği

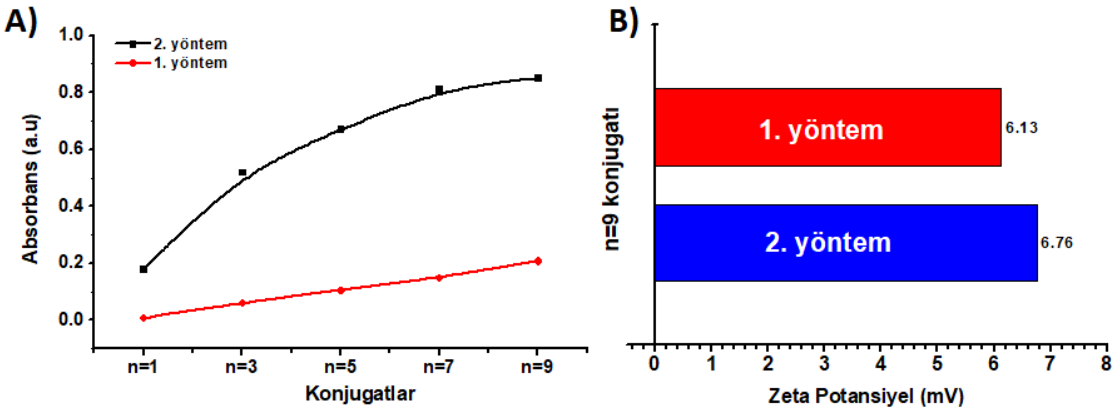
4.2 Peptid-Polimer Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu

4.2.1 Konjugatlarının Sentezinde Kullanılacak Yöntemin Belirlenmesi

Peptidin PAA ile EDC yöntemi ile biyokonjugasyonu için en verimli konjugasyon yöntemini belirleyebilmek için 2 farklı yöntem denenmiştir. Elde edilen konjugatlar membranlı santrifüj tüpü ile saflaştırılmış ve üst faz (konjugat) ve alt faz (reaksiyona girmeyen peptid ve fazla EDC) karakterizasyonu spektroskopik yöntemlerle ve ZetaSizer analizi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4. 3 Farklı 2 yöntemle sentezlenen n=9 oranındaki konjugata ait konjugat (üst faz) ve alt faz (reaksiyona girmeyen peptid) floresans ölçümlerine ait karşılaştırmalı spektrumlar



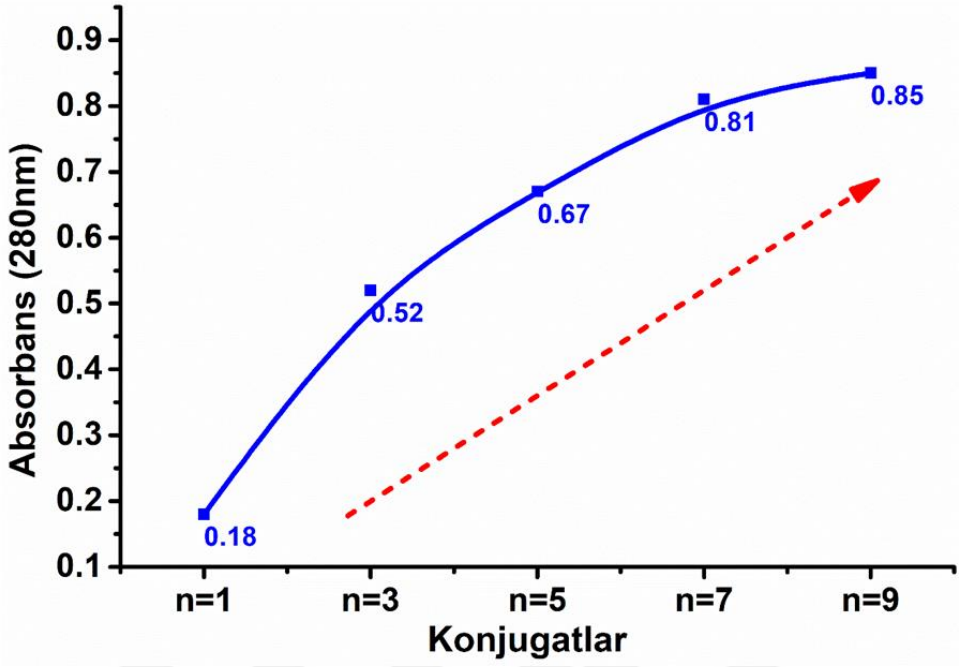
Şekil 4. 4 Farklı 2 yöntemle sentezlenen A) n=1, 3, 5, 7, 9 oranındaki konjugatlara ait 280 nm'deki UV absorbansları B) n=9 konjugatına ait zeta potansiyel sonuçları (mV)

4.2.2 Peptid- PAA Konjugasyonları

Bu tez çalışmasında, HF-18 peptidi ile PAA kullanılarak EDC çapraz bağlama reaktifi varlığında, peptidin artan oranlarında n= 1, 3, 5, 7, 9 oranlarında konjugatlar sentezlenmiştir. Sentezlenen konjugatlar UV-Vis ve Floresans Spektrofotometre, ZetaSizer ve GPC ile analiz edilmiştir.

4.2.2.1 UV-Vis Ölçümleri

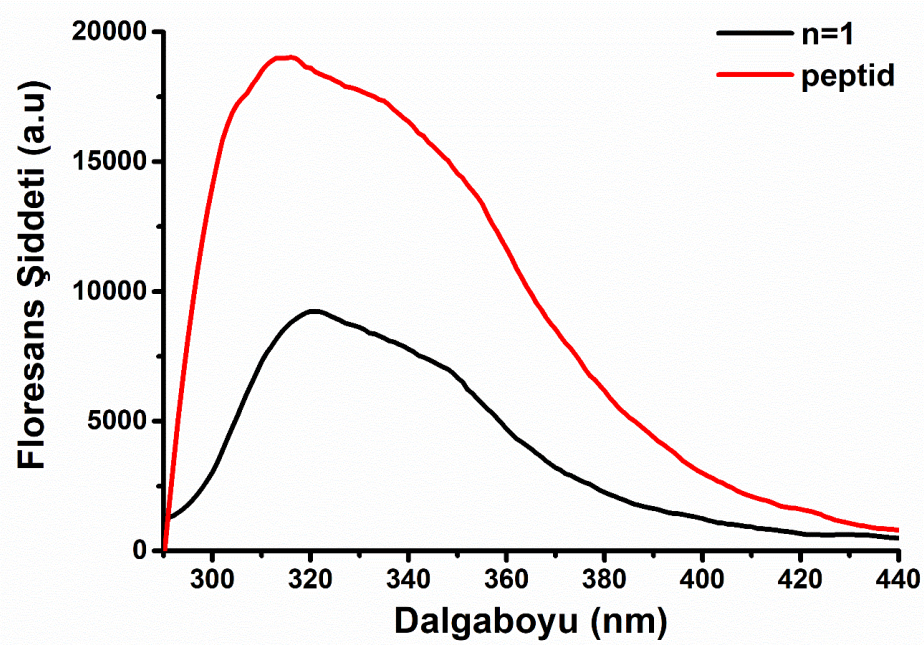
n_{Peptid}/n_{PAA}= 1, 3, 5, 7 ve 9 oranlarında sentezlenen konjugatların 280 nm'de ölçülen UV absorbans değerlerine ait grafik Şekil 4.5' de gösterilmiştir.



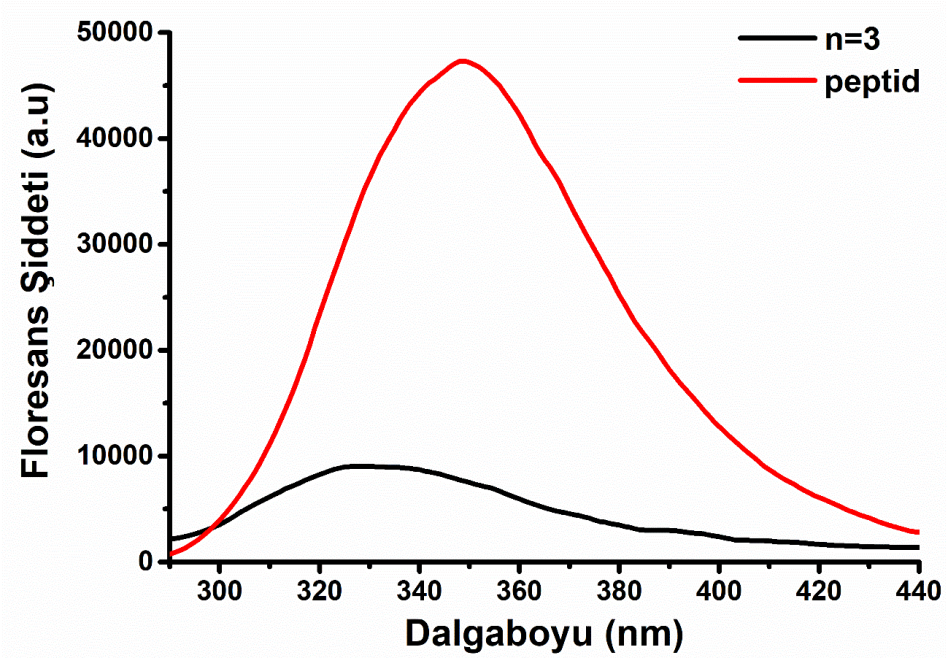
Şekil 4. 5 $n_{Peptid}/n_{PAA=}$ 1, 3, 5, 7 ve 9 oranlarında sentezlenen konjugatların 280 nm'de UV absorbans değerlerine ait grafik

4.2.2.2 Floresans Spektrofotometre Analizi

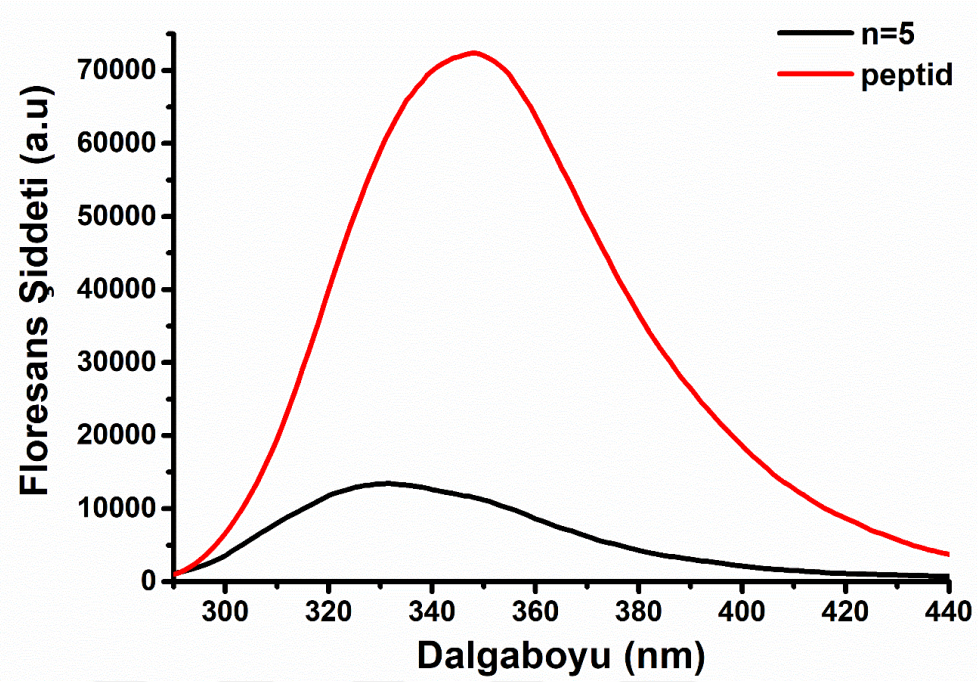
n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7 ve 9 oranlarındaki konjugatların saflaştırma sonrası floresans spektrumları tüm konjugat oranlarının her oranda başlangıçta kullanılan konsantrasyondaki peptid ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.6-4.10'da ve tüm konjugatların floresans spektrumlarına ait grafik karşılaştırmalı olarak Şekil 4.11'de verilmiştir.



