

Hetero Halkalı Bileşiklerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Antibacterial Activities of Heterocyclic Compounds

Meryem Pir*[©], Fatma Budak**[©]

*Kocaeli Üniversitesi, Köseköy Meslek Yüksekokulu, Kimya Teknolojisi Programı, Kocaeli

**Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı, bazı oksadiazol hetero halkalı bileşiklerin (1a-g) çeşitli bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite sonuçlarının değerlendirilmesidir. Elde edilen MİK değerleri ve hesaplanan çeşitli parametreler kullanılarak yapı aktivite ilişkileri değerlendirilip biyolojik aktiviteye sübstitüentin etkisi belirlenmiştir.

Yöntem: Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi için steril, disposabl U tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır. Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) testi için *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) standart suşları kullanılmıştır. Tüm bileşikler için teorik hesaplamalar (RHF-PM3) metodu ile yapılmıştır.

Bulgular: Oksadiazol bileşikleri özellikle hastane enfeksiyonuna neden olabilen *P. aeruginosa*'ya karşı iyi sonuçlar vermiştir. Test edilen bileşikler arasında 1c, 1d ve 1f en iyi sonuç gösteren bileşiklerdir.

Sonuç: Günümüzde, yeni bileşiklerin sentezi ve aktivite testleri önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmadaki sonuçlara göre, bu tür oksadiazol bileşikleri geliştirilebilir ve gelecekte daha etkili ve yeni antimikrobiyal madde dizaynında kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel aktivite, oksadiazol bileşikleri, MİK

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to evaluate the antimicrobial activity results of some heterocyclic oxadiazole compounds (1a-g) against several bacteria. Using the MIC values obtained and various calculated parameters, the relationship between the structures and the activity were evaluated and the effect of the substituent on the biological activity was determined.

Methods: Multiwell microdilution plates (sterile, disposable 96 U-shaped wells) were used for microbroth dilution procedure. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) were used for the minimal inhibitory concentration (MIC) tests. Theoretical calculations for all compounds were made by (RHF-PM3) method.

Results: Oxadiazole compounds have good results against particularly *P. aeruginosa* which causes nosocomial infections. Among the tested compounds; 1c, 1d and 1f have the best results.

Conclusion: Nowadays, synthesis of new compounds and their activity tests have great importance. According to the results of this study, such oxadiazole compounds can be improved and used for the design of more potent and new classes of antimicrobial agents in the future.

Keywords: Antibacterial activity, oxadiazole compounds, MIC

Alındığı tarih:

19.03.2019

Kabul tarihi:

16.07.2019

Yayın tarihi:

31.12.2019

ORCID Kayıtları

M. Pir 0000-0003-4305-8838

F. Budak 0000-0001-8439-3881

✉ pirmeryem@gmail.com

GİRİŞ

Antibiyotikler 20. yüzyılın başlarında keşfedildiklerinden bu yana bakteriyel enfeksiyonlara karşı birincil silah olarak kullanılmıştır. Profilaktik etkileri nedeniyle genellikle kanser veya ameliyat sırasında veya

kompleks hastalıkları tedavi etmek için verilen ilaç kokteyllerinin bir parçası olarak değerlendirilmişlerdir. Son yüzyılda bu durum, enfeksiyon hastalıklarından ölümleri azaltmış ve yaşam süresini uzatmış⁽¹⁾ olsa da, antibiyotiklerin uygulanma sıklığı kadar bazen yanlış kullanımları da antibiyotik dirençli bak-

