



**URASİL TÜREVLERİNİN DFT ÇALIŞMASI VE ANTİPARAZİTER
AKTİVİTELERİ**

Pınar KUBAŞIK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2020

Pınar KUBAŞIK tarafından hazırlanan “URASİL TÜREVLERİNİN DFT ÇALIŞMASI VE ANTİPARAZİTER AKTİVİTELERİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi İLERİ TEKNOLOJİLER Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Nevin SÜLEYMANOĞLU

Elektrik ve Enerji Bölümü, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

İkinci Danışman: Doç. Dr. Şahin DİREKEL

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Giresun Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Yasemin UDUM

Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr.Nurgül SEFEROĞLU

İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Doç. Dr. Reşat USTABAŞ

Fizik Eğitimi Anabilim Dalı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 20/05/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu çalışmanın Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

20/05/2020

Pınar KUBAŞIK

URASİL TÜREVLERİNİN DFT ÇALIŞMASI VE ANTİPARAZİTER AKTİVİTELERİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Pınar KUBAŞIK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2020

ÖZET

Bu çalışmada; literatürde verilen yönteme göre sentezlenmiş ve moleküler yapıları FTIR ve ¹H-NMR spektroskopik teknikleri kullanılarak karakterize edilmiş, urasil içeren azo boyarmaddeleri, 6-amino-5-[(4-nitrofenil) diazenil] pirimidine-2,4(1H,3H)-dion (**I**) ve 6-amino-5-[(4-bromofenil) diazenil] pirimidine-2,4(1H,3H)-dion (**II**) üzerine, moleküler modelleme çalışması ve antiparaziter aktivite çalışması gerçekleştirilmiştir. Moleküler modelleme çalışmasında; öncelikle, Bileşik I ve II'nin olası tautomerik formlarının moleküler yapıları optimize edilmiş ve moleküler toplam enerjileri hesaplanmıştır. Her iki bileşik için gaz fazında ve DMSO çözücünde, en düşük enerjili ve dolayısıyla en kararlı form olarak belirlenen imin-diketo-hidrazon formları dikkate alınarak; hesaplamalar, Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (DFT) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon formlarının optimize geometrileri, IR ve ¹H-NMR spektral verileri, DFT/B3LYP/6-311++G(d, p) yöntemi ile elde edilmiş ve, teorik spektral veriler deneysel olanlarla karşılaştırılmıştır. Antiparaziter aktivite çalışmasında; Bileşik I ve II, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica* promastigotları ve *Trichomonas vaginalis* trofozoitlerine karşı ilk kez test edilmiştir. Layşmanyaya promastigotlarına karşı *in vitro* antilayşmanyaz aktiviteler, alamar mavisi eklenmiş sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile ve *in vitro* trikomonasidal aktiviteleri, *Trichomonas vaginalis* parazitlerine karşı triptikaz maya özütü maltoz (TYM) ortamı kullanılarak test edilmiştir. Testlerde; antilayşmanyaz etki Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerlerinin ve trikomonasidal etki Minimum Letal Konsantrasyon (MLK) değerlerinin standart ilaçlar için elde edilen değerlerle karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Teorik çalışma ileride ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılabilecek, antiparaziter özellik gösteren ajanların yapısal özelliklerinin ortaya konulması açısından önemlidir. Bu çalışmalar antiparaziter aktivite sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde ilaç tasarımı ve geliştirilmesi çalışmalarına katkı sağlayacak ve bu çalışmalarda dikkate alınacak kimyasalları belirlemede yol gösterici olacaktır.

Bilim Kodu : 20203
Anahtar Kelimeler : Urasil Türevleri, DFT, Antiparaziter Aktivite
Sayfa Adedi : 60
Danışman : Doç. Dr. Nevin SÜLEYMANOĞLU
İkinci Danışman : Doç. Dr. Şahin DİREKEL

DFT STUDY AND ANTIPARASITIC ACTIVITIES OF URACIL DERIVATIVES

(M. Sc. Thesis)

Pınar KUBAŞIK

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

May 2020

ABSTRACT

In this study; molecular modelling and antiparasitic activity study were carried out on azo dyes containing uracil, 6-amino-5-[(4-nitrofenil) diazenil] pirimidine-2,4(1H,3H)-dion (**I**) and 6-amino-5-[(4-bromofenil)diazenil]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (**II**), which were synthesized using the method given in the literature and whose molecular structures were confirmed using FTIR and ¹H-NMR spectroscopic methods. In molecular modeling study; firstly, the molecular structures of the possible tautomeric forms of compounds I and II were optimized and their molecular total energies were calculated. In the gas phase and DMSO solvent for both compounds, as taking into account the imine-diketo-hydrazone forms, which were determined as the lowest energy and therefore the most stable form, the calculations were carried out by the Density Functional Theory (DFT) method. Optimized geometries, IR and ¹H-NMR spectral data of the imine-diketo-hydrazone forms of compounds I and II were obtained by the DFT/B3LYP/6-311++G(d, p) method and, theoretical spectral data were compared with experimental ones. In antiparasitic activity study; compounds I and II were tested for the first time against to the parasites *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica* promastigotes, *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *In vitro* antileishmanial activities against *Leishmania* promastigotes were tested by microdilution broth assay with alamar blue and, *in vitro* trichomonacidal activities against *Trichomonas vaginalis* parasites were tested using trypticase extract-maltose (TYM) medium. In tests; antileishmanial and trichomonacidal effects were determined by comparing the obtained Minimum Inhibitor Concentration (MIC) and Minimum Lethal Concentration (MLK) values with those obtained for standard drugs. The theoretical study is important in terms of revealing the structural properties of antiparasitic agents that can be used in drug development studies in the future. When these studies are evaluated together with antiparasitic activity results, they will provide an important contribution to drug design and development studies and will be guiding in determining the chemicals to be considered in these studies.

Science Code : 20203

Key Words : Uracil derivatives , DFT, Antiparasitic activity

Page Number : 60

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Nevin SÜLEYMANOĞLU

Co Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Şahin DİREKEL

TEŞEKKÜR

Bu çalışma boyunca bana her türlü yardımda bulunan, bilgi ve tecrübeleri doğrultusunda beni yönlendiren çok değerli hocam Doç. Dr. Nevin SÜLEYMANOĞLU'na (Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü) sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Antiparaziter aktivite çalışması, tez ikinci danışmanım Doç. Dr. Şahin DİREKEL(Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi) gözetiminde Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda büyük bir özveri ile gerçekleştirilmiştir. Değerli hocama tez çalışmamdaki katkıları için çok teşekkür ederim. Tez çalışmamda kullanılan, urasil içeren azo boyarmaddeleri Dr. Öğretim Üyesi Fatih EYDURAN (Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi) tarafından sentezlenmiş ve yapısı doğrulanmıştır. Hocama değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Antilayşmanyaz aktivite çalışmalarında bilgi ve tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ülkü KARAMAN'a (Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi) sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Trikomonasidal aktivite test çalışmalarında bilgi ve tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR ve Arş. Gör. Evren TİLEKLİOĞLU'na (Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi) sonsuz teşekkürlerimi sunarım. DFT çalışması Tübitak Ulakbim Yüksek Başarımlı ve Grid hesaplama merkezinden destek alınarak gerçekleştirilmiş ve hesaplamalar Truba kaynakları kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamdaki değerli katkılarından dolayı Tübitak'a teşekkür ederim. Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından 65/2019-03 kodlu yüksek lisans tez projesi ile desteklenmiştir. Katkıları için BAP'a çok teşekkür ederim.

Başarılı olmam için bana gereken motivasyon ve hayat görüşünü veren, her zaman yanımda olan ve bana güvenen babam Seyit KUBAŞIK, annem Kadriye KUBAŞIK başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Urasil ve Türevleri	7
2.2. Azo Boyarmaddeleri	7
2.2.1. Azo boyarmaddelerinin sentez yöntemleri	9
2.3. Moleküler Modelleme.....	10
2.3.1. Hartree-Fock alan teorisi	11
2.3.2. Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (DFT)	12
2.3.3. Becke, 3 Parametrelili, Lee-Yang-Parr (B3LYP) karma yoğunluk fonksiyoneli teorisi	13
2.3.4. Temel setler	14
2.4. Gaussian 09 Paket Yazılımı	15
2.4.1. Gauss View 5.0.8.....	15
2.4.2. Geometri optimizasyonu.....	16
2.5. Antiparaziter Aktivite Belirleme Yöntemleri	16
2.5.1. Dilüsyon yöntemi	17
2.5.2. Besiyeri.....	18
2.5.3. Minimum inhibitör konsantrasyon	18
2.5.4. Minimum letal konsantrasyon	19

	Sayfa
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Urasil İçeren Azo Boyarmaddelerinin Sentezi	21
3.2. Moleküler Modelleme.....	23
3.2.1. Geometri optimizasyonu.....	23
3.2.2. Spektral analiz	23
3.3. <i>İn vitro</i> Antiparaziter Aktivite	24
3.3.1. Antiparaziter aktivite testinde kullanılan araç ve gereçler	24
3.3.2. Antilayşmanyaz aktivite	25
3.3.3. Trikomonasidal aktivite.....	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	29
4.1. Teorik Hesaplamalar	29
4.1.1. Geometri optimizasyonu.....	29
4.1.2. IR ve ¹ H-NMR hesaplamaları.....	35
4.2. Antiparaziter Aktivite Sonuçları	38
4.2.1. Antilayşmanyaz aktivite sonuçları.....	38
4.2.2. Trikomonasidal aktivite sonuçları	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	49
EKLER	57
EK-1. Bileşik I ve Bileşik II'nin FTIR ve ¹ H-NMR Spektrumları	58
ÖZGEÇMİŞ	60