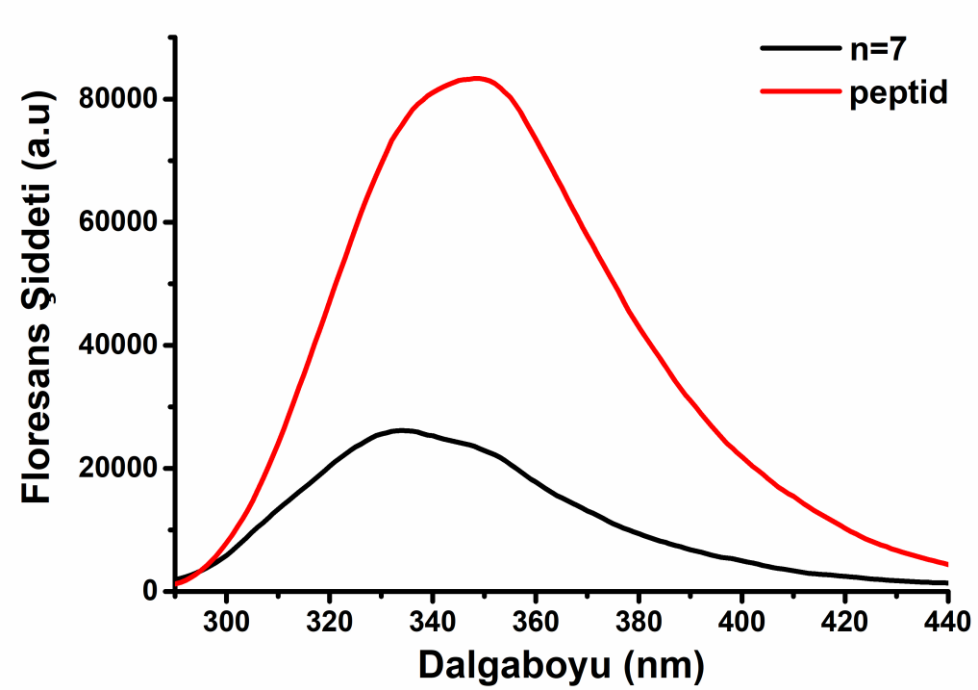
Şekil 4. 6 $n_{Peptid}/n_{PAA} = 1$ oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu



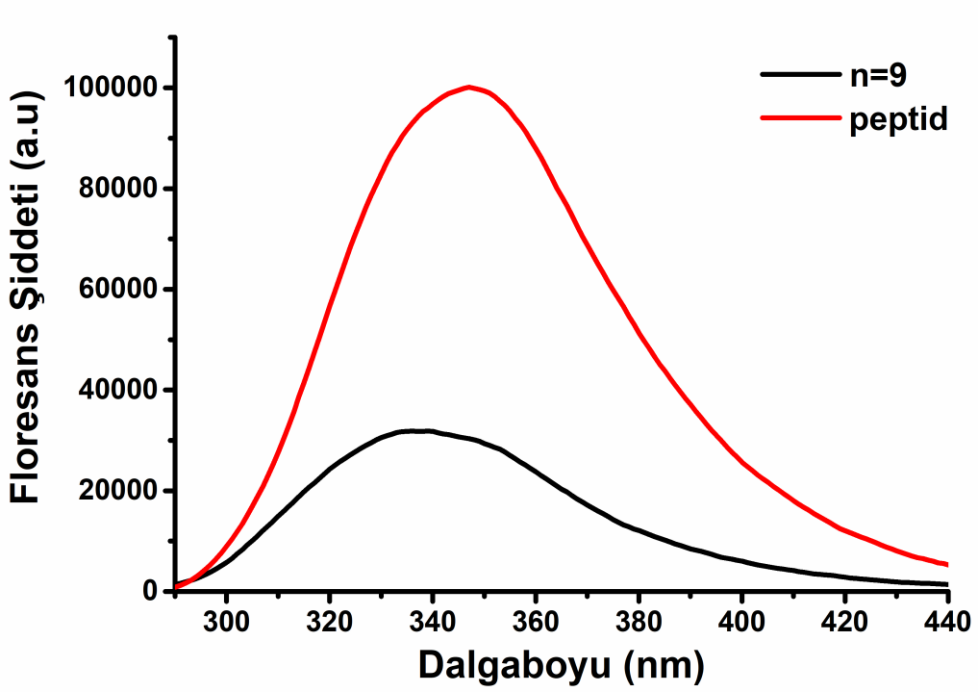
Şekil 4. 7 $n_{Peptid}/n_{PAA} = 3$ oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu



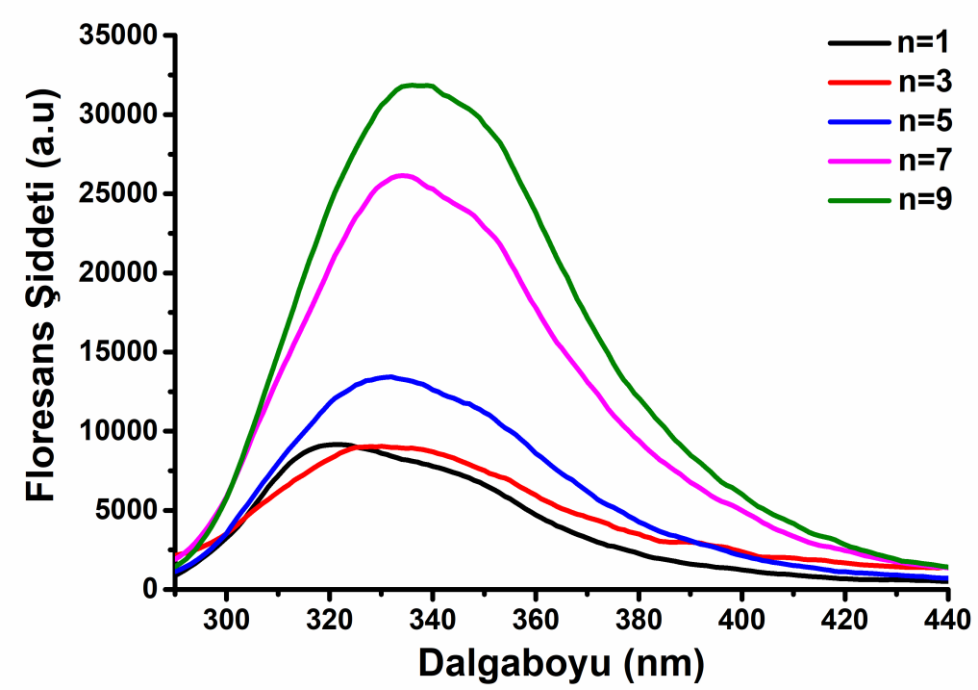
Şekil 4. 8 $n_{Peptid}/n_{PAA} = 5$ oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu



Şekil 4. 9 $n_{Peptid}/n_{PAA} = 7$ oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu



Şekil 4. 10 n_{Peptid}/n_{PAA} = 9 oranındaki konjugatın peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumu



Şekil 4. 11 n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7 ve 9 oranlarındaki konjugatların kıyaslamalı floresans spektrumu

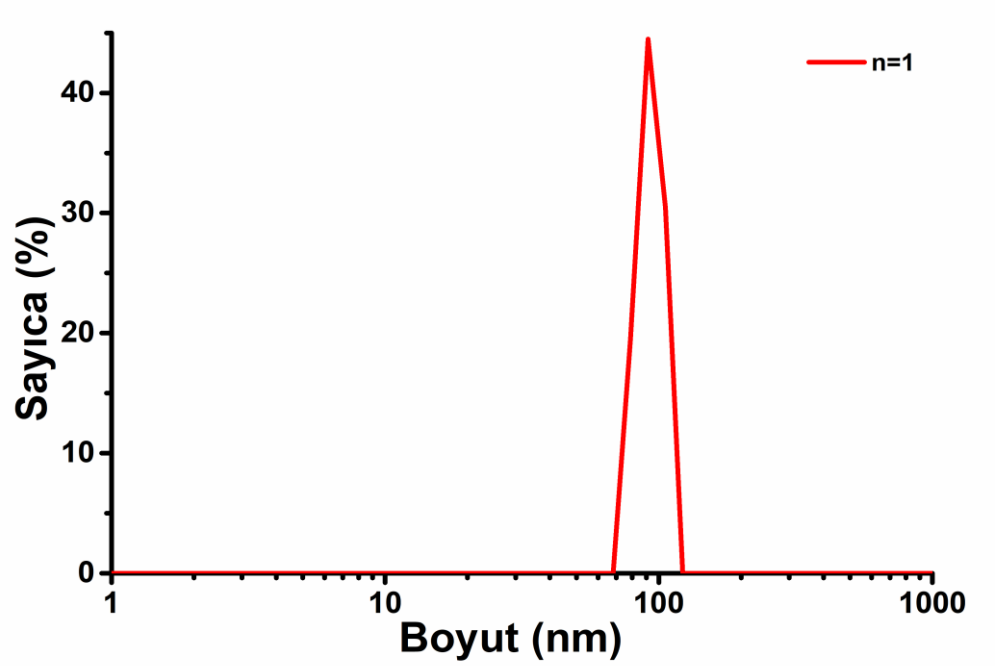
n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7 ve oranlarındaki konjugatların saflaştırma sonrası (üst faz), ve aynı oranlardaki serbest peptidlerin karşılaştırmalı λ_{max} değerleri Tablo 4.1' de gösterilmiştir.

Tablo 4. 1 Sentezlenen konjugatların ve aynı oranlardaki serbest peptidlerin karşılaştırmalı λ_{max} değerleri

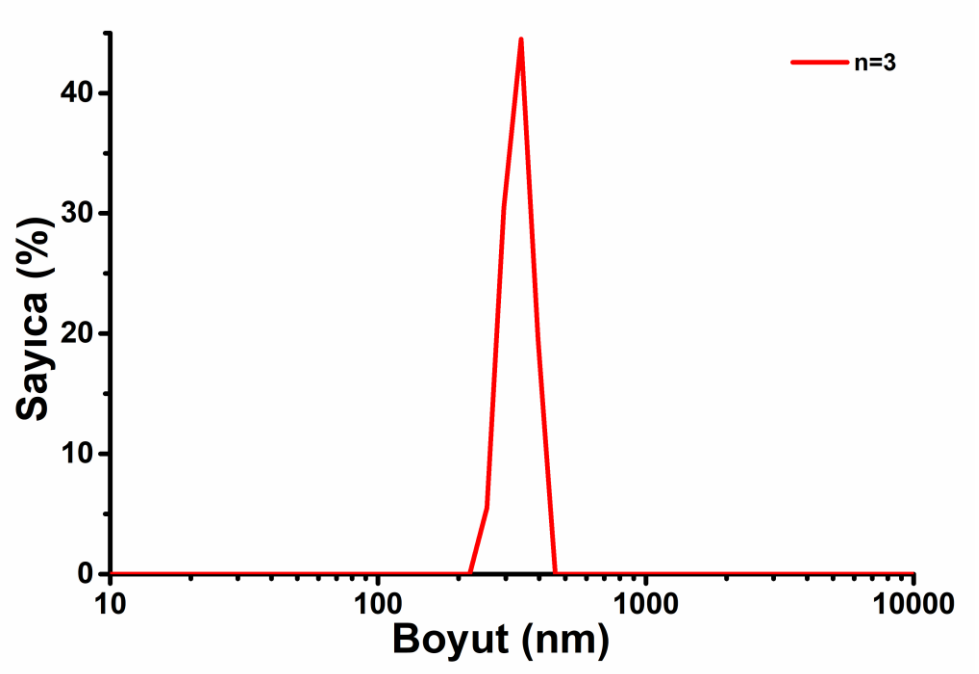
Oran	Konjugat	Serbest Peptid
n=1	λ_{max}=322	λ_{max}=348
n=3	λ_{max}=331	λ_{max}=349
n=5	λ_{max}=336	λ_{max}=348
n=7	λ_{max}=332	λ_{max}=348
n=9	λ_{max} =336	λ_{max}=349

4.2.2.3 Zetasizer Analizi

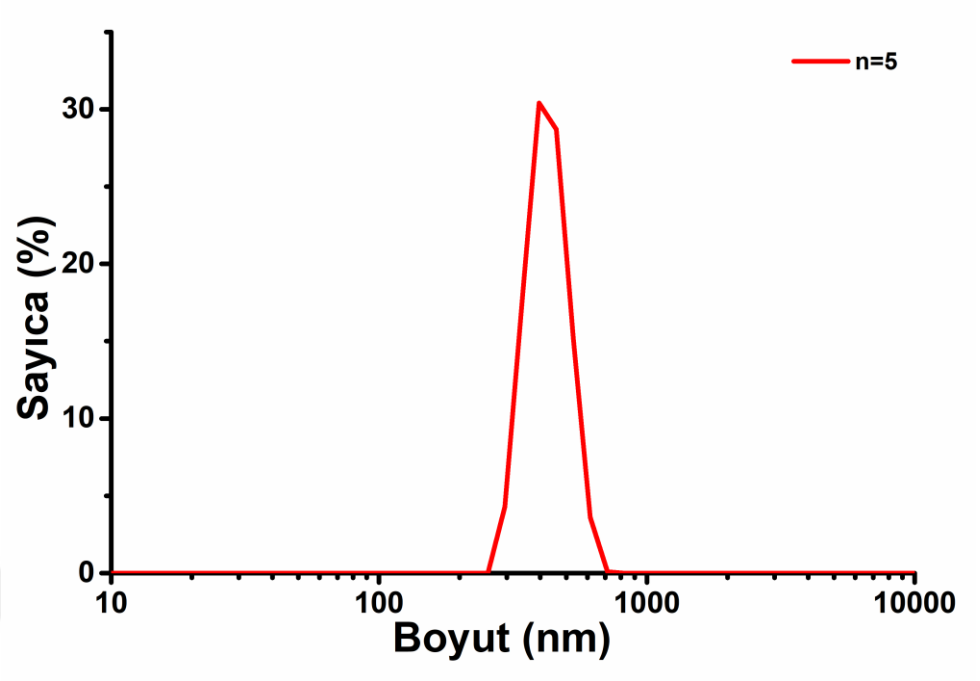
n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 9 oranlarındaki konjugatların saflaştırma sonrası (üst faz) sayıca boyut dağılım grafikleri Şekil 4.12-4.16'da ve peptide ve polimere ait sayıca boyut dağılım grafikleri Şekil 4.17'de verilmiştir. n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 9 oranlarındaki konjugatların, peptidin ve polimerin boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları Tablo 4.2' de gösterilmiştir.