terileri ortaya çıkarmıştır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* gibi yüksek dirençli yoğun bakım ünitelerindeki bakteriler tıbbi maliyeti artırıp hasta yaşamını risk altına alarak çeşitli komplikasyonlara yol açmıştır^(2,3). Hem bireyleri hem de toplumu tehdit eden çeşitli enfeksiyonlara karşı gelişen riskler, antibiyotiklere karşı direncin daha da artması ile yükselmektedir. Bu dirençli suşların ortaya çıkışı ile birlikte dirençli bakteriler için yeni antimikrobiallerin keşfindeki zorluklar bilim dünyasını harekete geçirmiştir. Enfeksiyonların ortadan kaldırılmasını sağlayacak antibiyotiklerin yanı sıra dirençli patojenlere karşı da yeni antibiyotiklere gereksinim duyulmaktadır. Antibakteriyellerin geliştirilmesinde son yıllarda başarılı çalışmaların sayısının artmakta olduğu ve bu çalışmaların genellikle bilinen antibakteriyel grupları kapsadığı dikkat çekmektedir⁽⁴⁾. Stratejilerin çoğu, ön ilaç veya yeni moleküllerin rasyonel düzenlenmesi temelinde ilaç geliştirmek için planlanmaktadır. Bu nedenle kimya ile yapılan multidisipliner çalışmalarla dirençlerin üstesinden gelinmesine çalışılmaktadır. Bizim de bu çalışmamızda, patojen mikroorganizmalara karşı savaşılan yeni alternatif kimyasalların duyarlılıkları incelenmiştir. Bu nedenle yeni bileşiklerin keşfi için önemli olacağını düşündüğümüz 1, 2, 4-oksadiazol bileşikleri⁽⁵⁾ (1a-g) biyolojik aktiviteye sahip önemli bileşiklerdir ve bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerine molekülde bağlı olan farklı sübstitüentlerin etkilerinin de (sübstitüent etki) olabileceği düşünülmüştür. Buradan yola çıkılarak da daha etkili hedef moleküllerinin tasarımı gerçekleştirilebilecektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Oksadiazol Hetero Halkalı Bileşikler: 3-Sübstitüefenil-4-(*m*-tolil)-1, 2, 4-oksadiazol-5(4*H*)-on türevi bileşiklerin (1a-g) sentezi ve spektral analiz sonuçları literatürde⁽⁵⁾ yer almaktadır. Aktivite çalışmasında kullanılan bu bileşik türevlerinin isimleri ve kodları Tablo 1’de, (1c) molekülünün şekli Şekil 1’de verilmektedir.

Mikroorganizmalar ve Besiyeri: Çalışmada kullanılan

mikroorganizmalar Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndan sağlanmıştır. Araştırmada *in vitro* antibakteriyel aktivite testleri için *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) standart suşları kullanılmıştır. Ampisilin (Fako, İstanbul, Türkiye) ve siprofloksasin (Fako, İstanbul, Türkiye) referans madde olarak kullanılmıştır. Hemolizli at kanlı Mueller-Hinton Broth (MHB) için at kanı Kocaeli Üniversitesi Kartepe Atçılık Meslek Yüksekokulu’ndan sağlanmıştır.

Bileşiklerin Mikrobiyolojik Etki Tayini Yöntemi: Yedi (1a-g) maddenin antibakteriyel aktivitesi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon duyarlılık test yöntemi ile yapılmıştır^(6,7). Sıvı mikrodilüsyon testi için steril, disposable U tabanlı 96 kuyucuklu plak kullanılmıştır. Maddelerin stok solüsyonu steril etanol ile yapılmıştır. Yapılan dilüsyonlarda kullanılan etanolün mikroorganizmalara karşı zararlı bir etkisi yoktur. Bileşik dilüsyonları Mueller Hinton Broth ile U tabanlı plaka kuyucuklarında maddelerin konsantrasyonu 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09 ve 0.04 µg/ml aralığında olacak şekilde hazırlanmıştır. Ampisilin (Fako, İstanbul, Türkiye) ve siprofloksasin (Fako, İstanbul, Türkiye) antibakteriyel maddeleri referans madde olarak kullanılmıştır ve konsantrasyonları literatürde^(6,7) belirtilmektedir.