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Bileşik I ve II'nin olası tautomerik formlarının optimize yapılarının toplam moleküler enerji değerleri.....	30
Çizelge 4.2. Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon (T-V) formları için DFT/B3LYP//6-311++G(d,p) yöntemi ile elde edilen bağ uzunlukları. ...	32
Çizelge 4.3. Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon (T-V) formları için DFT/B3LYP//6-311++G(d,p) yöntemi ile elde edilen bağ açıları.	33
Çizelge 4.4. Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon formları (T-V) için, DFT/B3LYP//6-311++G(d,p) yöntemi ile elde edilen torsiyon açıları.	34
Çizelge 4.5. Bileşik I ve II'nin deneysel ve, imin-diketo-hidrazon formları için DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle hesaplanmış teorik titreşim frekansları (cm ⁻¹).	36
Çizelge 4.6. Bileşik I ve II'nin; DMSO-d ₆ çözücünde deneysel ve, imin-diketo-hidrazon formları (T-V) için, DMSO içinde DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle hesaplanmış ¹ H izotropik kimyasal kaymaları (bütün değerler ppm biriminde).	37
Çizelge 4.7. Standart laşmanyaya promastigotlarına karşı elde edilen Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri.....	39
Çizelge 4.8. <i>T.vaginalis</i> trofozoitlerine karşı 16, 24 ve 48. saat sonunda elde edilen Minimum Letal Konsantrasyon (MLK) değerleri.	40

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Leishmania spp. yaşam döngüsü (Kum sinekleri ve insanda).....	2
Şekil 1.2. <i>T.vaginalis</i> 'in yaşam döngüsü	3
Şekil 2.1. Azo grubunun oluşturulmasına dayanan sentez tepkimesi.....	10
Şekil 3.1. Urasil içeren azo boyarmaddelerinin eldesi.....	22
Şekil 4.1. Urasil içeren azoboyarmaddeleri, Bileşik I (R=NO ₂) ve Bileşik II'nin (R=Br) olası tautomerik formları.	29
Şekil 4.2. Bileşik I'in imin-diketo-hidrazon (T-V) formunda DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle optimize edilmiş moleküler yapısı.	30
Şekil 4.3. Bileşik II'in imin-diketo-hidrazon (T-V) formunda DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle optimize edilmiş moleküler yapısı.	31
Şekil 4.4. <i>L.infantum</i> promastigotlarına karşı in vitro antilayşmanyaz aktivite; Bileşik I, Bileşik II, Kontrol İlacı, Amfoterisin B ve seyreltme konsantrasyonları 10.000-19 µg/mL.....	38
Şekil 4.5. <i>L.tropica</i> promastigotlarına karşı in vitro antilayşmanyaz aktivite; Bileşik I, Bileşik II, Kontrol İlacı, Amfoterisin B ve seyreltme konsantrasyonları 10.000-19 µg/mL.	39
Şekil 4.6. <i>L.major</i> promastigotlarına karşı in vitro antilayşmanyaz aktivite; Bileşik I, Bileşik II, Kontrol İlacı, Amfoterisin B ve seyreltme konsantrasyonları 10.000-19 µg/mL.....	39
Şekil 4.7. Bileşik I'in <i>T.vaginalis</i> trofozoitlerine karşı 48 saat sonra göstermiş olduğu trikomonasidal aktivitenin mikroskopik görüntüsü.....	41
Şekil 4.8. Bileşik II'nin <i>T.vaginalis</i> trofozoitlerine karşı 48 saat sonra göstermiş olduğu trikomonasidal aktivitenin mikroskopik görüntüsü.....	41
Şekil E.1. Bileşik I'in FTIR spektrumu	58
Şekil E.2. Bileşik I'in ¹ H-NMR spektrumu	58
Şekil E.3. Bileşik II'nin FTIR spektrumu	59
Şekil E.4. Bileşik II'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

ρ

Elektron olasılık yoğunluğu

Kısaltmalar

Açıklamalar

DFT

Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi

DMSO

Dimetil sülfoksit

DNA

Deoksiribo Nükleik Asit

E_{xc}

Değiş-tokuş korelasyon enerjisi

E_T

Kinetik enerji

E_V

Potansiyel enerji

E_J

Elektronların birbirini itmesinden kaynaklanan enerji

E_{xc}

Arta kalan diğer elektron-elektron etkileşimlerini

FBS

Fetal Bovin Serum

FT-IR

Fourier Transform Infrared Spektrofotometre

GIAO

Gauge-Including Atomic Orbital

HF

Hartree-Fock

LCAO

Atomik Orbitallerin Lineer Kombinasyonu

MİK

Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MLK

Minimum Letal Konsantrasyon

MO

Moleküler Orbital

N.K.

Negatif Kontrol

NMR

Nükleer Manyetik Rezonans

OD

Optik Yoğunluk

PBS

Phosphate-buffered saline

P.K.

Pozitif Kontrol

PPP

Pariser Parr Pople

Kısaltmalar**Açıklamalar****RNA**

Ribo Nükleik Asit

RPMI

Roswell Park Memorial Institute

SCF

Hartree-Fock Alan

TMS

Tetra Metil Silan

TYM

Tryptikaz Maya Ekstresi Maltoz

WHO

World Health Organization

1. GİRİŞ

Layşmanyazis, layşmanyaya parazitlerinin neden olduğu ve bazı kum sineklerinin ısırması ile bulaşan, klinik ve epidemiyolojik bakımdan farklılık gösteren, tüm dünyada önemli bir sağlık problemi olan bir hastalıktır (Cattand ve diğerleri, 2006; Süleymanoğlu ve diğerleri, 2017).

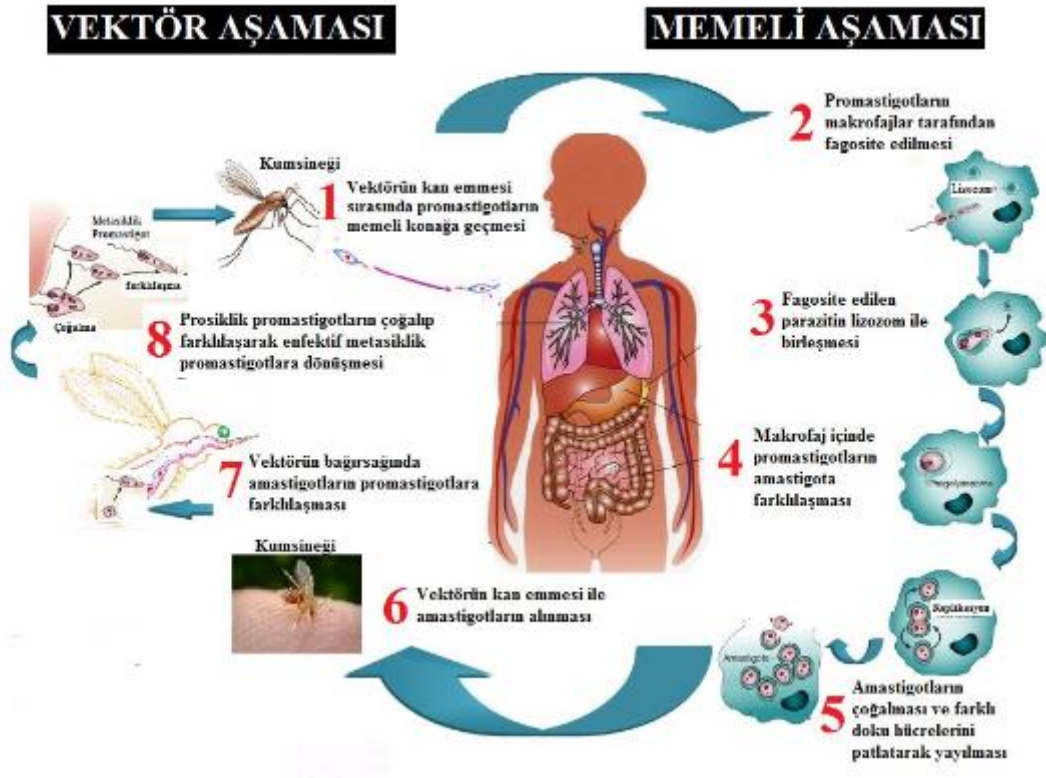
Layşmanyazis'in üç farklı klinik formu bulunmaktadır: Visseral Layşmanyazis (VL, Kala-Azar), Kutanöz Layşmanyazis (KL, Şark Çıbanı) ve Mukokutanöz Layşmanyazis (MKL) (Herwaldt, 1999). Akdeniz havzasında layşmanyazise neden olan üç layşmanyaya türü vardır. *Leishmania infantum* (*L.infantum*) VL'ye, *Leishmania major* (*L.major*) ve *Leishmania tropica* (*L.tropica*) KL'ye neden olmaktadır. Ayrıca *L.infantum*'un da KL'ye neden olduğu nadir de olsa tespit edilmiştir (Belazzoug, 1992). Layşmanyazis büyük oranda belirli alanlarda coğrafik dağılım göstermekle birlikte hastalığın oranı giderek artmaktadır (Desjeux, 2001).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 6 önemli tropikal hastalıktan biri kabul edilen layşmanyazis, 98 ülkede endemik olarak gözlenen bir hastalıktır. Beş kıtada 350 milyon insan risk altındadır. Her yıl yeni hasta sayısının VL için 500.000, KL için 1.500.000 olduğu tahmin edilmektedir (Erhan ve diğerleri, 2008).