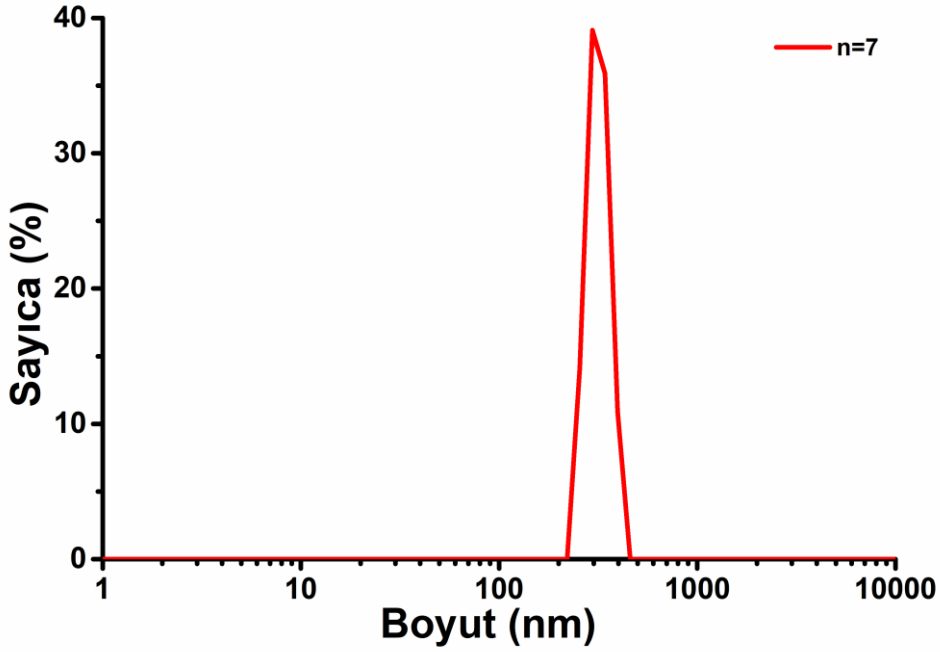
Şekil 4. 12 n_{Peptid}/n_{PAA}= 1 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği



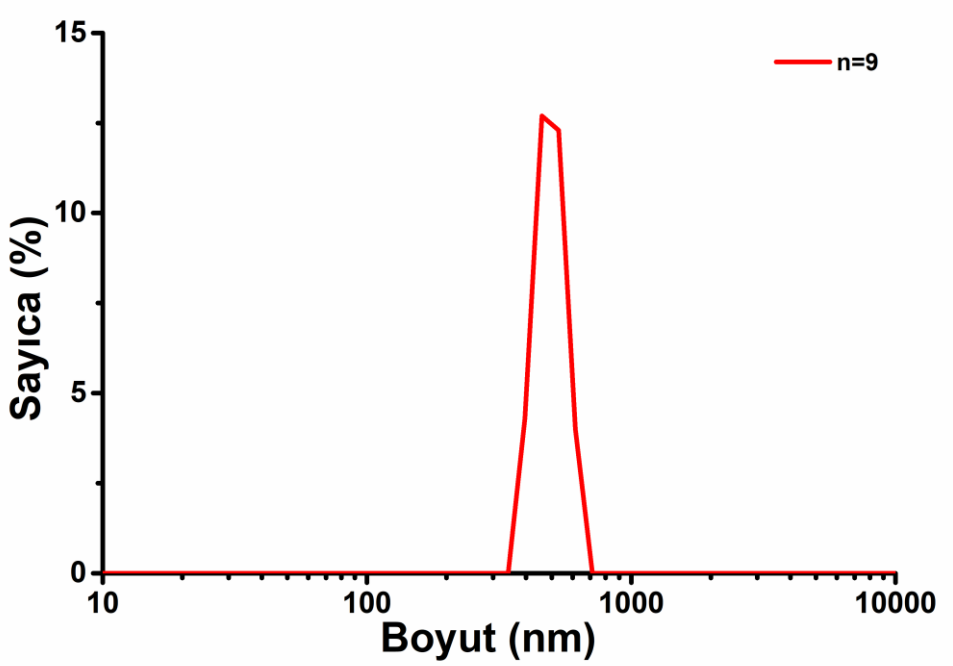
Şekil 4. 13 n_{Peptid}/n_{PAA}= 3 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği



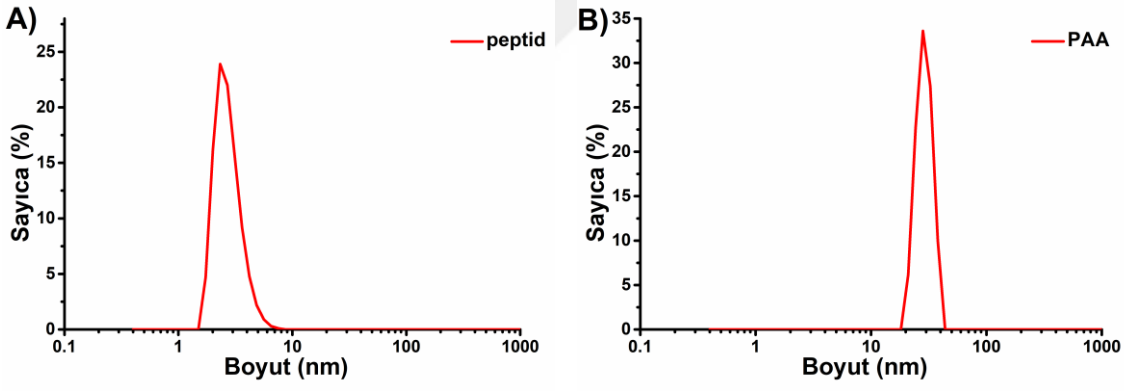
Şekil 4. 14 n_{Peptid}/n_{PAA}= 5 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği



Şekil 4. 15 n_{Peptid}/n_{PAA}= 7 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği



Şekil 4. 16 n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 oranındaki konjugata ait sayıca boyut grafiği



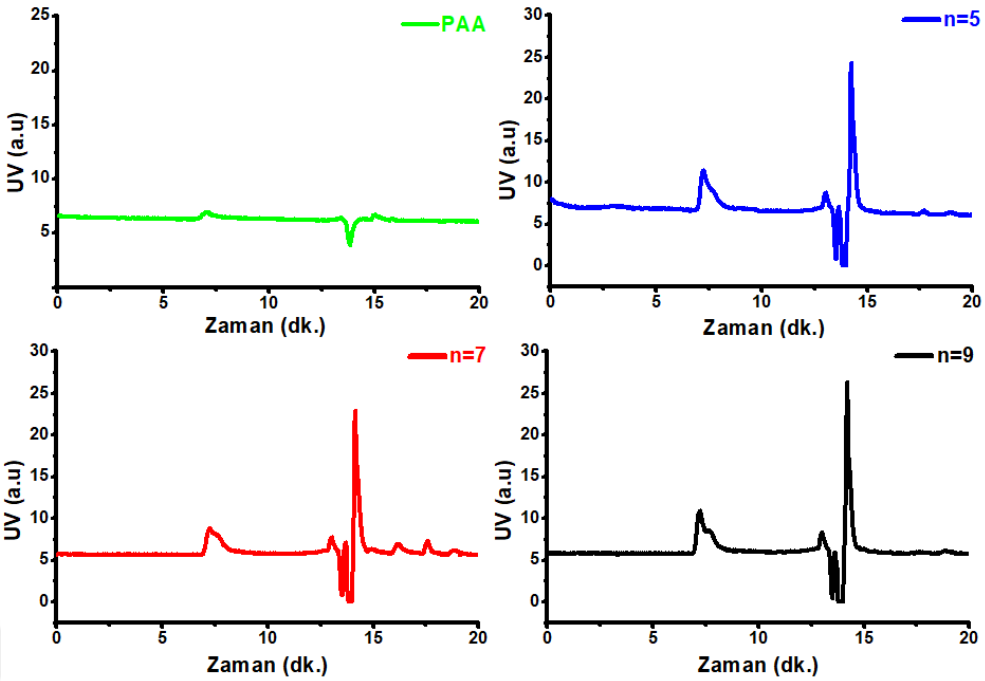
Şekil 4. 17 A) Serbest peptide ve **B)** PAA polimerine ait sayıca boyut grafiği

Tablo 4. 2 Sentezlenen konjugatların, peptidin ve polimerin boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları

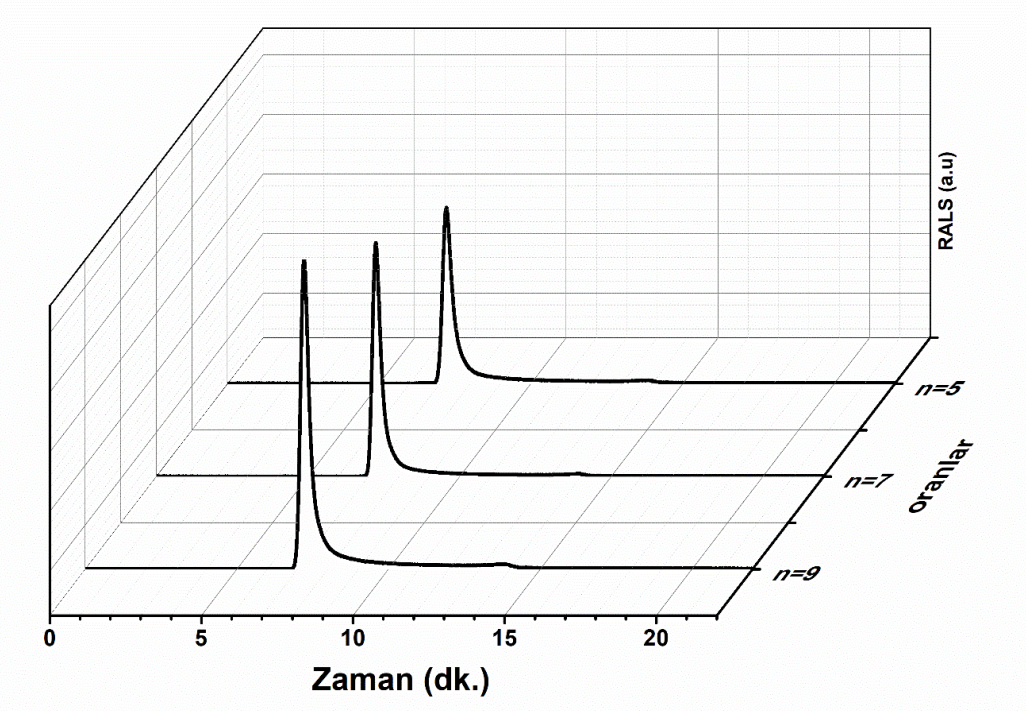
Oran	Boyut (nm)	Zeta Potansiyel (mV)
n=1	94.96	-14.8
n=3	333.5	-4.15
n=5	428.9	-2.39
n=7	404.3	5.14
n=9	496.2	6.76
Peptid	2.77	14.0
PAA	25.44	-16.9

4.2.2.4 GPC Analizi

EDC varlığında sentezlenen peptid-PAA konjugatlarının n_{Peptid}/n_{PAA} = 5, 7 ve 9 oranlarının üst fazları GPC ile analiz edilmiştir. n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 5, 7 ve 9 olan konjugatlara ait polimer kıyaslamalı GPC UV kromatogramı Şekil 4.18'de ve n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 5, 7 ve 9 olan konjugatlara ait kıyaslamalı GPC RALS kromatogramı Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 18 n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 5, 7 ve 9 olan konjugatlara ait polimer kıyaslamalı GPC UV kromatogramı



Şekil 4. 19 n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 5, 7 ve 9 olan konjugatlara ait GPC RALS kromatogramı

4.2.2.5 Termal ve pH Stabilite Analizi

Başlangış konsantrasyonuna göre; pH değişimi (pH 2-pH 11) ile beraber peptid, n=7 ve n=9 konjugatların UV-Vis spektrofotometre ile 280 nm de ölçülen absorbans ve bu absorbans değerlerine göre daha önce hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanan % peptid konsantrasyonları Tablo 4. 3'de verilmiştir.

