

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI

**BAZI PİRAZOL-3- KARBOKSİLLİ ASİT TÜREVLERİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE DNA İLE
ETKİLEŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

Proje No: FBY-10-3329

Yüksek Lisans Tezi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP

Duygu Cemre BULUT

BİYOLOJİ

**Haziran 2014
KAYSERİ**

T.C.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI PİRAZOL-3- KARBOKSİLLİ ASİT TÜREVLERİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE DNA İLE
ETKİLEŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Duygu Cemre BULUT**

**Danışman
Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FBY-10-3329 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.



Duygu Cemre BULUT

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Bazı Pirazol-3-Karboksilli Asit Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri ve DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



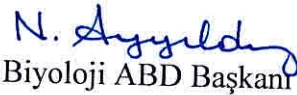
Tezi Hazırlayan

Duygu Cemre BULUT



Danışman

Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP



Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP danışmanlığında **Duygu Cemre BULUT** tarafından hazırlanan “**Bazı Pirazol-3-Karboksilli Asit Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri ve DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

05 /06/ 2014

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP

Üye : Prof. Dr. İlhan Özer İLHAN

Üye : Doç. Dr. Sevil ALBAYRAK



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 01/07/2014 tarih ve 2014/29-18 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Kâzım KEŞLİOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

“Bazı Pirazol-3-Karboksilli Asit Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri ve DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi” konulu tez çalışmasının seçiminde, yürütülmesinde, sonuçlandırılmasında ve sonuçlarının değerlendirilmesinde maddi ve manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP’ e teşekkür ederim.

Tez çalışmasında her türlü yardımı yapan, bilgisini paylaşan ve çalışmamda gerekli materyalleri sunan sayın hocam Doç. Dr. Fatih DUMAN’ a ve tez çalışmasının yürütülmesi için gereken yeni sentezlenmiş olan pirazol–3 karboksilli asit türevi bileşiklerinin analizlerinde ve temininde zaman harcayan, emek veren sayın Prof. Dr. İlhan Özer İLHAN’a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana verdikleri maddi ve manevi destek, göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı değerli aileme, değerli eşim Fatih SUNA’ ya ve candan arkadaşım Sevgi ERDOĞDU’ ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne (Proje No: FBY–10–3329) teşekkür ederim.

Duygu Cemre BULUT

Kayseri, Haziran 2014

BAZI PİRAZOL-3- KARBOKSİLLİ ASİT TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ

Duygu Cemre BULUT

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2014

Danışman: Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP

ÖZET

Bu çalışmada 4-Benzoil-1-(2,4-dinitrofenil)-5-fenil-1H-pirazol-3- karboksilli asit klorür ve 4-Benzoil-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1H-pirazol-3-karboksilli asit klorür bileşiklerinin hidrazin, hidrazit ve üre ile reaksiyonu sonucunda elde edilen 19 adet pirazol türevinin biyolojik aktiviteleri ve DNA ile olan etkileşimleri araştırılmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri 8 adet bakteri ve 2 adet maya türüne karşı agar difüzyon ve en düşük inhibe edici konsantrasyon (MİK) yöntemi ile incelenmiştir. İnhibisyon zon çapı ölçümlerine göre test edilen bileşikler içerisinde 4-benzoil-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-1H-pirazol-3-karboksilli asit-o-nitrofenil hidrazit (AC14), N-[4-benzoil-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1H-pirazol- 3-karbonil]-N',N'-dimetilüre (K1) ve N-[4-benzoil-1-(2,4-dinitrofenil)-5-fenil- 1H-pirazol-3-karbonil]-N'-etilüre (K6) en etkili olarak belirlenmiştir. Bileşiklerin mayalar üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Bileşiklerin toksisite düzeyleri Brine-Shrimp Toxicity Assay yöntemiyle *in vitro* ortamda tespit edilmiştir ve bileşiklerin LC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Test edilen bileşiklerin hepsinin *Artemia salina* larvaları üzerinde toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bileşiklerin DNA ile olan etkileşimleri pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmiştir. Test edilen bileşiklerden 4-Benzoil-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-N'-fenilasetil-1H-pirazol-3-karbohidrazit (MC2), 4-benzoil-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-1H-pirazol-3-karboksilli asit-p-nitrofenil hidrazit (AC3), N-[4-benzoil-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1H-pirazol-3-karbonil]-N',N'-dimetilüre (K1), N-[4-benzoil-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1H-pirazol- 3-karbonil]-N'-etilüre (K2) ve N-[4-benzoil-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1H-pirazol- 3-karbonil]-N,N'dimetiltiyoüre (K5)' in dışındaki bileşiklerin DNA'nın süper sarmal yapısını bozduğu ve hareketini yavaşlattığı belirlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçların yeni ilaç etken maddelerinin tasarımı, yapılarının aydınlatılması ve aktivite çalışmaları konusunda gerçekleştirilen yeni çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Pirazol türevleri, antimikrobiyal aktivite, toksisite, DNA bağlanma ve ayırma, pBR322 DNA

DETERMINATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES AND INTERACTION WITH DNA OF SOME 1H- PYRAZOLE-3 CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES

Duygu Cemre BULUT

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M. Sc. Thesis, June 2014

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Fatma ÖZTÜRK KÜP

ABSTRACT

In this study, biological activities and their interaction with DNA of new nineteen pyrazole derivatives at the resulting with hydrazine, hydrazide and urea was reacted of 4-Benzoyl-1-(2,4-dinitrophenyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid chloride and 4-Benzoyl-1-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid chloride compounds were investigated.

The synthesized compounds were investigated for antimicrobial activities against 8 bacteria and 2 species fungal strains by the agar diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) assays. By measuring the inhibition zone diameter is determined the most effective of 4-benzoyl-1-[2,4-dinitrophenyl]-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid o-nitrophenyl hydrazide (AC14), N-[4-benzoyl -1 - (4-nitrophenyl)-5-phenyl-1H pirazol-3-carbonyl]-N',N'-dimethylurea (K1) and N-[4-benzoyl-1-(2,4-dinitrophenyl) -5- phenyl-1H-pyrazole-3-carbonyl]-N'-ethylurea (K6) between the tested compounds. Compounds have not had any effect on yeast. Toxicity levels of the compounds were determined *in vitro* by Brine-Shrimp Toxicity Assay method and were calculated LC₅₀ values of the compounds. All of the tested compounds were determined toxic to larvae of *Artemia salina*. The interaction of the compounds with DNA was determined using pBR322 plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. That is determined that tested compounds other than 4-Benzoyl-1-[2,4-dinitrophenyl]-5-phenyl-N'-phenylacetyl-1H-pyrazol-3-carbohydrazide (MC2), 4-benzoyl-1-[2,4-dinitrophenyl] -5-phenyl-1Hpirazol-3-carboxylic acid-p-nitrophenyl hydrazide (AC3), N-[4-benzoyl-1-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-1H pyrazole-3-carbonyl]-N',N'-dimethylurea (K1), N-[4-benzoyl-1-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-1H pyrazole -3-carbonyl]-N'-ethylurea (K2) and N-

[4-benzoyl-1-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-1H pyrazole -3-carbonyl]-N,N'dimethylurea (K5) disrupt the structure of supercoiled DNA and slows down the movement of supercoiled DNA.

It is believed that the results obtained from this study will contribute to the research on the design of new pharmaceutical active substance, structure elucidation and activity studies.

Key words: Pyrazole derivatives, antimicrobial activity, toxicity, DNA binding/cleavage, pBR322 DNA

İÇİNDEKİLER

BAZI PİRAZOL-3- KARBOKSİLLİ ASİT TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ

	<u>Sayfa</u>
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMA VE SİMGELER.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
 GİRİŞ	 1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Kemoterapötikler	8
1.2. Antimikrobiyal Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları.....	10
1.2.1. Bakteri Hücre Duvarının Sentezini İnhibe Etmek ve Litik Enzimleri Aktive Etmek Suretiyle Etki	10
1.2.2. Sitoplazma Zarının Geçirgenliğini Arttırmak Suretiyle Etki.....	11
1.2.3. Bakteri Ribozomlarında Protein Sentezini İnhibe Etmek Suretiyle Etki	11

1.2.4. Genetik Materyal İçinde DNA Sentezinin veya DNA Kontrolü	
Altında Yapılan m-RNA Sentezinin Bozulmasıyla Oluşan Etki.....	12
1.2.5. İntermediyer Metabolizmayı Bozmak Suretiyle Etki.....	12
1.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	12
1.4. Toksisite	13
1.5. Bileşik DNA İnteraksiyonu	15

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal.....	18
2.2. Test Edilen Pirazol-3-Karboksilli Asit Kimyasal Yapıları ve Özellikleri	21
2.2.1 MC1' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	21
2.2.2. MC2' nin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	22
2.2.3. MC3' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	22
2.2.4. MC4' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	23
2.2.5. MC5' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	23
2.2.6. MC7' nin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	24
2.2.7. MC8' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	24
2.2.8. MC10' un Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	25
2.2.9. MC11' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	25
2.2.10. MC12' nin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	26
2.2.11. K1' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	26
2.2.12. K2' nin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	27
2.2.13. K3' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	27
2.2.14. K4' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	28
2.2.15. K5' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	29
2.2.16. K6' nın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	29
2.2.17. AC3' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	30
2.2.18. AC6' nın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	30
2.2.19. AC14' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	31
2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	31
2.3.1. Agar Difüzyon Yöntemi.....	31

2.3.2. Mikrodilüsyon Yöntemi.....	33
2.4. Bileşiklerin Toksisite Etkilerinin Belirlenmesi.....	34
2.4.1. <i>Artemia salina</i> Larvalarının Hazırlanması	34
2.4.2. Test Edilecek Bileşiklerin Hazırlanması ve Testin Yapılışı	35
2.5. Bileşik –DNA Etkileşiminin Belirlenmesi	36

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Test edilen Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	37
3.1.1 Agar difüzyon sonuçları	37
3.1.2. Pirazol türevlerine ait MİK değerleri	40
3.2. Bileşiklerin “Brine-Shrimp Toksisite Testi” Yöntemiyle Belirlenmiş Toksisite Değerleri.....	49
3.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile Bileşik–DNA Etkileşimi Sonuçları.....	51

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma-Sonuç ve Öneriler.....	62
--------------------------------------	----

KAYNAKLAR	73
-----------------	----

ÖZGEÇMİŞ.....	85
---------------	----

KISALTMALAR LİSTESİ

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
PRSP	Penisilin Dirençli <i>Streptococcus pneumoniae</i>
VRE	Vankomisin Dirençli Enterococci
IR	Infrared Spektroskopisi
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
HIV	Human Immunodeficiency Virus
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
MMD	Minimal Mortal Doz
LD ₅₀	Letal Doz 50 (IC ₅₀ , LC ₅₀)
AH2	Askorbik Asit
DMF	Dimetil Formamid
SC	Süper Coiled (Süper Sarmal Halkasal Plazmid)
ATCC	The American Type Culture Collection
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection
NA	Nutrient Agar Besiyeri
NB	Nutrient Broth Besiyeri
MHB	Mueller Hinton Broth Besiyeri
MHA	Mueller Hinton Agar Besiyeri
SDA	Sabouraud Dextrose Agar Besiyeri
TAE	Tris Asetik asit EDTA Tamponu
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TE	Tris-HCl + Etilendiamin Tetra Asetik Asit
MIC	Mikrodilüsyon Yöntemi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
TTC	Triphenyl Tetrazolium Chloride
SPSS	Statistical Packages for the Social Sciences
mm	Milimetre

l	Litre
ml	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
M	Molarite
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
ppm	Milyonda bir
nm	Nanometre
°C	Santigrat
V	Volt
N	Normal
M	Molar
Gram (-)	Gram negatif
Gram (+)	Gram pozitif
vd.	ve diğ�erleri
et al.	ve diğ�erleri

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1.	Bazı pirazol bileşiklerinin yapısal özellikleri	7
Tablo 2.1.	Kullanılan organizmalar ve kültür koleksiyon merkezi (ATCC) kodları .	19
Tablo 3.1.	Pirazol 3-karboksilli asit türevlerinin antimikrobiyal aktivite değerleri (mm zon çapı)	41
Tablo 3.2.	Mikroorganizmalar üzerinde denenen kimyasalların Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK-mg ml ⁻¹) değerleri	44
Tablo 3.3.	Test edilen bileşiklerin <i>E. coli</i> 35218' e karşı MİK değerleri	45
Tablo 3.4.	Test edilen bileşiklerin <i>B. subtilis</i> ' e karşı MİK değerleri.....	45
Tablo 3.5.	Test edilen bileşiklerin <i>B. cereus</i> ' a karşı MİK değerleri.....	46
Tablo 3.6.	Test edilen bileşiklerin <i>S. aureus</i> ' a karşı MİK değerleri.....	46
Tablo 3.7.	Test edilen bileşiklerin <i>P. vulgaris</i> ' e karşı MİK değerleri	47
Tablo 3.8.	Test edilen bileşiklerin <i>E. coli</i> 25922' ye karşı MİK değerleri.....	47
Tablo 3.9.	Test edilen bileşiklerin <i>P. aeruginosa</i> ' ya karşı MİK değerleri	48
Tablo 3.10.	Test edilen bileşiklerin <i>E. fecalis</i> ' e karşı MİK değerleri.....	48
Tablo 3.11.	Toksisite derecesi değerlendirilmesinde kullanılan referans değerler	49
Tablo 3.12.	Brine-Shrimp Toxicity Assay test sonuçları ile LC ₅₀ değerleri (µg/ml)...	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Pirazol Halkası	5
Şekil 1.2.	Karboksilik asitin dekarboksillenmesinden pirazolün oluşumu	5
Şekil 2.1.	MC1' in kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.2.	MC2' nin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.3.	MC3' ün kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.4.	MC4' ün kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.5.	MC5' in kimyasal yapısı.....	24
Şekil 2.6.	MC7' nin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 2.7.	MC8' in kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.8.	MC10' un kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.9.	MC11' in kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.10.	MC12' nin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.11.	K1' in kimyasal yapısı	27
Şekil 2.12.	K2' nin kimyasal yapısı	27
Şekil 2.13.	K3' ün kimyasal yapısı	28
Şekil 2.14.	K4' ün kimyasal yapısı	28
Şekil 2.15.	K5' in kimyasal yapısı	29
Şekil 2.16.	K6' nın kimyasal yapısı	29
Şekil 2.17.	AC3' ün kimyasal yapısı.....	30
Şekil 2.18.	AC6' nın kimyasal yapısı.....	30
Şekil 2.19.	AC14' ün kimyasal yapısı.....	31
Şekil 2.20.	McFarland 0,5, 1 ve 2 standardı.....	32
Şekil 2.21.	Mikrodilasyon Broth Tekniğinin Denemelerde Uygulanış Şekli	34
Şekil 2.22.	<i>Artemia salina</i> ' nın yumurtadan çıkmış larvaları	35
Şekil 3.1.	Dmf - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	51
Şekil 3.2.	MC1 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	52
Şekil 3.3.	MC2 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	52
Şekil 3.4.	MC3 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	53
Şekil 3.5.	MC4 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	53
Şekil 3.6.	MC5 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	54
Şekil 3.7.	MC7 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	54
Şekil 3.8.	MC8 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	55

Şekil 3.9. MC10 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	55
Şekil 3.10. MC11 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	56
Şekil 3.11. MC12 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	56
Şekil 3.12. AC3 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	57
Şekil 3.13. AC6 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	58
Şekil 3.14. AC14 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi.....	58
Şekil 3.15. K1 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi	59
Şekil 3.16. K2 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi	59
Şekil 3.17. K3 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi	60
Şekil 3.18. K4 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi	60
Şekil 3.19. K5 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi	61
Şekil 3.20. K6 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi	61

GİRİŞ

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

Antibakteriyel bileşiklere karşı direnç gelişimi ve AIDS, kanser tedavisi ve organ nakli gibi immun sistemin baskılandığı hastalarda oluşan fırsatçı bakteri ve mantar enfeksiyonları, daha etkili antimikrobiyal bileşikler geliştirme araştırmalarının hızla artmasına sebep olmaktadır.

Çoklu ilaç dirençli, örneğin; metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), penisilin dirençli *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) ve vankomisin dirençli Enterococci (VRE) gibi Gram-pozitif bakterilerin ortaya çıkması ve yaygınlaşması ile bulaşıcı hastalıkların tedavisini zorlaştırmıştır ve son yıllarda ciddi bir tıbbi sorun haline gelmiştir. Halen kullanılan antibakteriyel ilaçlara patojenik bakterilerin direnç mekanizmaları geliştikçe, yeni ve güçlü bakterisit keşfi, bakteriyel direnci aşmak ve etkili tedaviler geliştirmek için en iyi yoldur.

Son yıllarda, çoklu ilaç dirençli Gram-pozitif ve Gram-negatif patojen bakterilerin neden olduğu yaşamı tehdit eden bulaşıcı hastalık sayısı dünyanın birçok ülkesinde endişe verici bir düzeye ulaşmıştır [1,2].

Heterohalkalı bileşikler doğada çok geniş bir şekilde dağılmaktadır ve yaşam için temeldir. İlaçların büyük bir çoğunluğu, zirai ilaçlar, gıda katkı maddeleri ve tatlandırıcılar heterohalkalı bileşiklerdir. Antibakteriyel bileşiklerin bir kısmını pirazol türevli halkalı heterosiklik bileşikleri oluşturur. Pirazol türevleri genelde nitrojen içeren heterosiklik bileşikler olarak bilinirler ve onların sentezi için çeşitli prosedürler geliştirilmiştir [3-6].

Pirazol, birbirine komşu konumda bulunan iki azot atomu ve üç karbon atomundan oluşan, beş üyeli halka yapısı ile karakterize edilen heterohalkalı serinin basit aromatik halkalı organik bileşikler sınıfına dahildir [7]. Pirazol kimyasına olan ilgi, pirazol türevlerinin antipiretik (ateş düşürücü) etkisinin keşfedilmesiyle başlamıştır. Bu etkisi sonucu bileşiğin isimlendirilmesinde ‘antipirin’ adı günümüzde de kullanılır [8]. Pirazol çekirdeği termal ve hidrolitik olarak çok kararludur. Ligand olarak iki konumundaki azot atomu ile metallere bağlanabilirler. Pirazolun deprotonasyonu ile oluşan pirazolid iyonu ise iki azot atomu ile beraber koordinasyona katılabilirler.

Bu çalışmada kullanılan pirazol türevi bileşikler visinal dion yapısına sahip aktif bir karbon halkası olan 4-benzoil-5-fenil-2,3-furandion bileşiğidir. Ve literatüre yeni heterosiklik bileşikler kazandırmıştır. Bileşik sahip olduğu 4 C atomunun da farklı elektrofilik özellikte olmasından dolayı, bu 4 C atomu üzerinden farklı nükleofillerle ve aynı zamanda bir dien yapısında olması nedeniyle de dienofillerle çok çeşitli reaksiyonlar vermektedir. Bu bileşiğin etkinliği göz önüne alınarak, aynı iskelete sahip furan-2,3-dion sistemleri sentezlenerek bu bileşiklerin benzer reaksiyonları da literatüre kazandırılmıştır. Sentezi gerçekleştirilen bu bileşikler, uygun çözücülerle kristallendirilmesi ile saflaştırıldıktan sonra, IR, elementel analiz, NMR spektrofotometreleri kullanılarak yapısal olarak karakterize edilmiştir. Sentezi gerçekleştirilen hetero halkalı hidrazit, pirazolo-piridazin ve karboksamit türevi bileşiklerin sentezi gerçekleştirilerek literatüre yeni bileşikler kazandırılmıştır [9-11].

Yakın zamanda yapılan bir çalışma ile de furan-2,3-dion bileşiklerinin diaminoantrakinonlar ile reaksiyonlarından nafto-kinoksalin-trion ve antrakinon tipi bileşikler sentezlenmiş bu bileşiklerin boyar madde olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [9-11]. Elde edilen pirazol karboksilli asit bileşikleri ise çok aktif bir bileşik olan asit klorürüne dönüşerek çeşitli aminler, alkoller, hidrazitler gibi

nükleofillerle reaksiyonları yapılmış ve elde edilen bazı bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile reaksiyon mekanizmaları incelenerek literatüre kazandırılmıştır [9].

Pirazol karboksilli asit bileşiğinin fonksiyonlandırılması ile elde edilen pirazol-NO hibrit bileşiklerinin de biyolojik olarak NO verici özelliğinden dolayı aktifliği literatüre yakın zamanda kazandırılmıştır.

Sübstitue pirazoller çok çeşitli biyolojik ve farmakolojik aktiviteler gösterirler ve hem ilaç hem de tarım endüstrisinde geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Bu yüzden, bu bileşiklerin sentezi için geliştirilen yöntemler giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda; pirazol türevli 4-benzoil-5-fenil-2,3-furandion bileşiğinin değişken hidrazit, hidrazin ve üre türevlerinin antimikrobiyal aktiviteleri 4 adet Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* NRRL-B 37, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 292112) ve 4 adet Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922) ve 2 adet maya suşu (*Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida tropicalis* ATCC 13803)' na karşı belirlenmiştir. Antibakteriyel etki gösterdikleri belirlenen bileşiklerin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir. Aynı zamanda sentezlenen bileşiklerin *in-vivo* olarak *Artemia salina* larvalarına olan öldürücü etkisi, hızlı ve basit bir yöntem olan "Brine-Shrimp Lethality Assay" sitotoksisite testleriyle denenmiştir. Bunlara ek olarak, biyolojik aktivitelere dair daha fazla fikir elde etmek için, bileşiklerin plazmit DNA ile olan etkileşimi agaroz jel elektroforez yöntemiyle ilk kez incelenmiştir.

Yapılan tez çalışması kapsamında yeni sentezlenmiş pirazol türevli bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi sonucunda seçkin bir biyoaktif bileşiğin literatüre kazandırılabilceğini ümit ediyoruz.

1. BÖLÜM

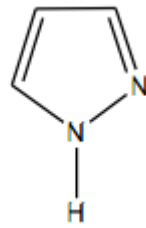
GENEL BİLGİLER

İlaç geliştirme çalışmaları bir takım zorlukları beraberinde getirmektedir. Bu zorluklar, ideal bir ilaç dizaynı için gerekli olan uygun “öncü bileşiğin” seçiminde ortaya çıkmakta ve bu seçim çok iyi bir organik sentez bilgisinin yanı sıra biraz da şansa bağlı bulunmaktadır. Teorik yaklaşımlarda önder bileşik geliştirme çalışmaları genellikle yetersiz kaldığı için, sentetik ya da doğal maddeler üzerinde yapılan rastgele tarama çalışmaları eskiden olduğu gibi günümüzde de önemini korumaktadır.

Heterohalkalı bileşikler (halka yapısında karbon dışında; N, O, S gibi heteroatom ihtiva eden bileşikler) doğada çok geniş bir şekilde dağılmaktadır ve yaşam için temeldir. İlaçların büyük bir çoğunluğu, zirai ilaçlar, gıda katkı maddeleri ve tatlandırıcılar heterohalkalı bileşiklerdir [12-13]. Literatürde çok sayıda heterohalkalı bileşik, antibakteriyel ve antifungal ajan olarak önerilmektedir. Organik kimyada önemli bir yeri olan heterohalkalı sistemler ve bunların süstitue türevleri endüstriyel ve tıbbi alanda son derece yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [12].

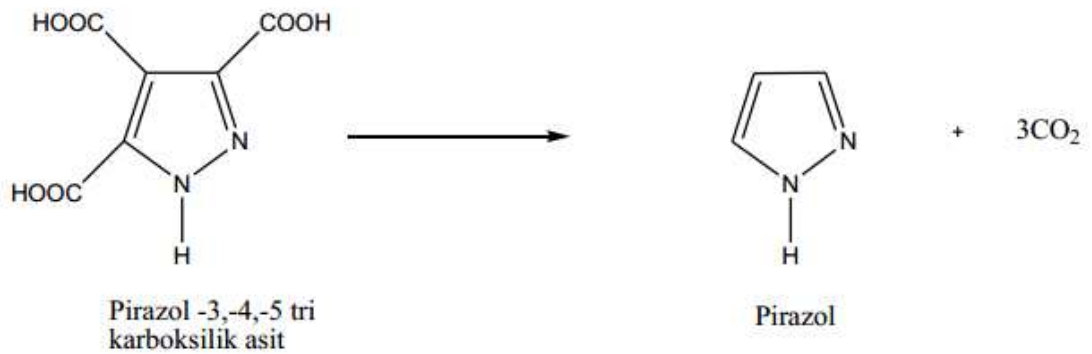
Doğal ürünlerde çok nadir karşılaşılmamasına rağmen sentetik uygulamalarda pirazollere çok sık rastlanır. Pirazol (1,2-diazol) erime noktası 70 °C, kaynama noktası 188 °C olan renksiz, kararlı bir bileşiktir. Aromatik özellikler gösterir. Bazlık özelliği zayıftır [14]. Pirazol aşırı pi elektronuna sahip bir heterohalkalı bileşiktir. Pirol ve piridin tip iki azot atomu içerir [14].

Pirazol kimyasına olan ilgi, pirazol türevlerinin antipirik (sıcaklık indirgeyici) etkisinin keşfedilmesiyle başlamıştır [14]. Bu etkisi sonucu bileşiğin isimlendirilmesinde ‘antipirin’ adı günümüzde de kullanılır (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. Pirazol Halkası

Daha sonraki yıllarda Pirazol-3,-4,5 tri karboksilik asit'in dekarboksillenmesinden pirazol hazırlanmıştır.



Şekil 1.2. Karboksilik asitin dekarboksillenmesinden pirazolün oluşumu

Pirazol kimyası hakkında edinilen temel bilginin pek çoğu; pirazolün aromatik özelliğiyle, benzen türevlerinin aromatik özelliklerinin karşılaştırılması ile geliştirilmiştir.

Yakın zamanlara kadar pirazol halkasının doğada mevcut olmadığına inanılmıştır. 1954 yılında Japonlar tarafından ilk doğal pirazol türevi (3-n-nonyl pirazol) "*Houttuynia cordata* (Tropikal Asya'da "piperaceae" ailesine ait bir bitki)" dan izole edilip, antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir [14]. Pirazolik amino asit (levo-B-(1-pirazolil) alanin) kavun çekirdek suyundan izole edilmiştir [14].

Pirazol türevleri, önemli biyolojik aktiviteli heterohalkalı bileşikler olarak literatürde iyi bilinmektedir. Bu türevler, bunların yaygın potansiyel farmakolojik aktiviteleri nedeniyle antienflamatuar [15], antipiretik [16], antimikrobiyal [17], antiviral [18],

antitümör [19], antikonvülsan [20], antihistaminik [21] ve antidepresan [22] olarak birçok bilimsel araştırmanın konusudur.

Pirazoller uyku verici özellikler taşırlar. Bazı azo pirazol türevleri ise boyar madde sentezinde kullanılmaktadır. Metamizol sodyum ve propifenazon, pirazol türevi analjeziklerdir. Metamizol sodyum, analjezik etkisini periferik antienflamatuar etkisinden çok, merkezi etkisiyle yaptığı sanılmaktadır. Pirazol türevleri, duyarlı kişilerde agranüloz dahil olmak üzere kemik iliği depresyonu yapabilir [14]. Gözlenen çok yönlü biyolojik aktiviteleri nedeniyle ve ticari açıdan önemli boyar madde ajan olarak kullanılmaları sebebiyle [23-25] ve farklı şekilde sübstitüe edilmiş türevlerinin sentezi son elli yıldan bu yana dikkatleri üzerine çekmektedir.