Antibakteriyel aktivite için *S. mutans* standart suşu koyun kanlı agara ekilerek 35°C 36-48 saat mikroaerofil ortamda inkübe edilmiştir. Antibakteriyel aktivite için kullanılacak standart suşların inokulumu 0.5 Mc Farland 1x10⁸ CFU/ml (koloni oluşturan ünite) olarak hazırlanmıştır. Daha sonra bu konsantrasyonlar *S. mutans* için %2-5 liyofilize at kanlı Mueller Hinton Broth besiyeri kullanılarak, diğer bakteriler için ise Mueller Hinton Broth ile 1/10 oranında sulandırılarak son derişim 10⁷ CFU/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonları (1a-g)

maddelerinin plaktaki 100 µl'lik konsantrasyonlarına 5x10⁵ CFU/ml oranında pipetlenmiştir. Daha sonra bu plaklar *S. mutans* için 35°C 36-48 saat mikroaerofil ortamda, diğer bakterileri içeren plaklar ise 35°C 16-24 saat aerobik olarak inkübe edilmiştir. Bakteri üremesinde gözle görülür bulanıklığın olmadığı en son kuyucuktaki madde konsantrasyonu MİK olarak kabul edilmiştir. Testler iki kez yinelenmiştir.

Teorik Hesaplanan Moleküler Parametreler: Bileşikler (1a-g) için çeşitli moleküler parametreler (diskriptörler) Hyperchem (Hypercube Inc., Ver 7.2 for Windows, 2002, ABD) programı kullanılarak sınırlandırılmış Hartree-Fock (RHF)-PM3 (Parametrizasyon modeli, sürüm 3) yöntemi ile hesaplanmıştır. Bu parametreler; oktanol-su dağılım katsayısının logaritması (clogP), Van der Waals yüzey alanı-approx (SAA), Van der Waals moleküler hacim (MV), molar refraktivite (MR), polarite (polar), total dipol moment (µ), hidrasyon enerjisi (HE) ve oluşum entalpisi (heat of formation) (ΔHf) değerleridir (Tablo 2). Bileşik (1c)'nin (RHF-PM3) metodu ile hesaplanan minimum enerjili konformasyonu Şekil 1'de verilmiştir.

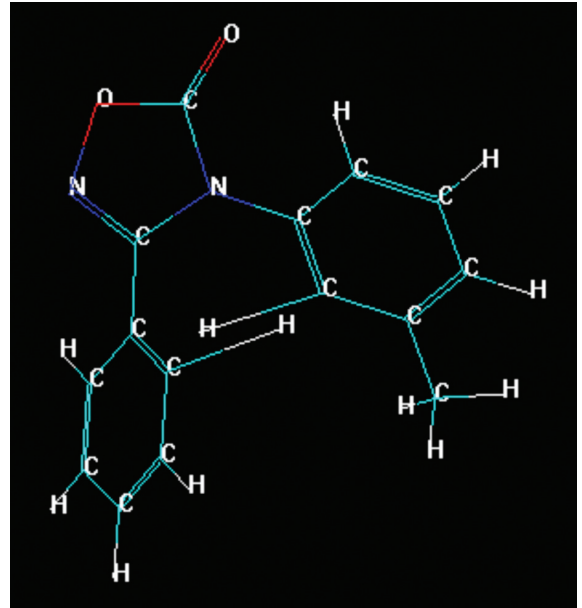
BULGULAR

Bileşiklerin (1a-g) *in vitro* antimikrobiyal aktivite bulguları Tablo 3'te verilmiştir. *S. mutans* bileşiklere karşı dirençli (MİK= >1600 µg/ml), diğer bakteriler ise bileşiklere karşı duyarlı (MİK=50-200 µg/ml) bulunmuştur. Bileşiklere ve referans maddelere ait aktivite sonuçlarının grafiksel gösterimi Şekil 2'de verilmiştir.