Tablo 4. 3 n_{Peptid}/n_{PAA}= 7, 9 ve serbest peptidin kıyaslamalı pH ile değişen peptid konsantrasyonu (%)

pH değeri	Serbest peptide ait pH ile değişen peptid konsantrasyonu (%)	n_{Peptid}/n_{PAA} 7 konjugatına ait pH ile değişen peptid konsantrasyonu (%)	n_{Peptid}/n_{PAA} 9 konjugatına ait pH ile değişen peptid konsantrasyonu (%)
2	10.56	44.28	50.62
3	15.56	54.28	65.43
4	18.33	63.33	71.60
5	26.11	80.00	71.60
6	31.10	85.71	81.48
7	100.00	100.00	100.00
8	87.22	82.86	76.54
9	78.33	80.00	64.20
10	68.88	67.14	55.56
11	21.11	51.43	51.85

Farklı sıcaklıklara farklı sürelerde maruz bırakılan peptid, n=7 ve n=9 konjugatlarının UV-Vis spektrofotmetre ile 280 nm de ölçülen absorbans ve bu absorbans değerlerine göre daha önce hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanan % peptid konsantrasyonları Tablo 4. 4'de verilmiştir.

Tablo 4. 4 n_{Peptid}/n_{PAA}= 7,9 ve serbest peptidin kıyaslamalı sıcaklık ile değişen peptid konsantrasyonu (%)

Sıcaklık değeri	Serbest peptide ait sıcaklık ile değişen peptid konsantrasyonu (%)	n_{Peptid}/n_{PAA} 7 konjugatına ait sıcaklık ile değişen peptid konsantrasyonu (%)	n_{Peptid}/n_{PAA} 9 konjugatına ait sıcaklık ile değişen peptid konsantrasyonu (%)
Oda Koşulu (30 dk)	100	100	100
Oda Koşulu (60 dk)	100	100	100
30°C (30 dk)	77.22	92.59	90.32
30°C (60 dk)	58.28	87.03	89.25
40°C (30 dk)	49.70	59.33	75.27
40°C (60 dk)	48.22	55.13	66.31
60°C (30dk)	36.69	44.5	50.18
60°C (60dk)	33.43	40.24	48.02
80°C (30dk)	28.70	31.97	38.71
80°C (60dk)	26.63	27.78	34.05
100°C (30dk)	16.87	13.30	28.78
100°C (60dk)	3.31	9.57	16.49

4.2.2.6 Antibakteriyel Aktivite Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada, n_{Peptid}/n_{PAA} 9 oranındaki serbest peptid (0.080 mg/mL) ve sentezlenen konjugat (serbest peptide eşdeğer eptid içeren konjugat), pH'ı 2'ye ayarlanmış n_{Peptid}/n_{PAA} 9 oranındaki serbest peptid ve sentezlenen konjugat ve 100 °C'ye maruz bırakılmış n_{Peptid}/n_{PAA} 9 oranındaki serbest peptid ve sentezlenen konjugat, kıyaslamalı olarak analiz edilmiştir.

600 nm'de *E.coli*'ye ait okuma sonuçları Tablo 4.5'de *S.Aureus*'a ait okuma sonuçları ise Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Tabloda, kuyucuklardaki üremeler (+: üreme mevcut, -: üreme yok) gösterilmiştir. n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 ve serbest peptidin kıyaslamalı MIC değerleri Tablo 4.7'te verilmiştir.

Tablo 4.5 *E.coli*'ye ait Broth-Mikrodilüsyon analizi sonuçları

Konsantrasyon	Peptid Kontrol		Peptid pH2		Peptid 100° C		n_{Peptid}/n_{PAA} = 9		n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 pH2		n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 100°C	
40μg/mL	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20μg/mL	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10μg/mL	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
5μg/mL	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

Tablo 4.6 *S.aureus*'a ait Broth-Mikrodilüsyon analizi sonuçları

Konsantrasyon	Peptid Kontrol		Peptid pH2		Peptid 100°C		n_{Peptid}/n_{PAA} = 9		n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 pH2		n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 100°C	
40μg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20μg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10μg/mL	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5μg/mL	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-

Tablo 4. 7 n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 ve serbest peptidin kıyaslamalı MIC değerleri

Bakteriler	*E.coli*	*S.Aureus*
Peptid	<5	<5
Peptid pH 2	>40	10
Peptid 100°C	10	<5
n_{Peptid}/n_{PAA}=9	<5	<5
n_{Peptid}/n_{PAA}=9 pH 2	20	5
n_{Peptid}/n_{PAA}=9 100°C	10	<5

5
SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid kullanılarak poliakrilik asit polimerinde bulunan karboksil (-COOH) gruplarının aktivasyonu sağlanmış ve oluşan aktif O-açilisoüre ara ürününün sonrasında peptid moleküllerinde bulunan amino ($-NH_2$) grupları ile bağlanması sonucu Peptid-PAA konjugatları sentezlenmiştir. Sentezlenen bu konjugatlar UV Spektrofotometre, Floresans Spektrofotometre, Zetasizer ve GPC cihazlarında analiz edilmiştir. Farklı oranlarda sentezlenen konjugatların karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen analizlerinden elde edilen çıktılar birbirleri ile örtüşmektedir.

Hazırlanan peptid-polimer fiziksel komplekslerinin floresans spekturmu ve Zetasizer analizleri incelenmiştir. Peptid-polimer kompleksleri negatif yüklenebilen yan grupları olan polimerlerin peptidler üzerindeki zıt yüklü grupları ile etkileşimi sonucunda oluşabilmektedir [139]. Analiz sonuçları kompleks moleküllerinin üzerindeki aktif fonksiyonel grupların kovalent bağlarla bağlanması sonucunda biyokonjugat oluşumu ile daha kararlı hale geldiğini göstermektedir.

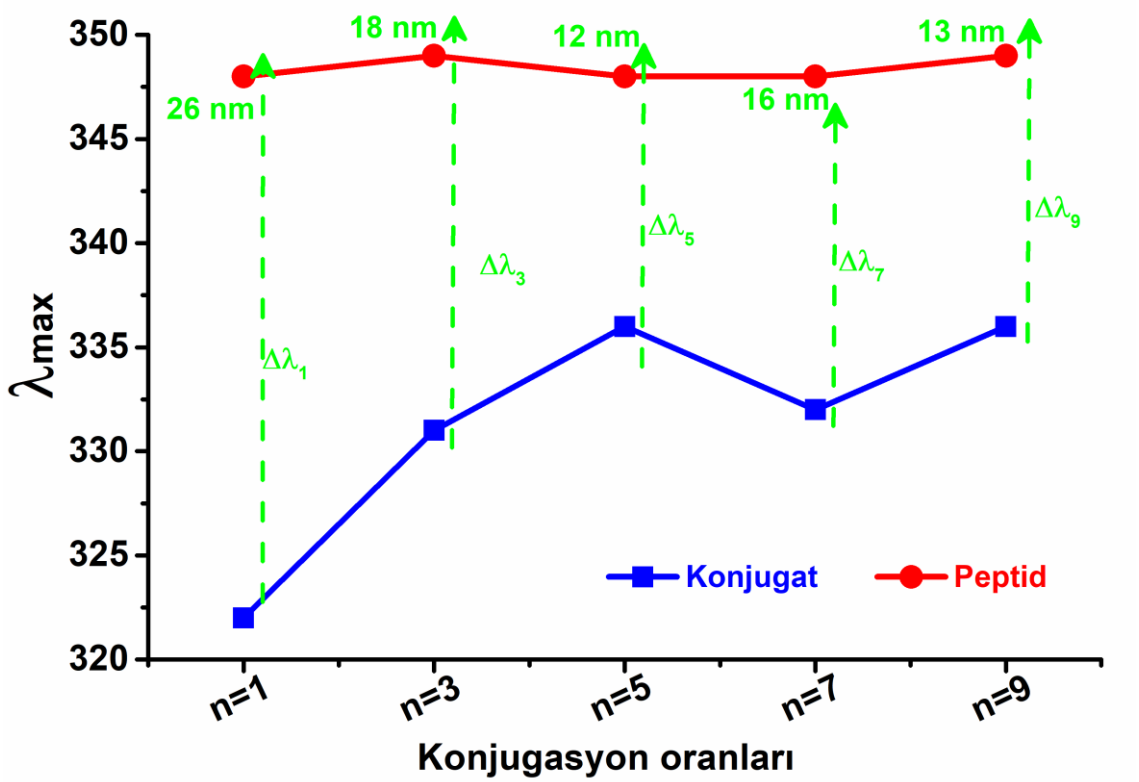
HF18 peptid dizisi için PAA polimeri ile biyokonjugatları, $n_{peptid}/n_{polimer}$= 1, 3, 5, 7, 9 oranlarında, her bir orandaki konjugasyon için PAA çözeltisi konsantrasyonu sabit tutularak üzerine değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenmiştir ve 2 farklı yöntem kıyaslanmıştır. Her 2 yöntemde de konjugasyonun başarılı olarak sentezlendiği hem floresans hem de UV-Vis spektrumları ile görülmüştür. Ayrıca zeta potansiyel değerleri de yakın olmakla beraber 2. yöntemde daha fazla peptidin bağlanmış olduğu söylenebilmektedir. Her 2 yöntemle de sentezlenen konjugatların saflaştırılmış ve reaksiyona girmeyen peptid miktarı hesaplanmıştır. 2. Yöntemle sentezlenen konjugatlarda reaksiyona

giren peptid miktarının daha fazla olduğu görülmüş ve daha verimli reaksiyon yöntemi olan 2. yöntem tercih edilerek konjugatlar sentezlenmiştir.

Şekil 4.5' de verilen konjugatların UV-Vis Spektrofotmetre analizlerinde konjugatlardaki peptid oranı arttıkça 280 nm'deki arsorbansın lineer bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Konjugatta kullanılan peptid miktarı arttıkça daha fazla miktarda peptid reaksiyona girerek polimere bağlanmıştır.

Konjugatların serbest peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumlarına bakıldığında, her oran için serbest peptidin floresans şiddetinin konjugatın floresans şiddetine göre daha fazla olduğu görülmektedir. Peptidin polimere konjugasyonu sonucunda genellikle floresans şiddetinde azalma ve/veya peptidin maksimum dalga boyunda kaymaya neden olması beklenmektedir [134]. Konjugasyonda kullanılan peptid oranı arttıkça, HF-18 peptidinde bulunan Triptofan aminoasitindeki aromatik indol halkasının da oranının artmasından kaynaklı olarak konjugatların 280nm'de uyarıldıklarındaki floresans şiddetinde artma meydana gelmiştir.

Bir proteinin UV floresansına katkıda bulunan triptofan (Trp-W), tirozin (Tyr-Y) ve fenilalanin (Phe-F) olmak üzere 3 aromatik amino asit kalıntısı vardır. HF-18 peptidi de (Gly-Phe-Phe-Lys-Lys-Ala-Trp-Arg-Lys-Val-Lys-Lys-Ala-Phe-Arg-Arg-Val-Leu) yapısında fenilalanin ve triptofan içermektdir ve bu sayede tek başına yüksek floresans şiddeti göstermektedir. Peptid ile polimer bağlandığında peptid dizisi polimer zinciri tarafından sarılmaktadır, böylece peptidin içerdiği triptofanın spektral özelliği ve çözücü ile olan etkileşimlerinden dolayı, çözücü moleküllerinden izole olmaktadır ve sonucunda biyokonjugatlara ait floresans spektrumlarının blue shift yaptığı gözlenmiştir (Şekil 5.1).

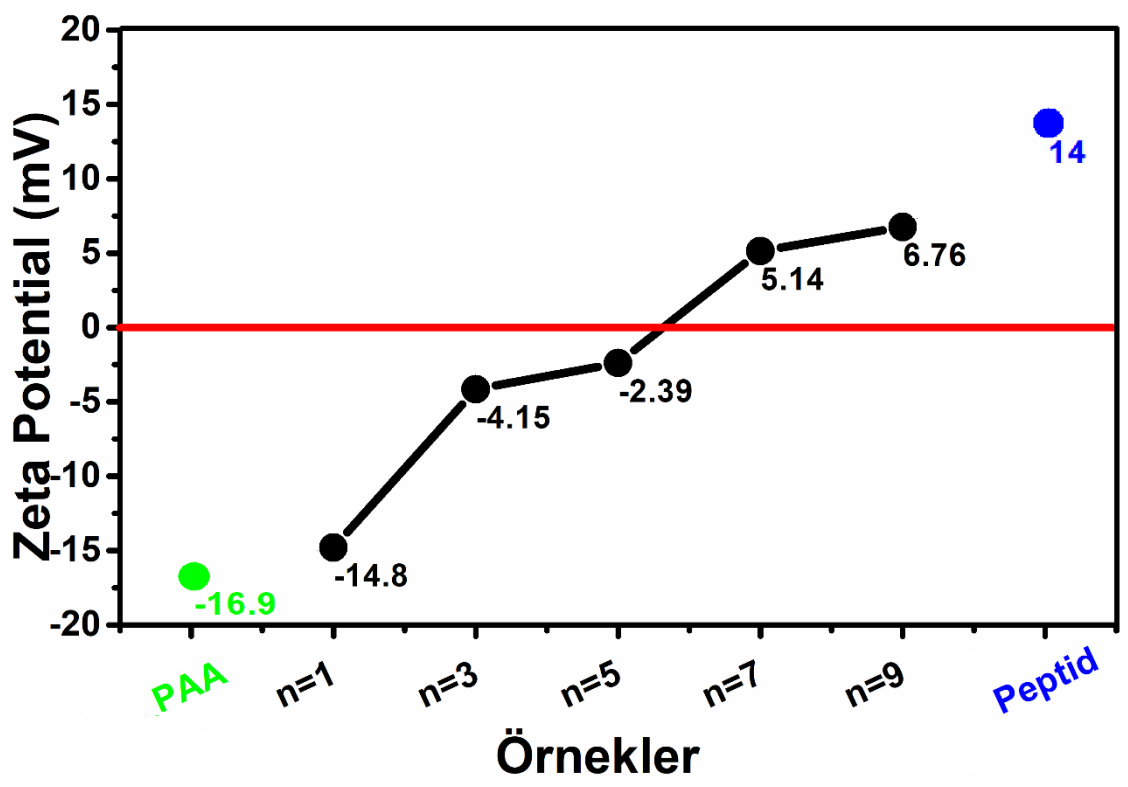


Şekil 5. 1 Konjugatların (n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 9) λ_{max} değerlerindeki floresans kayma