Beş değerli (Pentavalent) antimon türevleri, Sodyum stibogluconate (Pentostam®) ve megluminantimoniat (Glucantime®) layşmanyazis için geleneksel tedavi yöntemlerindendir, ancak araştırmacılar bu ilaçlara direnç geliştiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle, Amfoterisin B ve lipit formülasyonları, enjekte edilebilir paromomisin ve oral miltefosin gibi yeni tedavi yaklaşımları ortaya çıkmıştır. Hastalığa karşı etkili bir profilaktik aşı henüz yoktur. Kullanılmakta olan ilaçların toksik etkileri ve bu ilaçlara karşı artan direnç nedeniyle, yeni terapötik ajanların keşfi ve geliştirilmesi önem kazanmaktadır.

Layşmanyaya türlerinin promastigot formlarının canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri, kolorimetrik yöntemlerdir. Alamar mavisi, kolay kullanımı, düşük maliyeti, çevre dostu ve kolay aktarılabilmek gibi bir takım avantajlara sahip olması

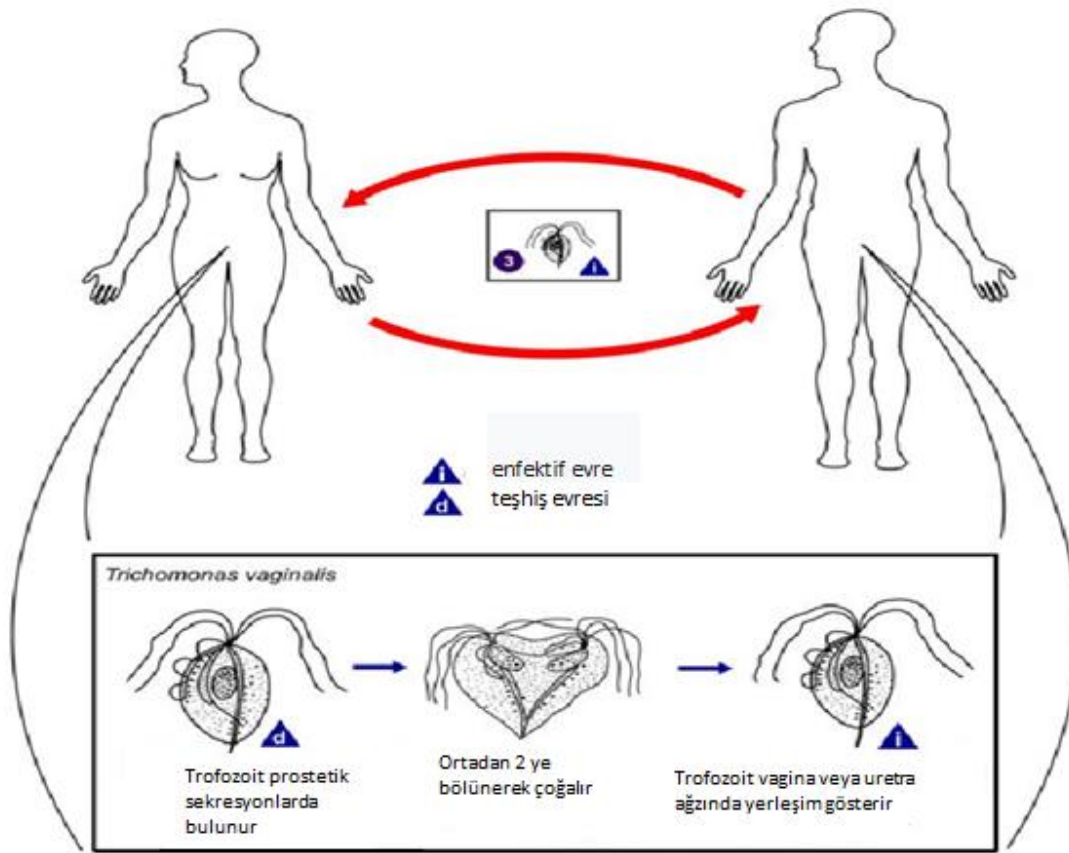
nedeniyle, *L.major* promastigotlar ile ilaç tarama testinde uygulanabilir bir kolorimetrik gösterge olmuştur (Süleymanoğlu ve diğerleri, 2017).



Şekil 1.1. *Leishmania* spp. yaşam döngüsü (Kum sinekleri ve insanda) (Aronson ve Magill, 2020).

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) sadece trofozoit formda bulunan, kamçılı ve tek konağı insan olan bir protozoan parazittir (Schwebke ve Burgess, 2004). *T. vaginalis*'in neden olduğu trikomoniyaz, viral ve bakteriyel etkenlerin dışında, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar (CYBE) arasında en sık görülenidir (Özcel ve diğerleri, 2007). DSÖ verilerine göre 2008 yılında tüm dünyada 276,4 milyon yeni *T. vaginalis* olgusunun ortaya çıktığı ve Avrupa'da toplam 46,8 milyon CYBE olgusundan 22,6 milyonunun; Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 26,4 milyon olgudan 20,2 milyonunun ve Güneydoğu Asya Bölgesi'nde 78,5 milyon olgudan 42,9 milyonunun *T.vaginalis* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (WHO, 2008). Türkiye'de son yıllarda yapılan çalışmalarda ise farklı çalışma gruplarında *T.vaginalis* görülme sıklığının % 0,3 ile % 9,0 arasında değişen oranlarda olduğu bildirilmiştir (Ertabaklar ve diğerleri, 2016).

Trikomoniyazis insandan insana genellikle cinsel temas yolu ile bulaşmaktadır. Bu nedenle cinsel olgunluktaki kadınlarda hastalığın görülme oranı daha yüksektir (Saygı, 2009). Cinsel temas dışında sık olmamakla birlikte alafranga tuvaletler, havuzlar, tuvalet kağıdı ve steril olmayan jinekolojik muayene aletler ile de sağlıklı bireylere bulaşabilmektedir (Altıntaş, 2002). *T.vaginalis* kozmopolit bir dağılım göstermekte ve kadınlarda %8,1 erkeklerde %1,0 prevalansa sahip olduğu tahmin edilmektedir. Yaygınlığını etkileyen esas faktörlerin ise cinsel ilişkideki partner sayısı, yaş ve düşük eğitim düzeyi olduğu bildirilmiştir (Kissinger, 2015).



Şekil 1.2. *T.vaginalis*'in yaşam döngüsü (<https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/>)

Trikomoniyazisin tedavi edilmediği durumlarda kadınlarda, vulva veya vajinada yanma, az veya şiddetli kaşıntı, beyazdan hafif sarıya kadar değişebilen kokulu ve köpüklü vajinal akıntı; erkeklerde ise belirgin bir semptom görülmemesi ile birlikte nadiren üretradan gelen beyaz bir akıntı ve idrara çıkıldığında yanma hissi gibi ciddi semptomlara neden olabilmektedir (Özcel ve diğerleri, 2007). Parazitin, gebelerde prematüre doğumlara veya

düşük doğum ağırlıklı bebek doğumlarına ve insan immün yetmezlik virusunun (HIV) bulaşma riskinde artışa sebep olabileceği bildirilmiştir (Kissinger ve Adamski, 2013).

Trikomoniyazisin tedavisinde güncel olarak 5-nitroimidazol türevleri (metronidazol, ornidazol, tinidazol) kullanılmakta olup bu ilaçlar DNA hasarına neden olarak parazitin hücre ölümüne neden olmaktadır. Metronidazol ilk tercih edilen ilaç olmasına karşın mutajenik ve karsinojenik etkileri bulunmasının yanı sıra plasentadan geçebilmesi nedeniyle de gebelikte kullanımı sınırlı olduğu bildirilmiştir. Bu sebeplerden dolayı trikomoniyazis tedavisinde alternatif olabilecek tedavi yöntemleri araştırılmaktadır (Cudmore ve diğerleri, 2018). Ayrıca ülkemizde ve diğer ülkelerde metronidazole dirençli *T. vaginalis* izolatlarının bulunduğu saptanmıştır (Ertabaklar ve diğerleri, 2016).

Azo bileşikleri, antibakteriyel, antifungal, antitümör, antioksidan aktiviteler gibi tıp ve farmakoloji alanlarında potansiyel uygulamalara sahiptir (Khanmohammadi ve diğerleri, 2017; Mohammadi ve diğerleri, 2015; Gouda ve diğerleri, 2016; Wamhoff ve diğerleri, 1992). Ayrıca kullanımları kolaydır ve nispeten ucuz olmalarının yanı sıra tekstil uygulamalarında da güçlü renkler ortaya koymaktadırlar. Bu yönleriyle azo boyarmaddeleri bilimsel çalışmalarda oldukça dikkat çekmektedirler (Kırkan ve Gup, 2008; Seferoğlu, 2009).