Pirazol karboksilik asitlerin sulfonamid türevlerinin, insan karbonik anhidraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmış (*in vitro*) ve oldukça etkili sonuçlar elde edilmiştir [26-29]. Böylece bu tip bileşiklerin *in vivo* çalışmalar yapıldıktan sonra, glökom hastalık tedavisinde de kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Pirazoller heterohalkada π -elektronlarına sahiptir. N atomu elektronegativitesinden dolayı halka elektronlarını çeker, böylece C (3) ve C (5) kısmen elektropozitif olur ve nükleofilik katımlara uygun hale gelir [7]. Tüm 1,2-azoller, piridin azotu ve C (4) atomu üzerinde yoğunlaşmış π -elektronlarına sahiptirler. Bunun yanında diğer heteroatom pozitif yük taşır. C (3) ve C (5) atomlarının π -elektron yükleri heterohalkaya bağlı olarak pozitif ya da negatif olabilirler. En yüksek bağ derecesi C (3)- N ve C (4)- C (5) atomları arasında bulunmuştur. En düşük bağ derecesi ise heteroatomlar arasındadır. Azotların nükleofililiği ve sterik ulaşılabilirlikleri, uygun halka sübstitüsyonu yoluyla çeşitlendirilebilir. Bu ilgi çekici özelliklere ve genel anlamda pirazol kimyasında güçlü gelişmeler olmasına rağmen pirazol ve pirazol türevi bileşiklere gösterilen ilgi 70' li yıllara kadar sınırlı kalmıştır [30]. Aril pirazoller, önemli biyolojik ve farmakolojik özellikleri olması nedeniyle çok yaygın olarak birçok bileşiğin çıkış maddesi olarak kullanılırlar. Bunların arasında 1,5-difenilpirazoller, HIVreverz transkriptaz inhibitörü olarak kullanılırlar. 1,3,5-trisüstitüe pirazoller, kolesterol inhibitörleri olarak kullanılırlar. Geçmişte pirazol türevleri lokal anestezi ve yatıştırıcı ilaçlarında kullanılmaktaydı. Ancak son zamanlarda tümör ve kanser tedavisinde kullanılmalarıyla ilgili olarak yoğun çalışmalar devam etmektedir [31].

Ayrıca; sara nöbetlerine karşı [32], antidepresan [22], antienflamatuar [33], ateş düşürücü [34], mide salgılarını arttırıcı [35], eklem iltihaplarını önleyici [36], antibakteriyel [37], bitki öldürücü [38], mantar öldürücü [39], pestisit [40], boyar madde [41], güneşten koruyucu madde [42] ve analitik ayıraç [43] olarak çok çeşitli kullanım alanlarına sahiptir.

Şimdiye kadar farklı pirazol bileşiklerinin kimyasal yapıları ile ilgili olarak literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Literatürde sentezlenmiş bazı pirazol bileşiklerinin yapısal özellikleri ile ilgili bilgiler Tablo 1.1’de verilmiştir.

Tablo 1.1. Bazı pirazol bileşiklerinin yapısal özellikleri

Pirazol bileşiği	Yapı Tipi	E.N (°C)	Referans (X ışınları/E.N)
Pirazol	katemer	69-70 70	[44]/[34] [45]/[46]
4-metilpirazol	trimer	15.8-18.5 sıvı	[47]/[34] [46]
3,5-dimetilpirazol	trimer	107	[48]/[34],[46]
3,4,5-trimetilpirazol	katemer	137-138 140	[34],[49]/[34],[46] [50]

Pirazol bileşiklerinin antimikrobiyal çok yönlü biyolojik faaliyetlerinin bulunması [18,51] ve antienflamatuar ajanlar [15] olmasından dolayı çok sayıda kimyasal, biyolojik, tıbbi ve zirai uygulama alanları olduğu rapor edilmiştir. Diğer taraftan, Tip 1 siklik oksalil bileşikleri yaklaşık iki yıldır çeşitli hidrazin veya hidrazonlar ile reaksiyonlar üzerinden çeşitli 1,4,5-trisubstituted pirazol-3-karboksilik asit ve bunların türevlerini sentezlemek için başlangıç maddeleri olarak başarıyla kullanılmıştır [52,53,8]. Metil hidrazin ve 2-hidrazinpiridine karşı furandione 1’in kimyasal davranışıyla oluşan reaksiyonların sonucunda yeni pirazol-3-karboksilik asitler sentezlenmiştir. Yeni asitler farklı hidrazin ile pirazol-piridazinin çeşitli türevlerine dönüştürülmüştür [54].

Literatürde çok sayıda heterohalkalı bileşik, antibakteriyel ve antifungal ajan olarak önerilmektedir. Son yıllarda ise tümör ve kanser tedavisinde kullanımlarıyla ilgili birçok güncel çalışmalar yapılmıştır. Bu sebeple bu tür bileşiklerin sentezi ve özelliklerinin araştırılması üzerine yapılan çalışmaların önemi ve yaygın etkileri gittikçe artmaktadır. Ancak pirazol halkasının bu konuda bilinen üstün etkileri nedeniyle her sentezlenen yeni tip bileşik test edilip değerlendirilmelidir. Çalışma sonuçlarının yeni ilaç etken maddelerinin tasarımı, sentez yöntemlerinin geliştirilmesi, yapılarının aydınlatılması ve aktivite çalışmalarının gerçekleştirilmesi konusunda önemli veriler sağlayacağı görülmektedir.

1.1.Kemoterapötikler

Kimyasal maddelerin organizma dışındaki ortamda mikroorganizmalar üzerine olan öldürücü veya üremelerini durdurucu etkilerine bakılarak hastalıkların tedavisinde bu maddelerden yararlanma fikri oldukça eskidir. 17. yüzyıldan beri sıtma ve amipli dizanteriye karşı kullanılan kinin ve emetin gibi maddeler ilk kimyasal tedavi maddeleri arasında sayılmalarına rağmen; kimyasal maddelerle tedavinin yani kemoterapinin temelleri 20. yüzyılın başında Afrika uyku hastalığına karşı tedavi çareleri arayan Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda patojen mikroorganizmalara etkili fakat konak organizma için az zararlı arsenik ve antimon bileşikleri bulunmuştur. Paul Ehrlich'in de daha o zaman belirtmiş olduğu gibi mikrobik hastalıkları tedavi eden kimyasal maddenin yani kemoterapötik maddenin, antimikrobik etkisinin düşük konsantrasyonlarda bile fazla olmasının yanı sıra bu konsantrasyonlarda organizmaya olan toksik etkisinin çok az olması ya da hiç bulunmaması gerekir [55].

Bu gelişmelere karşın modern kemoterapi, 1936 yılında sülfanilamidin ilk defa klinikte kullanılmasıyla başlamıştır [56]. Geçmişte, insanların bakteri kaynaklı bir hastalığa yakalanması durumunda, ölüm riski oldukça yüksektir. Bu durum, Alexander Fleming'in bulduğu penisilinin, 1940'lı yılların başında büyük ölçekte üretilmesine kadar sürmüştür. Böylelikle penisilinlerin 1941 yılında klinik kullanıma girmesiyle "antibiyotik çağı" başlamış ve günümüze kadar piyasaya birçok antibiyotik ilaç sürülmüştür [57]. Çok küçük konsantrasyonlarda bile patojen mikroorganizmalar üzerine zarar verici etkileri (parazitotrop etki) büyük, buna karşılık konak organizma üzerindeki etkileri (organotrop etki) çok küçük olan ya da hiç bulunmayan; tedavi amacı

ile kullanılan kimyasal maddelere “kemoterapötikler” adı verilmektedir. Seçici toksik etki dediğimiz bu özellik kemoterapötiklerle antiseptik maddeler arasındaki başlıca ayrıcalıktır. Mikroorganizmalar soliter canlı hücrelerdir. Organizmanın yapısını da canlı hücreler oluşturur. Hücrelerin de mikroorganizmalar gibi seçici geçirgen zarları, benzer yapıda sitoplazmaları ve metabolizmalarını sağlayan mikroorganizmalarinkine benzer enzimleri vardır. Bu durumda bir kemoterapötik maddenin patojen mikroorganizmayla, konak organizma arasında seçici toksik etki göstermesi zorluğu ortaya çıkar [58].

Kemoterapiyi diğer tedavilerden ayıran en önemli özelliklerden birisi, tedavide hastalığa yol açan etkenin yani mikroorganizmaların doğrudan yok edilmesinin hedeflenmesidir. Diğer birçok hastalığın etiolojisinde çok çeşitli faktörlerin rol oynaması nedeniyle tedavide tek hedefe yönelik strateji geliştirme zorluğuna karşın enfeksiyon hastalıklarında, her ne kadar bireysel ve çevresel faktörlerin rolü olsa da esas olarak hastalığa yol açan mikroorganizmanın kemoterapötiklerle yok edilmesinde büyük ölçüde başarı sağlamaktadır. Oldukça etkin olan bu tedavi yaklaşımı, bilinçsiz kullanım halinde direnç gelişmesi nedeniyle tedavide başarısızlığa neden olabilmektedir. Bu nedenle kemoterapötiklerin belirli kurallar dahilinde, bilinçli olarak kullanılması önem kazanmaktadır [58].

Kemoterapide ana ilke; konakçıda, hiç veya çok az toksik etki yapan bir kimyasal madde ile hastalık etkeni organizma üzerinde, yeteri kadar toksik veya letal etki oluşturmaktır. Kemoterapötik ilaçlar, vücutta kimyasal maddelerin seçici etkisi için tipik birer örnektirler. Bu seçici etki, patojen mikroorganizma hücresi ile insan veya genel olarak memeli hücresi arasında, yapı ve biyokimyasal mekanizmalar bakımından var olan farklar sayesinde mümkün olmaktadır. Seçicilik derecesi, çeşitli terapötik ilaç gruplarında değişiklik gösterir. Penisilinler en çok seçicilik gösteren ilaçlardır. Güçlü bakterisidal etki gösterdikleri halde, memeli hücresi üzerindeki yalın toksik etkileri çok zayıftır. Buna karşılık, sitoplazma membranına veya çekirdekte DNA/m-RNA sentezine ya da m-RNA’nın ribozomlardaki çevirisine etki yapmak suretiyle antibakteriyel etki gösteren bazı kemoterapötik ilaçların seçiciliği düşüktür; genellikle bakteri yanında memeli hücresi üzerine de toksik etki yaparlar. Bu konuya penisilinlerin etki mekanizması örnek olarak verilebilir. Bakterilerde; memeli hücrelerinde de bulunan lipit tabiatındaki hücre sitoplazma membranına ilave olarak, bir de onun dış tarafında hücre duvarı denilen daha sağlam bir tabaka vardır. Bu duvar sayesinde bakteri

sitoplazmasının osmotik basıncı, ortama göre çok yüksek değere ulaştığı zaman bile, bütünlüğünü ve şeklini koruyabilir. Penisilinler, hücre duvarının esasını oluşturan uzun polimer molekül zincirlerinin yan dallarla birbirine kenetlenmelerini engeller; böylece hücre duvarının oluşması önlenmiş olur ve sonuçta bakterinin ölümüne yol açar. Memeli hücresinde böyle bir yapı bulunmadığından onun üzerine penisilinlerin belirgin bir toksik etkisi yoktur [58].

Antimikrobiyal tedavisinin temelinde yatan en önemli kavram seçici toksisite, yani konağı harap etmeden mikroorganizmaların inhibe edilmesidir. Seçici toksisite mikroorganizmalar ile insan hücreleri arasında yapı ve metabolizma farklarının ortaya çıkarılması ile elde edilir. Örneğin; penisilinler ve sefalosporinler peptidoglikan sentezini önlemeleri nedeniyle bakteri üremesini inhibe edip, insan hücrelerinin üremesini etkilemediklerinden etkin antibakteriyel ajanlardır [59].

1.2. Antimikrobiyal Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları

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

Bakteri hücresi lipit yapıdaki sitoplâzma membranına ilave olarak membranın dış yüzünü örten bir de hücre duvarına sahiptir. Bakteriler dış ortamdan aktif transport sistemiyle, suda çözünmüş birçok maddeyi alarak sitoplazmalarında konsantre ederler ve bunun sonucu olarak hücre içi osmotik basınçları yükselir. Hücre duvarının görevi, bakteri sitoplazmasının içindeki yüksek osmotik basınca (yaklaşık 25 atmosfer basınca kadar) direnmek suretiyle, hücrenin bütünlüğünü korumaktır. Eğer bu duvar herhangi bir nedenle zayıflayacak olursa veya oluşmazsa hücre şişer ve parçalanır [60].

Bazı antibiyotikler bakteri hücre duvarının senteziyle ilgili biyokimyasal reaksiyonları bozarlar. Sonuçta hücre duvarı oluşamayacağı için bakteri hücresi ölür. Bu tip ilaçlar, gelişmesini tamamlamış bakteriler üzerine etkisizdirler; çünkü bunlarda hücre duvarının oluşumu zaten tamamlanmış durumdadır. Bu ilaçlar özellikle gelişmekte ve üremekte olan bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterirler. Hücre duvarının ana maddesi olan murein rijid polimer bir bileşiktir. Bu madde, bir mukopolisakkarid olan lineer peptidoglikan zincirlerinin yan dallarla birbirine bağlanması sonucu oluşur. Murein,

Gram-pozitif bakterilerde duvar kalınlığının yaklaşık %50' sini oluşturur ve bu duvarın mekanik dayanıklılığını sağlayan esas ögedir. Penisilinler ve sefalosporinler, transpeptidaz enzimlerini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler ve sonuçta peptidoglikanlardan murein oluşması bozulur. Murein sentezi bozulunca ortamda polimerize olamamış nükleotidler birikir ve sonuçta hücreler lizise uğrar [61].

1.2.2. Sitoplâzma Zarının Geçirgenliğini Arttırmak Suretiyle Etki

Deterjan özelliğine sahip antibiyotikler ve bazı antiseptikler sitoplâzma zarının geçirgenliğini arttırarak sitoplâzma içindeki fonksiyonel önemi bulunan nispeten ufak moleküllü bileşiklerin (aminoasitler, nükleotidler ve potasyum gibi) hücreden dışarı sızmalarına neden olurlar ve böylece bakterisidal etki oluştururlar. Bunların etkisi, hücre duvarının sentezini bozan antibiyotiklerin aksine, bakterinin gelişme ve üreme döneminde olup olmaması ile ilişkili değildir ve gelişmesini tamamlamış bakterileri de öldürürler. Bu gruptaki antibiyotiklere örnek polimiksinler, gramisidin, amfoterisin-B, nistatin ve diğer bazı antifungal ilaçlar ile siklosporin-A'dır [61].

1.2.3. Bakteri Ribozomlarında Protein Sentezini İnhibe Etmek Suretiyle Etki

Bu tip etki gösteren kemoterapötikler çoğunlukla geniş spektrumludur ve bakteriyostatik etki gösterirler. Gram-negatif ve Gram-pozitif mikroorganizmaların gelişmesini inhibe ederler. Bu şekilde etki yapan ilaçların bazıları bakterilerin ribozomları ile kombine olur ve orada m-RNA tarafından yönetilen protein sentezini bozarlar. Birçok ilaç, insan hücrelerindeki protein sentezini bozmadan bakterilerdeki protein sentezini inhibe eder. Bu seçicilik bakteri ve insan ribozomal proteinleri, RNA'lar ve bunlarla ilişkili enzimler arasındaki farklılıklara bağlıdır. Bakteriler 50S ve 30S alt birimlerine sahip 70S ribozomlar içerirken, insan hücreleri 60S ve 40S alt birimli 80S ribozomlara sahiptir. 70S bakteri ribozomu, ökaryot hücrelerin (insan hücrelerinin) 80S ribozomuna göre antibiyotiklere daha fazla duyarlılık gösterir. Yalnızca memelilerin mitokondrilerinde bulunmakta olan 55S ribozomları, antibiyotiklere duyarlılık bakımından bakteri ribozomlarına benzerler. Bakteri 70S ribozomları sadece protein ve RNA'dan oluşurlar [59]. Kemoterapötikler, protein sentezi olayı ile ilgili çeşitli basamakları bozabilirler. Böylece bakteri hücresi için gerekli proteinleri, dolayısıyla enzimlerin sentezini engellerler.

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

Bu gruptaki ilaçların büyük bir kısmı, memeli hücresinin çekirdeğini de etkilediğinden sitotoksik ilaçlardır. Bunların antibakteriyel etkileri olmasına karşın çoğu bu amaçla kullanılmazlar. Bir kısmı antineoplastik ilaç olarak malin tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır (mitomisinler, aktinomisinler, daunorubisin ve doksorubisin gibi). Memeli hücresi üzerinde fazla toksik olmayan rifamisinler (rifampin ve benzerleri) ile kinolonları antibakteriyel ilaç olarak kullanılır. DNA' yı etkileyerek antibakteriyel etkinlik oluşturan ilaçlar; aktinomisinler, rifamisinler, kinolonlar (nalidiksik asit, oksolinik asit ve fluorokinolonlar), mitomisinler ve benzerleridir [61].

1.2.5. İntermediyer Metabolizmayı Bozmak Suretiyle Etki

Bu gruptaki ilaçlar daha çok bakteriostatiktirler. Bu şekilde antibakteriyel etki yapan ilaçlara örnek olarak sulfonamidler, sulfonlar, trimetoprin, paminosalisilik asit ve izoniazid verilebilir. Bunlar bakterinin metabolizması için gerekli bazı maddelerin sentezini engellerler. Bakteriler için antimetabolit niteliğinde olan maddelerdir [61].

1.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık deneyini uygulamak için ilk yöntem Fleming tarafından 1929 yılında geliştirilmiştir. Bu yöntemde Fleming, bir petri kutusunda katı besiyerini, ortadan kenara çok daha yakın bir yerden, dik olarak kesmiş ve bir şerit halinde dışarı almıştır. Açılan bu boşluğa küf özütü (Penisilin gibi) içeren besiyerini yerleştirmiş, daha sonra bu boşluğa dik bir açıda paralel olarak değişik bakteri kültürlerini (*Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptococcus* ve *Pneumococcus*) yayma yöntemiyle ekmiştir. İnokulasyondan sonra kültürlerin üreme ve inhibisyon zonlarını gözleyerek kültürlerin duyarlılığını değerlendirmiştir [62].

İkinci Dünya Savaşı sırasında birçok değişik antibiyotik bulunmuş ve değişik mikroorganizmalara karşı duyarlılık modelleri saptanmıştır. Yeni antibiyotikler medikal uygulamada “olağan üstü” ilaçlar olarak kabul edilmiştir. Ancak dirençli bakteriyel suşların ortaya çıkmasıyla yeni önlemlere gerek duyulmuş ve bakterilerin *in-vitro*

kemoterapötik maddelere karşı olan dirençlerini tayin için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1940'lı yıllarda birçok antibiyotiğin ortaya çıkmasıyla tüp dilüsyon yöntemleri yetersiz kalmış ve uygulamada pratik bulunmamıştır [62].

Foster ve Woodruff, duyarlılık testlerinin uygulamasında ilk kez antibiyotik emdirilmiş süzgeç kâğıtlarının kullanılmasını önermişlerdir. Araştırmacılar, duyarlılığı test edilecek organizma ile önceden inoküle edilen petri kutusundaki besiyeri üzerine bir antibiyotik emdirilmiş şeridi yerleştirerek duyarlılık testini yapmışlardır. Vincent, antibiyotik solüsyonunun kâğıt disklerde kurutulduktan sonra kullanılabileceğini ve böylece taze stok solüsyonlara her zaman gereksinme duyulmayacağını göstermiştir. 1960'lı yıllara dek mikroorganizmaların ilaç duyarlılık özellikle de antibiyotik duyarlılık testleri için birçok yöntem (difüzyon ve titrasyon yöntemleri) veya bu yöntemlerin değişik birçok modifikasyonu bildirilmiştir. Her yöntemin bazı avantajları ve kullanım sınırlılığı gibi dezavantajları vardır. Sonuçların en yüksek düzeyde verimlilikle yorumlanabilmesi için yöntemin tüm özelliklerinin iyi kavranılması ve yöntemlerin sürekli yenilenebilir sonuçlar vermesi gereği göz önünde tutulduğunda, bir standardizasyonun saptanmasına gerek duyulmuştur. İlk kez 1970'li yıllarda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) önderliğinde, Anderson ve Bauer-Kirby'nin yöntemlerindeki standart aşamalar dikkate alınmak suretiyle, Uluslararası İşbirliği Çalışma Kurulunca bir standardizasyona gidilmiştir [62,63].

Günümüzde kullanılan antibiyotik duyarlılık testleri şunlardır:

- Difüzyon Yöntemleri (Agar kuyucuk, Kirby-Bauer-Disk difüzyon)
- Epsilometer Testi
- Titrasyon Yöntemleri
- Agar Dilüsyon Testi
- Makrodilüsyon Broth Testi
- Mikrodilüsyon Broth Testi

1.4. Toksisite

İlaçların yan etkileri, aslında toksik etkileridir. Belirli bir dozdan sonra öldürücü etki gösterebilirler. Kimyasal maddelerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu toksik etkiler akut ve kronik olarak gelişir. Bazı araştırmacılar akut toksisiteyi, tek ya da birkaç dozun 48 saat içinde deney hayvanlarında veya kaza sonucu insanlarda oluşturduğu etki olarak

tanımlamaktadırlar. Akut toksisite saptanmasında başvuru alan deneylerin amacı biyolojik sistemlerde kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek ve doz-yanıt ilişkisinde karakteristik veriler elde etmektir. Bu veriler, yeni ilaçların kliniğe uygulanmasındaki olabilirlik derecesini ortaya koymaktadır. Toksikolojide akut toksisite deneyleri, ilaç, kozmetik, hijyenik maddeler ve evlerde çeşitli amaçla kullanılan diğer kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek için yapılır. En sık kullanılan akut toksisite testleri;

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

1926 yılında Knaffl-Lenz tarafından kobaylarda dijital’in toksik aktivitesinin gösterilmesinde tarif edilen **Minimal Mortal Doz (MMD)**, damar içi yolla sürekli ve yavaş akımla bir ilacın, hayvanın ölmesine kadar verilmesiyle elde edilir. Tavşan, kedi ve köpek gibi hayvanlarda kolay uygulanabilir ve fizyolojik parametrelerdeki değişiklikler izlenebilir. Ancak çok sayıda hayvana uygulanmasının biyoistatistik zorunluluğu yanında, damar içi verilmesi nedeniyle kimyasal maddenin çözücü içinde erimesi ve etkisini çabuk göstermesi gerekir. Hayvana enjekte edilen total sıvı hacmi dolaşım kapasitesini geçmemelidir. Bu nedenlerden ötürü fazla kullanılan bir akut toksisite yöntemi değildir. Bazı araştırmacıların medyan letal doz diye adlandırıldığı **Letal Doz 50 (LD₅₀)** bir deney hayvan grubunun % 50’sini öldürebilen bir kimyasal maddenin tek bir dozunun istatistikî değerlendirmesidir. Bir maddenin akut toksisitesinin değerlendirilmesinde LD₅₀ tayini sıklıkla başvuru alan bir toksikoloji değerlendirme yöntemidir [64].

Artemia salina larvaları, farklı mikotoksinlere karşı geniş bir yelpazede duyarlılık gösterirler [65]. Bu larvalar, günümüzde biyolojik aktiviteleri araştırılan örneklerin sitotoksitelerinin tayininde, oldukça geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Dolayısıyla, toksik maddelerin *in-vivo* olarak *A. salina* larvalarına olan öldürücü etkisi, hızlı ve basit bir yöntem olarak “Brine-Shrimp Lethality Assay” ’in kullanılmasına olanak sağlamaktadır [66]. Toksisitenin öngörülmesi açısından kullanışlı bir testtir. Ayrıca fungal toksinlerin, bitkisel ekstraktların, ağır metallerin, siyanobakteri toksinlerinin, pestisitlerin ve diş hekimliğinde kullanılan bazı maddelerin sitotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır [67-75].

Bunlara ek olarak, embriyonel gelişim sürecini etkileyen teratojen maddelerin [76], organofosfor insektisitlerin [77] ve zirai amaca yönelik olarak oldukça sık kullanılan birçok antibiyotiğin, toksisite düzeylerinin tespitinde de kullanılmaktadır [78]. *A. salina*'nın kullanıldığı bazı akuatik toksisite testleri ile rodentlerin (fare veya rat) kullanıldığı toksisite testleri arasında bir korelasyon olup olmadığını anlamak üzere bazı çalışmalar yapılmış ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Her iki testten elde edilen LD₅₀ değerleri, aynı kimyasalların insanlar için geçerli olan akut oral letalite verileriyle kıyaslandığında, sonuçlar arasında genellikle iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Benzer olarak bu kimyasalların, oral akut toksisite potansiyellerinin test edilip, insanlar için geçerli olan akut dozlarla kıyaslandığında akuatik testlerin, rodent testlerine nispeten biraz daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Ancak akuatik toksisite testlerinin, suda çözünebilen maddelerin toksisite değerlerinin saptanmasında daha uygun olduğuna da değinilmiştir [79,80]. Yine başka bir çalışmada ise *A. salina* ile yapılan bu testin modifiye edilmiş şekli ile alınan sonuçlar, memeli hücre kültürleri ile yapılan toksisite testlerinde alınan sonuçlarla karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir [81].

1.5. Bileşik-DNA Etkileşimi

Moleküler tanıma, biyolojide temel bir ilkedir. Örnek olarak; enzim-substrat, antijen-antikör, hormon-reseptör ve ilaç-DNA yanı sıra protein-DNA ve protein-protein etkileşimleri gibi. Moleküler tanımanın başlıca fizikokimyasal ilkelerini anlamak ve daha fazla spesifik ligandlar ve reseptörlerinin tasarımında bu bilgidan yararlanmak, moleküler üstü kimyanın hızla gelişen bir disiplindir. Tıbbi kimyada rasyonel şekilde ilaç ile ilgili reseptörleri tasarlanan ligandların tasarımı ayrıca çok dikkat çekmekte ve yeni kuvvetli tedavi edici ilaçların geliştirilmesi için temel sağlamaktadır. Moleküler biyoloji ve kimya arasındaki sınır bölgesinde, DNA tanıma ile ilgili olan alan çok başarılıdır. Protein işleme veya çift sarmal DNA'ın seçici dizilerine bağlanan düşük moleküler ağırlıklı güçlü antikanser ilaçlar gen düzenleme biçiminde doğal ligandların çok çeşitli çalışmalarına bu alan ile ışık saçmıştır. Kimyagerler 30 yılı aşkın süredir doğadan ilham olarak farklı prensipler geliştirerek, çift sarmal DNA üzerinde rastgele herhangi bir yere bağlanabilen bileşikler sentezleyebilmişlerdir [82-84].