Membranlı santrifüj tüpü kullanılıp santrifüj yapılmasının ardından ortamdaki reaksiyona girmeyen serbest peptidlerin alt faza geçmesi ile konjugat saflaştırıldıktan sonra üst fazlara ait λ_{max} değerleri serbest peptid ile kıyaslamalı olarak Tablo 4.1'de verilmiştir ve Şekil 5.1'de de görüldüğü üzere her bir oran için λ_{max} değerinin (12-26 nm aralığında değişen nm'lerde) daha küçük bir dalga boyuna doğru kaydığı gözlenmiştir. Farklı konjugatlara ait λ_{max} dalga boyundaki gözlenen maviye doğru kayma, konjugasyon sonucu HF-18 peptidinde bulunan Trp'ın sudan uzaklaştığını ve hidrofobik ortama çekildiğini yani PAA molekülleri ile peptid moleküllerinin bağlanması sonucu triptofanil uçlarının daha içeride kaldığını göstermektedir [128]. Hem floresans şiddetindeki değişim, hem de maksimum dalga boyundaki kayma peptid-PAA biyokonjugalarımızın her oran için başarıyla sentezlenmiş olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Biyokonjugatların zeta potansiyel değerleri peptidin (+14.0 mV) ve PAA polimerinin (-16.9 mV) zetapotansiyel değerleri ile karşılaştırıldığında,

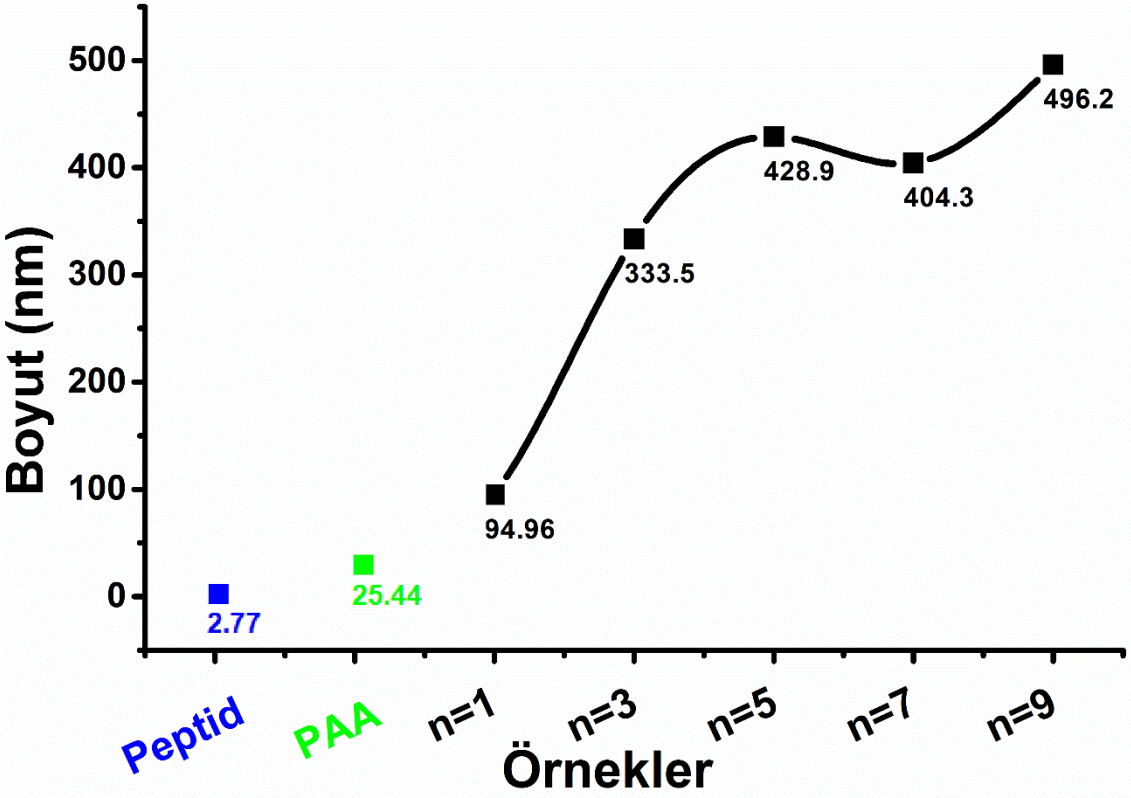
biyokonjugatların zeta potansiyel değerlerinin PAA'ya göre daha pozitif olduğu görülmektedir. Tüm konjugat oranları için zeta potansiyel değerlerinde konjugasyonda kullanılan peptid miktarının artması sonucunda polimere bağlanan peptid miktarının da artması ile pozitife kayma görülmüştür (Şekil 5.2). Pozitife kayma, HF-18 peptidinin katyonik yüklü olması ve peptid üzerindeki amino grupları ile (-NH_2) PAA'daki karboksil uçları (-COOH) arasında amid bağı oluşturduktan sonra negatif yüklerin kaybolmasıdır. Amid bağı oluşumu ile karboksil grupları nötürleşmiştir ve böylelikle konjugatların net negatif yükleri serbest PAA'ya göre azalmış ve bu sayede de zeta potansiyel değeri pozitife kaymıştır [135].



Şekil 5. 2 Konjugatların (n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 9) peptid ve polimer kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri

Serbest peptid ve polimer ile n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 9 oranlarındaki konjugatların zetasizer analizlerine göre elde edilen sayıca boyut dağılımları karşılaştırıldığında; 5.24 nm boyuta sahip olan peptidin PAA ile biyokonjugasyonu sonucunda biyokonjugatların boyutlarının peptid miktarının artması ile neredeyse tüm

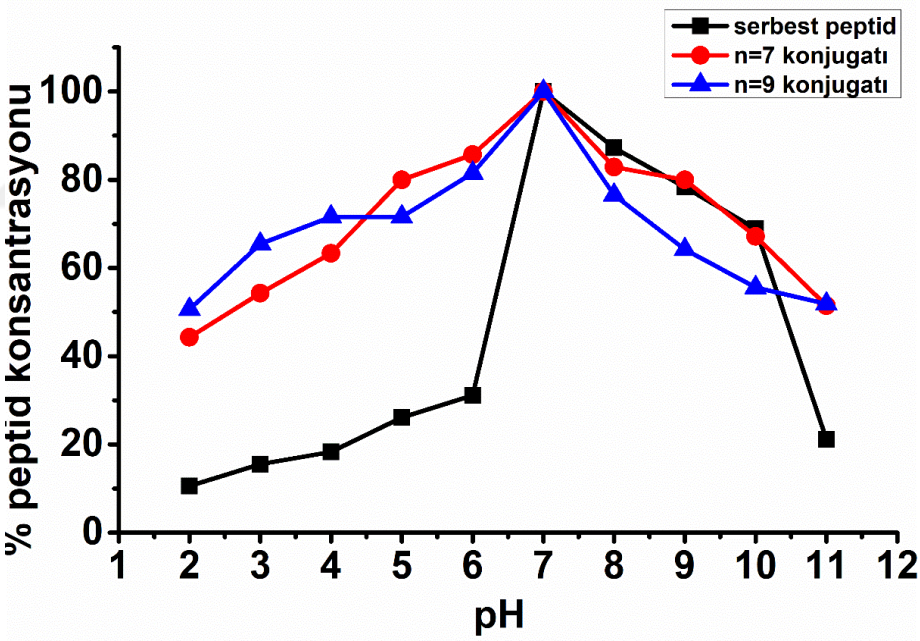
oranlar için lineer bir artış görülmüştür (Şekil 5.3). Sonuçlar konjugasyon işlemi ile beraber polimer ve peptid moleküllerinin birbirine başarılı bir şekilde bağlanması ile molekül boyutunun arttığını göstermiştir. ZetaSizer analizleri sonucunda elde edilen boyut ve zetapotansiyel değerleri biyokonjugatların başarılı bir şekilde sentezlendiğini doğrulamaktadır.



Şekil 5. 3 Konjugatların (n_{Peptid}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 9) peptid kıyaslamalı boyut değerleri

GPC kromotogramları incelendiğinde, UV dedektörden elde edilen sonuçların floresans ve UV spektrofotometreyle örtüştüğü görülmektedir. Peptid ve polimerin birbirlerine bağlanmasının sonucu sentezlenen konjugatların, polimere kıyasla 7-8 dakika arası şiddetli bir pik verdiği ve polimere oranla n=5, 7, 9 oranları için pik alanlarının lineer bir şekilde artış gösterdiği görülmektedir. Şekil 4.19'da verilen GPC RALS (Işık saçılması) dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, biyokonjugattaki peptid konsantrasyonu arttıkça molekül boyutunun orantılı bir şekilde büyüdüğü görülmektedir.

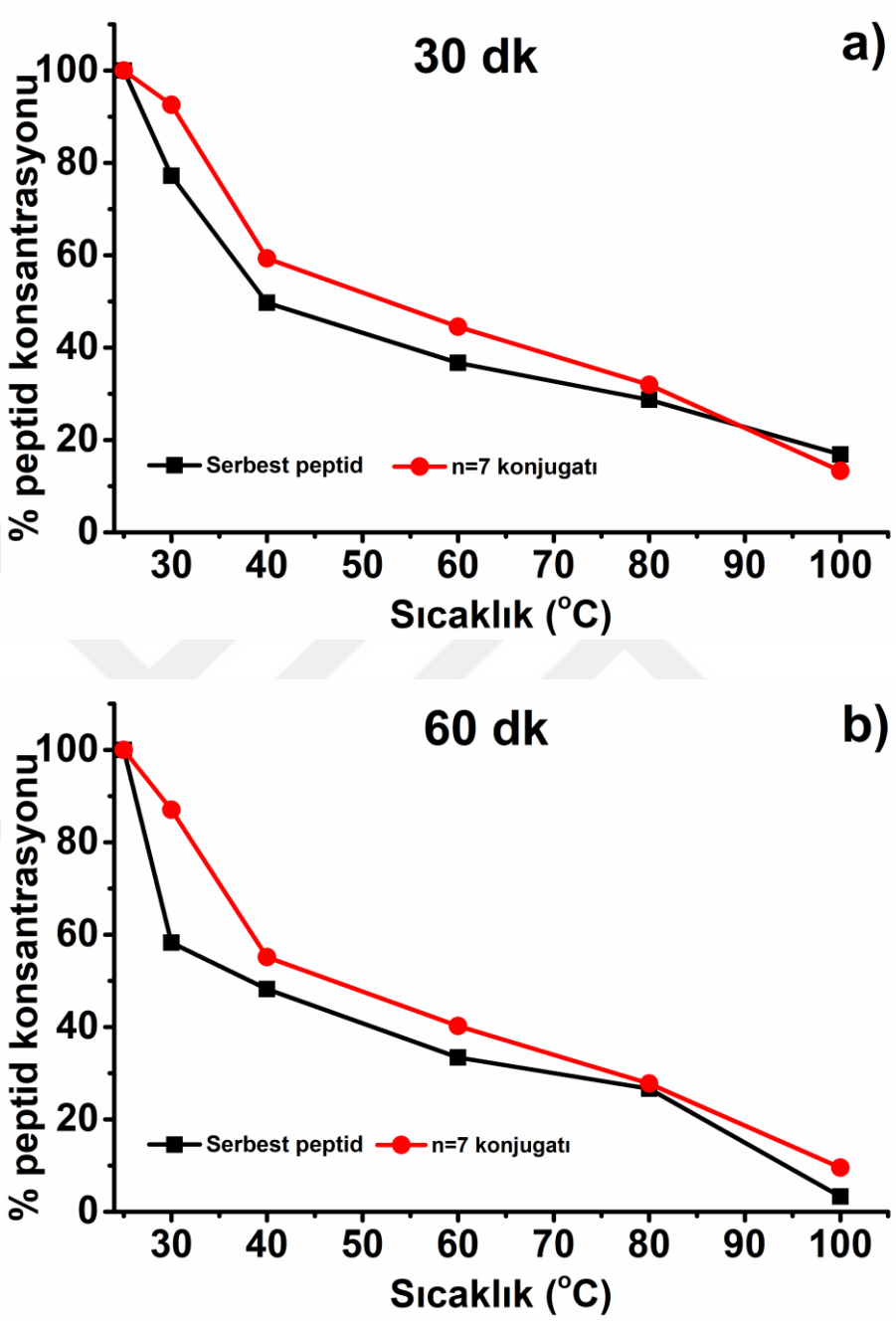
n_{Peptid}/n_{PAA}= 7, 9 ve serbest peptidin pH ile değişen peptid konsantrasyonlarının % değişimlerine ait grafik Şekil 5.4' de gösterilmiştir. pH 7 değeri referans alınarak yapılan çalışmada özellikle asidik koşullarda peptid-polimer konjugatlarının serbest peptide göre stabilitesini önemli ölçüde koruduğu görülmektedir. Alkali koşullarda pH 8-10 arası serbest peptid ve konjugatların stabilitesinde büyük bir fark görülmemekle beraber pH 11' de hem n=7 hem de n=9 oranındaki konjugatın peptid konsantrasyonunun yaklaşık 1.5 kat daha stabil kaldığı görülmektedir. n_{Peptid}/n_{PAA}=9 oranında sentezlenen konjugat, nötral pH'tan çalışmamızın en asidik pH'ı olan pH 2'ye çekildiğinde başlangıç konsantrasyonunun %50,62'sinin stabil olduğu görülmüştür. Aynı koşulda muamele edilmiş peptid için bu oran %10,56'dır. pH stabilite çalışmaları sonucunda PAA ile konjuge edilen HF18 peptidinin serbest haline göre pH değişimlerine karşı önemli derecede stabilite sağladığı görülmektedir.