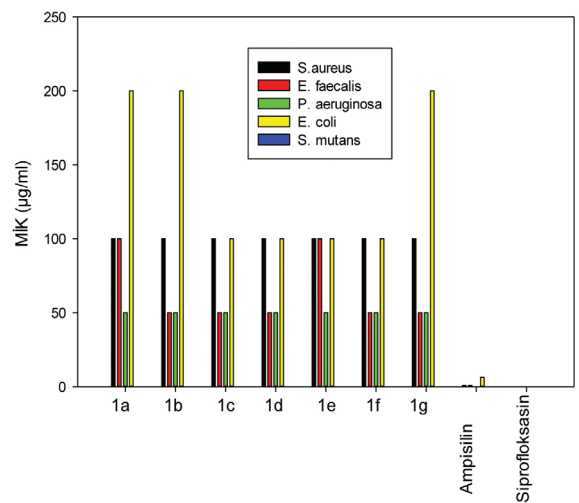
Bileşiklerin tümü ampisilin ile karşılaştırıldığında Gram negatif bakteri olarak hastane enfeksiyonlarına yol açan *P. aeruginosa*'ya karşı (MİK=50 µg/ml) oldukça etkilidir. Birbirleriyle ve standart suş ile karşılaştırıldığında Gram negatif *E. coli* bakterisi maddenin c, d, e ve f türevlerine karşı duyarlı (MİK=100 µg/ml) ancak a, b ve g türevlerine karşı daha dirençli (MİK=200 µg/ml) bulunmuştur. Oldukça dirençli enfeksiyonlara yol açabilen *S. aureus* bakterisi maddenin tüm türevlerine karşı duyarlıdır (MİK=100 µg/ml).

Tablo 1. 3-Süstitüfenil-4-(*m*-tolil)-1, 2, 4-oksadiazol-5(4*H*)-on türevleri ve kodları (1a-g).

Türevler	Kod
3-(<i>p</i> -metoksifenil)-4-(<i>m</i> -tolil)-1,2,4-oksadiazol-5(4 <i>H</i>)-on	1a
3-(<i>p</i> -tolil)-4-(<i>m</i> -tolil)-1,2,4-oksadiazol-5(4 <i>H</i>)-on	1b
3-(fenil)-4-(<i>m</i> -tolil)-1,2,4-oksadiazol-5(4 <i>H</i>)-on	1c
3-(<i>p</i> -florofenil)-4-(<i>m</i> -tolil)-1,2,4-oksadiazol-5(4 <i>H</i>)-on	1d
3-(<i>m</i> -klorofenil)-4-(<i>m</i> -tolil)-1,2,4-oksadiazol-5(4 <i>H</i>)-on	1e
3-(<i>m</i> -bromofenil)-4-(<i>m</i> -tolil)-1,2,4-oksadiazol-5(4 <i>H</i>)-on	1f
3-(<i>p</i> -triflorometilfenil)-4-(<i>m</i> -tolil)-1,2,4-oksadiazol-5(4 <i>H</i>)-on	1g



Şekil 1. Bileşik (1c)'nin (RHF-PM3) metodu ile hesaplanan minimum enerjili konformasyonu.



Şekil 2. Bileşiklere (1a-g) ve standartlara ait MİK değerlerinin grafiksel gösterimi.

Tablo 2. (1a-g) bileşiklerine ait (RHF-PM3) metodu ile hesaplanan teorik parametreler.

Bileşik	clogP	SAA (Å ²)	MV (Å ³)	MR (Å ³)	Polar (Å ³)	μ (D)	HE (kcal/mol)	ΔHf (kcal/mol)
1a	1.22	296.56	253.61	85.67	30.30	6.830	-8.74	-11.65
1b	2.36	284.18	245.83	83.57	29.67	6.395	-5.94	17.14
1c	2.21	261.41	229.36	79.29	27.83	6.246	-7.11	27.12
1d	1.61	266.46	231.73	79.42	27.74	4.781	-6.80	-16.35
1e	1.99	277.20	243.23	84.01	29.76	5.890	-6.73	20.75
1f	2.26	282.12	250.73	86.83	30.46	5.819	-6.72	35.08
1g	2.78	298.10	253.62	84.51	29.39	3.773	-6.53	-130.22

Tablo 3. (1a-g) nolu bileşiklerin in vitro antibakteriyel aktivite sonuçları [MİK µg/ml (µmol/ml)].