DNA' ya bağlanma çalışmalarında Kumar ve ark. [85] yaptığı çalışmalarda indol türevi bileşiklerin DNA molekülleri ile etkileşime girdikleri ve her eklemekten sonra DNA' nın floresan yoğunluğunda azalma olduğu gözlenmiştir. Etkileşimde dinamik bir değişimin olduğu da rapor edilmiştir. Bakteriyel plazmit DNA pBSK, Vinkristin ve Berberin ile etkileşime sokulmuştur. Bu alkaloidler de güçlü bir DNA bağlama etkisi gözlenmiştir. Reaksiyon karışımı, ligandlar ve miktarı arttıkça, bandın yoğunluğu da artmıştır. Bununla birlikte, gittikçe artan yoğun bantlar, her iki alkaloidin etidyum bromür yerine alternatif floresan kaynağı olduğunu göstermiştir. Bu alkaloidlere DNA bağlama çalışmalarında etidyum bromürle aynı potansiyele sahip olabilir yorumu yapılmıştır.

Shahabadi ve ark. [86] SF ligand ve kobalt kompleksi ile pUC18 DNA' nın parçalanmasını çalışmışlardır. SF ligand türevleri ve kobalt kompleksi plazmit DNA pUC18' i farklı konsantrasyonlarda parçalayabilmektedir. SF ligand ve kobalt kompleksi konsantrasyonu arttıkça, form II bandın yoğunluğu da artmıştır. Ancak SF ligandın süper sarmallı plazmit DNA' ya etkisi kobalt kompleksinden daha belirgin bulunmuştur.

Raman ve Sobha [87] yaptıkları çalışmada, AH2 (askorbik asit) varlığında, metal (II) komplekslerinin ilave edilmesiyle uyarılan plazmit pUC19 DNA' nın, jel elektroforez sonucunda ayrılma gösterdiğini açıklamışlardır. Aynı koşullar altında serbest AH2' nin pUC19 DNA üzerinde hiçbir çentik açmadığı gözlenmiştir. Cu (II), Ni (II) ve Zn (II) komplekslerinin nükleaz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir. Plazmit pUC19 DNA, metal kompleks ve askorbik asit karışımları ile etkileşime bırakıldığında, bandın hareketinin açıkça arttığı görülmüştür.

Xiao-Feng He ve ark. [88] süper sarmal halkasal plazmit (SC) pBR322 suşunu (Form I), Co (III) polypyridyl mixed-ligand kompleksleri varlığında 302 nm' de ışıkla parçalama çalışmaları yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda Form I yapısı bozulmuş ve yavaş yavaş kesilmiş halkasal DNA (Form II) ve doğrusal Form III oluşmaya başlamıştır. Gerek Co (III) olmaksızın ışıklı ortamda gerekse Co (III) varlığında ışıksız ortamda olsun her ikisinde de DNA hasara uğramıştır.

Bileşiklerin esas olarak DNA' ya bağlanma parametreleri aşağıdaki gibi gözlenmiştir;

- i. Dış DNA çift sarmal yapısına bağlı olan ve seçicilik göstermeyen negatif yüklü şeker-fosfat yapısı ile elektrostatik etkileşimler,
- ii. DNA çift sarmalın iki oluğuyla olan bağlanma etkileşimleri,
- iii. Doğal DNA' nın baz çiftlerinin arasındaki interkalasyon [89-90].

Pirazol türevi bileşikler Naik ve ark. tarafından süper sarmal (SC) pUC19 plazmidine denenmiştir [91]. Plazmit çift DNA zincirine sahip olup 2686 baz çiftine sahiptir. Rekombinantlar olarak geniş kullanım alanına sahip vektör molekülünden biridir. İçine yabancı DNA parçası getirilmiş olan hücreler, büyüme ortamındaki kolonilerin renk farklılıklarını temel almış rekombinant olmayanlardan kolayca ayırt edilebilir. Bu çalışmayla plazmit ile etkileşim sonucunda farklı absorbanslarda pik vermiş olup, DNA' nın yapısına etkili olduğu açıklanmıştır. Bileşik ile DNA' nın etkileşimi 298 nm'den daha yüksek bir dalga boyuna doğru bir kayma ile absorpsiyon yoğunluğunda bir azalma ile sonuçlanmıştır. Aynı bileşiğin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak da spektral absorbansta değişimler gözlenmiştir.

Selenyum içeren pirazollerin, *in silico* moleküler bağlama çalışmalarında yavaşma ve bağlanma enerjisiyle DNA' ya etkin bir şekilde bağlandığı bulunmuştur. Bileşikler H₂O₂ aktivasyonu üzerinde pUC19 plazmit DNA' sını süper sarmal formdan açık doğrusal forma parçaladığı bulunmuştur. Bu bileşikler olası DNA kesici ajanlardır. Bu nedenle benzer heterohalkalı pirazol analogları üzerinde daha fazla çalışma yapılması önerilmektedir. Ve bu bileşiğin biyolojik anlamda önemli bir pirazol türevi olduğu rapor edilmiştir [92].

Yine bazı araştırmacılar tarafından DMF içerisinde çözünen deney numuneleri *Escherichia coli*' nin genomik DNA' sı ile 2 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmış, agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Sonuç olarak; bazı metal kompleksli pirazoller DNA' ya yüksek bağlanma yeteneği sergilemiştir. Bunu da antimikrobiyal aktivitesine bağlamışlardır [93].

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Bakteri Örnekleri

Çalışmamızda Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* NRRL-B 37, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 8427 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Escherichia coli* ATCC 35218 kullanılmıştır. Bu bakterileri kullanmamızın başlıca nedenleri; seçilen organizmaların insan, hayvan ve bitkiler üzerinde son derece güçlü patojen etkilerinin bulunması ve kolay üretilebilir olmasıdır.

Çalışmamızda kullandığımız bakteriler Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Maya Örnekleri

Çalışmamız sırasında kullanılan fungus türleri: *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida tropicalis* ATCC 13803' dir. Bu türler insanları etkileyen en yaygın fungal patojendir. Çalışmamızda kullandığımız maya örnekleri Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Mikroorganizmaların kültür koleksiyon merkez kodları Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Sucul Örnekler

Tuzlu suda yetişen bir sucul bir kabuklu olan *Artemia salina* toksisite testi test organizması olarak kullanılmıştır. Yumurtalar akvaryumculardan temin edilmiştir.

Artemia cinsinin sistematigi

Şube : Arthropoda (Eklem bacaklılar)
 Altşube : Crustacea (Kabuklular)
 Sınıf : Branchiopoda
 Takım : Anostraca
 Familya : Artemiidae
 Cins : *Artemia*
 Tür : *Artemia salina* (Tuzlu su karidesi)

Tablo 2.1. Kullanılan organizmalar ve kültür koleksiyon merkezi (ATCC) kodları

Mikroorganizma	Organizma Kodu
<i>Bacillus cereus</i>	NRRL-B 37
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 292112
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

Besiyerleri

-Nutrient Agar (NA) Besiyeri (g l^{-1}): Et Özütü (beef extract) 1,0 g, maya özütü (yeast ekstrakt) 2,0 g, pepton 5,0 g, sodyum klorür 5,0 g, agar 15 g 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 20'şer ml 120 mm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüştür.

-Nutrient Sıvı (NB) Besiyeri (g l^{-1}): Et Özütü 1,0 g, Maya Özütü 2,0 g, Pepton 5, 0 g sodyum klorür (NaCl) 5,0 g. 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 10 ml steril tüplere dağıtılmıştır.

-Mueller Hinton (MHB) Sıvı Besiyeri (g l^{-1}): Et özütü 2,0 g, Kazein Hidrolizatı 17,5 g, Nişasta 1,5 g. 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 10'ar ml steril tüplere dağıtılmıştır.

-Mueller Hinton Agar (MHA): Et özütü 5,0 g, Agar 12,0 g, Kazein Hidrolizatı 17,5 g, Nişasta 1,5 g. 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 15' er ml 90 mm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüştür.

-Sabouraud Dextrose Agar (SDA): Bacto Pepton 10,0 g, Bacto Dekstroz 40,0 g, Bacto Agar 15,0 g. 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 25' er ml 120 mm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüş ve düz bir zeminde katılaşması sağlanmıştır.

Mikroorganizmaların üreme durumlarının tayininde kullanılan kimyasal madde:

2,3,5- Triphenyltetrazolium Chloride 250 mg tartılarak 100 ml etanolde (%96) iyice çözülmüş ve sprey özellikli cam şişede buzdolabında saklanmıştır.

McFarland No: 0.5 Bulanıklık Standardı:

0,5 ml BaCl_2 (%1.175) ve 99,5 ml H_2SO_4 (0.36 N) karıştırılarak 10 ml' lik kapaklı tüpe doldurulmuş ve kapağı parafilm ile sıkıca kapatılan tüp, karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

Tampon ve Çözeltiler

Agaroz jel elektroforezi bileşik-DNA etkileşimi çalışmaları için kullanılan çözeltiler:

-Tris Asetik Asit EDTA (TAE) Tamponu (x50) (pH 8.0): 242 g Tris, 57,1 ml Glasial asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH 8.0), maddeler distile su içerisinde çözülerek hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır.

-Yükleme tamponu: % 0,1 bromfenol mavisi, % 0,1 ksilen siyanol

-TE: 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA

-Etidyum bromür: 10 mg ml^{-1} derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan sentetik maddeler Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İlhan Özer İLHAN danışmanlığında yüksek lisans yapan Ayşe ÇAĞLAYAN, Mehmet ÇADIR ve Kazım DEMİRKOL tarafından sentezlenmiştir (Tablo 2.2).

Visinal dion yapısına sahip aktif bir karbon halkası olan 4-benzoil-5-fenil-2,3-furandion bileşiği literatüre yeni heterosiklik bileşikler kazandırmış bir bileşiktir. Bileşik sahip olduğu 4C atomunun da farklı elektrofilik özellikte olmasından dolayı, bu 4C atomu üzerinden farklı nükleofillerle ve aynı zamanda bir dien yapısında olması nedeniyle de dienofillerle çok çeşitli reaksiyonlar vermektedir. Bu bileşiğin etkinliği göz önüne alınarak, aynı iskelete sahip furan-2,3-dion sistemleri sentezlenerek bu bileşiklerin benzer reaksiyonları da literatüre kazandırılmıştır. Bu bileşikler hidrazin, hidrazit ve üre serilerinden oluşan bileşiklerdir.

Daha önce sentez edilmiş olan ve preparatif organik kimya çalışanlarının birçok yeni bileşiğin elde edilmesinde yararlandığı aktif birer başlangıç maddesi olan 4-benzoil-5-fenil-2,3-furandion ve yakın zamanda kimya araştırma laboratuvarında sentezlenmiş olan hidrazit (MC1, MC2, MC3, MC4, MC5, MC7, MC8, MC10, MC11, MC12), hidrazin (AC3, AC6, AC14) ve üre (K1, K2, K3, K4, K5, K6) serisi bileşikler, bu tez çalışmasında aktivite bakımından incelenmiştir. Aşağıda sentezi yapılan bileşiklerin kimyasal yapı ve özelliklerinden moleküler formülü, formül ağırlığı ve yüzde bileşimi şekillerle beraber verilmiştir.

2.2. Test Edilen Pirazol-3-Karboksilli Asit Kimyasal Yapıları ve Özellikleri

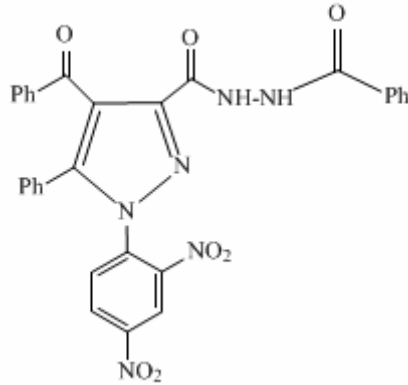
2.2.1. MC1' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

4-Benzoil-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-N'-benzoil-1H-pirazol-3-karbohidrazit

Moleküler Formülü: $C_{30}H_{20}N_6O_7$

Formül Ağırlığı: $576.52 \text{ g mol}^{-1}$

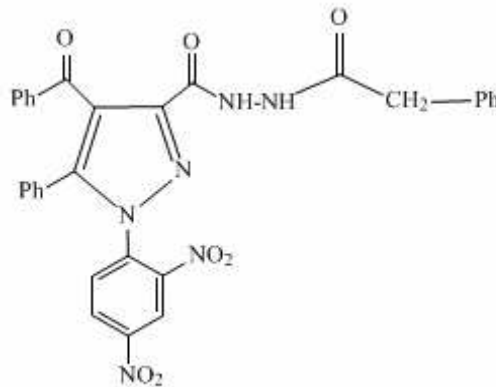
Bileşimi: C (% 62,32) H (% 3,62) N (% 14,20)



Şekil 2.1. MC1' in kimyasal yapısı

2.2.2. MC2' nin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

4-Benzoyl-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-N'-**fenilasetil**-1*H*-pirazol-3-karbohidrazit



Şekil 2.2. MC2' nin kimyasal yapısı

Moleküler Formülü: $C_{31}H_{22}N_6O_7$

Formül Ağırlığı: $590,54 \text{ g mol}^{-1}$

Bileşimi: C (% 62,99) H (% 3,60) N (% 14,52)

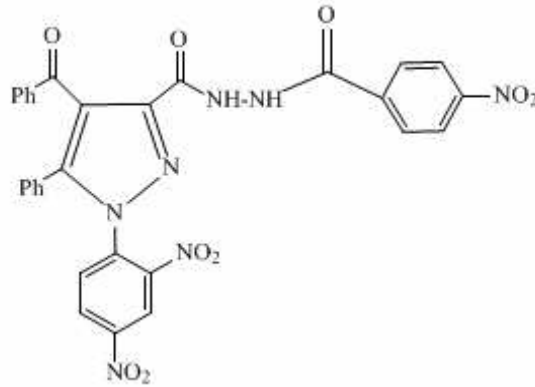
2.2.3 MC3' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

4-Benzoyl-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-N'-(**4-nitrobenzoil**)-1*H*-pirazol-3-karbohidrazit

Moleküler Formülü: $C_{30}H_{19}N_7O_9$

Formül Ağırlığı: $621,51 \text{ g mol}^{-1}$

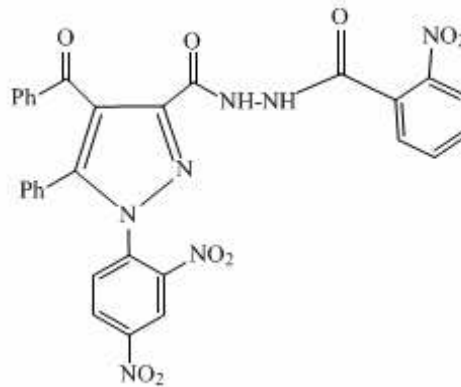
Bileşimi: C (% 57,66) H (% 3,54) N (% 15,68)



Şekil 2.3. MC3' ün kimyasal yapısı

2.2.4. MC4' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

4-Benzoil-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-N'-(2-nitrobenzoil)-1H-pirazol-3-karbohidrazit



Şekil 2.4. MC4' ün kimyasal yapısı

Moleküler Formülü: $C_{30}H_{19}N_7O_9$

Formül Ağırlığı: $621,51 \text{ g mol}^{-1}$

Bileşimi: C (% 57,66) H (% 3,42) N (% 15,55)

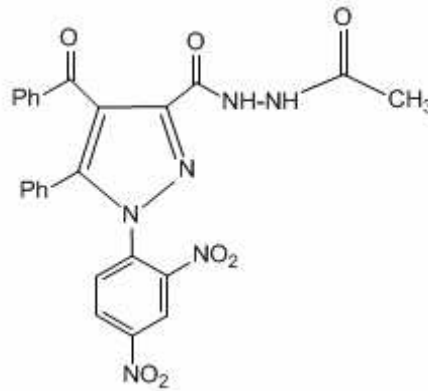
2.2.5. MC5' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

4-Benzoil-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-N'-asetil-1H-pirazol-3-karbohidrazit

Moleküler Formülü: $C_{25}H_{18}N_6O_7$

Formül Ağırlığı: $514,45 \text{ g mol}^{-1}$

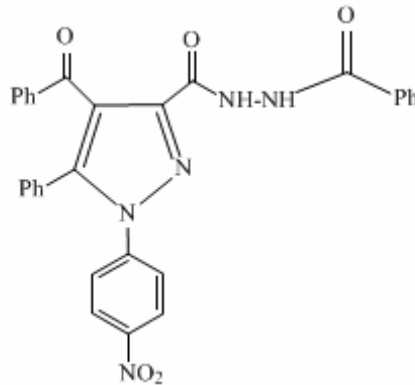
Bileşimi: C (% 58,22) H (% 3,38) N (% 16,59)



Şekil 2.5. MC5' in kimyasal yapısı

2.2.6. MC7' nin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

4-Benzoil-1-[4-nitrofenil]-5-fenil- N'- **benzoil**-1*H*-pirazol-3-karbohidrazit



Şekil 2.6. MC7' nin kimyasal yapısı

Moleküler Formülü: $C_{30}H_{21}N_5O_5$

Formül Ağırlığı: $531,52 \text{ g mol}^{-1}$

Bileşimi: C (% 68,02) H (% 4,19) N (% 13,46)

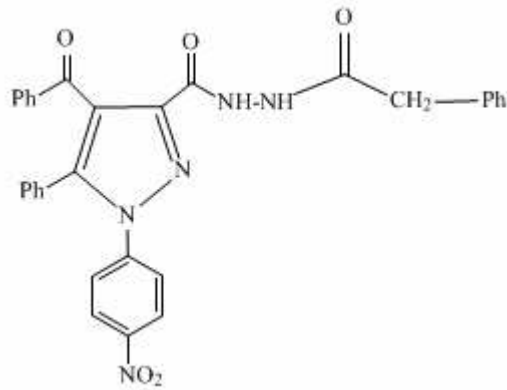
2.2.7. MC8' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

4-Benzoil-1-[4-nitrofenil]-5-fenil-N'- **fenilasetil**-1*H*-pirazol-3-karbohidrazit

Moleküler Formülü: $C_{31}H_{23}N_5O_5$

Formül Ağırlığı: $545,54 \text{ g mol}^{-1}$

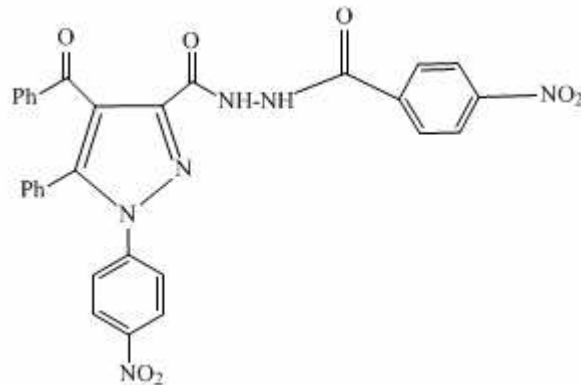
Bileşimi: C (% 67,99) H (% 4,53) N (% 12,56)



Şekil 2.7. MC8' in kimyasal yapısı

2.2.8. MC10' un Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

4-Benzoyl-1-[4-nitrofenil]-5-fenil- N'-(4-nitrobenzoil)-1H-pirazol-3-karbohidrazit



Şekil 2.8. MC10' nun kimyasal yapısı

Moleküler Formülü: $C_{30}H_{20}N_6O_7$

Formül Ağırlığı: $576,52 \text{ g mol}^{-1}$

Bileşimi: C (% 62,72) H (%3,68) N (% 14,63)

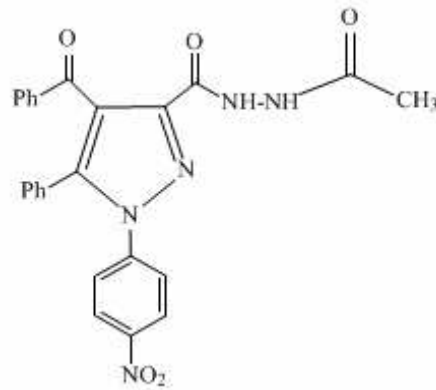
2.2.9. MC11' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

4-Benzoyl-1-[4-nitrofenil]-5-fenil- N'-asetil-1H-pirazol-3-karbohidrazit

Moleküler Formülü: $C_{25}H_{19}N_5O_5$

Formül Ağırlığı: $469.45 \text{ g mol}^{-1}$

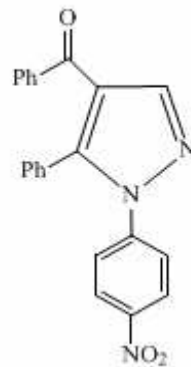
Bileşimi: C (% 63,74) H (% 4,29) N (% 14,63)



Şekil 2.9. MC11' in kimyasal yapısı

2.2.10. MC12' nin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

[1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1*H*-pirazol-4-il] **fenilmetanon**



Şekil 2.10. MC12' nin kimyasal yapısı

Moleküler Formülü: $C_{22}H_{15}N_3O_3$

Formül Ağırlığı: $369,37 \text{ g mol}^{-1}$

Bileşimi: C (% 71,72) H (% 4,13) N (% 11,00)

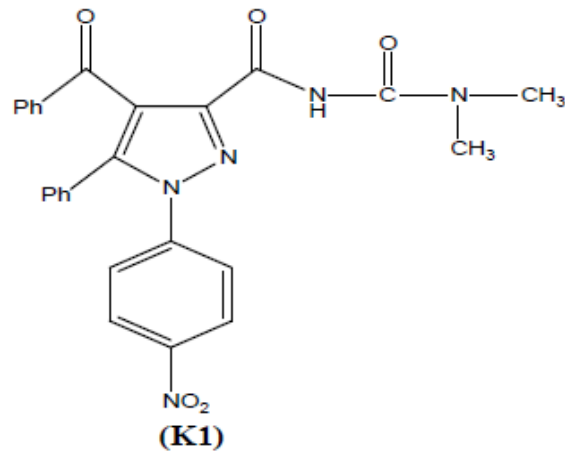
2.2.11. K1' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

N-[4-benzoil-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1*H*pirazol- 3-karbonil]-N',N'-**dimetilüre**

Moleküler Formülü: $C_{26}H_{21}N_5O_5$

Formül Ağırlığı: 483 g mol^{-1}

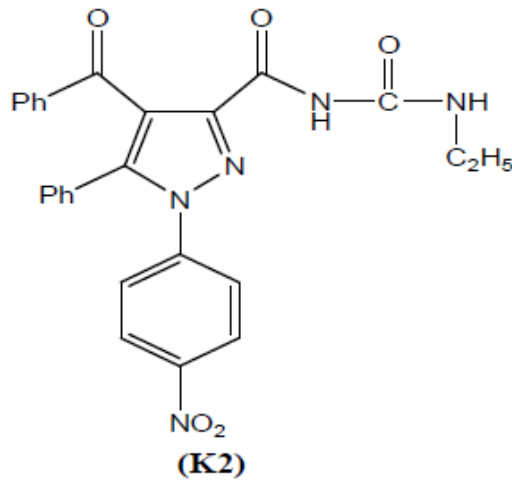
Bileşimi: C (% 64,45) H (% 4,02) N (% 14,70)



Şekil 2.11. K1' in kimyasal yapısı

2.2.12. K2' nin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

N-[4-benzoyl-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1Hpirazol- 3-karbonil]-N'-etilüre



Şekil 2.12. K2' nin kimyasal yapısı

Moleküler Formülü: $C_{26}H_{21}N_5O_5$

Formül Ağırlığı: 483 g mol^{-1}

Bileşimi: C (% 64,87) H (% 4,20) N (% 14,30)

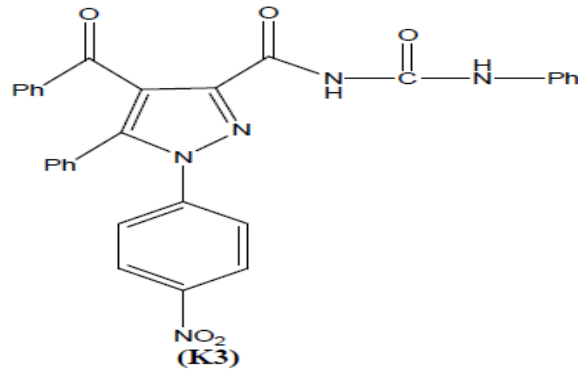
2.2.13. K3' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

N-[4-benzoyl-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1Hpirazol-3-karbonil]-N'-fenilüre

Moleküler Formülü: $C_{30}H_{21}N_5O_5$

Formül Ağırlığı: 531 g mol⁻¹

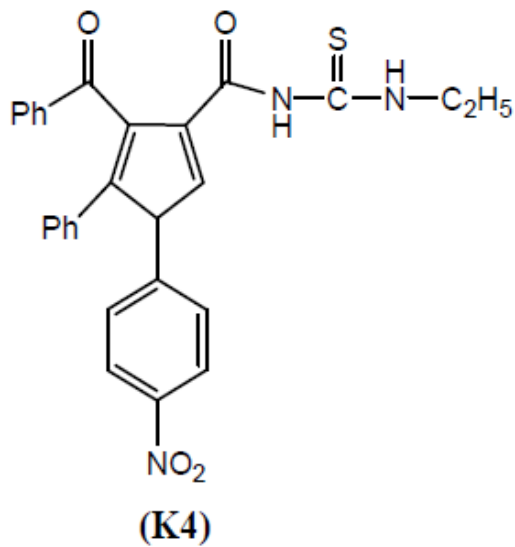
Bileşimi: C (% 68,10) H (% 3,69) N (% 13,04)



Şekil 2.13. K3' ün kimyasal yapısı

2.2.14. K4' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

N-[4-benzoil-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1Hpirazol- 3-karbonil]-N'-**etiltiyöüre**



Şekil 2.14. K4'ün kimyasal yapısı

Moleküler Formülü: C₂₆H₂₁N₅O₄S

Formül Ağırlığı: 499 g mol⁻¹

Bileşimi: C (% 62,66) H (% 4,17) N (% 13,85) S (% 6,17)

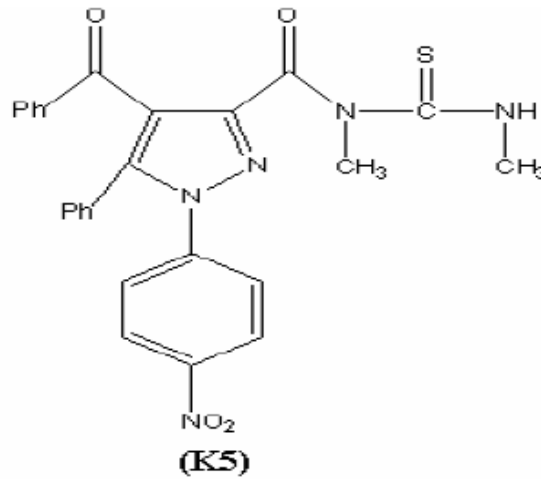
2.2.15. K5' in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