Şekil 5. 4 Serbest peptid ve n_{Peptid}/n_{PAA} oranları 7 ve 9 olan konjugatların pH'a bağlı % peptid konsantrasyon değişimleri

n_{Peptid}/n_{PAA}= 7 ve serbest peptidin sıcaklık ile değişen 30 ve 60. dakikalardaki peptid konsantrasyonlarının % değişimlerine ait grafik Şekil 5.5a ve 5.5b'de gösterilmiştir. Oda sıcaklığı (25°C) değeri referans alınarak yapılan çalışmada

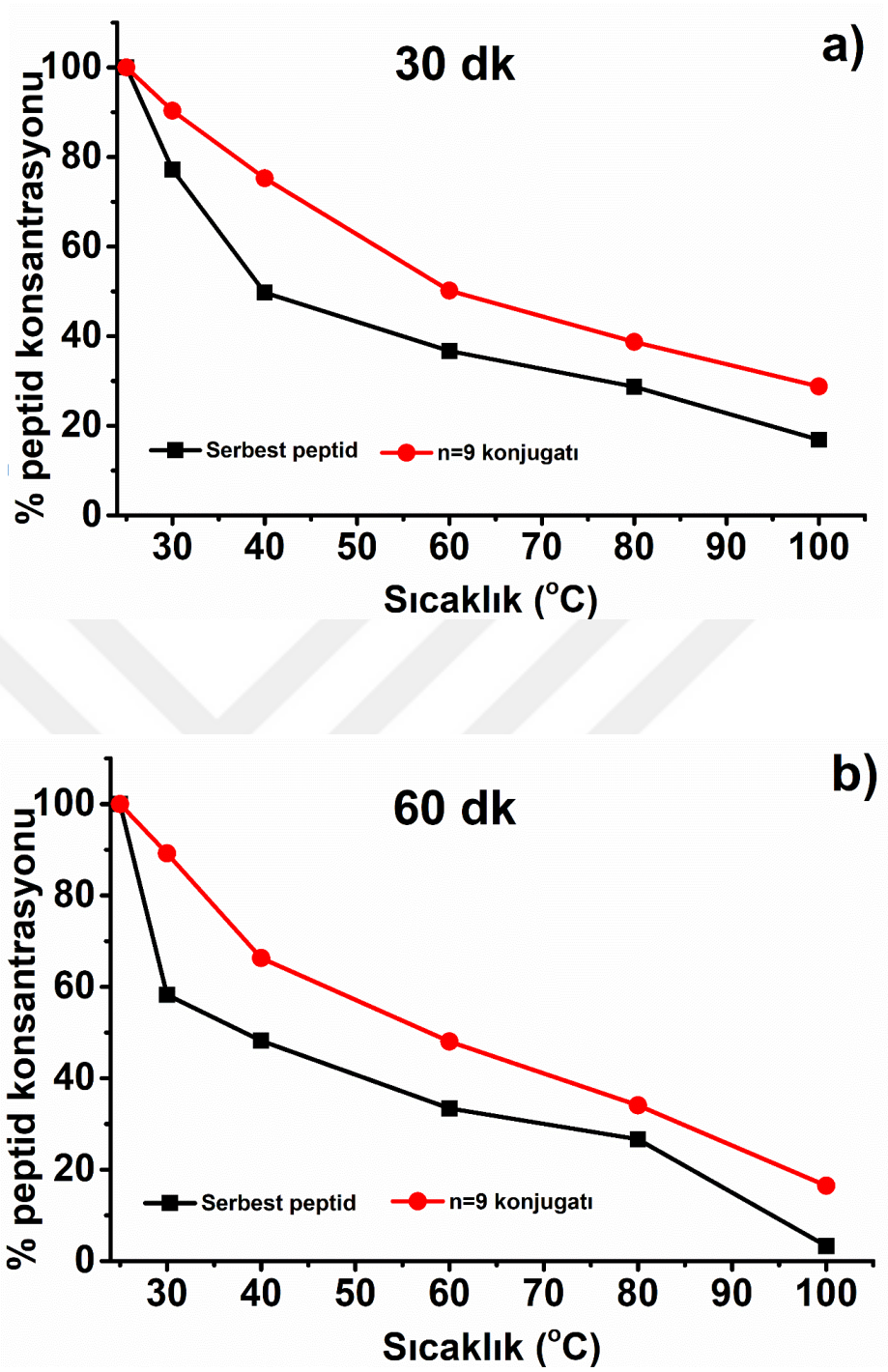
yüksek sıcaklık değerlerinde peptid-polimer konjugatlarının serbest peptide göre stabilitesini önemli ölçüde koruduğu görülmektedir.



Şekil 5. 5 Serbest peptid ve n_{Peptid}/n_{PAA} = 7 oranındaki konjugatın farklı sıcaklıklara (25, 30, 40, 60, 80, 100°C) **a)** 30 dakika ve **b)** 60 dakika maruz kaldığındaki % peptid konsantrasyon değişimleri

n_{Peptid}/n_{PAA}= 9 ve serbest peptidin sıcaklık ile değişen 30 ve 60. dakikalardaki peptid konsantrasyonlarının % değişimlerine ait grafik sırasıyla Şekil 5.6a ve Şekil

5.6b'de gösterilmiştir. n_{Peptid}/n_{PAA} 9 oranında sentezlenen konjugat, 100 °C sıcaklığa 60dk maruz bırakıldığında başlangıç konsantrasyonunun %16,48'inin stabil olduğu görülürken, aynı koşulda muamele edilen n_{Peptid}/n_{PAA} 7 oranında sentezlenen konjugat için bu oran %9,57, aynı koşulda muamele edilen peptid için ise bu oran %3,31'dir. Peptidin PAA ile konjuge edilmesi ile dış etkenlere karşı korunması artmış ve konjugat termal stabilite kazanmıştır [132-133].



Şekil 5. 6 Serbest peptid ve n_{Peptid}/n_{PAA} = 9 oranındaki konjugatın farklı sıcaklıklara (25, 30, 40, 60, 80, 100°C) **a)** 30 dakika ve **b)** 60 dakika maruz kaldığındaki % peptid konsantrasyon değişimleri

Antimikrobiyal aktivite analizi sonuçları incelendiğinde, literatürde peptidler ile polimerlerin konjugasyonu sonucu sentezlenen konjugatın, serbest peptide oranla

daha stabil olduğu fakat daha düşük aktivite gösterdiği bilinmektedir [140-143]. Peptidlerin hücre zarında bir gözenek oluşturduktan sonra, hücre zarından penetre olarak sitozolik çevre ile etkileşimi sonucu aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Bu etkinliğin gerçekleşmesi için, doğal peptidin lipofilik/hidrofilik dengesinin sağlanması gerekmektedir. Ancak literatürde sentezlenen bazı konjugatların, bahsedilen lipofilik/hidrofilik dengeye sahip olmadığından ötürü serbest peptide kıyasla aktiviteleri azalmıştır [142]. Veya polimerin serbest peptide oranla büyük bir molekül olması sebebiyle sentezlenen konjugatın bakteri membranından içeri alımının engellediği için aktivitenin azaltıldığı belirtilmiştir [141]. Ancak bu tez çalışmasında sentezlenen konjugatın oda koşullarında serbest peptid ile hemen hemen aynı aktiviteye sahip olduğu ve *E.coli* ve *S.aureus* ile yapılan analizlerde, pH 2 koşullarında MIC değerinin 2 kat azaldığı gözlenmiştir. Aktivitenin düşük pH'ta ve yüksek sıcaklıkta artması, polimer konjugasyonu ile sağlanmış olup peptidin fizikokimyasal yapısının korunması sağlandığı için mümkün olmuştur. Bu sayede de peptidin yarılanma ömrü, düşük pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda artmıştır.

KAYNAKÇA

[1] R. Singh, M. S. Smitha, and S. P. Singh, “The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria,” Journal of Nanoscience and Nanotechnology, vol. 14, no. 7, pp. 4745–4756, 2014.

[2] R. K. Kunkalekar, M. S. Prabhu, M. M. Naik, and A. V. Salker, “Silver-doped manganese dioxide and trioxide nanoparticles inhibit both gram positive and gram negative pathogenic bacteria,” Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 113, pp. 429–434, 2014.

[3] B. Li and T. J. Webster, “Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections,” Journal of Orthopaedic Research, 2017.

[4] K.-N. Tran and M. J. Rybak, “Vancomycin (VAN) combinations with B-lactams (BLS) against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin (hvisa) and vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (VISA),” Open Forum Infectious Diseases, vol. 4, no. suppl_1, 2017.

[5] J. Davies and D. Davies, “Origins and evolution of antibiotic resistance,” Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 74, no. 3, pp. 417–433, 2010.

[6] L. T. Nguyen, E. F. Haney, and H. J. Vogel, “The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action,” Trends in Biotechnology, vol. 29, no. 9, pp. 464–472, 2011.

[7] M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, and C. Björn, “Antimicrobial peptides: An emerging category of Therapeutic Agents,” Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, vol. 6, 2016.

[8] M. Jiang, X. Yang, H. Wu, Y. Huang, J. Dou, C. Zhou, and L. Ma, “An active domain HF-18 derived from hagfish intestinal peptide effectively inhibited drug-resistant bacteria in vitro/vivo,” Biochemical Pharmacology, vol. 172, p. 113746, 2020.

[9] X. Zhou, Y. Gao, Y. Wang, Q. Xia, R. Zhong, Y. Liu, C. Ma, M. Zhou, X. Xi, C. Shaw, D. Wu, T. Chen, L. Wang, and H. F. Kwok, “Rational design of novel brevinin analogues with broad antimicrobial spectrum and less cytotoxicity,” SSRN Electronic Journal, 2019.

[10] J. Y. Shu, B. Panganiban, and T. Xu, “Peptide-polymer conjugates: From fundamental science to application,” Annual Review of Physical Chemistry, vol. 64, no. 1, pp. 631–657, 2013.

[11] H. Sun, Y. Hong, Y. Xi, Y. Zou, J. Gao, and J. Du, “Synthesis, self-assembly, and biomedical applications of antimicrobial peptide–polymer conjugates,” Biomacromolecules, vol. 19, no. 6, pp. 1701–1720, 2018.

[12] M. Ashby, A. Petkova, J. Gani, R. Mikut, and K. Hilpert, “Use of peptide Libraries for identification and optimization of novel antimicrobial peptides,” Current Topics in Medicinal Chemistry, vol. 17, no. 5, pp. 537–553, 2016.

[13] L. Kourkouta, K. Koukourikos, C. Iliadis, P. Plati, and A. Dimitriadou, “History of antibiotics,” Sumerian J Med Healthcare, 1, 51-5, 2018

[14] J. B. Sanderson, “Health and geology combined - i.—public health. Tenth report of the medical officer of the privy council. with appendix. 1867. published 1868.,” Geological Magazine, vol. 6, no. 56, pp. 79–81, 1869.

[15] J. Lister, “Xvi.—a contribution to the germ theory of putrefaction and other fermentative changes, and to the natural history of torulæ and bacteria,” Transactions of the Royal Society of Edinburgh, vol. 27, no. 3, pp. 313-344, 1875.

[16] W. Roberts, “Xii. studies on biogenesis,” Philosophical Transactions of the Royal Society of London, vol. 164, pp. 457–477, 1874.

[17] J. Tyndall, “II. the optical deportment of the atmosphere in relation to the phenomena of putrefaction and Infection,” Philosophical Transactions of the Royal Society of London, vol. 166, pp. 27–74, 1876.