Bileşikler (1a-g) ve Standartlar	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25983)	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)
1a	100 (0.354)	100 (0.354)	50 (0.177)	200 (0.708)	>1600
1b	100 (0.376)	50 (0.188)	50 (0.188)	200 (0.751)	>1600
1c	100 (0.396)	50 (0.198)	50 (0.198)	100 (0.396)	>1600
1d	100 (0.370)	50 (0.185)	50 (0.185)	100 (0.370)	>1600
1e	100 (0.349)	100 (0.349)	50 (0.174)	100 (0.349)	>1600
1f	100 (0.302)	50 (0.151)	50 (0.151)	100 (0.302)	>1600
1g	100 (0.312)	50 (0.156)	50 (0.156)	200 (0.624)	>1600
Ampisilin	0,78	0,78	-	6,25	≤0,25
Siprofloksasin	0,25	0,25	0,25	0,04	-

E. faecalis bakterisi birbirleriyle ve standart suş ile karşılaştırıldığında ise maddenin b, c, d, f ve g türevlerine duyarlıdır (MİK=50 µg/ml). Diğer yapıların MİK değeri ise 100 µg/ml olarak ve daha az etkili bulunmuştur.

Diş çürüklerine, periodontit enfeksiyonlarına ve tedavi edilmezse pulpit ve periapikal doku enfeksiyonlarına yol açan *S. mutans*'ın ise maddenin tüm yapılarına karşı dirençli olduğu (MİK= >1600 µg/ml) bulunmuştur. Maddelerin (1a-g) 1600-0.04 µg/ml konsantrasyon aralığında *S. mutans*'ın üremesini durduracak bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Ayrıca oksadiazol (1a-g) bileşikleri için antimikrobiyal aktivite tayinine ek olarak çeşitli fizikokimyasal ve teorik parametreler hesaplanmıştır. Yapı-etki ilişkilerinin çözümlenmesine yardımcı tekniklerden biri olan QSAR analizinde de kullanılabilecek bu teorik parametreler ilaç etken maddesi bileşiklerin araştırılması ve geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Yeni ilaçların ortaya çıkması için öncelikle yapısı belirlenmiş bir bileşiğe çeşitli kimyasal modifikasyonlar uygulanarak kimyasal yapısı çeşitlendirilir. Daha sonra kimyasal

bileşiklere ait moleküler yapı ile gösterdikleri biyolojik etkinlik arasındaki ilişkinin varlığı fizikokimyasal parametreler hesaplanarak matematiksel yöntemlerle nicel olarak çözümlenir. Bu hesaplamalar daha sonra regresyon analizinde kullanılabileceği gibi çeşitli elektron çekici ve elektron salıcı süstitüentlerin *m*- ve *p*- konumundaki varlığında heterosiklik oksadiazol bileşiklerinin sahip olduğu tanımlayıcılar hakkında bilgi vermektedir. Tablo 2'de süstitüent etkinin fizikokimyasal parametreler üzerindeki etkisi görülmektedir.

TARTIŞMA

Günümüzde, bakterilerin bilinen molekül gruplarına karşı direnç kazanıyor olması halk sağlığı açısından büyük sorunlar oluşturmakta ve bu durumun kuşku verici seviyede olabileceği düşünülmektedir. Antibiyotiklere direnç kazanmış mikrobiyal patojenleri kontrol altına almak için farmakolojik olarak aktif yeni bileşiklerin bulunması gerekmektedir. Özellikle 1988'lerden bu yana vankomisin dirençli *E. faecalis* (VRE)'in ortaya çıkışı, metisilin ve vankomisin dirençli *S. aureus* (MRSA/VRSA) suşları, dirençli bakterilerin

neden olduğu sepsis, ishal ve yoğun bakım ünitelerinde sık rastlanan MRSA ve VRE hastane enfeksiyonları gibi yeni klinik tabloların ortaya çıkması doğal antimikrobiyal ürünlerin önemini tüm dünyada artırmaktadır^(8,9).