N-[4-benzoil-1-(4-nitrofenil)-5-fenil-1Hpirazol- 3-karbonil]-N,N'dimetiltiyöre

Moleküler Formülü: $C_{26}H_{21}N_5O_4S$

Formül Ağırlığı: 499 g mol^{-1}

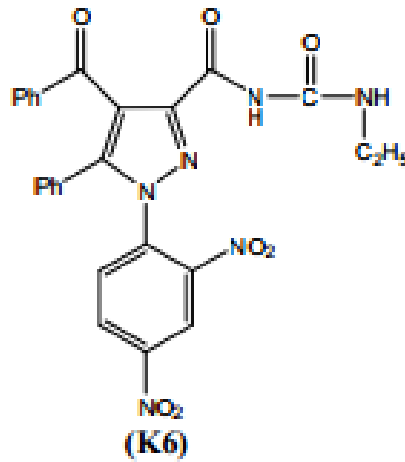
Bileşimi: C (% 62,40) H (% 3,97) N (% 14,31) S (% 6,25)



Şekil 2.15. K5' in kimyasal yapısı

2.2.16. K6' nın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

N-[4-benzoil-1-(2,4-dinitrofenil)-5-fenil-1Hpirazol- 3-karbonil]-N'etilüre



Şekil 2.15. K6' nın kimyasal yapısı

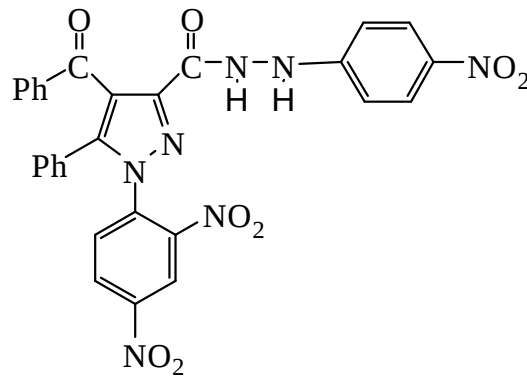
Moleküler Formülü: $C_{26}H_{20}N_6O_7$

Formül Ağırlığı: 499 g mol^{-1}

Bileşimi: C (% 58,90) H (% 3,66) N (% 16,10)

2.2.17. AC3' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri (C)

4-benzoil-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-1Hpirazol-3-karboksilli asit-*p*-nitrofenil hidrazit



Şekil 2.17. AC3' ün kimyasal yapısı

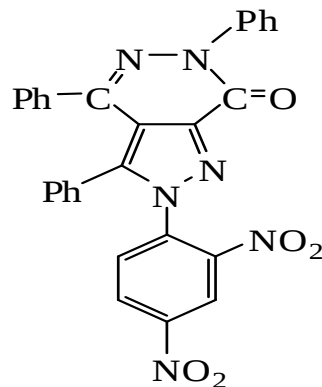
Moleküler Formülü: $C_{29}H_{19}N_7O_8$

Formül Ağırlığı: 593 g mol^{-1}

Bileşimi: C (% 58,89) H (% 3,20) N (% 16,52)

2.2.18. AC6' nın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri (F)

2-(2,4-dinitrofenil)-3,4,6-trifenil-2,6-dihidropirazolo-[3,4-d]piridazin-7-on



Şekil 2.18. AC6' nın kimyasal yapısı

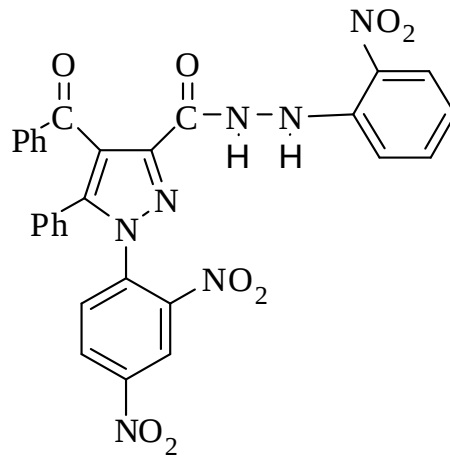
Moleküler Formülü: $C_{29}H_{18}N_6O_5$

Formül Ağırlığı: 530 g mol^{-1}

Bileşimi: C (% 65,49) H (% 3,28) N (% 15,63)

2.2.19. AC14' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri (D)

4-benzoil-1-[2,4-dinitrofenil]-5-fenil-1*H*-pirazol-3-karboksilli asit-*o*-nitrofenil hidrazit



Şekil 2.19. AC14' ün kimyasal yapısı

Moleküler Formülü: $C_{29}H_{19}N_7O_8$

Formül Ağırlığı: 593 g mol^{-1}

Bileşimi: C (% 58,68) H (% 3,20) N (% 16,53)

2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Pirazol türevi bileşiklerin antimikrobiyal aktivite testleri Agar difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon yöntemi (MİK) ile gerçekleştirilmiştir [94].

2.3.1. Agar Difüzyon Yöntemi

Stok kültürlerden, bakteri suşları Nutrient agar besiyerinde 37°C ' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Maya suşları ise Saboruod Dekstroza Agar besiyerinde 27°C ' de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Kültürler sıvı besiyerinde 37°C ' de 18 saat ekspanansiyel faza gelene kadar yetiştirilmiş ve kültürlerin son konsantrasyonu McFarland No: 0.5 (1×10^6 - 5×10^6 hücre ml^{-1}) bulanıklık standardına uygun hale getirilmiştir (Şekil 2.20). Bulanıklılık ayarının uygun bir şekilde yapılabilmesi için

siyah-beyaz şeritli bir fon kullanılmıştır. Ayrıca gözlemden ötürü meydana gelebilecek hatayı ortadan kaldırmak için McFarland' da yoğunluk ayarlaması yapılan mikroorganizmalar spektrofotometrede de yoğunluğu tespit edilerek doğruluğu tekrar kontrol edilmiştir [22,64].

Bileşiklerin Dimetil sülfoksit (DMSO) ile 10000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonunda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler 0,22 mm por çapına sahip şırınga ucu filtre kullanılarak steril edilmiştir. DMSO ayrıca negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

McFarland 0.5' e göre yoğunluk ayarlaması yapılan mikroorganizmalardan 100 μl alınarak, bakteriler için Mueller Hinton Agar, mayalar için Saboroud Dekstroz agar ile hazırlanmış besiyerlerinin yüzeyine drigalski yayma çubuğu ile ekimi yapılmıştır. Daha sonra ekim yapılan petri kutularına korkborla (mantar delici) 6 mm çapında kuyucuklar açılmış ve bu kuyucuklara uygun konsantrasyonlarda hazırlanmış stok çözeltilerden 50 μl ilave edilmiştir. Petriler +4 °C' de yaklaşık 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra bakteri örnekleri 37 °C' de 24 saat, maya örnekleri ise 30 °C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Denemeler üçer tekrarlı olarak yapılmıştır. Meydana gelen inhibisyon zonlarının çapı mm cinsinden ölçülmüştür.



Şekil 2.20. McFarland 0,5, 1 ve 2 standardı.
Soldan sağa doğru, McFarland standards. No. 0.5, 1 and 2.
(http://en.wikipedia.org/wiki/File:McFarland_standards.JPG)

Bileşiklerin antimikrobiyal etkisi hakkında bilgi vermesi amacıyla pozitif kontrol olarak bakteriler için ampisilin (10 µg), mayalar için de flukonazol (25 µg) kullanılmıştır.

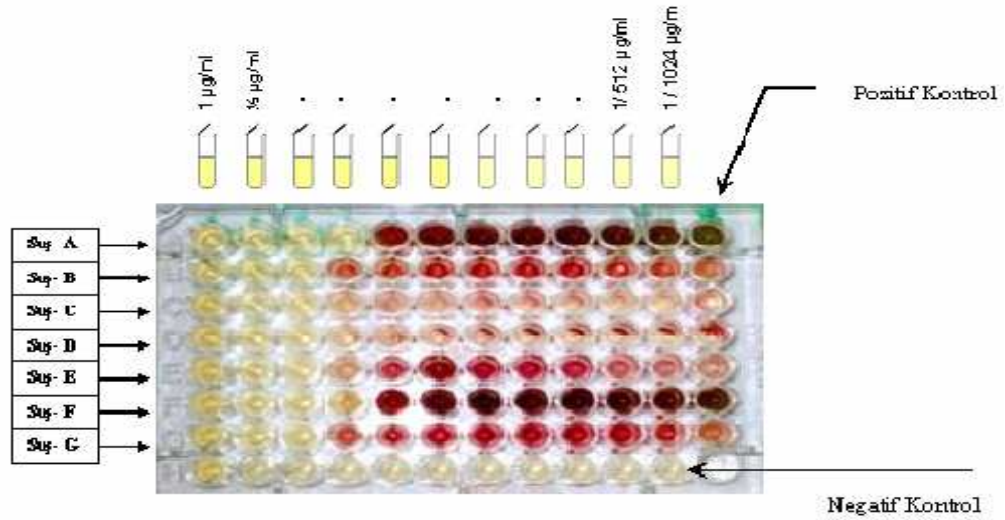
2.3.2. Mikrodilüsyon Yöntemi

Agar kuyucuk yönteminde mikroorganizmalara karşı etkili olduğu tespit edilen bileşiklerin en düşük inhibe edici konsantrasyonları (MİK) 96 kuyucuklu mikrotitrasyon petrileri kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 2.21.).

Bileşikler için 1’den 11’ e kadar sıralanmış 10000 ile 95 µg ml⁻¹ arasında konsantrasyonlara sahip seri çözeltiler hazırlanmıştır.

Deneyde petrinin son sütunu olan 12. sütun mikroorganizmaların pozitif kontrolü için boş bırakılmıştır. Yatayın en alt sırası olan H sırası çukurları negatif kontrol olarak ayrılmıştır; bu nedenle bu çukurlara mikroorganizma eklenmemiştir ve her çukura sadece 100 µl steril distile su konulmuştur. Buna göre ilk olarak dilüsyonları 1’ den 11’ e kadar sıralanmış kimyasallar kendi numaralarına denk gelen petri sütunlarındaki çukurlara, sırasıyla mikropipetör yardımıyla 100’er µl olarak aktarılmıştır. Böylelikle tüm konsantrasyonlar kuyucuklara aktarıldıktan sonra, mikroorganizmaların eklenmesine geçilmiştir. Bunun için önceden bulanıklığı McFarland No: 0,5’ e göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri mikropipetör yardımıyla A’ dan H’ ye sıralanmış her bir kuyucuk satırına (H satırı hariç) bir mikroorganizma denk gelecek şekilde, 12. çukurdan 1.’ ye doğru 100’ er µl aktarılmıştır. Bu işlemlerden sonra mikrotitrasyon petrilerinin kapakları kapatılarak bakteriler için 37 °C’ de 24 saat, mayalar için ise 27-30 °C’ de saat 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda test bileşiklerinin MİK değerleri petrilerin üzerlerine sıkılan Triphenyltetrazolium Chloride (TTC)’ nin 37 °C’ de 3 saatlik inkübasyonu sonucu meydana gelen renklenmeye bakılarak tespit edilmiştir (Şekil 2.21.). TTC hücre zarı ve duvarından geçebilme yeteneğine sahip bir tuz türevidir. Bu madde hücre içerisine girdiğinde dehidrogenaz enzimleri ve kofaktörler ile etkileşimi sonucunda indirgenerek kırmızı renkli formazon isimli pigmentleri oluşturmaktadır. Üremenin oluşmasına ve buna paralel olarak hücre yoğunluğunun artmasına bağlı olarak kırmızı ve tonları şeklinde bir renklenme meydana gelmektedir. Hücre yoğunluğu arttıkça meydana gelen renklenme de artmaktadır [95,96].

Üremenin olduğu kuyucuklarda kırmızı bir renklenme gözlenirken üremenin olmadığı kuyucuklarda herhangi bir renk değişimine rastlanmamıştır. Üremenin gözlemlendiği en küçük numaralı kuyucuğun temsil ettiği konsantrasyon Minimal İnhibisyon Konsantrasyon yani MİK olarak saptanmıştır [62,94,97,98]. Deneyler üç paralel olarak tekrarlanmıştır.



Şekil 2.21. Mikrodilasyon Broth Tekniğinin Denemelerde Uygulanış Şekli [99]

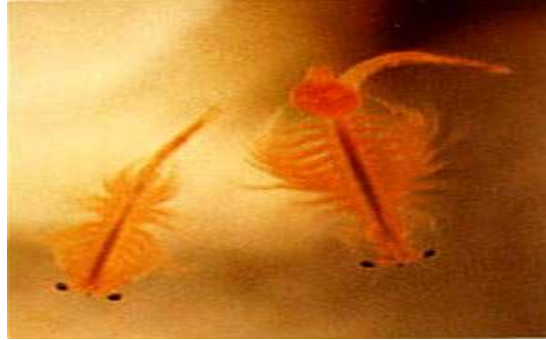
2.4. Bileşiklerin Toksikite Etkilerinin Belirlenmesi

Pirazol türevlerinin sucul organizmalar üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla *Artemia salina* ile akut toksisite çalışmaları yapılmıştır. Bileşiklerin toksisite özellikleri “Brine-Shrimp Toxicity Assay” tekniği ile belirlenmiştir.

2.4.1. *Artemia salina* Larvalarının Hazırlanması

A. salina yumurtaları akvaryumculardan temin edilmiştir. 500 ml hacmindeki pet şişe alt kısmından kesilerek kapağı bir delici yardımıyla delinip alttan havalandırma ucu takılmıştır. İçerisine su doldurulmuş ve ısısı 22-29 °C’ ye ayarlanmış küçük bir su tankının içerisine kapak altta kalacak şekilde yerleştirilmiştir. Yapay deniz suyu ile doldurulmasından sonra, yumurtalar pet şişeye eklenmiştir. Pet şişe ışıktan korunmak için alüminyum folyo ile ışık geçirmeyecek şekilde kapatılmıştır. Akvaryum motoru ile havalandırılan pet şişe bu şekilde 24 saat oda sıcaklığında (22-29 °C) bekletilerek *A.*

salina larvalarının (Şekil 2.22.) yumurtalardan çıkmaları sağlanmıştır. Son olarak pet şişenin üst bölmesi ışıklandırılarak, yumurtalardan ayrılan larvaların ışığa göçü sağlanmıştır [66].



Şekil 2.22. *Artemia salina*'nın yumurtadan çıkmış larvaları.

(<http://cichlid-fish.tr.gg/Artemia-Salina.htm>)

2.4.2. Test Edilecek Bileşiklerin Hazırlanması ve Testin Yapılışı

Bileşiklerin $5000 \mu\text{g ml}^{-1}$ olacak şekilde DMSO ile stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden suni deniz suyu ile seyreltilerek 5, 10, 20, 40, 80, 100 ve $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun toksisite sonuçlarını etkileyip etkilemediğini öğrenmek için, DMSO'nun azalan konsantrasyonlarda seri dilüsyonları yapılmıştır. DMSO'nun *Artemia* üzerinde hiçbir toksik etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Işığa göçü sağlanan larvaların yoğun olarak bulunduğu bölgeden, $20 \mu\text{l}$ 'ye ayarlanmış mikropipet yardımıyla suyla birlikte alınan larvalar, steromikroskop altında boş bir petri kabına damlatılmış ve 10 adet *A. salina* sayılmıştır. Daha sonra 5, 10, 20, 40, 80, 100 ve $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ lik konsantrasyonların ve suni deniz suyunun hazır bulunduğu cam tüplere 10'ar adet organizma aktarılmıştır. Denemeler 24 saat 20°C 'de 16 / 8 ışık / karanlık periyodunda gerçekleştirilmiştir [100,101].

Süre sonunda her bir madde konsantrasyonunda hareketli ve hareketsiz *Artemia* örnekleri sayılmıştır. Bu veriler kullanılarak SPSS 17.0 ve Probit Analiz bilgisayar

programı ile “LC₅₀” değerleri hesaplanmıştır [102]. Deneyler üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.5. Bileşik –DNA Etkileşiminin Belirlenmesi

Bileşiklerin DNA üzerindeki etkisi pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmiştir [103].

Bileşiklerin Dimetil formamid (DMF) ile 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonunda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden 5000, 2500, 1250, 625, 312,5, 156,25 ve 78 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonlarda ara çözeltiler hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin 40 μl ’ si üzerine 1 μl pBR322 DNA (0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ilave edilmiştir. Örnekler 37 °C’ de 24 saat karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bileşik-DNA karışımının 10 μl ’ si yükleme tamponu (% 0,1 bromfenol mavisi, % 0,1 ksilen siyanol) ile karıştırılıp %1’ lik agaroz jele yüklenerek TAE tamponu içerisinde 60 V’ ta, serbest akımda, 3 saat süre ile elektroforez yapılmıştır. Elektroforezden sonra jeller etidyum bromid (0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ile boyanarak görüntüleme sisteminde fotoğrafları alınmıştır [40]. Denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Test Edilen Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

3.1.1 Agar Difüzyon Sonuçları

Pirazol 3-karboksilli asitin hidrazid, hidrazin ve üre türevlerinin antimikrobiyal aktiviteleri 10 mg ml⁻¹ konsantrasyonunda agar kuyucuk yöntemi ile Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* NRRL-B 37, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 292112; Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 8427 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Escherichia coli* ATCC 35218' e ve mayalardan *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida tropicalis* ATCC 13803' e karşı denenmiştir. Test edilen pirazol 3-karboksilli asit türevlerinin bakterilere ve mayalara karşı olan antimikrobiyal aktivite sonuçları ise Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Table 3.1.' de gösterildiği gibi pirazol türevi MC2, MC8, MC10, MC11, MC12 ve AC3 bileşiklerinin test edilen konsantrasyon da çalışılan bakterilerden hiçbirine karşı etkili olmadığı gözlenmiştir.

Pirazol 3- karboksilli asitin hidrazid türevi olan MC1 bileşiği G (+) bakterilerden sadece *B. subtilis* üzerinde etki göstermiş olup inhibisyon zon çapı 10 ± 1,00 mm olarak ölçülmüştür (Tablo 3.1). MC1 bileşiğinin diğer bakteriler üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir.

MC2 bileşiğinin test edilen bakteriler üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Tüm test bakterilerinin bu bileşiğe karşı dirençli olduğu görülmüştür

MC3 bileşiği Gram (-) bakterilerinden sadece *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* ATCC 35218' e karşı aynı etkiyi göstermiş olup zon çapı bu iki bakteride $8,33 \pm 0,58$ mm olarak ölçülmüştür. Aynı bileşik Gram (+) bakterilerden sadece *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı sırasıyla $10,67 \pm 0,58$ mm ve $9,67 \pm 1,53$ mm inhibisyon zon çapıyla etki göstermiştir.

MC4 bileşiği test edilen bakteriler arasında Gram (+) bakterilerden sadece *B. subtilis*' e karşı $10 \pm 1,73$ mm olarak ölçülen zon çapı ile inhibe edici etki göstermiştir. MC4' ün Gram (-) bakterilere karşı etkili olmadığı belirlenmiştir. Bu serideki bileşiklerden MC1 bileşiği ile aynı etkiyi göstermiştir.

MC5 bileşiğine karşı Gram (+) bakteriler arasından en dirençliler *B. subtilis* ve *E. faecalis* olmuştur. Diğer Gram (+) bakterilerden *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı $9,67 \pm 0,58$ mm inhibisyon zon çapı ile etkili olmuştur. MC5 test edilen Gram (-) bakterilere karşı herhangi bir inhibe edici etki göstermemiştir.

MC7 bileşiği test edilen Gram (-) bakterilerden sadece *E. coli* ATCC 35218' e karşı $8,33 \pm 0,58$ mm zon çapıyla çok düşük bir etki göstermiştir. MC7 test edilen diğer bakterilere karşı çalışılan konsantrasyon da herhangi bir etkisi görülmemiştir.

Pirazol 3-karboksilli asitin hidrazin türevi olan AC6 bileşiği Gram (+) bakterilerden *E. faecalis* ve *B. cereus* üzerinde sırasıyla $9 \pm 0,00$ ve $8,67 \pm 0,58$ mm zon çapı ile etkili olmuştur. AC6' nın Gram (-) bakteriler üzerinde herhangi bir inhibe edici etkisi olmamıştır.

AC14 test edilen mikroorganizmalar arasından Gram (-) bakterilerin hiçbirine karşı etki göstermezken, Gram (+) bakterilerin hepsine karşı etkili bulunmuştur. AC14' ün $13,67 \pm 1,15$ mm zon çapı ile *B. cereus*, $12,67 \pm 0,58$ mm zon çapı ile *B. subtilis*, $19,33 \pm 0,58$ mm zon çapı ile *E. faecalis* ve $14,33 \pm 0,58$ mm zon çapı ile *S. aureus* üzerinde oldukça yüksek bir inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir. Gram (+) bakteriler arasında AC14 hidrazin türevi test bileşiğine karşı en duyarlı bakterinin *E. faecalis* olduğu görülmüştür. Pirazol 3-karboksilli asitin üre türevi olan K1 bileşiği, Gram (-) bakterilerden *E. coli* 35218, *P. aeruginosa* ve *P. vulgaris*' e karşı sırasıyla $10,67 \pm 0,58$ mm, $11,33 \pm 0,58$ mm ve $17,67 \pm 0,58$ mm inhibisyon zon çapı ile inhibe edici etki göstermiştir. K1 bileşiğinin Gram (+) bakterilere karşı etkisi herhangi bir etkisi gözlenmemiştir.

K2 bileşiğine karşı Gram (-) bakteriler arasından en dirençli *P. aeruginosa* olmuştur. Gram (-) bakterilerden *E. coli* 35218, *E. coli* 25922 ve *P. vulgaris* üzerinde sırasıyla $9,33 \pm 0,58$, $10 \pm 0,00$ ve $15,67 \pm 0,58$ mm inhibisyon zon çapı ile etkili olmuştur. K2 bileşiğine karşı Gram (+) bakteriler arasından *B. cereus*, *S. aureus* ve *E. fecalis* en dirençli olarak belirlenmiştir. K2 bileşiği Gram (+) test bakterisi olan *B. subtilis*'e karşı $10,33 \pm 0,58$ mm inhibisyon zon çapı ile etkili olmuştur.

K3'e karşı Gram (-) bakteriler arasından en dirençliler *E. coli* 25922 ve *E. coli* 35218 olmuştur. En hassas olan bakteriler ise *P. aeruginosa* ($8,33 \pm 0,58$ mm) ve *P. vulgaris*' dir. K3'e karşı Gram (+) bakteriler arasından en hassas olan bakteri *B. subtilis* ($10 \pm 0,00$) olarak bulunmuştur. Diğer test edilen Gram (+) bakterilere karşı herhangi bir etki gözlenmemiştir. K3'ün *P. vulgaris*'e karşı $14,33 \pm 0,58$ mm inhibisyon zon çapı ile etkili olduğu belirlenmiştir.

K4 bileşiği, Gram (-) bakterilerden *E. coli* 35218 ($9 \pm 0,00$ mm) ve *P. vulgaris*' e karşı inhibe edici etki göstermiştir. K2'nin *P. vulgaris*'e karşı oluşturduğu $12,67 \pm 0,58$ mm inhibisyon zon çapı ile etkili olduğu belirlenmiştir. K4, Gram (+) bakterilere karşı ise hiç aktivite göstermemiştir.

K5 bileşiğine karşı Gram (+) bakteriler arasından en dirençliler *B. subtilis* ve *E. fecalis* olmuştur. En hassas olan bakteriler ise $8,67 \pm 0,58$ mm inhibisyon çapı ile *B. cereus* ve $9 \pm 0,00$ mm zon çapı ile *S. aureus*'dur. K5'e karşı Gram (-) bakteriler arasından en dirençli olan *E. coli* 35218 ve *E. coli* 25922' dir. En hassas olan bakteriler ise *P. aeruginosa* ($11 \pm 0,00$ mm) ve *P. vulgaris* ($15 \pm 0,00$ mm) olarak bulunmuştur.

Test edilen mikroorganizmalar arasında Gram (-) bakterilerden K6'ya karşı hepsinin hassas olduğu görülmüştür. *E. coli* 35218, *E. coli* 25922, *P. aeruginosa* ve *P. vulgaris*' e karşı sırasıyla $10,67 \pm 0,58$ mm, $10,67 \pm 0,58$ mm, $10,67 \pm 0,58$ mm ve $15,67 \pm 0,58$ mm inhibisyon zon çapı ile etki göstermiştir. K6 bileşiği Gram (+) bakteriler içerisinde yalnızca $8,33 \pm 0,58$ mm zon çapı ile *B. subtilis* üzerinde etkili olmuştur. Diğer Gram (+) bakteriler üzerinde inhibe edici bir etki göstermemiştir.

Test edilen pirazol türevlerinin *C. albicans* ve *C. tropicalis*' e karşı herhangi bir antifungal aktivitesi tespit edilmemiştir.

Pozitif kontrol olarak kullanılan Amfisilin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonunun da *E. coli* ATCC 25922' ye $16,66 \pm 1,15$ mm, *E. coli* ATCC 35218' ye $40 \pm 1,00$ mm, *B. subtilis*' e $26,33 \pm 1,15$ mm, *B. cereus*' e $26 \pm 0,00$ mm, *P. aeruginosa*' ya $28 \pm 0,00$ mm, *S. aureus*' a $34,66 \pm 0,58$ mm, *E. fecalis*' e $28,33 \pm 1,52$ mm ve *P. vulgaris*' e karşı $10,33 \pm 0,58$ mm inhibisyon zonu ile etkili olmuştur.

Mayalara karşı pozitif kontrol olarak Flukonazol $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonunun da *C. tropicalis* ATCC 10231' e $30 \pm 0,00$ mm ve *C. albicans* ATCC 13803' e $29 \pm 0,00$ mm inhibisyon zonu ile etkili olmuştur.

Kimyasal çözücü olan DMSO' nun bakterilere ve mayalara karşı etkisiz olduğu görülmüştür.

3.1.2. Pirazol Türevlerine Ait MİK Değerleri

Agar difüzyon yönteminde bakterilere karşı etkili olduğu tespit edilen bileşiklerin en düşük inhibe edici konsantrasyonları (MİK) 96 kuyucuklu pleytler kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Tablo 3.2'de test edilen bileşiklerin bakterilere karşı minimum inhibe edici değerleri (mg ml^{-1}) verilmiştir.

Tablo 3.2'de görüldüğü gibi MC1 bileşiği test edilen mikroorganizmalardan MİK = 5 mg ml^{-1} değeri ile sadece *B. subtilis*' e karşı etkili olmuştur.

MC3'ün test edilen Gram (-) bakterilerden *E. coli* ATCC 35218 ve *E. coli* ATCC 25922' ye karşı elde edilen MİK değerleri sırasıyla 10 mg ml^{-1} ve 5 mg ml^{-1} dir. MC3 test edilen Gram (+) *S. aureus*' a karşı MİK= 10 mg ml^{-1} değeri ile etkili olmuştur. *B. cereus*' a karşı ise MİK değeri 5 mg ml^{-1} değeri ile etkili olmuştur (Tablo 3.2).

MC4 test edilen mikroorganizmalardan sadece *B. subtilis* üzerinde MİK= 5 mg ml^{-1} değeri ile etkili olmuştur (Tablo 3.2).