Bu tezde; literatürde verilen yöntem (Yazdanbakhsh ve diğerleri, 2010; Seferoğlu ve Ertan, 2008) kullanılarak sentezlenmiş ve yapıları, FTIR ve ¹H-NMR spektroskopik yöntemleri kullanılarak doğrulanmış, urasil içeren azo boyarmaddeleri, 6-amino-5 - [(4-nitrofenil) diazenil] pirimidin-2,4 (1H, 3H) -dion (**I**) ve 6-amino-5 - [(4-bromofenil) diazenil] pirimidin-2,4 (1H, 3H) -dion (**II**) üzerine çalışılmıştır. Bileşik I ve II'nin moleküler modelleme çalışması GaussView 5 (Dennington ve diğerleri, 2009) programı ve Gaussian 09 (Frisch ve diğerleri, 2009) paket yazılımı kullanılarak; Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (DFT) DFT/B3LYP yöntemi ile gerçekleştirilmiş, antiparaziter aktiviteleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile *in vitro* olarak test edilmiştir. Testlerde, urasil içeren azo boyarmaddelerinin standart *L.infantum*, *L.tropica* ve *L.major* parazitlerinin üzerine etkinliği Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri ve *T.vaginalis*'e karşı Minimum Letal Konsantrasyon (MLK) değerleri saptanarak, standart kontrol ilaçlardan (sırasıyla Amfoterisin B ve Metranidazol) elde edilen değerlerle karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, Bileşik I ve II'nin moleküler yapılarına ait yapısal parametreler, moleküler modelleme çalışması ile belirlenmiş, IR ve ¹H-NMR spektral verileri elde edilmiş, spektral veriler deneysel olanlarla karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve bu bileşikler, seçilen parazitler *L.infantum*, *L.tropica*, *L.major* promastigotları ve *T.vaginalis* trofozotlerine karşı, sırasıyla antilayşmanyaz ve trikomonasidal aktiviteleri açısından ilk kez test edilmiştir.

Urasil içeren azo boyarmaddelerinin antilayşmanyaz, ve trikomonasidal aktivitelerinin *in vitro* olarak ortaya konulması, bu hastalıklarla mücadele etmek için yapılan çalışmalara katkı sağlamak amacıyla, ilaç hammaddesi olarak kullanılabilecek bileşiklerin çeşitliliğini artırmak açısından son derece önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Urasil ve Türevleri

Tüm organizmaların temel yaşam süreçlerinin ilk basamağında bulunan nükleik asitlerin (DNA ve RNA) en önemli bileşenleri pürin ve pirimidin bazları olan adenin, guanin, sitozin, timin ve urasildir. Bundan dolayı bu biyomoleküller ve türevleri, biyolojik yaşamda büyük öneme sahiptir. Özellikle urasil ve bazı türevlerinin, ilgi çekici biyolojik ve kemoterapotik özellikler gösterdiği gözlenmiştir (Rastogi, 2011).

Temel biyolojik süreçlerde gerekli enzimlerin sentezlenmesinde ribozomların ve fosfatın bağlanmasında önemli bir yere sahip olan pirimidinler grubuna ait urasil türevleri (Garrett ve Grisham, 1997), önemli farmakolojik aktiviteler de göstermektedir (Palafox ve diğerleri, 2007).

Pirimidin halkasının C5 ve C6 atomlarına yerleşimle oluşturulan sentetik pirimidinler üzerinde yapılan araştırmalar, dikkat çekici biyolojik ve farmakolojik özelliklerin varlığını ortaya koymaktadır (Soni ve diğerleri, 1996). Bu nedenle urasil türevleri antitümör, antibakteriyel ve antiviral özellik gösteren ilaçlarda kullanılır (Palafox ve diğerleri, 2007).

2.2. Azo Boyarmaddeleri

Renklendiriciler, boyarmadde ve pigmentler olarak ikiye ayrılır. Sentetik boyarmaddelerden azo boyarmaddeleri ilk defa, Ch. Méne tarafından 1861’de Anilin Sarısı ve 1863’de C. Martius tarafından Bismark Kahverengisi olarak üretilmiştir. Bu boyarmaddeler iki basamakta diazo-kenetlenme yöntemiyle elde edilmiştir (Zollinger, 1991). 1870’lerde suda çözünmesi ve yüne karşı etkisi yüksek olan azo boyarmaddelerinin gelişme süreci hız kazanmıştır (Eyüboğlu ve diğerleri, 1983). 1912 yılı itibariyle de azo boyarmaddelerinin metal kompleksleri sentezlenmeye başlanmış ve 1950 sonrasında da heterosiklik bileşiklerden reaktif boyarmaddeler ortaya konarak dayanıklılıkları artan boyarmaddeler sentezlenmiştir (Gümrükçüoğlu ve Kocaokutgen, 1990).

Boyarmaddeler sınıfının yaklaşık %70'ini azo boyarmaddeleri oluşturmaktadır (Patai, 1975). Azo boyarmaddelerinin boyama gücünün yüksek olması, kolay elde edilmeleri, kullanım amaçlarındaki çeşitlilik, geniş renk skalasına ve çok iyi renk haslığına sahip olmaları, ham maddelerinin kolay ulaşılabilir ve düşük maliyetli olması nedeniyle boyarmaddeler arasında büyük öneme sahiptir (Gordon ve Gregory, 1983).

Azo boyarmaddeleri, yapılarındaki kromofor grubu olan, azo ($-N=N-$) grubu ile karakterize edilmektedirler. Karbon atomları, sp^2 hibritleşmesine uğrayan azot atomları ile bağlanmaktadır (Zollinger, 1991). Azo grubuna bağlanan bu karbon atomlarından biri aromatik (benzen, naftalin ve türevleri) veya heterosiklik halka, diğeri ise aromatik ya da enolleşebilen alifatik zincire bağlı bir grup olabilmektedir.

Doğal boyarmaddeler azo grubu içermemektedir, dolayısıyla azo boyarmaddelerinin tümü sentetiktir. Azo boyarmaddeler sulu çözeltiler içinde basitçe sentezlenebilirler ve başlangıç maddelerinin değiştirilebilir olması nedeniyle farklı özelliklere sahip olacak şekilde elde edilebilirler (Başer ve İnancı, 1990).

Azo boyarmaddelerinin yapısal ve elektronik özelliklerini ortaya koymak için hem deneysel teknikler hem de teorik yöntemler kullanılarak yeni azo boyarmaddelerinin sentezlenmesi ve bunların karakterize edilmesi gereklidir. Kuantum kimyasal hesaplama yöntemleri (Ramachandran ve diğerleri, 2008; Lewars, 2016) malzemelerin yapısal, titreşimsel ve elektronik özelliklerinin tanımlanmasında ve aydınlatılmasında fayda sağlarlar. Bazı azo boyarmaddelerinin yapıları FTIR, 1H -NMR ve ^{13}C -NMR gibi deneysel teknikler ve teorik yaklaşımlar kullanılarak karakterize edilmiştir (Şener ve diğerleri, 2017).

Kapalı formülleri aynı, atomlarının uzayda üç boyutlu düzenlenmesi bakımından farklı organik bileşikler izomer olarak adlandırılırlar. Azo boyarmaddelerinde geometrik izomeri ve tautomeri olmak üzere iki çeşit izomerleşme gözlenmektedir. Azo boyarmaddeleri, $-N=N-$ köprüsünde yer alan π bağı nedeniyle dönme engeline sahiptir ve bu durum geometrik izomeriye neden olmaktadır. Tautomeri; genel anlamda değerlik tautomerisi ve proton tautomerisi olarak iki grupta incelenmektedir. Azo boyarmaddelerinde görülen tautomeri formu proton tautomerisidir. Tautomerleşme olayında daima bir σ bağı kopması ve oluşması durumu söz konusudur. Proton molekülden ayrılarak aynı moleküldeki farklı

bir atoma bağlanır. Bu proton göçleri genel olarak heteroatoma (O, S, N) bağlı hidrojenlerin yer değiştirmesi sonucu oluşur. Bu yer değiştirme asit veya baz kullanılarak katalizlenir. Amino ve hidroksi grubu içeren boyarmaddelerde; amino-imino, keto-enol, azo-hidrazon gibi dengeler görülmektedir. Azo boyarmaddelerinin hangi tautomerik formda bulunduğunun belirlenmesi oldukça önemlidir. Hidroksil grubu içeren boyarmaddelerde azo-hidrazon tautomerleşmesi gözlenir (Reichardt, 1998).

Tautomeri ile ilgili çalışmalarda yapı aydınlatması için FTIR, ^{13}C -NMR ile ^1H -NMR, UV ve X ışını kırınımı (XRD) yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca ilgili bulguları desteklemek amacıyla PPP, MO ve DFT yaklaşımları kullanılarak hesaplamalar yapılmaktadır (Gordon ve Gregory, 1983; Lycka ve diğerleri, 1989).

2.2.1. Azo boyarmaddelerinin sentez yöntemleri

Temelde azo boyarmaddeleri, azo grubunun oluşturulmasına dayanan sentez yöntemi ve yapısında azo grubu bulunan bileşiklerin kullanıldığı sentez yöntemi olmak üzere iki yöntem ile sentezlenmektedir.

Azo grubu içeren bileşiklerle yapılan sentez yöntemi

Azo grubu içeren bileşiklerle yapılan sentez yönteminde; korunmuş amino gruplarının açılması, amino azo bileşiklerinin açılınması, fenolik hidroksi gruplarının açılınması veya alkilenmesi ve metal- kompleks oluşturması tepkimelerinden yararlanılmıştır.