[18] L. Pasteur, C. Chamberland, J. Joubert, “Théorie des germes et ses applications à la médecine et à la chirurgie,” 1878

[19] F. Winau, O. Westphal, and R. Winau, “Paul Ehrlich — in search of the magic bullet,” Microbes and Infection, vol. 6, no. 8, pp. 786–789, 2004.

[20] N. Khardori, C. Stevaux, and K. Ripley, “Antibiotics: From the beginning to the future: Part 1,” The Indian Journal of Pediatrics, vol. 87, no. 1, pp. 39–42, 2019.

[21] S. Y. Tan and Y. Tatsumura, “Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of Penicillin,” Singapore Medical Journal, vol. 56, no. 07, pp. 366–367, 2015.

[22] B. Saran and Z. C. Karahan, “Antimicrobial agents at a glance,” Türk Üroloji Seminerleri/Turkish Urology Seminars, vol. 1, no. 8, pp. 216–220, 2010.

[23] A. Fuentes, M. Pineda, and K. Venkata, “Comprehension of top 200 prescribed drugs in the US as a resource for pharmacy teaching, training and Practice,” Pharmacy, vol. 6, no. 2, p. 43, 2018.

[24] B. Thakuria, “The beta lactam antibiotics as an empirical therapy in a Developing country: An update on their current status and recommendations to counter the resistance against them,” Journal Of Clinical And Diagnostıc Research, 2013.

[25] N. Kardos and A. L. Demain, “Penicillin: The medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes,” Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 92, no. 4, pp. 677–687, 2011.

[26] D. M. Livermore, “Are all beta-lactams created equal?,” Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum, 101, 33-43, 1996

[27] J. R. Johnson, D. F. Colombo, D. Gardner, E. Cho, P. Fan-Havard, and C. S. Shellhaas, “Optimal dosing of penicillin G in the third trimester of pregnancy for prophylaxis against group B streptococcus,” American Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 185, no. 4, pp. 850–853, 2001.

[28] A. J. Wright, “The penicillins,” Mayo Clinic Proceedings, vol. 74, no. 3, pp. 290–307, 1999.

[29] R. A. Borchardt, “Diagnosis and management of Group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis,” Journal of the American Academy of Physician Assistants, vol. 26, no. 9, pp. 53–54, 2013.

[30] E. L. Miller, “The Penicillins: A review and update,” Journal of Midwifery & Women's Health, vol. 47, no. 6, pp. 426–434, 2002.

[31] W. I. L. L. I. A. M. H. HINDLE, “Other benign breast problems,” Clinical Obstetrics and Gynecology, vol. 37, no. 4, pp. 916–924, 1994.

[32] D. I. John Wesley, S. M, and C. S, “Prescribing pattern of beta lactam antibiotics in paediatrics,” American Journal of PharmTech Research, vol. 8, no. 3, pp. 250–257, 2018.

[33] R. Dagan, “Treatment of acute otitis media — challenges in the era of antibiotic resistance,” Vaccine, vol. 19, 2000.

[34] A. Ahovuo-Saloranta, U.-M. Rautakorpi, O. V. Borisenko, H. Liira, J. W. Williams Jr, and M. Mäkelä, “Antibiotics for acute maxillary sinusitis,” Cochrane Database of Systematic Reviews, 2008.

[35] U. Zango, M. Ibrahim, S. A. A. Shawai, “ A review on β-lactam antibiotic drug resistance,” MOJ Drug Des Develop Ther, 3(2), pp. 52-58, 2019

[36] İ. Yıldız, M. A. Varkal, and E. Ünüvar, “Günümüzde Sefalosporinler ve Antibiyotik Direnci,” The journal of child, pp. 22–27, 2014.

[37] K. Bush, “Improving known classes of antibiotics: An optimistic approach for the future,” Current Opinion in Pharmacology, vol. 12, no. 5, pp. 527–534, 2012.

[38] A. Clavenna and M. Bonati, “Differences in antibiotic prescribing in paediatric outpatients,” Archives of Disease in Childhood, vol. 96, no. 6, pp. 590–595, 2011.

[39] J. Le, M. Castanheira, D. S. Burgess, B. McKee, R. Iqbal, and R. N. Jones, “Clonal dissemination of klebsiella pneumoniae carbapenemase KPC-3 in Long Beach, California,” Journal of Clinical Microbiology, vol. 48, no. 2, pp. 623–625, 2010.

[40] L. Poirel, T. Naas, and P. Nordmann, “Diversity, epidemiology, and genetics of class D β-lactamases,” Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 54, no. 1, pp. 24–38, 2010.

[41] J. N. Kattan, M. V. Villegas, and J. P. Quinn, “New developments in carbapenems,” Clinical Microbiology and Infection, vol. 14, no. 12, pp. 1102–1111, 2008.

[42] G. G. Zhanel, R. Wiebe, L. Dilay, K. Thomson, E. Rubinstein, D. J. Hoban, A. M. Noreddin, and J. A. Karlowsky, “Comparative review of the Carbapenems,” Drugs, vol. 67, no. 7, pp. 1027–1052, 2007.

[43] V. H. Tam, K.-T. Chang, K. Abdelraouf, C. G. Brioso, M. Ameka, L. A. McCaskey, J. S. Weston, J.-P. Caeiro, and K. W. Garey, “Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of pseudomonas aeruginosa,” Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 54, no. 3, pp. 1160–1164, 2010.

[44] G. Calandra, E. Lydick, J. Carrigan, L. Weiss, and H. Guess, “Factors predisposing to seizures in seriously III infected patients receiving antibiotics: Experience with imipenem/Cilastatin,” The American Journal of Medicine, vol. 84, no. 5, pp. 911–918, 1988.

[45] P. M. Shah, “Parenteral carbapenems,” Clinical Microbiology and Infection, vol. 14, pp. 175–180, 2008.

[46] L. Mandell, “Doripenem: A new carbapenem in the treatment of nosocomial infection,” Clinical Infectious Diseases, vol. 49, no. s1, 2009.

[47] N. E. L. S. O. N. S. BREWER and W. A. L. T. E. R. C. HELLINGER, “The monobactams,” Mayo Clinic Proceedings, vol. 66, no. 11, pp. 1152–1157, 1991.

[48] N. Khardori, “Antibiotics—past, present, and future,” Medical Clinics of North America, vol. 90, no. 6, pp. 1049–1076, 2006.

[49] G. G. Zhanel, M. Dueck, D. J. Hoban, L. M. Vercaigne, J. M. Embil, A. S. Gin, and J. A. Karlowsky, “Review of Macrolides and Ketolides,” Drugs, vol. 61, no. 4, pp. 443–498, 2001.

[50] K. Naghmouchi, C. Le Lay, J. Baah, and D. Drider, “Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: Synergistic inhibition of pseudomonas fluorescens and antibiotic-resistant variants,” Research in Microbiology, vol. 163, no. 2, pp. 101–108, 2012.

[51] K. Aydın, “Makrolidler ve Linkozamidler,” ANKEM Derg, vol. 21, pp. 57-61, 2007.

[52] T. G. Fraser, C. Hansen, and J. K. Long, “Newer antibiotics for serious gram-positive infections.,” Cleveland Clinic Journal of Medicine, vol. 73, no. 9, pp. 847–853, 2006.

[53] G. Usluer, “Tetrasiklinler ve Kloramfenikol,” ANKEM Derg, vol. 21, pp. 45-51, 2007.

[54] A. Uzun, D. Gulen, Y. Tanriverdi, and A. D. Kaya, “Evaluation of in vitro activity of fosfomycin and other antimicrobial agents against urinary escherichia coli isolates,” Klimik Dergisi/Klimik Journal, vol. 25, no. 2, pp. 77–80, 2013.

[55] G. Usluer, “Linezolid,” ANKEM Derg, vol. 24, pp. 114-8, 2010

[56] E. Küçükateş, E. Kansız, N. Gültekin, “Gram-negatif bakterilerde isepamisin, amikasin ve gentamisine karşı direnç,” İnfeks Derg, vol. 21(1), pp. 21-5, 2007.

[57] S. Jana and J. K. Deb, “Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance,” Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 70, no. 2, pp. 140–150, 2006.

[58] T. Yamazhan, “Sulfonamidler ve Aminoglikozidler,” ANKEM Derg, vol 21, pp. 52-6, 2007.

[59] M. O. Griffin, E. Fricovsky, G. Ceballos, and F. Villarreal, “Tetracyclines: A pleitropic family of compounds with promising therapeutic properties. review of the literature,” American Journal of Physiology-Cell Physiology, vol. 299, no. 3, 2010.

[60] I. Chopra and M. Roberts, “Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 65, no. 2, pp. 232–260, 2001.

[61] G. A. Noskin, “Tigecycline: A new glycylcycline for treatment of serious infections,” Clinical Infectious Diseases, vol. 41, no. s5, 2005.

[62] M. W. Garrison, J. J. Neumiller, and S. M. Setter, “Tigecycline: An investigational Glycylcycline antimicrobialwith activity against resistant gram-positive organisms,” Clinical Therapeutics, vol. 27, no. 1, pp. 12–22, 2005.

[63] D. M. Livermore, “Tigecycline: What is it, and where should it be used?,” Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 56, no. 4, pp. 611–614, 2005.

[64] V. T. Andriole, “The quinolones: Past, present, and future,” Clinical Infectious Diseases, vol. 41, no. Supplement_2, 2005.

[65] P. C. Appelbaum and P. A. Hunter, “The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and Future Perspectives,” International Journal of Antimicrobial Agents, vol. 16, no. 1, pp. 5–15, 2000.

[66] F. Van Bambeke, J.-M. Michot, J. Van Eldere, and P. M. Tulkens, “Quinolones in 2005: An update,” Clinical Microbiology and Infection, vol. 11, no. 4, pp. 256–280, 2005.

[67] S. Ulusoy, “1986’dan 2010’a Kinolonlar,” ANKEM Derg, vol. 24, pp. 96-100, 2010.

[68] L. Nicolle, “Best pharmacological practice: Urinary tract infections,” Expert Opinion on Pharmacotherapy, vol. 4, no. 5, pp. 693–704, 2003.

[69] P. A. Masters, T. A. O'Bryan, J. Zurlo, D. Q. Miller, and N. Joshi, “Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited,” Archives of Internal Medicine, vol. 163, no. 4, p. 402, 2003.

[70] K. T. Wisell, G. Kahlmeter, and C. G. Giske, “Trimethoprim and enterococci in urinary tract infections: New perspectives on an old issue,” Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 62, no. 1, pp. 35–40, 2008.

[71] S. Ercis, M. A. Ergin, G. Hasçelik, “Metisilin dirençli ve duyarlı Stafilokoklarda trimetoprim-sülfametoksazol duyarlılığının değerlendirilmesi,” İnfeksiyon Dergisi, vol. 15(4), pp. 485-488, 2001.

[72] A. L. Kwa, V. H. Tam, M. E. Falagas, “Polymyxins: a review of the current status including recent developments,” Ann Acad Med Singapore, vol. 37(10), pp. 870-883, 2008

[73] J. Molina, E. Cordero, and J. Pachón, “New information about the polymyxin/colistin class of antibiotics,” Expert Opinion on Pharmacotherapy, vol. 10, no. 17, pp. 2811–2828, 2009.

[74] R. Ozaras, “Daptomycin,” Klimik Dergisi/Klimik Journal, vol. 23, no. 2, pp. 35–38, 2010.

[75] G. Y. Bozkurt, H. Kutlu, A. Arslan, “Yeni Bir Antibakteriyel Ajan Daptomisin,” Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, vol. 63, no. 3, pp. 85–88, 2010.

[76] N. Demirtürk, T. Demirdal, “Antibiyotiklerde direnç sorunu. Kocatepe tıp dergisi,” vol. 5(2), 2004.

[77] E. P. ABRAHAM and E. CHAIN, “An enzyme from bacteria able to destroy penicillin,” Nature, vol. 146, no. 3713, p. 837, 1940.

[78] G. Ippolito, S. Leone, F. N. Lauria, E. Nicastri, and R. P. Wenzel, “Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: The superbug,” International Journal of Infectious Diseases, vol. 14, 2010.

[79] K. A. Rodvold and K. W. McConeghy, “Methicillin-resistant Staphylococcus aureus therapy: Past, present, and future,” Clinical Infectious Diseases, vol. 58, no. suppl 1, 2013.

[80] K. Töreci, “Antibiyotik kullanımı ve direnç ilişkisi,” Flora, vol. 8(2), pp. 89-110, 2003

[81] L. Archibald, L. Phillips, D. Monnet, J. E. McGowan, F. Tenover, and R. Gaynes, “Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: Increasing importance of the Intensive Care Unit,” Clinical Infectious Diseases, vol. 24, no. 2, pp. 211–215, 1997.

[82] G. Usluer, “Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol,” Flora, vol. 7(3), pp. 135-141, 2002

[83] M. Yücesoy, N. yulu, S. Kocagöz, S. Ünal, S. Çetin, and S. Çalangu, “Antimicrobial resistance of gram-negative isolates from intensive care units in Turkey: Comparison to previous three years,” Journal of Chemotherapy, vol. 12, no. 4, pp. 294–298, 2000.