MC5' in test edilen Gram (+) bakterilerden *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı elde edilen MİK değeri aynı olmakla birlikte, 10 mg ml^{-1} olarak belirlenmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. Pirazol 3-karboksilli asit türevlerinin antimikrobiyal aktivite değerleri (mm zon çapı)

Bileşikler (10mM)	Gram(-) Bakteriler					Gram(+) Bakteriler			Mayalar	
	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.fecalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 25922	ATCC 35218	ATCC 27853	ATCC 8427	ATCC 6633	NRRL-B 37	ATCC 25923	ATCC 292112	ATCC 10231	ATCC 13803
Mc1	-	-	-	-	10 ± 1,00	-	-	-	-	-
Mc2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mc3	8,33 ± 0,58	8,33 ± 0,58	-	-	-	10,67 ± 0,58	9,67 ± 1,53	-	-	-
Mc4	-	-	-	-	10 ± 1,73	-	-	-	-	-
Mc5	-	-	-	-	-	9,67 ± 0,58	9,67 ± 0,58	-	-	-
Mc7	-	8,33 ± 0,58	-	-	-	-	-	-	-	-
MC8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mc10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mc11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mc12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AC6	-	-	-	-	-	8,67 ± 0,58	-	9 ± 0,00	-	-
AC14	-	-	-	-	12,67 ± 0,58	13,67 ± 1,15	14,33 ± 0,58	19,33 ± 0,58	-	-
K1	-	10,67 ± 0,58	11,33 ± 0,58	17,67 ± 0,58	-	-	-	-	-	-
K2	10 ± 0,00	9,33 ± 0,58	-	15,67 ± 0,58	10,33 ± 0,58	-	-	-	-	-
K3	-	-	8,33 ± 0,58	14,33 ± 0,58	10 ± 0,00	-	-	-	-	-
K4	-	9 ± 0,00	-	12,67 ± 0,58	-	-	-	-	-	-
K5	-	-	11 ± 0,00	15 ± 0,00	-	8,67 ± 0,58	9 ± 0,00	-	-	-
K6	10,67 ± 0,58	10,67 ± 0,58	10,67 ± 0,58	15,67 ± 0,58	8,33 ± 0,58	-	-	-	-	-
Amp(10µg)	16,66 ± 1,15	40 ± 1,00	28 ± 0,00	10,33 ± 0,58	26,33 ± 1,15	26 ± 0,00	34,66 ± 0,58	28,33 ± 1,52	-	-
Fluk(10µg)	-	-	-	-	-	-	-	-	30 ± 0,00	29 ± 0,00
DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: İnhibisyon yok

*: İnhibisyon zonlarına 6 mm delik çapı dahil edilmiştir.

MC7' nin test edilen mikroorganizmalar arasından sadece *E. coli* ATCC 35218 için MİK değeri 10 mg ml⁻¹ olarak belirlenmiştir (Tablo 3.2).

AC6' nın test edilen Gram (+) bakterilerden *E. fecalis* ve *B. cereus*' a karşı elde edilen MİK değerleri sırasıyla 1,25 ve 5 mg ml⁻¹ olarak belirlenmiştir. (Tablo 3.2).

AC14' ün test edilen Gram (+) bakterilerden *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. fecalis*' e karşı aynı MİK = 0,625 mg ml⁻¹ değeri ile etkili olduğu tespit edilmiştir. *S. aureus*' a karşı da etkili olan AC14' ün bu mikroorganizmaya karşı MİK değeri 1,25 mg ml⁻¹ olarak belirlenmiştir (Tablo 3.2).

K1' in test edilen Gram (-) bakterilerden *E. coli* 35218, *P. aeruginosa* ve *P. vulgaris*' e karşı elde edilen MİK değerleri sırasıyla 1,25 mg ml⁻¹, 5 mg ml⁻¹ ve 1,25 mg ml⁻¹ olarak belirlenmiştir (Tablo 3.2).

K2' nin test edilen Gram (-) bakterilerden *E. coli* 35218 için MİK= 2,5 mg ml⁻¹, *E. coli* 25922 için MİK=5 mg ml⁻¹ ve *P. vulgaris* için MİK=1,25 µg ml⁻¹ olarak belirlenmiştir. K2'nin test edilen Gram (+) bakterilerden sadece *B. subtilis*' e karşı MİK=10 mg ml⁻¹ değeri ile etkili olduğu tespit edilmiştir. Doz seviyelerine bakıldığında en etkili olduğu test organizması *P. vulgaris* olmuştur. K2 bileşiğine en dirençli test bakterilerinin *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. fecalis* olduğu görülmüştür (Tablo 3.2).

K3, MİK = 2,5 mg ml⁻¹ değeri ile test edilen Gram (+) bakterilerden *B. subtilis*' e karşı etkili olmuştur. Gram (-) bakterilerden *P. aeruginosa* ve *P. vulgaris*' e karşı sırasıyla 10 mg ml⁻¹ ve 5 mg ml⁻¹ MİK değeri ile etkili olmuştur (Tablo 3.2).

K4' ün test edilen Gram (-) bakterilerden *E. coli* 35218 ve *P. vulgaris*' e karşı elde edilen MİK değerleri sırasıyla 2,5 mg ml⁻¹ ve 1,25 mg ml⁻¹ olarak belirlenmiştir (Tablo 3.2).

K5' in test edilen Gram (-) bakterilerden *P. aeruginosa* ve *P. vulgaris*' e karşı elde edilen MİK değerleri sırasıyla 2,5 mg ml⁻¹ ve 1,25 mg ml⁻¹ olarak belirlenmiştir. K5' in test edilen Gram (+) bakterilerden *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı MİK değerleri sırasıyla 2,5 mg ml⁻¹ ve 5 mg ml⁻¹ ile etkili olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.2).

K6, MİK = 5 mg ml⁻¹ değeri ile test edilen Gram (+) bakterilerden sadece *B. subtilis*' e karşı etkili olmuştur. K6' nın Gram (-) test bakterileri arasında sırasıyla *E. coli* 25922 için MİK=1,25 mg ml⁻¹, *E. coli* 35218 için MİK= 2,5 mg ml⁻¹, *P. aeruginosa* için MİK= 10 mg ml⁻¹ ve *P. vulgaris* için MİK= 0,625 mg ml⁻¹ değeri tespit edilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.3' de test edilen bileşiklerin Gram (-) bakterilerden *E. coli* 35218' e karşı MİK değerleri (mg ml⁻¹) verilmiştir. Tablo 3.3'de agar difüzyon yönteminde *E. coli* 35218' e karşı etkili olduğu tespit edilen MC3, MC7, K1, K2, K4 ve K6'nın *E. coli* 35218' i inhibe edici en düşük konsantrasyonları sırasıyla 10; 10; 1,25; 2,5; 2,5 ve 2,5 mg ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Tablo 3.3'de görüldüğü gibi *E. coli* 35218' e karşı inhibe edici etkisi olan bileşikler arasında en düşük MİK değerine sahip olan bileşik K1 (1,25 mg ml⁻¹)' dir. K1'den sonra *E. coli* 35218' e karşı inhibe edici etkisi en fazla olan bileşik MİK = 2,5 mg ml⁻¹ değeri ile K2, K4 ve K6 olmuştur.

Tablo 3.4' de test edilen bileşiklerin Gram (+) bakterilerden *B. subtilis*' e karşı MİK değerleri (mg ml⁻¹) verilmiştir. Tablo 3.4'de agar difüzyon yönteminde *B. subtilis*' e karşı etkili olduğu tespit edilen MC1, MC4, AC14, K2, K3 ve K6'nın *B. subtilis*' i inhibe edici en düşük konsantrasyonları sırasıyla 5,0; 5,0; 0,625; 10,0; 2,5 ve 5,0 mg ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Tablo 3.4' de görüldüğü gibi *B. subtilis*' e karşı inhibe edici etkisi olan bileşikler arasında en düşük MİK değerine sahip olan bileşik AC14 (0,625 mg ml⁻¹)' dir.

Tablo 3.5' de test edilen bileşiklerin Gram (+) bakterilerden *B. cereus*' a karşı MİK değerleri (mg ml⁻¹) verilmiştir. Tablo 3.5' de agar difüzyon yönteminde *B. cereus*' a karşı etkili olduğu tespit edilen MC3, MC5, AC3, AC14 ve K5'in *B. cereus*' u inhibe edici en düşük konsantrasyonları sırasıyla 5,0; 10,0; 5,0; 0,625 ve 2,5 mg ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Tablo 3.5' de görüldüğü gibi *B. cereus*' a karşı inhibe edici etkisi olan bileşikler arasında en düşük MİK değerine sahip olan bileşik AC14 (0,625 mg ml⁻¹)' dir.

Tablo 3.6' da test edilen bileşiklerin Gram (+) bakterilerden *S. aureus*' a karşı MİK değerleri (mg ml⁻¹) verilmiştir. Tablo 3.6' da agar difüzyon yönteminde *S. aureus*' a karşı etkili olduğu tespit edilen MC3, MC5, AC14 ve K5'in *S. aureus*' u inhibe edici en

Tablo 3.2. Mikroorganizmalar üzerinde denenen kimyasalların Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK mg ml⁻¹) değerleri

Bileşikler	Mikroorganizma adı							
	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.fecalis</i>	<i>P. vulgaris</i>
	ATCC 25922	ATCC 35218	ATCC 6633	NRRL-B 37	ATCC 27853	ATCC 25923	ATCC 292112	ATCC 8427
MC1	-	-	5	-	-	-	-	-
MC3	5	10	-	5	-	10	-	-
MC4	-	-	5	-	-	-	-	-
MC5	-	-	-	10	-	10	-	-
MC7	-	10	-	-	-	-	-	-
AC6	-	-	-	5	-	-	1,25	-
AC14	-	-	0,625	0,625	-	1,25	0,625	-
K1	-	1,25	-	-	5	-	-	1,25
K2	5	2,5	10	-	-	-	-	1,25
K3	-	-	2,5	-	10	-	-	5
K4	-	2,5	-	-	-	-	-	1,25
K5	-	-	-	2,5	2,5	5	-	1,25
K6	1,25	2,5	5	-	10	-	-	0,625
Ampisilin	<0,075	<0,075	-	<0,075	-	<0,075	<0,075	-

-: İnhibisyon yok

düşük konsantrasyonları sırasıyla 10,0; 10,0; 1,25 ve 5,0 mg ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Sonuçta *S. aureus*' a karşı en etkili bileşiğin 1,25 mg ml⁻¹ MİK değeri ile AC14 olduğu bulunmuştur.

Tablo 3.3. Test edilen bileşiklerin *E. coli 35218*' e karşı MİK değerleri

Konsantrasyon (mg ml ⁻¹)	MC3	MC7	K1	K2	K4	K6
10,0	-	-	-	-	-	-
5,0	+	+	-	-	-	-
2,5	+	+	-	-	-	-
1,25	+	+	-	+	+	+
0,625	+	+	+	+	+	+
0,312	+	+	+	+	+	+
0,16	+	+	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+	+	+
Kontrol	+	+	+	+	+	+

E. coli 35218

-: Gelişme yok

+: Gelişme var

Tablo 3.4. Test edilen bileşiklerin *B. subtilis*' e karşı MİK değerleri

Konsantrasyon (mg ml ⁻¹)	MC1	MC4	AC14	K2	K3	K6
10,0	-	-	-	-	-	-
5,0	-	-	-	+	-	-
2,5	+	+	-	+	-	+
1,25	+	+	-	+	+	+
0,625	+	+	-	+	+	+
0,312	+	+	+	+	+	+
0,16	+	+	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+	+	+
Kontrol	+	+	+	+	+	+

B. subtilis

-: Gelişme yok

+: Gelişme var

Tablo 3.7' de test edilen bileşiklerin Gram (-) bakterilerden *P. vulgaris*'e karşı MİK değerleri (mg ml⁻¹) verilmiştir. Tablo 3.7' de agar difüzyon yönteminde *P. vulgaris*'e karşı etkili olduğu tespit edilen K1, K2, K3, K4, K5 ve K6'nın *P. vulgaris*' i inhibe edici en düşük konsantrasyonları sırasıyla 1,25; 1,25; 5,0; 1,25; 1,25 ve 0,625 mg ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Tablo 3.7' de görüldüğü gibi *P. vulgaris*' e karşı inhibe edici etkisi olan bileşikler arasında en düşük MİK değerine sahip olan bileşik K6 (0,625 mg

ml⁻¹)' dır. Bu bakteriye karşı inhibe edici etkisi en az olan bileşiğin K3 (5,0 mg ml⁻¹) olduğu bulunmuştur.

Tablo 3.5. Test edilen bileşiklerin *B. cereus*' a karşı MİK değerleri

Konsantrasyon (mg ml ⁻¹)	MC3	MC5	AC3	AC14	K5
10,0	-	-	-	-	-
5,0	-	+	-	-	-
2,5	+	+	+	-	-
1,25	+	+	+	-	+
0,625	+	+	+	-	+
0,312	+	+	+	+	+
0,16	+	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+	+
Kontrol	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>					
-: Gelişme yok					
+: Gelişme var					

Tablo 3.6. Test edilen bileşiklerin *S. aureus*' a karşı MİK değerleri

Konsantrasyon (mg ml ⁻¹)	MC3	MC5	AC14	K5
10,0	-	-	-	-
5,0	+	+	-	-
2,5	+	+	-	+
1,25	+	+	-	+
0,625	+	+	+	+
0,312	+	+	+	+
0,16	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+
Kontrol	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>				
-: Gelişme yok				
+: Gelişme var				

Tablo 3.8' de test edilen bileşiklerin Gram (-) bakterilerden *E. coli* 25922' e karşı MİK değerleri (mg ml⁻¹) verilmiştir. Tablo 3.8' de agar difüzyon yönteminde *E. coli* 25922' e karşı etkili olduğu tespit edilen MC3, K2 ve K6' nın *E. coli* 25922' i inhibe edici en düşük konsantrasyonları sırasıyla 5,0; 5,0 ve 1,25 mg ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Tablo 3.8' de görüldüğü gibi *E. coli* 25922' e karşı inhibe edici etkisi olan bileşikler arasında en düşük MİK değerine sahip olan bileşik K6 (1,25 mg ml⁻¹)'dır.

Tablo 3.7. Test edilen bileşiklerin *P. vulgaris*’ e karşı MİK değerleri

Konsantrasyon (mg ml ⁻¹)	K1	K2	K3	K4	K5	K6
10,0	-	-	-	-	-	-
5,0	-	-	-	-	-	-
2,5	-	-	+	-	-	-
1,25	-	-	+	-	-	-
0,625	+	+	+	+	+	-
0,312	+	+	+	+	+	+
0,16	+	+	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+	+	+
Kontrol	+	+	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>						
-: Gelişme yok						
+: Gelişme var						

Tablo 3.8. Test edilen bileşiklerin *E. coli* 25922’ e karşı MİK değerleri

Konsantrasyon (mg ml ⁻¹)	MC3	K2	K6
10,0	-	-	-
5,0	-	-	-
2,5	+	+	-
1,25	+	+	-
0,625	+	+	+
0,312	+	+	+
0,16	+	+	+
0,08	+	+	+
Kontrol	+	+	+
<i>E. coli</i> 25922			
-: Gelişme yok			
+: Gelişme var			

Tablo 3.9’ da test edilen bileşiklerin Gram (-) bakterilerden *P. aeruginosa*’ ya karşı MİK değerleri (mg ml⁻¹) verilmiştir. Tablo 3.9’ da agar difüzyon yönteminde *P. aeruginosa*’ ya karşı etkili olduğu tespit edilen K1, K3, K5 ve K6’nın *P. aeruginosa*’ yı inhibe edici en düşük konsantrasyonları sırasıyla 5,0; 10,0; 2,5 ve 10,0 mg ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Tablo 3.9’ da görüldüğü gibi *P. aeruginosa*’ ya karşı inhibe edici etkisi olan bileşikler arasında en düşük MİK değerine sahip olan bileşik K5 (2,5 mg ml⁻¹)’ dür.

Tablo 3.10’ da test edilen bileşiklerin *E. fecalis*’ e karşı MİK değerleri (mg ml⁻¹) verilmiştir. Tablo 3.10’ da agar difüzyon yönteminde *E. fecalis*’ e karşı etkili olduğu tespit edilen AC6 ve AC14’ ün *E. fecalis*’ e inhibe edici en düşük konsantrasyonları sırasıyla 1,25 ve 0,625 mg ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Tablo 3.10’ da görüldüğü gibi *E. fecalis*’ e karşı inhibe edici etkisi olan bileşikler arasında en düşük MİK değerine sahip olan bileşik AC14 (0,625 mg ml⁻¹)’ dür.

Tablo 3.9. Test edilen bileşiklerin *P. aeruginosa*’ ya karşı MİK değerleri

Konsantrasyon (mg ml ⁻¹)	K1	K3	K5	K6
10,0	-	-	-	-
5,0	-	+	-	+
2,5	+	+	-	+
1,25	+	+	+	+
0,625	+	+	+	+
0,312	+	+	+	+
0,16	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+
Kontrol	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>				
-: Gelişme yok +: Gelişme var				

Tablo 3.10. Test edilen bileşiklerin *E. fecalis*’ e karşı MİK değerleri

Konsantrasyon (mg ml ⁻¹)	AC6	AC14
10,0	-	-
5,0	-	-
2,5	-	-
1,25	-	-
0,625	+	-
0,312	+	+
0,16	+	+
0,08	+	+
Kontrol	+	+
<i>E. fecalis</i>		
-: Gelişme yok +: Gelişme var		

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

Pirazol 3-karboksilli asitin hidrazid, hidrazin ve üre türevlerinin toksisite aktiviteleri içerisinde 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olacak şekilde belirlenen test solüsyonunda Brine-Shrimp Toksisite Testi yöntemi ile test organizması *A. salina*’ya denenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda göstermiş olduğu sonuçların toksisite derecelendirilmeleri ise Tablo 3.11.’deki referans değerlerine göre yapılmıştır. Toksisite testinden elde edilen veriler, Probit analizi ile LC_{50} değerleri hesaplanmış aynı zamanda LC_{50} değerleri ile birlikte üst ve alt % 95 güvenirlilik sınırları ortaya konulmuştur.

Tablo 3.12’de test edilen bileşiklere ait *A. salina*’ya karşı toksisite testi sonuçları ve LC_{50} değerleri ($\mu\text{g ml}^{-1}$) verilmiştir.

Tablo 3.11. Toksisite derecesi değerlendirilmesinde kullanılan referans değerler [Brayn, et.al., 1997]

Toksisite Derecesi	LC_{50} Limitleri
Oldukça Toksik	$< 10 \mu\text{g ml}^{-1}$
Toksik	$> 10 \mu\text{g ml}^{-1}$
Zararlı	$> 100 \mu\text{g ml}^{-1}$
Toksik Değil	$> 1000 \mu\text{g ml}^{-1}$

24 saat sonraki ölçümlerde bazı konsantrasyonlarda *A. salina*’ların yaşayamadıkları gözlenmiştir. Yeni pirazol türevi bileşiklerin üre türevlerinin bu küçük sucul canlılar üzerinde çok etkili oldukları kayıtlara geçmiştir.

Kullanılan bütün test bileşikleri 5-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ arasında bulunan LC_{50} değerleri, alt ve üst güvenlik sınırları itibariyle toksisite sınırları içerisinde yer almıştır (Tablo 3.12). DMSO’ nun ise toksik olmadığı gözlenmiştir. Tablo 3.12’de görüldüğü gibi Brine-Shrimp Toksisite Testi yönteminde *A. salina*’ya karşı tüm pirazol türevleri etkili olmuştur.

Pirazol 3-karboksilli asit hidrazid türevi bileşiklerden *A. salina* test organizmasına karşı en etkili olanı 14,10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LC_{50} değeri ile MC12 ve 26,69 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LC_{50} değeri ile MC10 olduğu görülmüştür (Tablo 3.12). MC10 ve MC12’ nin diğer bileşiklere oranla

yüksek derecede toksik olduğu görülmüştür. Diğer hidrazid türevi MC1, MC2, MC3, MC4, MC5, MC7 ve MC11 bileşiklerinin LC_{50} değerleri sırasıyla 61,04; 57,32; 60,21; 83,30; 49,67; 59,87 ve 79,82 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dir. Değerlere bakıldığında bu bileşiklerin toksik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Pirazol 3-karboksilli asit hidrazin türevi bileşiklerinde ise Tablo 3.12' de görüldüğü gibi AC3, AC6 ve AC14 bileşikleri için sırasıyla 60,55 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 84,09 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 45,87 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LC_{50} değeri ile Tablo 3.11' deki referans değerlerine göre toksik sınıfına girmiştir. Bu bileşikler kendi aralarında kıyaslandığında en toksik olan bileşiğin AC14 olduğu tespit edilmiştir.

Pirazol 3-karboksilli asit üre türevli bileşiklerinde ise K1 ve K2 bileşikleri sırasıyla 52,13 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LC_{50} değeri ve 49,93 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LC_{50} değeri ile toksik değerde bulunmuştur. Yine aynı türevin bileşiklerinden K3, K4 ve K6 ise aynı grubun diğer bileşiklerine göre daha toksik değerde bulunmuştur. Bu bileşiklerin de LC_{50} değerleri sırasıyla 13,87 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 14,88 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 21,82 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Tablo 3.12. Brine-Shrimp Toxicity Assay test sonuçları ile LC_{50} değerleri ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

Bileşikler	LC_{50} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Alt Sınır	Üst Sınır	Toksosite derecesi
MC1	61,04	44,93	85,67	toksik
MC2	57,32	41,67	77,03	toksik
MC3	60,21	43,01	83,65	toksik
MC4	83,30	72,90	95,05	toksik
MC5	49,67	44,45	56,75	toksik
MC7	59,87	41,18	89,57	toksik
MC8*	-	-	-	-
MC10	26,69	16,55	41,48	toksik
MC11	79,82	26,40	102,68	toksik
MC12	14,10	4,87	25,60	toksik
AC3	60,55	52,34	68,73	toksik
AC6	84,09	74,60	92,47	toksik
AC14	45,87	39,08	53,14	toksik
K1	52,13	28,00	122,90	toksik
K2	49,93	12,11	120,68	toksik
K3	13,87	10,58	17,55	toksik
K4	14,88	11,75	18,46	toksik
K5*	-	-	-	-
K6	21,82	12,49	34,58	toksik

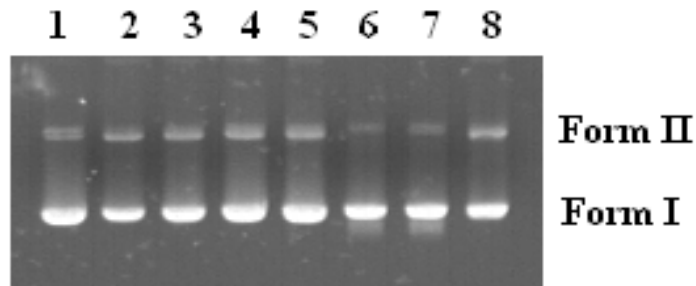
*Bileşik yetersizliğinden toksikolojik analizi yapılamamıştır.

3.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile Bileşik–DNA Etkileşimi Sonuçları

Pirazol 3-karboksilli asitin hidrazit türevleri MC1, MC2, MC3, MC4, MC5, MC7, MC8, MC10, MC11 ve MC12 bileşiklerinin 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 ve 78 μ M konsantrasyonlardaki çözeltileri DMF (Dimetil formamid) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

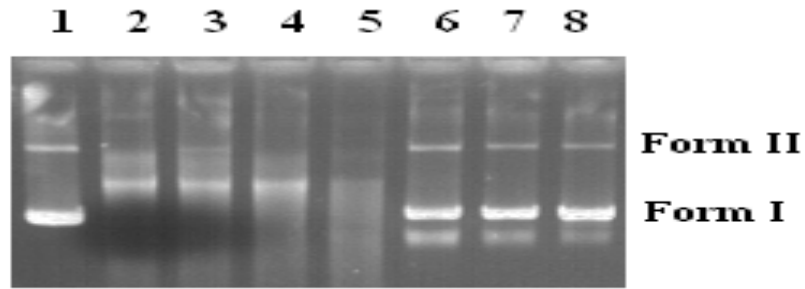
Hazırlanan çözeltiler pBR322 plazmit DNA ile +37 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler %1’ lik agaroz jel üzerinde 60 V’ ta 3 saat elektroforezle yürütülerek bileşiklerin DNA üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.2–11).

Agaroz jel elektroforez yöntemine göre incelenen bileşik-DNA etkileşim çalışmalarının gösterdiği sonuçlara göre DMF’ nin DNA üzerine hiçbir etkisi olmamıştır (Şekil 3.1).