Azo grubunun oluşturulmasına dayanan sentez yöntemi

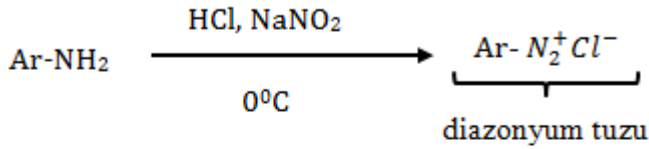
Azo grubunun oluşturulmasına dayanan sentez yönteminde; kenetlenme tepkimesi, aminlere nitro bileşiklerinin katılması, nitro bileşiklerinin indirgenmesi ve amino bileşiklerinin yükseltgenmesi tepkimeleri kullanılmıştır. Literatürde en çok tercih edilen yöntem kenetlenme tepkimesidir.

Azo grubunu oluşturmak için gerçekleştirilen kenetlenme tepkimeleri “azo kenetlenmesi” olarak da adlandırılmaktadır. Bu tepkimeler, aromatik birincil aminden elde edilen diazonyum tuzu ile -OH, -NH₂, -NH(R) gibi süstitüentleri içeren aromatik yapıda olan

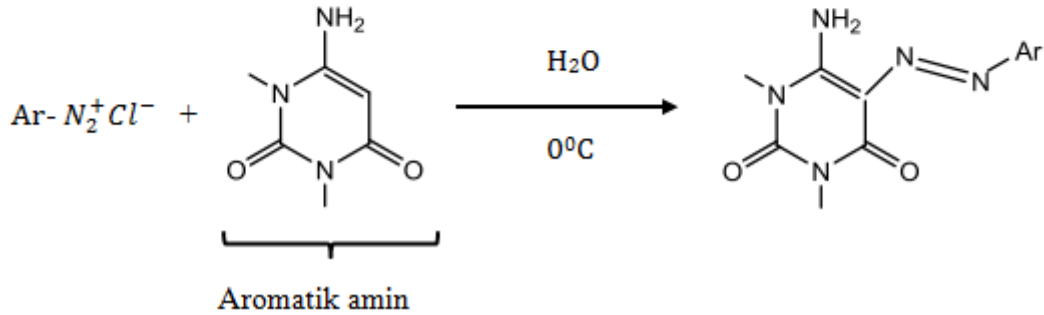
kenetleme bileşeninin karşılıklı etkileşimi ile meydana gelir. Sentez, diazolama ve kenetleme olmak üzere iki aşamada gerçekleşir.

Diazolama aşamasında tepkime sulu ortamda gerçekleşir. Aromatik aminler suda çözünmemeleri nedeniyle sulu asitte çözülerek tuzlarına dönüştürülür ve soğukta doymuş NaNO_2 çözeltisiyle etkileştirilerek diazonyum tuzuna dönüştürülürler. Kenetlenme aşamasında ise, diazonyum katyonu elektrofil görevi görür ve aromatik amin olarak kullanılan bileşik elektrofilik atak yaparak proton ayrılmasıyla azo boyarmadde bileşiğini oluşturur. Tepkime ortamı nötr veya zayıf asitlidir (Yazdanbakhsh ve diğerleri, 2010).

Diazolama Tepkimesi



Kenetlenme Tepkimesi



Şekil 2.1. Azo grubunun oluşturulmasına dayanan sentez tepkimesi

2.3. Moleküler Modelleme

Moleküler modelleme, çeşitli hesaplama yöntemleri kullanılarak, bilgisayar ortamında moleküllerin özelliklerinin ve davranışlarının belirlenmesidir. Moleküllerin atomlarının kartezyen koordinatları, bağ uzunlukları, bağ açıları ve dihedral açıları (atomik pozisyonlarının), atom pozisyonlarına ve yarıçaplarına bağlı olarak moleküler yüzeyleri,

atomik mesafeleri, tipleri ve bağ düzenlemelerinden elde edilen enerjileri moleküler modelleme ile elde edilebilmektedir (Dirlik, 2013; Gözütok, 2009; Kaya, 2013).

Günümüzde, farmakoloji alanında yeni ilaçların geliştirilmesinde, hesaplama yöntemi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İlaç etken maddelerini sentezlemeden önce yapılan molekül modelleme çalışmalarından elde edilen veriler kullanılarak, tasarlanacak kılavuz bileşiklerin belirlenebilmesi mümkün olmaktadır (Arısoy ve Temiz Arpacı, 2016). Moleküler modelleme ile moleküller farklı açılardan görülebilmekte, geometrileri ve izometrik yapıları belirlenebilmekte, enerjileri hesaplanabilmekte, IR, UV ve NMR spektrumları ve Moleküler Orbital (MO) diyagramları elde edilebilmektedir (Popelier, 2000).

Bilgisayarlı hesaplama yöntemlerinde, moleküler yapı ve spektroskopik özellikleri dikkate alan, moleküler mekanik ve elektronik yapı olmak üzere iki temel kuram vardır. Elektronik yapı yöntemleri, kuantum mekaniksel yasaları kullanır. Ayrıca, yarı deneysel ve ab-initio yöntem olarak iki kısma ayrılmaktadır. Ab-initio yöntemi için sıklıkla kullanılan yaklaşımlar, Hartree-Fock Alan (SCF) ve Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisidir (DFT).

HF modelinde, elektron-elektron etkileşimleri için ortalama bir potansiyel temel alınır. Bu yaklaşım, molekül frekanslarının hesaplanması ve molekül geometrisinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. DFT modelinde ise, molekül dalga fonksiyonları yerine, elektron olasılık yoğunluğu (ρ) kullanılır. Bu model, molekül özelliklerinin ortaya konulmasında çok daha doğru sonuçlar vermektedir.

2.3.1. Hartree-Fock alan teorisi

Hartree-Fock (HF) yöntemi, çoklu elektron içeren atom ve iyonların özelliklerinin büyük bir kısmını hassas olarak tanımlamaktadır. Çıkış noktası, zamandan bağımsız parçacık modeli olan bu yaklaşım, 1928'de Hartree tarafından formüle edilmiştir. Bu yaklaşımda elektron-elektron itmesi hesaba katılmaz, her bir elektron çekirdeğin çekici alanı ve diğer elektronların itme etkileşmelerinin ortalama etkisini hesap ederek etkin bir potansiyelde hareket eder. Böylelikle çok elektronlu sistemde yer alan her bir elektron, kendi dalga fonksiyonu ile tanımlanır.

HF yöntemi atomik dalga fonksiyonları ve enerjilerinin elde edilmesinde ilk adım sayılabilir. HF yöntemi, sadece atomlara değil bir molekül veya katıdaki elektronlar gibi başka sistemlere de uygulanabilir (Leach, 2001).

HF teorisinin avantajı çok elektronlu Schrödinger denklemini basit tek elektronlu denklemlere dönüştürmesidir (Yılmaz, 2011). En önemli problemi ise, moleküler bir sistem içinde yer alan, özellikle karşıt spinli elektronlar arasındaki korelasyonları tanımlamada yetersiz olmasıdır (Arslan, 2005).

2.3.2. Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (DFT)

Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (Density Functional Theory, DFT) yoğun madde tanımlamada önemli bir “ab initio” yaklaşımıdır (Akgeç, 2010). DFT yöntemi, elektron yoğunluk fonksiyonu ile elektron korelasyon modelinin ilkelerine dayanmaktadır. Temel seviye enerjisinin elektron yoğunluğu (ρ) ile ifade edildiği, 1964 yılında yayınlanan Hohenberg-Kohn teoremi bu yöntemlerin temelini oluşturmaktadır (Yılmaz, 2011). Yerel yoğunluk yaklaşımı ile de bağdaştırılan DFT yöntemi, moleküllerin taban durum özelliklerinin hesaplanmasında istenilen doğruluğu sağlamaktadır (Akgeç, 2010).

Bu teorem; $V(r) \leftrightarrow n(r)$ şeklinde ifade edilebilirken, taban durum enerjisinin, yoğunluğun fonksiyoneli olarak ifadesi, $E[n(r)] = F[n(r)] + \int n(r)V(r)d^3r$ şeklindedir. Bu ifadede $F[n(r)]$, yoğunluğun evrensel bir fonksiyoneli olmakla birlikte (Nagy, 1998), bu evrensellik $F[n(r)]$ 'nin $V(r)$ potansiyeline bağlı olmaması ve atomlar, moleküller veya katılar gibi tüm sistemler için aynı şekilde sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Harbola ve Banerjee, 2003).

DFT’nde, çok parçacık dalga fonksiyonu yerine, temel değişken olarak, tek parçacık yoğunluğunun kullanılması ve dolayısıyla, sadece üç uzaysal koordinatın fonksiyonu olması sonucu; DFT çok büyük sistemlerin hesaplanmasında oldukça kolaylık sağlamaktadır (Hohenberg ve Kohn, 1964).

DFT, yoğun madde fiziği ve malzeme biliminde yaygın bir şekilde kullanılan, güncel ve deneylerle uyumlu sonuçlar veren, hesaplamalara dayalı bir yöntemdir. Metaller, yarı iletkenler ve yalıtkanların temel durum özelliklerini belirlemede de oldukça başarılıdır

(Akgenç 2010). DFT oldukça güvenilir bir yöntemdir (Xiaohong ve diğerleri, 2010) ve deneysel ile hesaplanmış frekanslar karşılaştırıldığında, HF yönteminden daha uyumlu sonuçlar vermektedir (Schoone ve diğerleri, 2003).