[84] H. S. Gold and R. C. Moellering, “Antimicrobial-Drug Resistance,” New England Journal of Medicine, vol. 335, no. 19, pp. 1445–1453, 1996.

[85] K. A. Culos, J. P. Cannon, and S. A. Grim, “Alternative agents to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections,” American Journal of Therapeutics, vol. 20, no. 2, pp. 200–212, 2013.

[86] A. Soriano, F. Marco, J. A. Martinez, E. Pisos, M. Almela, V. P. Dimova, D. Alamo, M. Ortega, J. Lopez, and J. Mensa, “Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia,” Clinical Infectious Diseases, vol. 46, no. 2, pp. 193–200, 2008.

[87] S. Tsiodras, H. S. Gold, G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman, R. C. Moellering, and M. J. Ferraro, “Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus,” The Lancet, vol. 358, no. 9277, pp. 207–208, 2001.

[88] A. Mangili, I. Bica, D. R. Snydman, and D. H. Hamer, “Daptomycin-resistant, methicillin-resistantstaphylococcus aureusbacteremia,” Clinical Infectious Diseases, vol. 40, no. 7, pp. 1058–1060, 2005.

[89] R. Nordström and M. Malmsten, “Delivery systems for antimicrobial peptides,” Advances in Colloid and Interface Science, vol. 242, pp. 17–34, 2017.

[90] R. E. Hancock and D. S. Chapple, “Peptide antibiotics,” Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 43, no. 6, pp. 1317–1323, 1999.

[91] M. Zasloff, “Antimicrobial peptides of multicellular organisms,” Nature, vol. 415, no. 6870, pp. 389–395, 2002.

[92] K. V. R. Reddy, R. D. Yedery, and C. Aranha, “Antimicrobial peptides: Premises and promises,” International Journal of Antimicrobial Agents, vol. 24, no. 6, pp. 536–547, 2004.

[93] K. A. Brogden, “Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?,” Nature Reviews Microbiology, vol. 3, no. 3, pp. 238–250, 2005.

[94] J.-P. S. Powers and R. E. W. Hancock, “The relationship between peptide structure and antibacterial activity,” Peptides, vol. 24, no. 11, pp. 1681–1691, 2003.

[95] Y. Huang, J. Huang, and Y. Chen, “Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function,” Protein & Cell, vol. 1, no. 2, pp. 143–152, 2010.

[96] A. Bahar and D. Ren, “Antimicrobial peptides,” Pharmaceuticals, vol. 6, no. 12, pp. 1543–1575, 2013.

[97] A. M. McManus, N. F. Dawson, J. D. Wade, L. E. Carrington, D. J. Winzor, and D. J. Craik, “Three-dimensional structure of RK-1: a novel α-defensin peptide,” Biochemistry, vol. 39, no. 51, pp. 15757–15764, 2000.

[98] M. Uteng, H. H. Hauge, P. R. Markwick, G. Fimland, D. Mantzilas, J. Nissen Meyer, and C. Muhle-Goll, “Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge,” Biochemistry, vol. 42, no. 39, pp. 11417–11426, 2003.

[99] A. Rozek, C. L. Friedrich, and R. E. Hancock, “Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles,,” Biochemistry, vol. 39, no. 51, pp. 15765–15774, 2000.

[100] J. Havard, P. Hamill, and R. E. Hancock, “Peptide antimicrobial agents,” Clinical Microbiology Reviews, vol. 19, no. 3, pp. 491–511, 2006.

[101] J. M. Loeffler, D. Nelson, and V. A. Fischetti, “Rapid killing of streptococcus pneumoniae with a bacteriophage cell wall hydrolase,” Science, vol. 294, no. 5549, pp. 2170–2172, 2001.

[102] K. He, S. J. Ludtke, D. L. Worcester, and H. W. Huang, “Neutron scattering in the plane of membranes: Structure of alamethicin pores,” Biophysical Journal, vol. 70, no. 6, pp. 2659–2666, 1996.

[103] F. Madani, S. Lindberg, Ü. Langel, S. Futaki, and A. Gräslund, “Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides,” Journal of Biophysics, vol. 2011, pp. 1–10, 2011.

[104] F. Costa, P. Gomes, and M. C. L. Martins, “Antimicrobial peptides (AMP) biomaterial coatings for tissue repair,” Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair, pp. 329–345, 2018.

[105] Y. Pouny, D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, and Y. Shai, “Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes,” Biochemistry, vol. 31, no. 49, pp. 12416–12423,
1992.

[106] B. Bechinger, “Detergent-like properties of Magainin antibiotic peptides: A 31p solid-state NMR spectroscopy study,” Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, vol. 1712, no. 1, pp. 101–108, 2005.

[107] D. S. Bolintineanu and Y. N. Kaznessis, “Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: A Review,” Peptides, vol. 32, no. 1, pp. 188–201, 2011.

[108] A. Mecke, D.-K. Lee, A. Ramamoorthy, B. G. Orr, and M. M. Banaszak Holl, “Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: An atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers,” Biophysical Journal, vol. 89, no. 6, pp. 4043–4050, 2005.

[109] S. Ludtke, K. He, and H. Huang, “Membrane thinning caused by Magainin 2,” Biochemistry, vol. 34, no. 51, pp. 16764–16769, 1995.

[110] F.-Y. Chen, M.-T. Lee, and H. W. Huang, “Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation,” Biophysical Journal, vol. 84, no. 6, pp. 3751–3758, 2003.

[111] K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, and K. Miyajima, “An antimicrobial peptide, Magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation,” Biochemistry, vol. 35, no. 35, pp. 11361–11368, 1996.

[112] K. Matsuzaki, “Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides,” Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, vol. 1376, no. 3, pp. 391–400, 1998.

[113] M. Wu, E. Maier, R. Benz, and R. E. Hancock, “Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of escherichia coli,” Biochemistry, vol. 38, no. 22, pp. 7235–7242, 1999.

[114] G. Ehrenstein and H. Lecar, “Electrically gated ionic channels in lipid bilayers,” Quarterly Reviews of Biophysics, vol. 10, no. 1, pp. 1–34, 1977.

[115] K. Shimazaki, T. Tazume, K. Uji, M. Tanaka, H. Kumura, K. Mikawa, and T. Shimo-oka, “Properties of a heparin-binding peptide derived from bovine lactoferrin,” Journal of Dairy Science, vol. 81, no. 11, pp. 2841–2849, 1998.

[116] M. Cudic and L. Otvos Jr., “Intracellular targets of antibacterial peptides,” Current Drug Targets, vol. 3, no. 2, pp. 101–106, 2002.

[117] F. Costa, I. F. Carvalho, R. C. Montelaro, P. Gomes, and M. C. Martins, “Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPS) onto biomaterial surfaces,” Acta Biomaterialia, vol. 7, no. 4, pp. 1431–1440, 2011.

[118] J. D. Wade, F. Lin, M. A. Hossain, and R. M. Dawson, “Chemical synthesis and biological evaluation of an antimicrobial peptide gonococcal growth inhibitor,” Amino Acids, vol. 43, no. 6, pp. 2279–2283, 2012.

[119] K. L. Piers, M. H. Brown, and R. E. W. Hancock, “Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria,” Gene, vol. 134, no. 1, pp. 7–13, 1993.

[120] R. Ramos, S. Moreira, A. Rodrigues, M. Gama, and L. Domingues, “Recombinant expression and purification of the antimicrobial peptide magainin-2,” Biotechnology Progress, vol. 29, no. 1, pp. 17–22, 2012.

[121] N. Papo, Z. Oren, U. Pag, H.-G. Sahl, and Y. Shai, “The consequence of sequence alteration of an amphipathic α-helical antimicrobial peptide and its diastereomers,” Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 37, pp. 33913–33921, 2002.

[122] G. T. Hermanson, “Introduction to bioconjugation,” Bioconjugate Techniques, pp. 1–125, 2013.

[123] S. Acar, "Peptid Protein Kovalent Konjugasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006.

[124] A. Basu, T. G. Shrivastav, and K. P. Kariya, “Preparation of enzyme conjugate through adipic acid dihydrazide as linker and its use in immunoassays,” Clinical Chemistry, vol. 49, no. 8, pp. 1410–1412, 2003.

[125] J. C. Sheehan, J. Preston, and P. A. Cruickshank, “A rapid synthesis of oligopeptide derivatives without isolation of intermediates,” Journal of the American Chemical Society, vol. 87, no. 11, pp. 2492–2493, 1965.

[126] M. Davies, “Canine parvovirus strains identified from clinically ill dogs in the United Kingdom,” Veterinary Record, vol. 163, no. 18, pp. 543–544, 2008.

[127] N. S. Çimen, “Proteinlerin Poliakrilik Asit ile Suda Çözünmeyen Kompleksleri” Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006.

[128] A. Filenko, M. Demchenko, Z. Mustafaeva, Y. Osada, and M. Mustafaev, “Fluorescence study of Cu2+-induced interaction between albumin and anionic polyelectrolytes,” Biomacromolecules, vol. 2, no. 1, pp. 270–277, 2000.

[129] B. Mansuroğlu, S. Derman, K. Kızılbey, S. Canım Ateş, and Z. Mustafaeva Akdeste, “Synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease: Synthesis,

characterization and immunogenicity," Turkish Journal of Biochemistry, vol. 45, no. 6, pp. 859–868, 2020.

[130] E. L. Kosarev and K. O. Muranov, Instruments and Experimental Techniques, vol. 44, no. 5, pp. 638–643, 2001.

[131] S. Acar, " Canine parvovirus'e ait antijenik özellikli sentetik peptidlerin sentezi ve biyokonjugatlarının geliştirilmesi," Doktora Tezi, Biyomühendislik, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2012.

[132] I. W. Hamley, "Peg–peptide conjugates," Biomacromolecules, vol. 15, no. 5, pp. 1543–1559, 2014.

[133] J. M. Harris and R. B. Chess, "Effect of pegylation on pharmaceuticals," Nature Reviews Drug Discovery, vol. 2, no. 3, pp. 214–221, 2003.

[134] Y. B. Kilinc, Z. M. Akdeste, R. C. Koc, M. Bagirova, and A. Allahverdiyev, "Synthesis and characterization of antigenic influenza A M2E protein peptide-poly(acrylic) acid bioconjugate and determination of toxicityin vitro," Bioengineered, vol. 5, no. 6, pp. 357–362, 2014.

[135] P. P. Arayici, T. Acar, B. Ucar, M. Karahan, B. A. Arslan, and Z. Mustafaeva, "Rabies virus 31D peptide-[p(vp-co-aa)] conjugates: Synthesis, characterization and cytotoxicity evaluation," ChemistrySelect, vol. 4, no. 32, pp. 9483–9487, 2019.

[136] A. I. Khan, S. Nazir, A. Ullah, M. N. Haque, R. Maharjan, S. U. Simjee, H. Olleik, E. Courvoisier-Dezord, M. Maresca, and F. Shaheen, "Design, synthesis and characterization of [G10A]-temporin Sha Dendrimers as dual inhibitors of cancer and pathogenic microbes," Biomolecules, vol. 12, no. 6, p. 770, 2022.

[137] T. Arasoğlu, S. Derman, B. Mansuroğlu, D. Uzunoğlu, B. Koçyiğit, B. Gümüş, T. Acar, and B. Tuncer, "Preparation, characterization, and enhanced antimicrobial activity: Quercetin-loaded PLGA nanoparticles against

foodborne pathogens," Turkısh Journal of Biology, vol. 41, pp. 127–140, 2017.

[138] S. Durak, T. Arasoglu, S. C. Ates, and S. Derman, "Enhanced antibacterial and antiparasitic activity of multifunctional polymeric nanoparticles," Nanotechnology, vol. 31, no. 17, p. 175705, 2020.

[139] K. A. Kızılbey, "Melanoma Hastalığını Oluşturan Sentetik Peptidlerin Poliakrilikasit Ve Kopolimerleri İle Konjugasyonu," Doktora Tezi, Kimya, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2012.

[140] Y. Imura, M. Nishida, Y. Ogawa, Y. Takakura, and K. Matsuzaki, "Action mechanism of tachyplesin I and effects of pegylation," Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, vol. 1768, no. 5, pp. 1160–1169, 2007.

[141] Y. Imura, M. Nishida, and K. Matsuzaki, "Action mechanism of pegylated magainin 2 analogue peptide," Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, vol. 1768, no. 10, pp. 2578–2585, 2007.

[142] A. Guiotto, M. Pozzobon, M. Canevari, R. Manganelli, M. Scarin, and F. M. Veronese, "Pegylation of the antimicrobial peptide Nisin A: Problems and perspectives," Il Farmaco, vol. 58, no. 1, pp. 45–50, 2003.

[143] P. Kumar, R. A. Shenoi, B. F. Lai, M. Nguyen, J. N. Kizhakkedathu, and S. K. Straus, "Conjugation of aurein 2.2 to HPG yields an antimicrobial with better properties," Biomacromolecules, vol. 16, no. 3, pp. 913–923, 2015.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Projeler

1. YTU BAP FYL-2021-4154 numaralı BAP Projesi

Ödüller

1. Tübitak 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Bursu