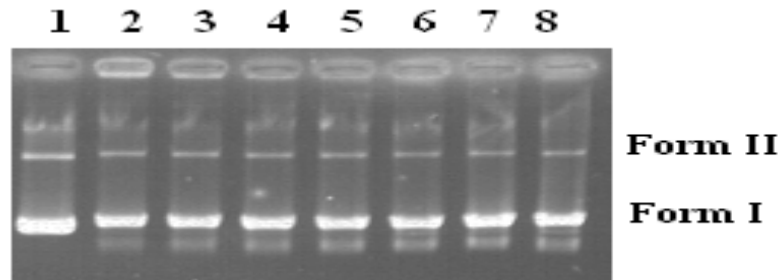
Şekil 3.1. DMF - pBR322 DNA etkileşim sonuçları.
1-pBR322 plazmit DNA, 2-% 100 DMF+ pBR322,
3-% 80 DMF + pBR322, 4-% 60 DMF + pBR322,
5-% 40 DMF + pBR322, 6-% 20 DMF + pBR322,
7-% 10 DMF + pBR322, 8-% 5 DMF + pBR322

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC1 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.2’ de gösterilmektedir. MC1 bileşiğinin 5000, 2500, 1250 ve 625 μ M’ lık yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA’ nın süper sarmal (Form I) ve gevşek sarmal (Form II) yapısının güçlü bir gevşeme göstererek bozulduğu görülmüştür. 312, 156 ve 78 μ M’ lık konsantrasyonlarda ise süper sarmal ve gevşek sarmal yapısında herhangi bir bozulma olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.2. MC1 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, **2**-5000 μ M MC1 + pBR322,
3-2500 μ M MC1 + pBR322, **4**-1250 μ M MC1 + pBR322,
5-625 μ M MC1 + pBR322, **6**-312 μ M MC1 + pBR322,
7-156 μ M MC1 + pBR322, **8**-78 μ M MC1 + pBR322 μ M

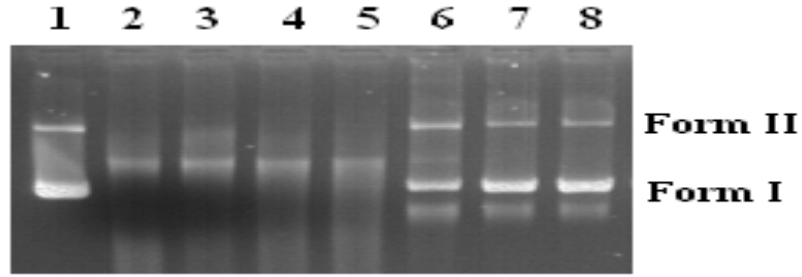
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC2 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.3’ de gösterilmektedir. MC2 bileşiğinin plazmit DNA’ nın süper sarmal ve gevşek sarmal (Form I ve Form II) yapısında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.3. MC2 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, **2**-5000 μ M MC2 + pBR322,
3-2500 μ M MC2 + pBR322, **4**-1250 μ M MC2 + pBR322,
5-625 μ M MC2 + pBR322, **6**-312 μ M MC2 + pBR322,
7-156 μ M MC2 + pBR322, **8**-78 μ M MC2 + pBR322

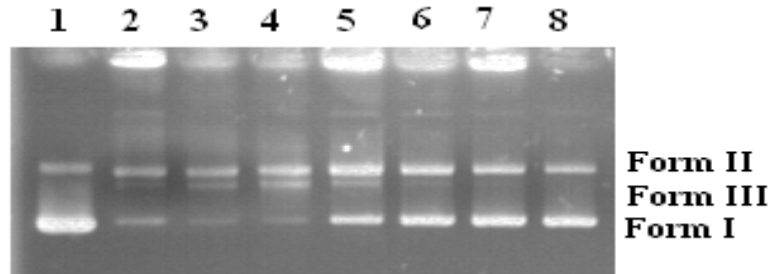
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC3 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.4’ de gösterilmektedir. MC3 bileşiğinin MC1 bileşiğinde olduğu gibi 5000, 2500, 1250 ve 625 μ M’ lık yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA’ nın Form I ve Form II yapısının güçlü bir gevşeme göstererek bozulduğu görülmüştür. 312, 156 ve 78 μ M’ lık konsantrasyonlarda ise Form I ve Form II yapısında herhangi bir bozulma olmadığı belirlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC4 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.5’ de gösterilmektedir. MC4 bileşi-



Şekil 3.4. MC3 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
 1-pBR322 plazmit DNA, 2-5000 μ M MC3 + pBR322,
 3-2500 μ M MC3 + pBR322, 4-1250 μ M MC3 + pBR322,
 5-625 μ M MC3 + pBR322, 6-312 μ M MC3 + pBR322,
 7-156 μ M MC3 + pBR322, 8-78 μ M MC3 + pBR322 μ M

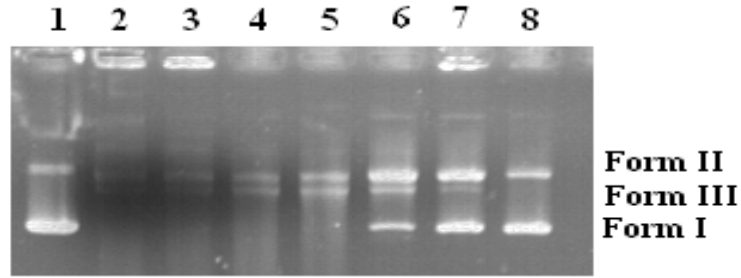
ğinin 5000, 2500 ve 1250 μ M' lık yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA' nın süper sarmal Form I yapısının yoğunluğunda azalma olmuştur. Aynı zamanda Form II yapısının güçlü bir gevşeme göstererek bozulduğu görülmüştür. 312, 156 ve 78 μ M' lık konsantrasyonlarda ise Form I ve Form II yapısında herhangi bir bozulma olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.5. MC4 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
 1-pBR322 plazmit DNA, 2-5000 μ M MC4+pBR322,
 3-2500 μ M MC4+ pBR322, 4-1250 μ M MC4 + pBR322,
 5-625 μ M MC4 + pBR322, 6-312 μ M MC4 + pBR322,
 7-156 μ M MC4 + pBR322, 8-78 μ M MC4 + pBR322

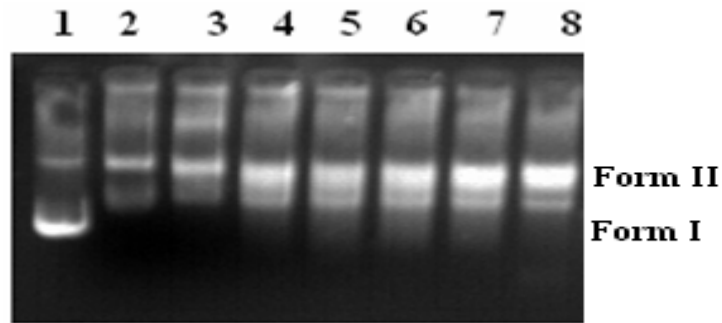
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC5 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.6' da gösterilmektedir. MC5 bileşiğinin 5000, 2500, 1250 ve 625 μ M' lık yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA' nın süper sarmal Form I yapısı tamamen parçalanmıştır. Form II yapısının kontrole göre yoğunluğunda azalma olmuş ve Form III yapısının oluştuğu gözlenmiştir. 312 ve 156 μ M' lık konsantrasyonlarda yoğunluklarının kontrole göre olan

karşılaştırılmaları ile Form I yapısının açılıp Form II yapısına dönüştüğü belirlenmiştir. 78 μ M'lık konsantrasyonlarda ise Form I ve Form II yapısında herhangi bir bozulma olmadığı belirlenmiştir.



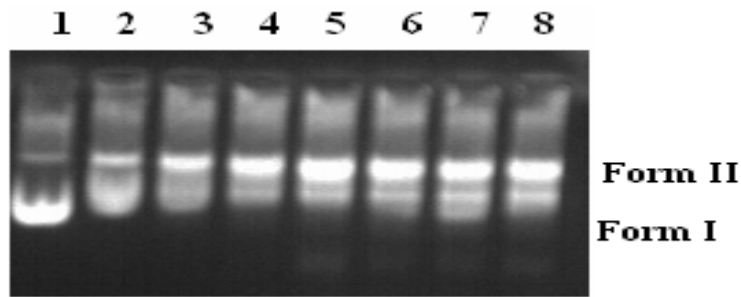
Şekil 3.6. MC5 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, **2**-5000 μ M MC5 + pBR322,
3-2500 μ M MC5 + pBR322, **4**-1250 μ M MC5 + pBR322,
5-625 μ M MC5 + pBR322, **6**-312 μ M MC5 + pBR322,
7-156 μ M MC5 + pBR322, **8**-78 μ M MC5 + pBR322

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC7 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.7' de gösterilmektedir. MC7 bileşiğinin 5000, 2500, 1250, 625 ve 312 μ M'lık yüksek konsantrasyonlarında (8-4 nolu örnekler arası) plazmit DNA'nın süper sarmal Form I yapısı açılarak Form II yapısına dönüştüğü, Form I yapısının yoğunluğunun ve hareketliliğinin azaldığı, Form II yapısının yoğunluğunun ise arttığı belirlenmiştir.



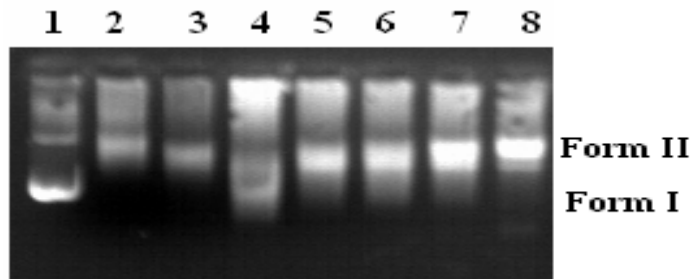
Şekil 3.7. MC7 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, **2**-78 μ M MC7 + pBR322,
3-156 μ M MC7 + pBR322, **4**-312 μ M MC7 + pBR322,
5-625 μ M MC7 + pBR322, **6**-1250 μ M MC7 + pBR322,
7-2500 μ M MC7 + pBR322, **8**-5000 μ M MC7 + pBR322

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC8 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.8’ de gösterilmektedir. MC8 bileşiğinin düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona (3-8) doğru gidildikçe Form I yapısının açılarak yoğunluğunun azaldığı ve Form II yapısının yoğunluğunda artış olduğu belirlenmiştir.



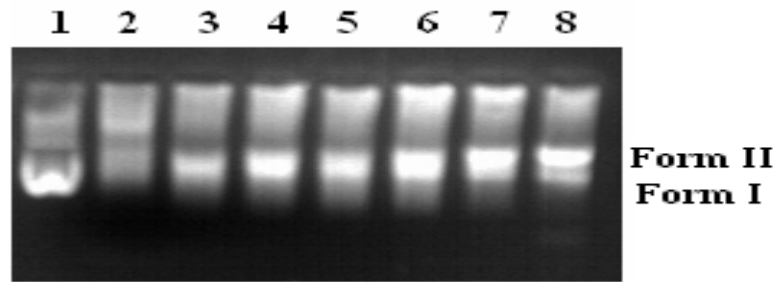
Şekil 3.8. MC8 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, 2-78 μ M MC8 + pBR322,
3-156 μ M MC8 + pBR322, 4-312 μ M MC8 + pBR322,
5-625 μ M MC8 + pBR322, 6-1250 μ M MC8 + pBR322,
7-2500 μ M MC8 + pBR322, 8-5000 μ M MC8 + pBR322

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC10 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.9’ da gösterilmektedir. MC10 bileşiğinin düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona (3-8) doğru gidildikçe Form I yapısının açılarak yoğunluğunun azaldığı ve Form II yapısının ise yoğunluğunda artış olduğu belirlenmiştir.



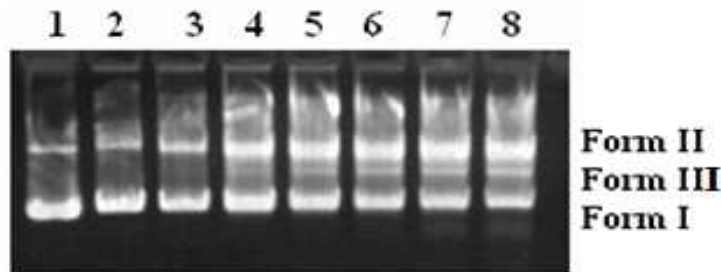
Şekil 3.9. MC10 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, 2-78 μ M MC10 + pBR322,
3-156 μ M MC10 + pBR322, 4-312 μ M MC10 + pBR322,
5-625 μ M MC10 + pBR322, 6-1250 μ M MC10 + pBR322,
7-2500 μ M MC10 + pBR322, 8-5000 μ M MC10 + pBR322

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC11 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.10' da gösterilmektedir. MC11 bileşiğinin düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona (3-8) doğru gidildikçe Form I yapısının açılarak yoğunluğunun azaldığı ve Form II yapısının ise yoğunluğunda artış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.10. MC11 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, **2**-78 μ M MC11 + pBR322,
3-156 μ M MC11 + pBR322, **4**-312 μ M MC11 + pBR322,
5-625 μ M MC11+ pBR322, **6**-1250 μ M MC11 + pBR322,
7-2500 μ M MC11 + pBR322, **8**-5000 μ M MC11 + pBR322

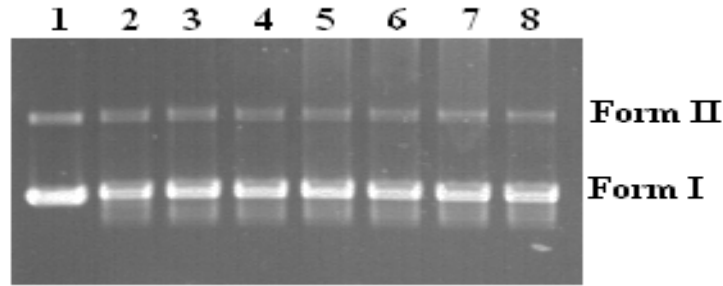
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MC12 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.11' de gösterilmektedir. MC12 bileşiğinin 5000, 2500,1250, 625 ve 312 μ M' lık yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA' nın süper sarmal Form I yapısının yoğunluğunda azalma olmuştur. Form II yapısının yoğunluğunun arttığı ve aynı zamanda Form III yapısının oluştuğu gözlenmiştir.



Şekil 3.11. MC12 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, **2**-78 μ M MC12 + pBR322,
3-156 μ M MC12 + pBR322, **4**-312 μ M MC12 + pBR322,
5-625 μ M MC12+ pBR322, **6**-1250 μ M MC12 + pBR322,
7-2500 μ M MC12 + pBR322, **8**-5000 μ M MC12 + pBR322

Pirazol 3-karboksilli asitin hidrazit türevleri AC3, AC6 ve AC14 bileşiklerinin 5000, 2500, 1250, 625, 312 ve 78 μM konsantrasyonlardaki çözeltileri DMF (Dimetil formamid) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler pBR322 plazmit DNA ile +37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler %1' lik agaroz jel üzerinde 60 V' ta 3 saat elektroforezle yürütülerek bileşiklerin DNA üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.12-14).

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hidrazin türevi AC3 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.12' de gösterilmektedir. Plazmit DNA' nın AC3 maddesi ile muamele sonucunda Form I ve Form II yapısında ve yoğunluğunda önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

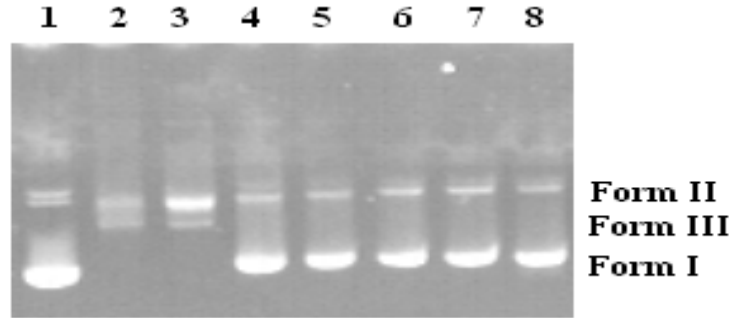


Şekil 3.12. AC3 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, 2-5000 μM AC3 + pBR322,
3-2500 μM AC3 + pBR322, 4-1250 μM AC3 + pBR322,
5-625 μM AC3 + pBR322, 6-312 μM AC3 + pBR322,
7-156 μM AC3 + pBR322, 8-78 μM AC3+ pBR322 μM

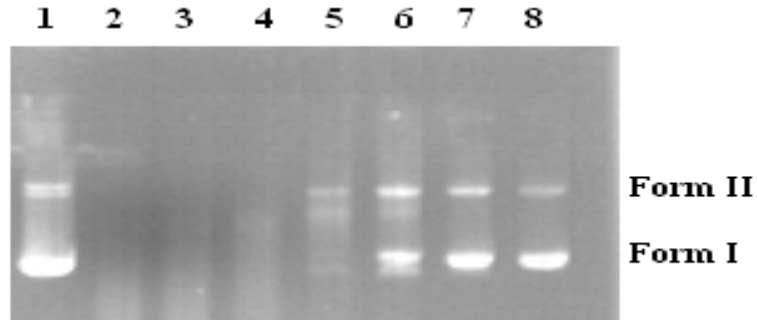
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hidrazin türevi AC6 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.13' de gösterilmektedir. AC6 bileşiğinin 5000 ve 2500 μM ' lık yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA' nın süper sarmal Form I yapısının tamamen açıldığı görülmüştür. Aynı zamanda Form II yapısının yoğunluğunun arttığı ve Form III yapısının oluştuğu gözlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hidrazin türevi AC14 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.14' de gösterilmektedir. AC14 bileşiğinin 5000, 2500, 1250 ve 625 μM ' lık yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA' nın Form I ve Form II yapısı tamamen

bozulmuştur. Düşük konsantrasyonlarda ise Form I ve Form II yapısı korunmuş ancak yoğunluklarında kontrole göre azalma olduğu görülmüştür.



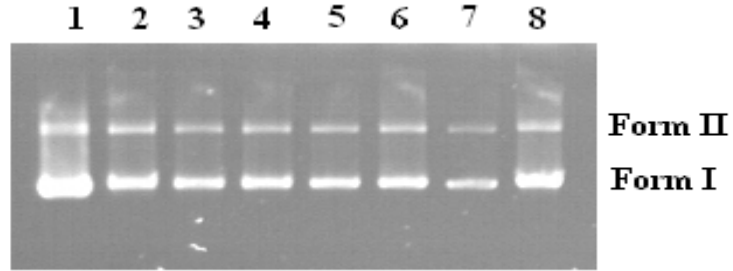
Şekil 3.13. AC6 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, 2-5000 μ M AC6 + pBR322, 3-2500 μ M AC6 + pBR322, 4-1250 μ M AC6 + pBR322, 5-625 μ M AC6 + pBR322, 6-312 μ M AC6 + pBR322, 7-156 μ M AC6 + pBR322, 8-78 μ M AC6+ pBR322



Şekil 3.14. AC14 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, 2-5000 μ M AC14 + pBR322, 3-2500 μ M AC14 + pBR322, 4-1250 μ M AC14 + pBR322, 5-625 μ M AC14 + pBR322, 6-312 μ M AC14 + pBR322, 7-156 μ M AC14 + pBR322, 8-78 μ M AC14+ pBR322

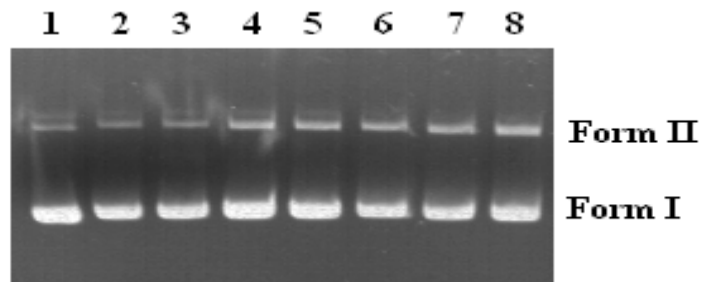
Pirazol 3-karboksilli asitin üre türevleri K1, K2, K3, K4, K5 ve K6 bileşiklerinin 5000, 2500, 1250, 625, 312 ve 78 μ M konsantrasyonlardaki çözeltileri DMF (Dimetil formamid) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler pBR322 Plazmit DNA ile +37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda örnekler %1' lik agaroz jel üzerinde 60 V' ta 3 saat elektroforezle yürütülerek bileşiklerin DNA üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.15-20).

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üre türevi K1 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.15’ de gösterilmektedir. K1 bileşiğinin DNA’ ya bağlanma ve ayırma üzerinde önemli bir etkisi belirlenememiştir.



Şekil 3.15. K1 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
 1-pBR322 plazmit DNA, 2-5000 μ M K1 + pBR322,
 3-2500 μ M K1 + pBR322, 4-1250 μ M K1 + pBR322,
 5-625 μ M K1 + pBR322, 6-312 μ M K1 + pBR322,
 7-156 μ M K1 + pBR322, 8-78 μ M K1+ pBR322

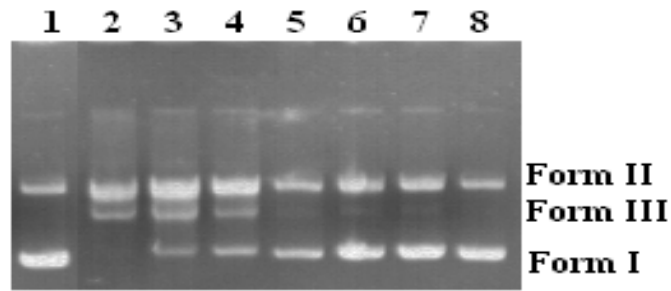
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üre türevi K2 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.16’ da gösterilmektedir. K2 bileşiğinin plazmit DNA ile etkileşimi sonucunda Form I ve Form II DNA yoğunluğu ve yapısı üzerinde önemli bir etkisi bulunamamıştır.



Şekil 3.16. K2 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
 1-pBR322 plazmit DNA, 2-5000 μ M K2 + pBR322,
 3-2500 μ M K2 + pBR322, 4-1250 μ M K2 + pBR322,
 5-625 μ M K2 + pBR322, 6-312 μ M K2 + pBR322,
 7-156 μ M K2 + pBR322, 8-78 μ M K2+ pBR322

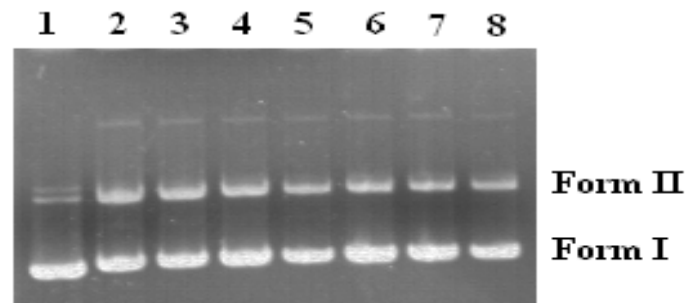
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üre türevi K3 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.17’ de

gösterilmektedir. K3 bileşiğinin 5000 μM 'lık yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA' nın süper sarmal Form I yapısı tamamen parçalanmıştır. Form II yapısının yoğunluğu artmış ve Form III yapısı oluşmuştur. 2500 ve 1250 μM 'lık konsantrasyonlarda Form I yoğunluğunun azaldığı ve Form II yapısının yoğunluğunda artma olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda bu konsantrasyonlarda Form III yapısının oluştuğu da gözlenmiştir. Diğer konsantrasyonlarda ise Form I ve Form II yapısında herhangi bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.



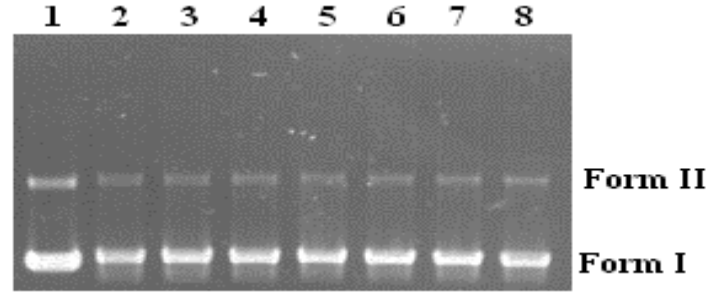
Şekil 3.17. K3 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, 2-5000 μM K3 + pBR322,
3-2500 μM K3 + pBR322, 4-1250 μM K3 + pBR322,
5-625 μM K3 + pBR322, 6-312 μM K3 + pBR322,
7-156 μM K3 + pBR322, 8-78 μM K3+ pBR322 μM

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üre türevi K4 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.18' de gösterilmektedir. K4 bileşiği ile plazmit DNA' nın muamele edilmesi sonucunda Form I' in hareketinde kontrole göre gecikme olmuştur.



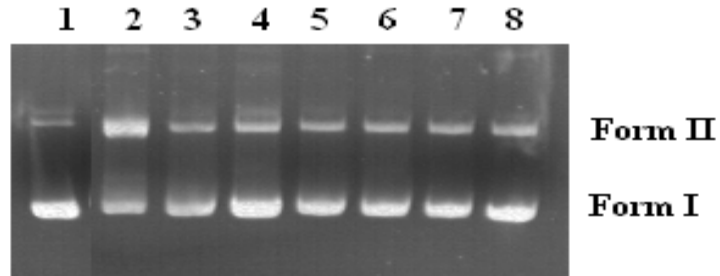
Şekil 3.18. K4 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, 2-5000 μM K4 + pBR322,
3-2500 μM K4 + pBR322, 4-1250 μM K4 + pBR322,
5-625 μM K4 + pBR322, 6-312 μM K4 + pBR322,
7-156 μM K4 + pBR322, 8-78 μM K4+ pBR322 μM

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üre türevi K5 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.19’ da gösterilmektedir. K5 bileşiğinin DNA’ ya bağlanma ve ayırma üzerinde önemli bir etkisi bulunamamıştır.



Şekil 3.19. K5 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, **2**-5000 μ M K5+ pBR322,
3-2500 μ M K5 + pBR322, **4**-1250 μ M K5 + pBR322,
5-625 μ M K5 + pBR322, **6**-312 μ M K5 + pBR322,
7-156 μ M K5 + pBR322, **8**-78 μ M K5+ pBR322

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üre türevi K6 bileşiğinin plazmit DNA ile inkübasyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.20’ de gösterilmektedir. K6 bileşiğinin plazmit DNA ile etkileşimi sonucunda 5000 ve 2500 μ M’ lık konsantrasyonlarda Form I DNA yoğunluğunda azalma olurken Form II yoğunluğu artmıştır. Diğer konsantrasyonlarda önemli sayılabilecek bir değişiklik belirlenememiştir.



Şekil 3.20. K6 - pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi
1-pBR322 plazmit DNA, **2**-5000 μ M K6 + pBR322,
3-2500 μ M K6 + pBR322, **4**-1250 μ M K6+ pBR322,
5-625 μ M K6 + pBR322, **6**-312 μ M K6 + pBR322,
7-156 μ M K6 + pBR322, **8**-78 μ M K6+ pBR322

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

Patojen mikroorganizmalar kendilerine karşı artan miktarlarda kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı gün geçtikçe direnç kazanmaktadır. Gereksiz yere veya kontrolsüz olarak antibiyotik kullanımından doğan bu durum, halk sağlığını ve günümüz araştırmalarını zorlar bir duruma geldiğinden dünya genelinde bu konu üzerinde ciddi çalışmalar yapılmaktadır [104]. Günümüzde biyolojik kaynaklardan elde edilen ve şu an kullanılmakta olan doğal kimyasallara dayalı tedavilerin yukarıda belirtilen geniş spektrumlu direnç kazanmış mikroorganizmalara karşı zaman zaman yetersiz kaldıkları bildirilmektedir. Sonuç olarak, mikroorganizmaların direnç kazandığı doğal bileşiklerden türevlendirilmiş yeni bileşiklerin sentezlenip *in vitro* ve *in vivo* koşullarda biyolojik etki testlerinden geçirilerek insanlar üzerinde uygulanabilirliğini araştırma yaklaşımı ortaya çıkmıştır [105,106].

Son zamanlarda heterohalkalı bileşikler özellikleri ve uygulamaları açısından detaylı şekilde incelenmektedir. Bu bileşikler arasında pirazol ve türevleri özellikle son yıllarda dikkat çekmektedir. Geçmişte pirazol türevleri lokal anestezi ve yatıştırıcı ilaçlarında kullanılmaktaydı. Ancak son zamanlarda tümör ve kanser tedavisinde kullanılmalarıyla ilgili olarak yoğun çalışmalar devam etmektedir [31]. Pirazol ve pirazol türevi bileşikler geniş spektrumlu biyoaktiviteye sahip farklı kimyasal yapıda bir seri bileşik oluşturmada önemli rol oynamaktadır. Pirazol türevleri, önemli biyolojik aktiviteli heterohalkalı bileşikler olarak literatürde iyi bilinmektedir. Bu türevler, bunların yaygın potansiyel farmakolojik aktiviteleri nedeniyle antienflamatuar [15], antipiretik [16], antimikrobiyal [17], antiviral [18], antitümör [19], antikonvülsan [20], antihistaminik [21] ve antidepresan [22] birçok biyolojik aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur.

Pirazol karboksilik asitlerin sülfonamit türevlerinin, insan karbonik anhidraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmış (*in vitro* olarak) ve oldukça etkili sonuçlar elde edilmiştir [26-29]. Böylece bu tip bileşiklerin *in vivo* çalışmalar yapıldıktan sonra glokom hastalık tedavisinde de kullanılabileceği anlaşılmıştır. Ancak yapılan literatür taramalarına göre bizim çalışmamızda yeni sentezlenen bu bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi, toksisitesi ve DNA etkileşimi ile ilgili yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yeni sentezlemiş pirazol 3-karboksilli asit hidrazid, hidrazin ve üre türevlerinin *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* 25922, *E. coli* 35218, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *E. fecalis* bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri, *C. albicans* ve *C. tropicalis*'e karşı antifungal aktiviteleri ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir. Yine bu çalışmada sentezlenen pirazol 3-karboksilli asitin hidrazid, hidrazin ve üre bileşiklerinin toksisite deneyleri yapılmış, bileşiklerin toksik etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve LC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Son olarak DNA ile olan etkileşimleri tespit edilmiştir. Yeni sentezlenen pirazol türevlerinin biyoaktivitelerinin araştırıldığı bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiş ve bu sonuçlar diğer araştırmacıların bulgularıyla karşılaştırılarak detaylı bir şekilde tartışılmıştır.