2.3.3. Becke, 3 Parametrelili, Lee-Yang-Parr (B3LYP) karma yoğunluk fonksiyoneli teorisi

Dalga mekaniğine dayanan HF teorisi, kinetik enerji için anlamlı bir ifade vermekte, fakat korelasyon enerjilerinin hesaplanamaması nedeniyle değiş tokuş enerjisi için iyi sonuç vermemektedir. DFT yönteminde ise, kinetik enerji için uygun sonuçlar elde edilememesine karşın, korelasyon enerji terimleri uyumlu bir biçimde hesaplanabilmekte ve değiş tokuş enerji terimi içinde anlamlı bir ifade elde edilebilmektedir. Tam enerji ifadesinin elde edilebilmesi amacıyla saf HF ya da saf DFT modellerinin yerine, bu modellerin her birine ait enerji ifadelerinin, toplam elektronik enerji ifadesinde kullanılmaları sonucu, karma (hibrit) modeller üretilmiştir. Karma modeller toplam enerji, bağ uzunlukları, iyonizasyon enerjileri gibi birçok büyüklüğü saf modellere göre çok daha iyi hesaplamaktadırlar.

Literatürde sıklıkla karşılaşılan enerji fonksiyonelleri; H28, TF27 (kinetik enerji fonksiyoneli); F30, D30 (değiş tokuş enerji fonksiyoneli); LYP, VWN (korelasyon enerji fonksiyonelleri) şeklindedir (Kurt,2003).

Bir karma modelde bu enerji ifadeleri bir araya getirilerek yeni bir enerji ifadesi elde edilmektedir. Becke, değiş tokuş ve korelasyon enerjisi E^{xc} için aşağıdaki karma modeli ortaya koymuştur.

$$E_{\text{karma}}^{xc} = C_{HF} E_{HF}^x + C_{DFT} E_{DFT}^{xc}$$

Bu formülde C'ler sabittir. Becke'nin önermiş olduğu karma modeller BLYP ve B3LYP'dir. Bu modellerden en iyi sonuç veren Becke karma yöntemi LYP korelasyon enerjili ve üç parametrelili B3LYP'dir. B3LYP modelinin değiş-tokuş ve korelasyon enerjisi;

$$E_{B3LYP}^{XC} = E_{LDA}^X + C_0(E_{HF}^X - E_{B3LYP}^{XC}) + C_1\Delta E_{B88}^X + E_{VWN3}^C + C_2(E_{LYP}^C - E_{VWN3}^C)$$

İfadesi ile verilmektedir.

E_{LDA}^X : yerel değiş-tokuş enerjisi

E_{B88}^X : Becke 88 değiş-tokuş enerjisi

E_{VWN3}^C : Vosko, Wilk ve Nusair korelasyon enerjisi

C_0 , C_1 ve C_2 : Deneysel değerlerden türetilmiş sabitlerdir. Değerleri sırasıyla 0,2; 0,7; 0,8 dir.

B3LYP modelinde bir molekülün toplam elektronik enerjisi,

$$E_{B3LYP} = E^T + E^V + E^J + E_{B3LYP}^{XC}$$

şeklinde ifade edilmektedir.

E_{B3LYP}^{XC} : B3LYP değiş-tokuş ve korelasyon enerjisidir (Becke, 1993; Yılmaz, 2011).

2.3.4. Temel setler

Elektronik yapı hesaplama yöntemlerinin çoğunda, bir baz seti, sistemin bilinmeyen moleküler orbitallerini (MO) temsil etmek amacıyla kullanılır. Orbitallerin matematiksel tanımı, temel set olarak tanımlanmaktadır. Her bir moleküler orbital, temel baz set olarak bilinen atomik orbital terimlerinin doğrusal toplamıyla (LCAO: Atomik Orbitallerin Lineer Kombinasyonu) ifade edilmektedir. Bu setler orbitallerin şekline göre Gaussian-tip fonksiyonların lineer kombinasyonlarını kullanmaktadır.

Baz setleri, orbitallerin en temel hallerini tanımlayan küçük ölçekli baz setleri ve orbitalleri çok daha detaylı tanımlayan genişletilmiş baz setleri olmak üzere iki ana kategoride incelenir. Genişletilmiş baz setleri polarizasyon fonksiyonu içeren (Polarised Basis Sets) ve difüzyon fonksiyonu içeren baz setleri (Diffuse Basis Sets) şeklinde çeşitli baz setlerini içermektedir. Polarizasyon fonksiyonu içeren baz setlerine 6-31G(d) ve 6-31G(d,p); difüzyon fonksiyonu içeren baz setlerine ise 6-31+G ve 6-31++G örnek verilebilir (Başköse, 2011).

2.4. Gaussian 09 Paket Yazılımı

Bu çalışmada, Gauss serisinin son ürünü olan Gaussian 09 paket yazılımı kullanılmıştır. Gaussian 09; moleküler mekanik, yarı-deneysel ve ab-initio yöntemleri içeren ve her üç yöntem için birçok teori ve temel set seçeneğine sahip, oldukça kapsamlı bir programdır. Gaussian 09 ile moleküllerin geometrik optimizasyonları yapılabilir, enerjileri, enerjiye bağlı titreşim frekansları, kuvvet sabitleri ve dipol momentleri hesaplanabilir.

Gaussian 09; molekül dalga fonksiyonunun kararlılığını test edebilmekte ve potansiyel enerji yüzeyinde dolaşarak geçiş hallerini, tepkime yollarını ve minimumları tarayabilmektedir. Ek olarak, IR ve Raman spektrumları, termokimyasal özellikleri, bağ ve tepkime enerjileri, molekül orbitalleri, atom yükleri, çok kutuplu momentler, NMR ve manyetik duyarlılık titreşimsel şiddetleri, elektron ilgisi ve iyonlaşma enerjileri, kutuplanabilirlik ve hiperkutuplanma, elektrostatik potansiyel ve elektron yoğunluğu gibi birçok özelliğin atomlar ve moleküller için hesaplanmasına olanak sağlar. Bu özelliklerin tamamı gaz fazında, çözelti içinde ve kristal yapılarında hesaplanabilmektedir (Frisch ve diğerleri, 2009).

2.4.1. Gauss View 5.0.8

Gauss View 5.0.8 Gaussian paket programları için giriş dosyalarının hazırlanması ve Gaussian çıktılarının görselleştirilmesi amacıyla hazırlanmış bir grafik ara yüzdür. Gauss view molekülleri görselleştirerek istenen yönde döndürülmesine, hareket ettirilmesine ve moleküllerde değişiklik yapılmasına olanak sağlar. Program karmaşık hesaplamalar için de giriş dosyalarının kolaylıkla hazırlanmasını sağlar. Gaussian programı ile gerçekleştirilen hesaplamaların sonuçları grafiksel olarak incelenebilir, optimize edilmiş moleküler yapılar,

moleküler orbitaller, elektrostatik potansiyel yüzeyi, atomik yükler, IR, Raman, NMR, VCD spektrumları, titreşim frekanslarına bağlı normal mod animasyonları elde edilebilir (Foresman ve Frisch, 1996).

2.4.2. Geometri optimizasyonu

Moleküler geometri optimizasyonu, minimum enerjili noktaların bulunması işlemidir. Minimum enerjili noktaların bulunması için ilk aşamada gradyent vektörü bulunmalı, daha sonra da bu vektörü sıfır yapan noktalar tespit edilmelidir. Gradyent vektörünün sıfır olduğu bu noktalar minimum enerjili duruma karşılık gelmektedir ve molekülün bu durumdaki geometrisi denge durumu geometrisi olarak adlandırılır.

Geometrik optimizasyon, potansiyel enerji yüzeyindeki minimumları araştırarak moleküler sistemin denge yapılarını tahmin etmektedir. Minimum ve eyer noktalarında enerjinin birinci türevi yani gradyent sıfırdır ve bu noktalar kararlı noktalar olarak kabul edilmektedir. Başarılı geometri optimizasyonları için bu kararlı noktaları bulmak hedeflenmektedir. Optimizasyon belirlenmiş bir giriş geometrisi ile başlar ve her noktada enerji ve gradyent hesaplanarak potansiyel enerji yüzeyini dolaşır. Hesaplanan geometride gradyent vektörü sıfır ve bu kademede hesaplanan değerlerle bir sonraki kademede hesaplanan değerler arasındaki fark ihmal edilebilir bir değerde ise optimizasyon tamamlanmış olur (Şahin, 2013).

2.5. Antiparaziter Aktivite Belirleme Yöntemleri

Enfeksiyon sırasında canlıdan alınan örneklerden üretilen mikroorganizmanın, hangi ilaçlara ve bunların hangi yoğunluklarına duyarlı olduğu antiparaziter aktivite belirleme yöntemleriyle ortaya konulmaktadır. Dilüsyon yöntemleri ve moleküler yöntemler en sık kullanılan antiparaziter duyarlılık testleridir. Genellikle mikrobiyoloji laboratuvarlarında dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır (Jorgensen, 2015).

2.5.1. Dilüsyon yöntemi

Antiparaziter maddenin bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmesi veya öldürmesi için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanan ve kantitatif sonuçlar veren bir yöntemdir. Bu sonuçları; inokulum yoğunluğu, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, besiyeri ve antiparaziter maddenin stabilitesi etkilemektedir (Rios ve diğerleri, 1988).