Günümüzde, yoğun bakımda uzun süre yatan hastalardan üretilen çok ilaca dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına bağlı tedavide zorluk yaşanmaktadır. Güncel kullanılan antibakteriyel ilaçların dirençli oluşu veya tedavi sırasında direnç gelişmesi en çok zorlandığımız durumdur. *P. aeruginosa* bakterisi incelenen bileşiklerin (1a-g) tümüne duyarlı bulunmuştur (MİK=50 µg/ml). Bu durum gelecekte tedavi seçenekleri için bize ümit vermektedir.

Tüm bileşiklerin 50-200 µg/ml arasında değişen MİK değerlerinde antibakteriyel etkiye sahip oldukları bulunmuştur.

Biyolojik aktivite-yapı ilişkisi veya kantitatif yapı-aktivite ilişkileri (QSAR) olarak tanımlanan işlemlerle, kimyasal bileşiklerin moleküler nitelikleri (yapısal/fizikokimyasal özellikleri) ile biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişkileri matematiksel yöntemlerle belirlenmektedir⁽¹⁰⁾. QSAR yöntemi kullanılarak ileride oluşturulabilecek yeni çalışmalarla, bu tür oksadiazol bileşiklerinin biyolojik aktivite sonuçları daha iyi değerlendirilecek ve en başarılı ilaç aktif maddelerinin sentez yolu açılacaktır. Diş çürüklerine, periodontit enfeksiyonlarına ve tedavi edilmezse pulpit ve periapikal doku enfeksiyonlarına yol açan *S. mutans*'a karşı etkili olabilecek yeni molekül araştırmalarına ağırlık verilip ayrıca maddelerin antifungal aktiviteleri de incelenebilecektir.

Literatürde bu tür 1, 2, 4-oksadiazol hetero halkalı bileşiklerinin antibakteriyel aktivite sonuçları bulunmamaktadır. Yeni bir antibakteriyel sınıf olma potansiyeline sahip olan bu bileşiklere ait gerçekleştirdiği-

miz antimikrobiyal aktivite çalışması büyük bir önem taşımaktadır. Daha kompleks oksadiazol bileşiklerinin farklı sübstitüentler kullanılarak sentezi gerçekleştirilebilir ve bu bileşiklerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri belirlenebilir.

KAYNAKLAR

1. Fernebro J. Fighting bacterial infections-future treatment options. Drug Resist Updat. 2011;14(2):125-39. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.02.001>
2. Waness A. Revisiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. J Glob Infect Dis. 2010;2:49-56. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.59251>
3. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(11):7687-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.122108599>
4. Akbal AU, Çoban AY, Durupınar B. Yeni antibakteriyeller. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2018;48(2):87-99. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.087>
5. Kara YS. Nitril oksit ve amidoksim kullanılarak yeni hetero halkalı bileşiklerin sentezi [Doktora Tezi]. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi, 2009.
6. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M07-A7, Wayne, ABD; 2006.
7. CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement, LSI-M110-S15, Wayne, ABD, 2005.
8. Karaaslan E. Çevreden izole edilen suşların antimikrobiyal direnç durumlarının araştırılması ve klinik suşlarla karşılaştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2013.
9. Martinez A, Kolvek SJ, Yip CLT, et al. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple bacterial hosts. Appl Environ Microbiol. 2004;70:2452-63. <https://doi.org/10.1128/aem.70.4.2452-2463.2004>
10. Özden S, Ertan R, Akı-Şener E ve ark. Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2. Ankara Üniversitesi. Ankara, 2004.