Bizim çalışma sonuçlarımıza göre pirazol 3-karboksilli asitin hidrazid, hidrazin ve üre türevlerinin DMSO' lu çözeltilerinin önemli derecede antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve özellikle üre türevlerinin Gram (-) bakteriler üzerinde (*P. vulgaris*) yüksek derecede etki gösterdiği belirlenmiştir. Bileşiklerin çözücüsü olarak kullanılan saf DMSO' nun mikroorganizmalara karşı etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. MC2, MC8, MC10, MC11, MC12 ve AC3 bileşiklerinin test edilen konsantrasyon da çalışılan mikroorganizmalardan hiçbirine karşı etkili olmadığı belirlenmiştir. Test edilen bakteriler arasında Gram (-) bakterilerden *P. aeruginosa* ve *P. vulgaris*' e hidrazit ve hidrazin serisinden hiçbir bileşik inhibe edici etki göstermemiştir. Gram (+) bakterilerden *E. fecalis*' e karşı çalıştığımız hidrazit ve üre türevli bileşiklerin antimikrobiyal etkisi olmamıştır.

Pirazol 3-karboksilli asitin hidrazid türevlerinden MC3 ve MC7 Gram (-) bakterilerden *E. coli* 35218 ve *E. coli* 25922 bakterileri üzerinde etki göstermiştir. İnhibisyon zon çapı değerlerine (8.33 ± 0.58 mm) göre bu bileşiklerin daha az etkili olduğu söylenebilir. Test edilen 4 farklı Gram (+) bakteri arasından hidrazidlere karşı en hassas olan bakteriler *B.*

cereus, *B. subtilis* ve *S. aureus* iken, test edilen hidrazid türevli bileşiklerden hiçbirisi *E. fecalis*' e karşı etkili olmamıştır. Bu grubun en etkili bileşiğinin ise MC3 olduğu görülmüştür.

Pirazol 3-karboksilli asitin hidrazin türevi bileşikleri Gram (+) test bakterilerinin hepsine karşı aktivite göstermiş fakat Gram (-) test bakterilerine etkisi olmamıştır. Ayrıca test bileşiklerinin *C. albicans* ve *C. tropicalis* üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Gram (+) bakteriler arasında *E. fecalis* test organizmasına sırasıyla AC6 maddesi MİK= 1,25 mg ml⁻¹ ve AC14 maddesi MİK=0,625 mg ml⁻¹ etkili olurken, *B. cereus*' a AC6 bileşiği MİK= 5 mg ml⁻¹ ve AC14 bileşiği MİK= 0,625 mg ml⁻¹ doz seviyesinde etki göstermiştir. AC14 bileşiği diğer Gram (+) test bakterilerinden *B. subtilis* ve *S. aureus*' a karşı sırasıyla 0,625 mg ml⁻¹ ve 1,25 mg ml⁻¹ MİK değeri ile etkili olmuşlardır. Hidrazin türevli bileşiklerde yapılan sıralamaya göre en duyarlı Gram (+) test bakterisinin *B. cereus* ve *E. fecalis* olduğu görülmüştür. AC14 bileşiğinin *S. aureus* üzerinde oluşturduğu 14,33 ± 0,58 mm inhibisyon zon çapı ile en etkili bileşik olduğu belirlenmiştir.

Pirazol 3-karboksilli asitin üre türevlerinin büyük çoğunluğu Gram (+) bakterilerden daha çok Gram (-) bakterilere karşı yüksek antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Pirazol 3-karboksilli asitin üre türevlerinin hepsinin *P. vulgaris* üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Gram (+) bakteriler arasında *E. fecalis* hariç hepsi üzerinde etkili olmuştur. Ayrıca bileşiklerin mayalar üzerinde ise hiçbir antifungal etkisi gözlenmemiştir. Bu serideki bileşiklere karşı en hassas bakteriler *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *E. coli* 35218 ve *B. subtilis* olmuştur. K5 bileşiğinin *P. aeruginosa*' ya karşı MİK değeri 2,5 mg ml⁻¹, K6' nın *P. vulgaris*' e karşı MİK değeri 0,625 mg ml⁻¹, K1 bileşiğinin *E. coli* 35218' e karşı MİK değeri 1,25 mg ml⁻¹ ve K3' ün *B. subtilis*' e karşı MİK değeri 2,5 mg ml⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Akbaş "vd." [107] yeni sentezledikleri 1*H*-pirazol-3-karboksilik asit ve piridazinon türevlerinin antibakteriyel etkisini *B. cereus* ATCC 7064, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 4230 ve *P. putida* bakterileri üzerinde bileşikleri DMSO' da 5000 µg ml⁻¹ olacak şekilde çözdürerek tüp dilüsyon yöntemiyle tespit etmişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin hepsinin bakterilere karşı etkili olduğu ve özellikle N-[4-Benzoil-1-metil-5-fenil-1*H*-pirazol-3-karbonil]-N'-fenilüre bileşiğinin hem Gram (-) hem de Gram (+) bakteriler

üzerinde yüksek aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Test edilen bakterilerde *B. cereus* ATCC 7064' e karşı MİK değeri $620 \mu\text{g ml}^{-1}$ iken *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 4230 ve *P. putida*' ya karşı MİK değeri $310 \mu\text{g ml}^{-1}$ ' dir [107]. Bizim yaptığımız çalışmada sentezlenmiş MC3 bileşiği, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus* NRRL-B 37 ve *S. aureus* ATCC 25923 bakterilerine karşı sırasıyla 5000; 10000; 5000 ve $10000 \mu\text{g ml}^{-1}$ MİK değeri ile hem Gram (-) hem de Gram (+) bakteriler üzerinde etkili bulunmuştur. K5 bileşiği ise *B. cereus* NRRL-B 37' ye karşı MİK= $2500 \mu\text{g ml}^{-1}$, *S. aureus* ATCC 25923' e karşı MİK= $5000 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve *P. aeruginosa*' ya karşı MİK= $2500 \mu\text{g ml}^{-1}$ değeri ile hem Gram (-) hem de Gram (+) bakteriler üzerinde etkili bulunmuştur.

Mert “vd.” tarafından yapılan çalışmada [108] pirazol-3-karboksilik asit ve pirazol-3,4-dikarboksilik asit türevleri sentezlenmiştir. Bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri 5 bakteri ve 5 mantar üzerinde agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. Bileşiklerin çoğunun standart *C. albicans* ve klinik izolat *C. albicans* suşu üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda bileşiklerin *C. albicans* suşu için yapı- antifungal ilişkisi incelenmiş olup moleküllerin reaktif kısımlarının geometrik ve elektronik karakterlerinin bu antifungal etki üzerinde büyük rol oynadığını açıklamışlardır. Bu reaktif kısımlarının gelecekte daha güçlü antifungal ajanlar üretmek için kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Pirazol bileşiklerinin yapısında yer alan (F) ve (O) gibi elektronegatif atomların pozisyonlarının ve miktarlarının *C. albicans* için antifungal aktiviteyi düzenleyen çok önemli bir faktör olduğunu belirlemişlerdir. [108]. Bu çalışmadaki bileşiklerin umut verici özellikte oldukları nitelendirilirken bizim çalışmamızdaki bileşiklerin mayalara karşı herhangi bir antifungal aktivitesi tespit edilememiştir.

Abdel-Hafez “et al.” tarafından [109] nitrik oksit taşıyıcısı olan pirazol-3-karboksilik asit türevleri sentezlenmiş ve bileşikler nitrik oksit serbest bırakma, antibakteriyel ve antienflamatuar aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Hazırlanan bileşiklerin bazılarının siprofloksasine göre *E. coli* C-600, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *S. aureus* NCTC 6571' a karşı agar kuyucuk difüzyon metodu ile yüksek derecede antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sentezledikleri bileşiklerden 5d maddesi *S. aureus*' a karşı $50,50 \mu\text{g ml}^{-1}$ MİK değeri ve 11 nolu maddesi *P. aeruginosa*' ya karşı $1,29 \mu\text{g ml}^{-1}$ MİK değeri ile siprofloksasine göre çok yüksek derecede antimikrobiyal aktiviteye

sahip olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca 4f maddesinin *B. subtilis*' e karşı MİK= 1,45 µg ml⁻¹ değeri ve 9 nolu maddesinin *E. coli* C-600' e karşı MİK= 1,37 µg ml⁻¹ değeri ile siprofloksasine benzer derecede etki gösterdiğini bulmuşlardır [109]. Bizim çalışmamızda da pirazol-3-karboksilik asit türevlerinin MC2, MC8, MC10, MC11, MC12 ve AC3 dışındaki bileşiklerin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *S. aureus* üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. MİK= 1,25 µg ml⁻¹ değeri ile *E. coli* ATCC 25922' ye karşı en etkili bileşik K6, *E. coli* ATCC 35218' e karşı en etkili bileşik K1, *S. aureus*' a karşı en etkili bileşik AC14 bileşiği olarak belirlenmiştir. *B. subtilis*' e karşı en etkili bileşik MİK= 0,625 µg ml⁻¹ değeri ile AC14 bileşiği iken *P. aeruginosa*' ya karşı en etkili bileşik ise MİK= 2,5 µg ml⁻¹ değeri ile K5 bileşiği olmuştur.

Bandgar "et al." [110] sentezledikleri 1-(2,4-dimetoksi-fenil)-3-(1,3-difenil-1H-pirazol-4-yl)-propenon türevlerinin antimikrobiyal aktivitelerini agar difüzyon yöntemiyle incelemişlerdir. 100 µg ml⁻¹ konsantrasyonunda test edilen bileşiklerin çoğunun *E. coli*, *B. subtilis* ve *S. aureus*' a karşı etkili olduğunu, *P. vulgaris*' e ise karşı bazılarının etkili olduğunu bulmuşlardır. Pozitif kontrol olarak bakterilere karşı denedikleri Tetrasiklin' e (10 µg ml⁻¹ konsantrasyonunda inhibisyon zonu 17 mm) en yakın değeri *S. aureus*' a karşı 1-(2,4-dimetoksi-fenil)-3-[3-(4-fluoro-fenil)-1-fenil-1H-pirazol-4-yl]-propenon bileşiğinin (inhibisyon zonu 15 mm) gösterdiğini tespit etmişlerdir. Analiz verilerinden yaptıkları SAR (yapı aktivite ilişkisi) çalışmasına göre, yapısında elektron verici gruplar (OCH₃ > CH₃ > F > Br > Cl) bulunan bileşiklerin antimikrobiyal etkisinin arttığını belirtmişlerdir [110]. Bizim çalışmamızda sentezlenen pirazol-3-karboksilik asitin -CH₃ elektron verici grubunu içeren bileşiklerden MC5, K1 ve K5 bileşikler dikkati çekmektedir. MC5 bileşiği *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı 10000 µg ml⁻¹ konsantrasyonunda inhibisyon zonu 9,67 ± 0,58 mm olarak ölçülmüştür. Çalışmamızda -CH₃ içeren bileşiklerden K1 bileşiği, *P. vulgaris*, *E. coli* 35218 ve *P. aeruginosa*' ya karşı sırasıyla 1,25; 1,25; 5,0 mg ml⁻¹ MİK değeri, K5 bileşiği Gram (-) bakterilerden *P. vulgaris* ve *P. aeruginosa*, Gram (+) bakterilerden *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı sırasıyla 1,25; 2,5; 2,5; 5,0 mg ml⁻¹ MİK değeri ile antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bundan dolayı özellikle *P. vulgaris* üzerinde yüksek aktivite gösteren üre türevli bileşiklerin yapı - aktivite analizlerinin yapılması büyük önem taşımaktadır.

Aly "et al." çalışmalarında [111] 4-amino antipirin' in asetilasyonu ile mükemmel verimde 4-asetamid pirazolon sentezlemişlerdir. 4-asetamid pirazolon' u çeşitli

mikroorganizmalara karşı yüksek biyolojik aktivitesi bulunması beklenen antipirin parça içeren yeni heterohalkalı bileşiklerin bugüne kadar bilinmeyen farklı tiplerinin sentezi için bir başlangıç materyali olarak kullanmışlardır. Sonuç olarak bileşiklerin çoğunun Penisilin G ve Streptomisin ile karşılaştırıldığında Gram (-) bakterilerden *E. coli* ve *P. aeruginosa*' ya, Gram (+) bakterilerden *B. subtilis* ve *S. aureus*' a karşı etkili olduklarını bulmuşlardır. Çalışılan bileşiklerin yapı ve biyolojik aktivite ilişkisi değerlendirildiğinde yüksek antimikrobiyal aktivitenin 4-aminoantipirin halkası içeren nitrojen atomuna bağlanan tiyofen, klor grupları, $-\text{COCH}_3$ ve $-\text{CH}_3$ gibi biyolojik olarak aktif grupların ve pirazol grubunun varlığından kaynaklandığı belirtilmiştir [111]. Bizim yaptığımız çalışmada da $-\text{CH}_3$ içeren bileşiklerden MC5 bileşiği *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı 10 mg ml^{-1} MİK değeri; K1 bileşiği, *P. vulgaris*, *E. coli* 35218 ve *P. aeruginosa*' ya karşı sırasıyla 1,25; 1,25; 2,5 mg ml^{-1} MİK değeriyle; K5 bileşiği Gram (-) bakterilerden *P. vulgaris* ve *P. aeruginosa*' ya karşı, Gram (+) bakterilerden *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı sırasıyla 1,25; 2,5; 2,5; 5,0 mg ml^{-1} MİK değeri ile antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

İlaçların yan etkileri aslında toksik etkileridir. Kimyasal maddelerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu toksik etkiler akut ve kronik olarak gelişir. Bir maddenin akut toksisitesinin değerlendirilmesinde LC_{50} tayini sıklıkla başvurulmuş bir toksikoloji değerlendirme yöntemidir [64]. LC_{50} düzeyinin tespitinde kullanılan toksisite testlerinden olan *A. salina* toksisite testi farklı mikotoksinlere karşı geniş bir yelpazede duyarlılık gösterirler [65]. Bu larvalar, günümüzde biyolojik aktiviteleri araştırılan örneklerin sitotoksitelerinin tayininde, oldukça geniş bir şekilde kullanılmaktadır [66]. Toksisitenin öngörülmesi açısından kullanışlı bir testtir. Ayrıca fungal toksinlerin, bitkisel ekstraktların, ağır metallerin, siyanobakteri toksinlerinin, pestisitlerin ve diş hekimliğinde kullanılan bazı maddelerin sitotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır [65,67–75,112]. *A. salina* ile yapılan bu testin modifiye edilmiş şekli ile alınan sonuçlar, memeli hücre kültürleri ile yapılan toksisite testlerinde alınan sonuçlarla karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir [81]. Bizim çalışmamızda da bileşiklerin toksisitelerinin belirlenmesi için *A. salina* toksisite testi kullanılmıştır.

DMSO toksisite testinde test organizması olan *A. salina* larvası üzerine saf haldeyken toksik etkiye sahip olduğu Choudhary “et al.” tarafından (2001) bildirilmiştir [89]. Bu

nedenle çalışmaya başlamadan önce ön çalışma olarak Choudhary “et al.” bildirdiği oran olan 1 / 50 oranında seyreltme yapılarak DMSO’ nun organizmalar üzerinde gerçekten toksik etkisinin ortadan kalkıp kalkmadığı denenmiş ve sonuç beklendiği gibi olmuştur. Bu saflıkta DMSO’ nun test organizması üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediği ortaya konulmuştur.

Yeni sentezlenmiş 19 adet pirazol-3 karboksilik asit türevinin *A. salina* sitotoksik testi ile taranması sonucunda maddelerin hepsinin toksik olduğu anlaşılmıştır. Yapılan toksisite çalışmaları; pirazol 3-karboksilli asit hidrazit türevi bileşiklerden *A. salina*’ ya karşı en etkili olanı 14,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LC_{50} değeri ile MC12 ve 26,69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LC_{50} değeri ile MC10 bileşiklerinin olduğu görülmüştür. MC4 ($\text{LC}_{50}=83,30 \mu\text{g mL}^{-1}$) ile aynı R grubuna sahip olan MC10 bileşiğinin ana iskelet yapısına NO_2 grubunun eklenmesinin toksik etkiyi artırıcı yönde etki ettiği görülmektedir. Hidrazit grubundaki türevlerin diğer yandan bileşiklerin pirazolin halka sistemi üzerindeki grup değişikliklerinin toksisiteye katkısının olduğu gözlenmiştir. Aynı yan grupları taşıyan MC3 ile MC4 karşılaştırması yapıldığında ana iskelete farklı konumdaki C atomlarından bağlanması bile toksisite değerini önemli ölçüde değiştirmiştir. MC5 ve MC11 bileşiklerinde de yine yan gruplar olmasına karşın MC5’ e NO_2 grubunun eklenmesi toksisite değerinde önemli ölçüde bir değişim olmuştur. Grubun tüm üyelerinin toksik olmasına karşın aralarında yapılan ufak değişikliklerle toksisitenin ne kadar değiştiği gözden kaçmayacak değerdedir.

Pirazol 3-karboksilli asit hidrazin türevinde ise AC3, AC6 ve AC14 bileşikleri için sırasıyla 60,547 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LC_{50} , 84,094 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LC_{50} ve 45,866 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LC_{50} değeri bulunmuştur. Hidrazin serisinin en yüksek toksik değeri olan 45,866 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LC_{50} değeri ile AC14 ve en düşük toksik değeri olan 84,094 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LC_{50} değeriyle AC6 bileşikleri karşılaştırıldığında her ikisinin Fenil Nitro yan grubu taşıdığı görülmektedir. Ancak AC6’da yan grup orto (o) pozisyonundan, AC14’de ise para (p) pozisyonundan pirazol halkasına bağlanmıştır. Bu farklılıkta sitotoksik etkinin değişmesine neden olmaktadır.

K3, K4 ve K6 ise aynı grubun diğer bileşiklerine göre daha toksik değerde bulunmuştur. Bu bileşiklerin de LC_{50} değerleri sırasıyla 13,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 14,88 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve 21,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ana iskelete fenil (K3), etil tiyo (K4) ve metil (K6) gruplarının eklenmesinin toksik etkiyi artırıcı yönde olduğu belirlenmiştir. K1 ve K2 bileşikleri

sırasıyla 52,13 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LC_{50} ve 49,93 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LC_{50} değeri ile birbirine yakın toksik değerde bulunmuştur.

Ahasan ve İslam [113] yaptıkları çalışmada pirazolin heterosiklik bileşikler sentezlemişler ve 'Brine shrimp lethality bioassay' yöntemi ile toksisitelerini belirlemişlerdir. Sentezledikleri bileşikler içerisinde en etkili olanların IC_{50} değerlerini 19.50 ve 20 ppm olarak belirlemişlerdir. Bileşiklerin yapı-aktivite ilişkilerinin belirlenmesi ile pirazol halkasının 4. konumunda bağlı metilen ($>\text{CH}_2$), karbonil ($>\text{C}=\text{O}$) ve imin ($>\text{C}=\text{N}-$) gibi fonksiyonel grupların sitotoksik etkiden sorumlu olduklarını belirlemişlerdir [113]. Bizim çalışmamızda kullanılan bileşiklerinde yapı-aktivite analizlerinin yapılması ile sitotoksik etkilerinin kesin olarak belirleneceği kanaatindeyiz. Devneath ve İslam [114] yaptıkları çalışmada siprofloksasinden pirazol halka uzantısı taşıyan pirazolon ve hidrazin türevleri sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin sitotoksik etkileri *A. salina* toksisite testi ile belirlenmiş ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bileşiklerin hepsinin toksik etkiye sahip olduğunu siprofloksasin'den daha potansiyel sitotoksik aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. En yüksek toksik etkiye sahip bileşiğin IC_{50} değerini 0.019 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir [114]. Yapmış olduğumuz çalışma ile sentezlenen pirazol-3 karboksilik asit türevlerinin hepsinin toksik olduğu belirlenmiştir.

Azol türevi bileşiklerin yapılan mikrobiyal geri mutasyon testleri, *in vitro* ve *in vivo* kromozom aberasyon çalışmaları ve genetik toksisite çalışmaları sonucunda oldukça düşük düzeylerde mutajenite gösterdiği tespit edilmiştir [115]. Azol türevi bileşiklerin memeliler üzerinde yapılmış akut toksisite testlerinde, toksisite düzeylerinin çok toksikten toksik olmayana kadar geniş bir aralığa yayıldığı ve genelde düşük düzeylerde toksik oldukları gösterilmekle birlikte; bu verilerin, diğer türevler içinde geçerli olabileceğine dair bir ilişki kurulabileceği vurgulanmıştır [115]. Bu durum bizim çalışmamızda test edilen maddelerin pratikte kullanım için uygun olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan DNA etkileşim çalışmaları sonucunda pirazol 3-karboksilli asit hidrazid türevi bileşiklerden MC2' nin DNA' nın yapısını bozucu etkisi olmamıştır. MC1 ve MC3

bileşiğinin yüksek konsantrasyonlarda plazmit DNA' nın süper sarmal (Form I) ve gevşek sarmal (Form II) yapısı üzerinde etkisi olduğu ve güçlü bir gevşeme göstererek yapıyı bozduğu görülmüştür. MC4 ve MC5' in yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA' nın süper sarmal Form I yapısının yoğunluğunda azalma olmuştur. Form II yapısının güçlü bir gevşeme göstererek bozulduğu ve doğrusal DNA yapısının meydana geldiği görülmüştür. MC7' nin yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA' nın süper sarmal Form I yapısının açılarak Form II yapısına dönüştüğü, yoğunluğunun ve hareketliliğinin azaldığı belirlenmiştir. MC8, MC10, MC11 ve MC12 yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru gidildikçe Form I yapısının açılarak yoğunluğunun azaldığı ve Form II yapısının yoğunluğunda artış olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda MC12' nin DNA ile etkileşimi sonucunda Form III yapısının oluştuğu gözlenmiştir.

DNA etkileşim çalışmaları sonucunda pirazol 3-karboksilli asit hidrazin türevi bileşiklerden AC3' ün DNA' ya hiç etkisinin olmadığı görülmüştür. AC6 ve AC14 yüksek konsantrasyonlarında plazmit DNA' nın Form I ve Form II yapısının tamamen bozulduğu, düşük konsantrasyonlarda ise Form I ve Form II yapısının korunduğu görülmüştür.

DNA etkileşim çalışmaları sonucunda pirazol 3-karboksilli asit üre türevi bileşiklerden K1, K2 ve K5' in DNA ile herhangi bir etkileşiminin olmadığı belirlenmiştir. K3' ün yüksek konsantrasyonlarda plazmit DNA ile etkileşimi sonucunda süpersarmal Form I yapısının tamamen parçalandığı, Form II yapısının yoğunluğunun arttığı ve Form III yapısının oluştuğu belirlenmiştir. Plazmit DNA' nın K4 bileşiği ile muamele edilmesi sonucunda Form I' in hareketinde kontrole göre gecikme olduğu tespit edilmiştir. K6 bileşiğinin plazmit DNA ile etkileşimi sonucunda yüksek konsantrasyonlarda Form I DNA yoğunluğunda azalma olurken Form II yoğunluğu artmıştır.

Dairesel plazmit DNA elektroforezle yürütüldüğünde, hızlı hareket eden bant süpersarmal formu (Form I) gözlenecektir. Eğer bir iplikçik parçalanır ise süpersarmal formu rahatlayacak ve yavaş hareket eden açık dairesel (Form II) oluşacaktır. Eğer her iki şerit bölünmüş ise, Form I ve Form II arasında, doğrusal bir form (Form III) gözlenecektir. Kısacası; DNA' daki kırıklar, süper sarmal halkasal form DNA' nın

gevşemesi sonucu, gevşek sarmal form ve doğrusal forma dönüşmesiyle kontrol edilir [116-120].

Kimyagerler 30 yılı aşkın süredir doğadan ilham alarak farklı prensipler geliştirerek, çift sarmal DNA üzerinde rastgele herhangi bir yere bağlanabilen bileşikler sentezleyebilmişlerdir [82-84].

Kumar “et al.” [85] yaptıkları çalışmalarında, indol türevi bileşiklerin DNA molekülleri ile etkileşime girdikleri ve her eklemenden sonra DNA’ nın floresan yoğunluğunda azalma olduğunu gözlemişlerdir. Bu alkaloidlerde güçlü bir DNA bağlama etkisi gözlenmiştir. Reaksiyon karışımı, ligandlar ve miktarı arttıkça, bandın yoğunluğu da artmıştır. Bizim çalışmamızda da sentezlenen bileşiklerin DNA ile etkileşime girerek yoğunluğunda azalmalara neden olduğu belirlenmiştir.

Raman ve Sobha [87] yaptığı çalışmada, AH2 (askorbik asit) varlığında, metal (II) komplekslerinin ilave edilmesiyle uyarılan plazmit pUC19 DNA’ nın, jel elektroforez sonucunda bölünme-parçalanma gösterdiğini açıklamışlardır. pUC19 DNA, metal kompleks ve askorbik asit karışımları ile etkileşime bırakıldığında, bandın hareketinin açıkça arttığı görülmüştür.

Naik “et al” pirazol türevi bileşiklerin süpersarmal pUC19 plazmidi ile olan etkileşimini çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada bileşiklerin plazmit ile etkileşimi sonucunda DNA’ nın yapısının bozulduğu ve bileşiğin artan konsantrasyonlarına bağlı olarakta spektral absorbansta değişimler olduğunu gözlemlemişlerdir [91]. Yapmış olduğumuz çalışmada konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA yapısının daha etkili bir şekilde bozulduğu belirlenmiştir.

DMF içerisinde çözünen pirazol köprülü iki çekirdekli geçiş metali kompleksleri *E. coli*’ nin genomik DNA’ sı ile 2 saat 37 °C’ de inkübasyona bırakılmış ve agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Çalışma sonucunda bazı metal kompleksli pirazollerin DNA’ ya interkalar olarak bağlandığı ve DNA yapısında değişikliğe neden olduğu belirlenmiştir [93]. Yapmış olduğumuz çalışma kapsamında pirazol-3 karboksilik asit türevlerinin bir çoğunun DNA’ ya bağlanma özelliği gösterdiği ve yapısında değişiklikler oluşturduğu belirlenmiştir. Etkili olan her bir bileşikte halkasal yapının bozularak doğrusal DNA yapısının oluştuğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak; pirazol türevi bileşikler geniş spektrumlu biyolojik aktiviteleri ve yapısal farklılıklarından dolayı yeni ilaçların keşfinde önemli bileşikler olarak yer alacaklardır. Bu öncül çalışma pirazollerin özellikle DNA ile olan etkileşimlerinin araştırılmasını teşvik edicidir. Aynı zamanda pirazol temelli bileşiklerin etki mekanizması, özgünlük ve seçiciliğinin incelenmesi gerekmektedir. Bu çalışmalar ışığında pirazol türevlerinin ilaç olma potansiyellerinin daha iyi anlaşılabilmesi için, biyolojik aktivite ve fizikokimyasal özellikleri arasındaki ilişkiyi tanımlamak için ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir.