Sıvı besiyerinde antiparaziter aktivitesi belirlenecek olan maddenin seri bir şekilde sulandırımı yapılır, duyarlılığı belirlenecek mikroorganizmanın belirli sayıda mikroorganizma içeren süspansiyonundan eşit olarak eklenmesi ile yapılmaktadır (Murray ve diğerleri, 2009).

Üremenin olup olmadığı bulanıklık tayini ile saptanmaktadır. Üremenin olmadığı en düşük test edilen madde konsantrasyon değeri minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) olarak tanımlanır (Burt, 2004).

Tüp Dilüsyon Yöntemleri

Tüp dilüsyon yönteminin benzer prensiplere sahip olan, makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri olmak üzere iki şekili bulunmaktadır. Mikrodilüsyon yöntemi daha az miktarlarla çalışıldığı için makrodilüsyon yöntemine göre daha ekonomiktir. Mikrodilüsyon yönteminde 96 kuyucuklu plaklar (mikroplak) kullanılırken makrodilüsyon yönteminde steril tüpler kullanılmaktadır (Mann ve Markham, 1998).

Antiparaziter madde özel çözücülerde hazırlanır ve kullanılacak sıvı besiyerinde yarı yarıya azaltılarak antiparaziter maddenin dilüsyonları yapılır. Mikroorganizmaların standart inokulumu (1×10^6 CFU/ml) hazırlanarak, antiparaziterin farklı dilüsyonlarını içeren her bir tüpe veya kuyucuğa eşit miktarda ilave edilir.

Hazırlanan farklı konsantrasyonda antiparaziter madde dilüsyonlarının, belirli bir konsantrasyondaki mikroorganizmaya karşı etkisi incelenmektedir. Antiparaziter duyarlılığı test edilen mikroorganizmaya karşı antiparaziter maddenin etkili konsantrasyonları ile; üreme olup olmama durumuna göre MİK değeri belirlenmektedir

(Demirpek ve Dizer, 2010). Üremenin gözlenmesinde, en çok optik yoğunluk (OD) ölçümü ve canlı mikroorganizmaların sayımı yöntemleri kullanılmaktadır (Mann ve Markham, 1998).

2.5.2. Besiyeri

Besiyeri, laboratuvar ortamında hazırlanmış sıvı veya jel yapısında olan, mikroorganizmalar veya hücrelerin gelişimini desteklemek için kullanılan ve mikroorganizmaların geliştirilmesi, izolasyonu, kültürasyonu, identifikasyonu ve sayımı gibi farklı amaçlara yönelik besleyici ortamlara verilen genel isimdir (Pitt, 1973). Besiyerleri, mikroorganizma için teşhis yönünden çok önemlidir (Clemmensen ve diğerleri, 2007).

Kullanım amacına göre besiyerlerinin sıvı olan formları bulunmaktadır (Mutlu ve diğerleri, 1999). Katı formdaki besiyerleri agar, sıvı formdaki besiyerleri buyyon veya broth olarak adlandırılmaktadır (Özçelik ve diğerleri, 2011).

Mikroorganizmanın ihtiyaçlarına göre besiyeri için kullanılan maddeler; özellikle distile su, karbon kaynağı (glikoz ve süktroz), azot kaynağı (pepton), fosfor kaynağı ve eser elementler olmak üzere değişiklik gösterebilmektedir (Mutlu ve diğerleri, 1999).

2.5.3. Minimum inhibitör konsantrasyon

Antiparaziter aktivite belirleme testlerinde duyarlılığı test edilen mikroorganizmaya karşı üremenin olmadığı en düşük antiparaziter madde konsantrasyonu Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlenmektedir (Demirpek ve Dizer, 2010).

Antiparaziter bir madde için hesaplanacak olan MİK değerini, inkübasyon sıcaklığı, inokulum miktarı, çalışılan mikroorganizma gibi analiz koşulları etkilemektedir (Courvalin ve diğerleri, 2010).

2.5.4. Minimum letal konsantrasyon

Antiparaziter aktivite belirleme testlerinde, duyarlılığı test edilen mikroorganizmaya karşı herhangi bir üremenin olmadığı (öldüğü) konsantrasyon Minimum Letal Konsantrasyon (MLK) olarak belirlenmiştir (Baygar, 2015: 45).

3. MATERYAL VE METOD

Bu tez çalışması, literatürde verilen (Yazdanbakhsh ve diğerleri, 2010; Seferoğlu ve Ertan, 2008) diazo-kenetlenme yöntemine göre sentezlenmiş ve yapısı FTIR ve ^1H -NMR spektroskopik teknikleri ile doğrulanmış urasil içeren azo boyarmaddeleri; 6-amino-5 - [(4-nitrofenil) diazenil] pirimidin-2,4 (1H, 3H) -dion (**I**) ve 6-amino-5 - [(4-bromofenil) diazenil] pirimidin-2,4 (1H, 3H) -dion (**II**) üzerine gerçekleştirilmiş, bileşiklerin FTIR ve ^1H -NMR spektrumlarından elde edilen spektral veriler, hesaplamalardan elde edilen teorik değerler ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan urasil içeren azo boyarmaddelerinin sentez tepkimesi Şekil 3.1’de verilmektedir.

3.1. Urasil İçeren Azo Boyarmaddelerinin Sentezi

Kullanılan kimyasal maddeler

N,N-Dimetilanilin, KOH, 4-Brom, derişik HCl asit, NaNO_2 ve 6-Amino urasil MERCK firmasından satın alınmış ve ileri saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. Saf su laboratuvarında elde edilmiştir.

Kullanılan cihazlar

Urasil içeren azo boyarmaddelerinin (I, II, Şekil 3.1), ^1H -NMR spektrumları Varian-Mercury 400 MHz lik NMR cihazında DMSO- d_6 çözücüsü ve TMS standardı kullanılarak, FTIR spektrumları ise Perkin Elmer FTIR 1600 (4000-400 cm^{-1}) spektrofotometre cihazında kaydedilmiştir. Bileşik I için; FTIR spektrumu, Ek Şekil 1’de ve ^1H -NMR spektrumu, Ek Şekil 2’de verilmektedir. Bileşik II için; FTIR spektrumu, Ek Şekil 3’te ve ^1H -NMR spektrumu Ek Şekil 4’te verilmektedir. Spektrumlardan elde edilen spektral veriler, DFT hesaplamalarının sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

6-Amino-5-[(E)-(4-nitrofenil)diazenil]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion’un sentezi (I):

Diazonyum tuzu çözeltisinin hazırlanması

Aromatik amin (4-Nitroanlin, 2 mmol) 1.5 mL derişik HCl ve 4 ml su karışım içinde çözülür. Karışım bir tuz / buz banyosunda soğutulur ve sonra soğuk 3 ml su içinde NaNO₂ (2 mmol) çözeltisi sürekli karıştırılarak damla damla ilave edilir. Elde edilen diazonyum tuzu bir tuz / buz banyosu içinde soğutulur.

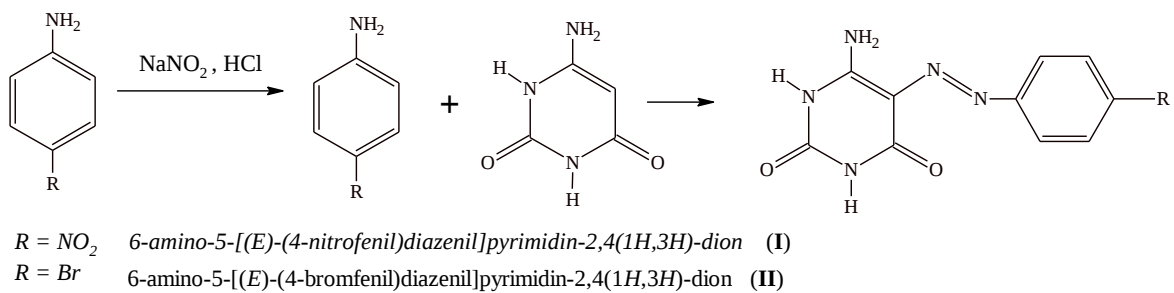
Kenetlenme bileşeni çözeltisinin hazırlanması

6-Aminourasil (2 mmol) üzerine, seyreltik KOH çözeltisinde çözülür ve tuz / buz banyosunda soğutulur.

Tuz/buz banyosunda soğutularak ve sürekli karıştırarak; hazırlanan kenetlenme bileşeni çözeltisine hazırlanan diazonyum tuzu çözeltisi damla damla ilave edilir. Bu arada tepkime ortamına sodyum asetatın sulu çözeltisinden ilave edilir ve çözeltinin pH'nın 4-6 arasında kalması sağlanır. Karışım soğukta 1 saat daha manyetik karıştırıcıyla karıştırılır. Oluşan ham katı azo boyarmadde süzülür, kurutulur. Daha sonra, boyarmadde N,N-dimetilformamid içinde kaynatılarak çözülür. Çözündükten sonra oluşan çözeltiye çökme başlayana kadar damla damla su ilave edilir. Tepkime karışım çökme tamamlanıncaya kadar oda sıcaklığında bekletilir. Oluşan katı boyarmadde süzülür ve kurutulur.

6-Amino-5-[(E)-(4-bromfenil)diazenil]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion'un sentezi (II):

Bileşik II, Bileşik I'in sentezi için verilen deneysel yolla, aromatik amin olarak 4-Bromanilin kullanılarak sentezlenmiştir.



Şekil 3.1. Urasil içeren azo boyarmaddelerinin eldesi.