Ayrıca çalışma sonuçlarının eczacılık başta olmak üzere birçok alanda sentezi kolay ve verimi yüksek yeni bileşiklerin kullanılmasına yönelik yapılacak olan diğer çalışmalara katkı sağlayacağına inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Berber, I., Cokmus, C., Atalan, E., 2003. Characterization of *Staphylococcus* species by SDS-PAGE of whole-cell and extracellular proteins. **Microbiology**, **72** (1): 54–59.
2. Mitscher, L. A., Pillai, S. P., Gentry, E. J., Shankel, D. M., 1999. Multiple drug resistance. **Medicinal Research Reviews**, **19** (6): 477-496.
3. Joule, J. A., Mills, K., Smith, G. F., 1995. Heterocyclic Chemistry, Third Edition, Chapter 22. Chapman & Hall, London, UK., 402-405.
4. Wiley, R. H., 1967. Pyrazoles, pyrazolines, pyrazolidines, indazoles and condensed rings, pp. 180-278. *In*: The Chemistry of Heterocyclic Compounds (Eds. A. Weissberger). Interscience Publishers, New York.
5. Elguero, J., 1984. pp. 167-302. *In*: Comprehensive heterocyclic chemistry, (Eds. A.R. Katritzky, C.W. Rees). Pergamon Pres, 5, Oxford.
6. Elguero, J., Goya P., Jagerovic, N., Silva, A.M.S., 2002. Targets in heterocyclic systems. **Italian Society of Chemistry**, **6**: 52-98.
7. Eicher, T., Hauptmann, S., 2003. The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Synthesis and Applications. Wiley-VCH Books, Weinheim, 179 pp.
8. Sener, A., Kasımoğlu, R., Sener, M., Bildirici, K., Akçamur, Y., 2002. Studies on the reactions of cyclic oxalyl compounds with hydrazines or hydrazones: Synthesis and reactions of 4-benzoyl-1-(3-nitrophenyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid, **Journal of Heterocyclic Chemistry**, **39** (5): 869-875.
9. Çağlayan, A., 2011. Bazı Pirazol-3-Karboksilli Asit Klorürlerinin Çeşitli Hidrazin ve Amidlerle Reaksiyonları. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 101 s.
10. Demirkol, K., 2011. Bazı Pirazol-3-Karboksilli Asit Klorürlerinin Çeşitli Ürelerle Reaksiyonları. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 86 s.
11. Çadır, M., 2011. Bazı Pirazol-3-Karboksilli Asit Klorürlerinin Çeşitli Hidrazidlerle Reaksiyonları. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 104 s.

12. Yılmaz, E. M., 2008. Axially chiral N-(O-aryl)-2-thioxo-oxazolidine-4-one and rhodanine Derivatives, Enantiomeric Separation and Determination of Racemization Barriers. Boğaziçi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri, İstanbul, 143 s.
13. Yurtseven, L., 2014. Bazı Rodanin Türevlerinin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 74 s.
14. Aygan, Ö. Ö. T., 2010. Pirazol ve Türevleri Üzerine Kuantum Kimyasal Çalışmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 89 s.
15. Tewari, A. K., Mishra, A., 2001. Synthesis and anti-inflammatory activities of N4,N5-disubstituted-3-methyl- H-pyrazolo[3,4-c]pyridazines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **9** (3): 715-723.
16. Wiley, R. H., Wiley, P., 1964. Pyrazolones, pyrazolidones and derivatives. Interscience Publishers, John Wiley and Sons, New York, 558 pp.
17. Pimerova, E. V., Voronina, E. V., 2001. **Journal Pharmaceutical Chemistry**, **35**: 18–20.
18. Janus, S. L., Magdif, A. Z., Erik, B. P., Claus, N., 1999. Synthesis of triazenopyrazole derivatives as potential inhibitors of HIV-1. **Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly**, **130**: 1167-1173.
19. Park, H. J., Lee, K., Park, S., Ahn, B., Lee, J. C., Cho, H. Y., Lee, K. I., 2005. Identification of antitumor activity of pyrazole oxime ethers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **15** (13): 3307-3319.
20. Michon, V., Du Penhoat, C. H., Tombret, F., Gillardin, J. M., Lepagez, F., Berthon, L., 1995. Preparation, structural analysis and anticonvulsant activity of 3- and 5-aminopyrazole N-benzoyl derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **30** (2): 147-155.
21. Yildirim, I., Özdemir, N., Akçamur, Y., Dinçer, M., Andaç, O., 2005. 4-Benzoyl-1,5-diphenyl-1H-pyrazole-3- carboxylic acid methanol solvate. **Acta Crystallographica Section E**, **61**: 256-258.
22. Bailey, D. M., Hansen, P. E., Hlavac, A. G., Baizman, E. R., Pearl, J., Defelice, A. F. and Feigenson, M. E., 1985. 3,4-Diphenyl-1H-pyrazole-1-propanamine antidepressants. **Journal of Medicinal Chemistry**, **28** (2): 256-260.

23. Hanson, G. A., 1958. 1-Phenyl, 2-pyrazolines substituees. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, **67** (11–12): 707–711.
24. Neunhoeffter, O., Alsdorf, G., Ulrich, H., 1959. Hyperkonjugation und fluoreszenzverhalten, **Chemische Berichte**, **92** (1): 252–255.
25. Baroni, E. E., Kovyrzina, K. A., 1961. Synthesis of luminescent heterocyclic compound. **Zhurnal Obshchei Khimii**, **31**: 1641–1643.
26. Kasimogullari, R., Bulbul, M., Mert, S., Guleryuz, H., 2011. Synthesis of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives and their inhibition effects on human carbonic anhydrase isozymes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, **26** (2): 231–237.
27. Kasımoğulları, R., Bulbul, M., Arslan, B. S., Gokce, B., 2010. Synthesis, characterization and antiglaucoma activity of some novel pyrazole derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **45** (9): 4769–4773.
28. Kasımoğulları, R., Bulbul, M., Gunhan, H., Guleryuz, H., 2009. Effects of new 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives on human carbonic anhydrase isozymes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **17** (11): 3295–3301.
29. Bulbul, M., Kasimogullari, R., Kufrevioglu, O. I., 2008. Amide derivatives with pyrazole carboxylic acids of 5-amino-1,3,4-thiadiazole 2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibitory effects. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, **23**(6): 895–900.
30. Halcrow, M. A., 2005. The synthesis and coordination chemistry of 2,6 bis (pyrazolyl) pyridines and related ligands-Versatile terpyridine analogues. **Coordination Chemistry Reviews**, **249** (24): 2880–2908.
31. Dias, L. R. S., Alvim, M. J., Freitas, A. C. C., Barreiro, E. J., Miranda, A. L. P., 1994. Synthesis and analgesic properties of 5-acyl-arylhydrazone 1-H pyrazolo [3,4-b] pyridine derivatives. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, **69** (3): 163–169.
32. Anandarajagopal, K., Sunilson, J. A. J., Illavarasu, A., Thangavelpandian, N., Kalirajan, R., 2010. Antiepileptic and antimicrobial activities of novel 1 (unsubstituted/substituted)-3,5-dimethyl-1H-pyrazole derivatives. **International Journal of ChemTech Research**, **2** (1): 45–49.
33. Sugiura, S., Ohno, S., Ohtani, O., Izumi, K., Kitamikado, T., Asai, H., Kato, K., 1977. Syntheses and antiinflammatory and hypnotic activity of 5-alkoxy-3-(N-

- substituted carbamoyl)-1- phenylpyrazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, **20** (1): 80-85.
34. Behr, L. C., Fusco, R., Jarboe, C. H., 1967. The Chemistry of heterocyclic compounds, pyrazoles, pyrazolines, pyrazolidines, indazoles and condensed rings. John Wiley & Sons, New York, 81 p.
 35. Palwinder, S., Kamaldeep, P., Wolfgang, H., 2006. Synthesis of pyrazole-based hybrid molecules: search for potent multidrug resistance modulators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **14** (14): 5061-5071.
 36. Padmaja, A., Payani, T., Reddy, G. D., Padmavathi, V., 2009. Synthesis, antimicrobial and antioxidant activities of substituted pyrazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **44** (11): 4557– 4566.
 37. Farghaly, A. M., Soliman, R., Khalil, M. A., Bekhit, A. A., El-Din, A., Bekhit A., 2002. Thioglycolic acid and pyrazole derivatives of 4(3H)-quinazolinone: synthesis and antimicrobial evaluation. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, **141** (5): 372-378.
 38. Moedritzer, K., Allgood, S. G., Charumilind, P., Clark, R. D., Gaede, B. J., Kurtzweil, M. L., Mischke, D. A., Parlow, J. J., Rogers, M. D., Singh, R. K., Stikes, G. L., Webber, R. K., 1992. Novel pyrazole phenyl ether herbicides. **American Chemical Society**, **504** (15): 147-160.
 39. White, G. A., Phillips, J. N., Huppatz, J. L., Witzens, B., Grant, S. J., 1986. Pyrazole carboxanilide fungicides: I. Correlation of mitochondrial electron transport inhibition and anti-fungal activity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, **25** (2): 163-168.
 40. Londershausen, M., 1996. Approaches to new parasiticides. **Pesticide Science**, **48** (4): 269-292.
 41. Lubs, H. A., 1970. The Chemistry of Synthetic Dyes and Pigments, American Chemical Society, Hafner Publishing Company, Washington, 734 p.
 42. Garcia, H., Iborra, S., Miranda, M. A., Morera, I. M., Primo, J., 1991. Pyrazoles and isoxazoles derived from 2-hydroxyaryl phenylethynyl ketones: Synthesis and spectrophotometric evaluation of their potential applicability as sunscreens. **Heterocycles**, **32** (9): 1745-1755.

43. Elhaik, J., Kinler, C. A., Halcrow, M. A., 2006. Structural diversity in iron(II) complexes of 2,6-di(pyrazol-1-yl)pyridine and 2,6-di(3-methylpyrazol-1-yl)pyridine. **Dalton Transactions**, (6): 823-830.
44. Ehrlich, H. W. W., 1960. The crystal and molecular structure of pyrazole, **Acta Crystallographica**, **13** (11): 946-952.
45. Berthou, J., Elguero, J., Rerat, C., 1970. Affinement de la structure cristalline du pyrazole. **Acta Crystallographica, Section B**, **26** (11): 1880-1881.
46. Schofield, K., Grimmett, M. R., Kene, B. R. T., 1976. The Azoles. Cambridge University Press, Cambridge, 257 p.
47. Goddard, R., Claramunt, R. M., Escolastico, C., Elguero, J., 1999. Structures of NH-pyrazoles bearing only C-methyl substituents: 4-methylpyrazole is a hydrogen-bonded trimer in the solid (100 K). **New Journal of Chemistry**, **23** (2): 237-234.
48. Baldy, A., Elguero, J., Faure, R., Pierrot, M., Vincent, E. J., 1985. Dynamic intermolecular tautomerism of 3,5-dimethylpyrazole in the solid state by carbon-13 CP/MAS NMR spectroscopy and x-ray crystallography. **American Chemical Society**, **107** (18): 5290-5291.
49. Infantes, L., Foces-Foces, C., Elguero, J., 1999. 3(5),4-Dimethyl- and 3,4,5-trimethylpyrazole at 200 K. X-ray crystallography and quantum-chemical analysis. **Acta Crystallographica Section B**, **55** (3): 441-447.
50. Kurtaran, R., Hopa, Ç., Alkan, M., Kara, H., 2010. 3,4,5-trimetilpirazolün Sentezi. 100K'de Tek Kristal X-Işınları Yapısı ve Termal Özellikleri. **SDU Journal of Science (E-Journal)**, **5** (2): 200-210.
51. Chornous, V. A., Bratenko, M. K., Vovk, M. V., Sidorchuk, I. I., 2001. **Journal Pharmaceutical Chemistry**, **35**: 26-28.
52. Akçamur, Y., Penn, G., Ziegler, E., Sterk, H., Kollenz, G., Peters, K., et al., 1986. Zur reaktion von 4-benzoyl-5-phenyl-furan-2,3-dion mit phenylhydrazonen bzw. phenylhydrazin. **Monatshefte für Chemie**, **117**: 231-245.
53. Akçamur, Y., Sener, A., Ipekoglu, A. M., Kollenz, G., 2009. Functionalization and cyclization reactions of 4 - benzoyl - 1,5 - diphenyl - 1H - pyrazole - 3 - carboxylic acid. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, **34** (1): 221-224.

54. Akbaş, E., Berber, İ., 2005. Antibacterial and antifungal activities of new pyrazolo[3,4 d] pyridazin derivatives, **European Journal of Medicinal Chemistry, 40**: 401–405.
55. Bilgehan, H. S., 1981. Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Ege Üniversitesi Matbaası, Barış Yayınları, Bornova, İzmir, 533 s.
56. Akgün, H., Balkan, A., Bilgin, A. A., Çalış, U., Dalkara, S., Erdoğan, H., Erol; D. D., Ertan, M., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç, S., Şafak, C., 2000. Farmasötik Kimya. Cilt II, Irmak Matbaası, Ankara, 991-1000 s.
57. Çaylı, N., 2000. Bazı Kimyasal Maddelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, 44 s.
58. Bökesoy, T.A. Çakıcı, I., Melli, M., 2000. Farmakoloji Ders Kitabı. Türk Farmakoloji Derneği, Gazi Kitabevi, 521-635 s.
59. Levinson, W., Jawetz, E., 1997. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji (Mikrobiyoloji Çeviri Kurulu ; Dündar, I. H., Erken, E., Kılıç, B., Memişoğlu, H. R., Özcan, K., Özgünen, T., Yarkın, F.). Barış Kitabevi, İstanbul, 592 s.
60. Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Göral, G., Helvacı, S., 1992. Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji. Onur Yayıncılık, Bursa, 20- 27 s.
61. Kayaalp, S. O., 2000. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd.Şti., Ankara, 397 s.
62. Beşe, M., 1989. Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri. Kardeşler Basımevi, İstanbul, 133 s.
63. Foster, W. J., Woodruff, H. B., 1943. Microbiological aspects of penicillin: I. Methods of assay. **Journal of Bacteriology, 46**: 187–202.
64. Dökmeci, I., 1994. Toksikoloji–Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Baskı, İstanbul, 547 s.
65. Harwig, J., Scott, P. M., 1971. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larva as a screening system for fungal toxins. **Journal of Applied Microbiology, 21**: 1011-1016.
66. Choudhary, I. M., Thomsen, W. J., Rahman, A., 2001. Bioassay Techniques For Drug Development, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 236 s.
67. Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. M., Gupta, M. P., Phillipson, J. D., 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Plant Media, 59**: 250-252.

68. Mc Lauglin, J. L., Chang, C. J., Smith, D. L., 1991. Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update, studies in natural products chemistry, 383-409. *In: (Edited by: AU Rahman). Elsevier, Amsterdam.*
69. Ulusoylu, M., Soyoğul, U., Gürkan, E., Tuzlacı, E., 2000. *Centaurea iberica* bitkisinin biyolojik aktivite tayinleri, 287-290. *XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (20-22 Eylül, 2000, İstanbul) Bildiri Kitabı*, **670** (17): 298 s.
70. Martinez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A., Diaz-mayans, J., 1998. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenetica*. **Aquaculture**, **172**: 315-325.
71. Jaki, B., Orjala, J., Bürji, H. R., Sticher, O., 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality and cytotoxicity. **Pharmaceutical Biology**, **37**: 138-143.
72. Barahona, M. V., Sacher-fortun, S., 1999. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, **104**: 469-476.
73. Pelka, M., Danzl, C., Distler, W., Petschelt, A., 2000. A new screening test toxicity testing of dental materials. **Journal of Dental Research**, **28**: 341-345.
74. Gürkan, E., Tüzün, O. T., Hırlak, F., Sarıyar, G., 2000. Bazı Papaver alkaloidlerinin Brine shrimp yöntemiyle sitotoksisite tayinleri, 66 s. *XII.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (20-22 Mayıs 1998, Hacettepe, Ankara) Bildiri Kitabı*, **670** (17).
75. Uğur, M. S., Gürkan, E., Tuzlacı, E., 2000. İstanbul çevresinde yetişen bazı bitkilerin fibrinolitik etkileri, 68 s. *XII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı(20-22 Mayıs 1998, Hacettepe, Ankara) Bildiri Kitabı*, **670** (17).
76. Sleet, R. B., Brendel, K., 1983. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **7**: 435-446.
77. Sanchez-fortun, S., Sanz, F., Barahona, M. W., 1996. Acute toxicity of several organophosphorous insecticides and protection by cholinergic antagonists and 2-PAM on *Artemia salina* larvae. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, **31** (3): 391-398.

78. Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G., Didelupis, G. D., 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. **Water Research**, **31**: 1801-1806.
79. Calleja, M. C., Persoone, G., 1992. Cyst-based toxicity tests IV. The potential of ecotoxicological tests for the prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme. The **ATLA Religion Database®**, **20**: 396-405.
80. Lagarto, P. A., Silva, Y. R., Guerra, S. I., Iglesias, B. L., Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LC₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts, 2001. **Drug Research and Development Center (CIDEM)**, Biologic Research Department, Ciudad de La Habana, Cuba, 395-400.
81. Lewan, L., Andersson, M., Morales-gomez, P., The use of *Artemia salina* in toxicity testing, 1992. The **ATLA Religion Database®**, **20**: 297-301.
82. Nielsen, P. E., 1991. Sequence-selective DNA recognition by synthetic ligands. **Bioconjugate Chemistry**, **2**: 1-12.
83. Devran, P. B., 1992. **Nature**, **359**: 87.
84. Helene, C., 1993. Sequence- selective recognition and cleavage of double-helical DNA. **The Current Opinion in Biotechnology**, **4**: 29-36.
85. Kumar, S., et al., 2012. Structural studies on ligand–DNA systems: A robust approach in drug design. **The Journal of Biosciences**, **37** (3): 553–561.
86. Shahabadi, N., et al., 2010. DNA binding and DNA cleavage studies of a water soluble cobalt(II) complex containing dinitrogen Schiff base ligand: The effect of metal on the mode of binding. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **45** (9): 4239-4245.
87. Raman, N., Sobha, S., 2012. Inspired research on the DNA binding ability of 4-aminoantiprine derived mixed ligand complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, **17**: 120–123.
88. Xiao Feng He et al., 1998. Synthesis, characterization and DNA binding study of Co(III) polypyridyl mixed-ligand complexes. **Polyhedron**, **17** (18): 3161-3166.
89. Fairley, T. A., Tidwell, R. R., Cory, M. J., et.al., 1993. Synthesis and antibacterial evaluation of certain quinolone derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, **36**: 1746–1753.

90. Gopal, M., Shahabuddin, M. S., et.al., 2002. Interaction between an 8-methoxy pyrimido[4',5' :4,5] thieno (2,3-*b*)quinoline-4(3H)one antitumour drug and deoxyribonucleic acid. **Indian Academy of Sciences (Chemical Science)**, **114**: 687–696.
91. Naik, H. S., et.al., (2008). Synthesis and DNA binding studies of novel heterocyclic substituted quinoline schiff bases: A potent antimicrobial agent. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **27** (10-11): 1197-1210 pp.
92. Sharath, N., Bhojya Naik, H. S., Vinay Kumar, B., Hoskeri, J., 2011. Antibacterial, molecular docking, DNA binding and photocleavage studies on novel heterocyclic pyrazoles. **British Journal of Pharmaceutical Research**, **1** (2): 46-65.
93. Kulkarni, N. V., Kamath, A., Budagumpi, S., Revankar, V. K., 2011. Pyrazole bridged binuclear transition metal complexes: Synthesis, characterization, antimicrobial activity and DNA binding/cleavage studies. **Journal of Molecular Structure**, **1006**: 580–588.
94. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C., 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott-Raven Publishers, 5th. Edition, Philadelphia, USA, 856-870 pp.
95. Fishbein, M. C., Meerbaum, S., Rondo, U., Kanmatsuse, K., Mercier, J. C., Corday, E., Ganz, W. 1981. Early faz acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. **American Heart Journal**, **101**: 593-600.
96. Klein, H. H., Puschmann, S., Schaper, W., 1981. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. **Virchows Archiv A**, **393** (3): 287-297.
97. Vanden-Berge, D. A., Vlietinck, A. J., 1991. Screening methods for antimicrobial and antiviral agents from higher plants, pp. 37-53. *In: Methods in Plant Biochemistry*. (Eds: Harborne, J. B., Dey, P. M.). Academic Press, London, England.
98. Eloff, J. N., 1998. A Sensitive quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, **64**: 711-713.

99. Karael, C., 2006. Yeni Sentezlenmiş Bazı Pirazolin Eklenmiş Triazaol Türevlerinin Antimikrobiyal Aktivite ve Toksisitelerinin Belirlenmesi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 67 s.
100. Martins, M. A. P., Pereira, C. M. P., Beck, P., Machado, P., Teixeira, M. V. M., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., 2003. Microwave-assisted synthesis of 5-trichloromethyl substituted 1-phenyl-1*H*-pyrazoles and 1,2-dimethylpyrazolium chlorides. **Tetrahedron Letters**, **44**: 6669-6672.
101. Rosiere, C. E., Grossman, M. I., 1951. An analog of histamine that stimulates gastric acid secretion without other actions of histamine. **Science**, **113**: 651.
102. Stauffer, S. R., Coletta, C. J., Tedesco, R., Nishiguchi, G., Carlson, K., Sun, J., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., 2000. Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-selective agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, **43** (26): 4934 -4947.
103. Siddall, T. L., Ouse, D. G., Benko, Z. L., Garvin, G. M., Jackson, J. L., McQuiston, J. M., Ricks, M. J., Thibault, T. D., Turner, J. A., VanHeertum, J. C., Weimer, M.R., 2002. Synthesis and herbicidal activity of phenyl-substituted benzoylpyrazoles. **Pest Management Science**, **58**: 1175–1186.
104. Ergenç, N., Gürsoy, A., Ateş, O., 1997. Farmasötik Kimya Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, **43**: 275 s.
105. Turan-Zitouni, G., Özdemir, A., Güven, K., 2005. Synthesis of some 1- [(N,N-disubstitutedthiocarbamoylthio)acetyl]-3-(2-thienyl)-5-aryl-2-pyrazoline derivatives and investigation of their antibacterial and antifungal activities. **Archiv der Pharmazie-Pharmaceutical and Medicinal Chemistry**, **338** (2-3): 96-104.
106. Turan-Zitouni, G., Kaplancıklı, Z. A., Yıldız, M. T., Chevallet, P., Kaya, D., 2005. Synthesis and antimicrobial activity of 4- phenyl/cyclohexyl-5-(1-phenoxyethyl)-3-[N-(2-thiazolyl)acetamido] thio - 4*h*-1,2,4 -triazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **40**: 607- 613.
107. Akbas, E., Berber, İ., Sener, A., Hasanov, B., 2005. Synthesis and antibacterial activity of 4-benzoyl-1-methyl-5-phenyl-1*H*-pyrazole-3 carboxylic acid and derivatives. **IL FARMACO**, **60**: 23–26.
108. Mert, S., Kasımoğulları, R., İça, T., Çolak, F., Altun, A., Ok, S., 2014. Synthesis, structure-activity relationships, and in vitro antibacterial and antifungal activity

- evaluations of novel pyrazole carboxylic and dicarboxylic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **78**: 86-96.
109. Abdel-Hafez, El-Shimaa M. N., Abuo-Rahma, Gamal El-Din A. A., Abdel-Aziz, M., Radwan, M. F., Farag, H. H., 2009. Design, synthesis and biological investigation of certain pyrazole-3-carboxylic acid derivatives as novel carriers for nitric oxide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **17**: 3829–3837.
 110. Bandgar, B. P., Gawande, S. S., Bodade, R. G., Gawande, N. M., Khobragade, C. N., 2009. Synthesis and biological evaluation of a novel series of pyrazole chalcones as anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **17**: 8168–8173.
 111. Aly, H. M., Saleh, N. M., Elhady, H. A., 2011. Design and synthesis of some new thiophene, thienopyrimidine and thienothiadiazine derivatives of antipyrine as potential antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **46**: 4566-4572.
 112. Wingard, J. R., 1995. Importance of candida species other than *Candida albicans* as pathogens in oncology patients. **Clinical Infectious Diseases**, **20**: 115-25.
 113. Ahasan, N. B., Islam, Md. R., 2007. Cytotoxicity study of pyrazole derivatives. **Bangladesh Journal Pharmacol**, **2**: 81-87.
 114. Devnath, H. P., Islam, Md. R., 2010. Synthesis of some pyrazolone derivatives from ciprofloxacin and study of their cytotoxicity. **Bangladesh Journal Pharmacol**, **5**: 30-33.
 115. Filipov, N. M., Lawrance D. A., 2001. Developmental toxicity of a triazole fungicide: consideration of interorgan communication. **The Journal of Toxicological Sciences**, **62** (2):185-186.
 116. Sigman, D. S., 1986. Nuclease activity of 1,10 phenanthroline-copper ion. **Accounts of Chemical Research**, **19**: 180–186.
 117. Sitlani, A. S., Long, E. C., Pyle, A. M., Barton, J. K., 1992. DNA photocleavage by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium (III): shape-selective recognition and reaction. **Journal of the American Chemical Society**, **114** (7): 2303–2312.
 118. Adnan, A. Bekhit., Tarek., Abdel-Aziem., et.al., 2004. Design, synthesis and biological evaluation of some pyrazole derivatives as anti-inflammatory-antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **12** (8): 1935–1945.

119. Argade, N. D., Gill, C. H., et.al., 2008. Microwave assisted improved method for the synthesis of pyrazole containing 2, 4,-Disubstituted Oxazole-5-one and their antimicrobial activity. **E-Journal of Chemistry**, 5 (1): 120-129.
120. Arslantas, A., Devrim, A. K., Kaya, N., Necefoğlu, N., 2006. Studies on theInteraction between zinc-hydroxybenzoite complex and genomic DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, 7 (4): 111– 118.

ÖZGEÇMİŞ

KİMLİK BİLGİLERİ VE İLETİŞİM

Adı Soyadı : Duygu Cemre BULUT
Uyruğu : Türkiye (TC)
Doğum Yeri ve Tarihi : Sivas / 07.11.1986
Medeni Durumu : Evli
Tel : 0553 396 5810
Email : d.cemrebulut@gmail.com
Yazışma Adresi : Kayseri Gıda Kontrol Laboratuar Müdürlüğü
 Osman Kavuncu Cad. No: 43
 Melikgazi / KAYSERİ

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	E.Ü. Fen Bilimler Enstitüsü -	2014
Lisans	Erciyes Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Kayseri Sümer Ahmet Eren Lisesi,	2005

MESLEKİ DENEYİM

Çalıştığı Kurum	Tarih
Kayseri Gıda Kontrol Laboratuar Müdürlüğü	12.2013- Devam ediyor
Diyarbakır Gıda Kontrol Laboratuar Müdürlüğü	11.2012- 11.2013
İstanbul Pendik Veteriner Enstitüsü Müdürlüğü	03.2011- 11.2012

YABANCI DİL

İngilizce, Orta derece