3.2. Moleküler Modelleme

Bileşik I ve II'nin moleküler modelleme çalışması, Gaussian 09 paket yazılımı (Frisch ve diğerleri, 2009) kullanılarak; Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (DFT), (DFT/B3LYP) yöntemi (Peng ve diğerleri, 1996; Stephens ve diğerleri, 1994) ile gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalarda, bileşiklerin yapısal parametreleri, IR ve ^1H -NMR spektral verileri elde edilmiştir. Çalışmada, grafik ara yüzeyleri için GaussView 5 (Dennington ve diğerleri, 2009) moleküler görselleştirme programı kullanılmıştır.

3.2.1. Geometri optimizasyonu

Bileşik I ve II'nin moleküler yapılarına ait parametreler teorik olarak belirlenmiştir. Hesaplamalar 6-311++G(d,p) temel seti kullanılarak DFT/B3LYP yöntemi (Peng ve diğerleri, 1996; Stephens ve diğerleri, 1994) ile yapılmış ve moleküllerin yapısı optimize edilerek üç boyutlu moleküler yapısı belirlenmiş, bağ uzunlukları, bağ açıları, dihedral açılar gibi yapısal parametreleri elde edilmiştir.

3.2.2. Spektral analiz

Bileşik I ve II için, IR titreşim frekansları; gaz fazında hesaplanmış, teorik titreşim frekans değerlerinin, katı halde kaydedilmiş deneysel frekans değerleri ile uygunluğu iki ölçek faktörüyle sağlanmıştır. DFT/B3LYP/6-311G++(d,p) yöntemi için; hesaplanan frekanslar, 1700 cm^{-1} 'in altındaki değerlerde 0,983 ve 1700 cm^{-1} 'in üzerindeki değerlerde 0,958 katsayısıyla çarpılarak ölçeklendirilmiştir (Abbas ve diğerleri, 2014; Gökce ve diğerleri, 2016).

^1H -NMR hesaplamaları için; öncelikle Bileşik I ve II, IEFPCM yöntemi kullanılarak, B3LYP/6-311++G(d,p) düzeyde DMSO çözücüsünde yeniden optimize edilmiş ve hesaplamalar bu yapılar üzerinden gerçekleştirilmiştir. ^1H -NMR kimyasal kayma değerleri, standart GIAO/B3LYP/6-311G++(d,p) (Gauge-Independent Atomic Orbital) yaklaşımı kullanılarak DMSO çözücünde hesaplanmıştır. (Ditchfield ve Chem, 1972; Wolinski ve diğerleri, 1990). GIAO/B3LYP/6-311G++(d,p) düzeyde elde edilen ^1H -NMR kimyasal kayma değerleri, TMS standardında, 31.9681 ppm değeri referans alınarak ölçeklendirilmiştir (Süleymanoğlu ve diğerleri, 2019).

3.3. *In vitro* Antiparaziter Aktivite

Bileşik I ve II'nin antiparaziter özellikleri; *L.infantum*, *L.tropica*, *L.major* promastigotları ve *T.vaginalis* trofoziotlerine karşı, sırasıyla antilayşmanyaz ve trikomonasidal aktiviteleri test edilerek belirlendi. Çalışma, sıvı mikrodilüsyon yöntemi (Microdilution broth assay) ile *in vitro* olarak gerçekleştirildi. Layşmanya promastigotlarına karşı antilayşmanyaz ve *T.vaginalis*'e karşı trikomonasidal aktivite sonuçları, sırasıyla MİK ve MLK değerleri dikkate alınarak değerlendirildi.

3.3.1. Antiparaziter aktivite testinde kullanılan araç ve gereçler

Antiparaziter aktivite belirleme testlerinde kullanılan cihaz ve gereçler ile bunların kullanım amaçları aşağıda yer almaktadır.

- Derin dondurucu: Standart *L.infantum*, *L.tropica*, *L.major* ve *T.vaginalis* parazitlerinin saklanması için kullanıldı.
- Buzdolabı: Besiyerleri, kullanılan çözeltilerin ve solüsyonların saklanmasında (Arçelik, Türkiye) kullanıldı.
- Hassas terazi: Sentezlenen maddelerin ve besiyerlerinin tartılmasında (Precisa, İsviçre) kullanıldı.
- pH metre: Besiyerlerinin pH değerlerinin ölçülmesinde kullanıldı.
- Vorteks: Sentezlenen maddelerin çözülmesi ve standart parazitlerin hazırlanması aşamasında karıştırma işlemleri için (Boeco, Almanya) kullanıldı.
- Ependorf tüpü: (Copp Expell, 45316, Danimarka): Laboratuvarda analiz edilen maddelerin çözülmesi aşamasında kullanıldı.
- Etüv: Antiparaziter çalışmada kullanılacak parazitlerin besiyerlerinde üretilmesi için (JEIO TECH, Kore) kullanıldı.
- Otoklav: Solüsyonların ve besiyerlerinin sterilizasyon işleminde (ALP, Japonya) kullanıldı.
- Işık Mikroskobu: Parazitlerin canlılık hareketlerinin gözlenmesinde kullanıldı.
- Pastör fırını: Cam tüplerin sterilizasyon işleminde (JSR, Kore) kullanıldı.
- Laminar akımlı biyogüvenlik kabini: Antiparaziter deney çalışmalarında kontaminasyonu önlenmek için (ESCO, ABD) kullanıldı.

- Otomatik pipetler: Tek kanallı veya sekiz kanallı otomatik pipetler mikropyletlere antimikrobik madde ve parazitlerin aktarılması ve dilüsyon işlemlerinde (NICHIRYO, Japonya) kullanıldı.
- Steril 96 Kuyucuklu mikropylet: Antiparaziter çalışmalarda kullanıldı.

3.3.2. Antilayşmanyaz aktivite

Layşmanyaya promastigotlarının hazırlanması

Çalışmada aksenik standart *L.infantum*, *L.tropica* ve *L.major* suşları kullanılmıştır. Parazitin çoğaltılması amacıyla temin edilen suşlar, 50 ml'lik falkon tüpler içerisine %10 Fetal Bovin Serum (FBS F4135 Sigma-Aldrich USA), %1 Penisilin (P3032 Sigma-Aldrich USA), Streptomisin (S9137 Sigma-Aldrich USA) (100.000 ünite penisilin ve 10 mg streptomisin) ve fluconazole'den (2mg/ml) eklenmiş RPMI-1640 (R8758 SigmaAldrich USA) besiyerinde 27°C'de inkübe edilmiştir. Düzenli aralıklarla ekim yapılarak kültürün devamlılığı sağlanmıştır.

Besiyerine ekim yapıldıktan yaklaşık 72 saat sonra kontrol edilmiş ve elde edilen promastigotlar, çoğaltıldıkları besiyerinden 20 ml alınarak steril falkon tüplerine aktarılmış ve 10 dak. 1.000 g'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerdeki süpernatant atılarak çökeltide bulunan promastigotların üzerine 10 ml steril Phosphate-buffered saline (PBS) eklenmiş homojen bir karışım olması amacıyla düşük devirde vortekslenmiştir. Bu hazırlanan çözelti 10 dak. 1.000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant tekrar çıkartılmış ve işlem üç kez tekrarlanarak promastigotların yıkanması sağlanmıştır. Layşmanyaya promastigotları hemositometre (thoma lamı) yardımıyla sayılmıştır. Son konsantrasyonu 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

In vitro antilayşmanyaz aktivite deneyi

Antilayşmanyaz aktivite çalışması, Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmada; Bileşik I ve Bileşik II, her biri toplam miktarı %10'u geçmeyecek şekilde Dimethylsulfoxide (DMSO)/H₂O (%10) içerisinde çözülerek son konsantrasyonu 40 mg/ml olacak şekilde çözüldü. Çözelti iyice homojenize edildikten sonra 0.45 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edildi. Öncelikle

steril 96'lık mikropiagın her kuyucuğuna 100 µl RPMI-1640 besiyeri (FBS ilave edilmiş) eklenmiştir. Daha sonra ilk kuyucuklarına her bileşikten 100 µl eklenmiş ve otomatik pipetle iyice karışması sağlanmıştır. İlk kuyucuktan 100 µl çekilmiş ve ikinci kuyucuğa eklenmiş ve böylece 1/2 oranında bileşik dilüe edilmiştir. Bu işlem 10 kuyucuğa kadar tekrar edilmiş ve onuncu kuyucukta iyice karıştırıldıktan sonra 100 µl karışım dışarı atılmıştır. Böylece dilüsyon oranları 10.000-19 µg/mL arasında olacak şekilde hazırlanmış oldu. Seri dilüsyondan sonra parazit yoğunluğu ayarlanmış olan *L. infantum*, *L. tropica* ve *L. major* promastigotlarından kuyucuklara 100 µl eklenmiştir. Negatif kontrol için 40 mg/ml konsantrasyondaki stok çözelti bileşiğinden 100 µl 11. kuyucuğa ve pozitif kontrol için 100 µl promastigot 12. kuyucuğa eklenmiştir.

Mikroplaklar 27°C'de etüvde 20 saat inkübe edilmiştir. Hazırlanmış olan tüm kuyucuklara 20 saatin sonunda 20 µl alamar mavisinden (0.1 mg/ml) (Resazurin sodium salt R7017 Sigma Aldrich USA) eklenmiş ve 27°C'de 4 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Mikroplak 24, 48 ve 72 saat sonra değerlendirilerek sonuçlar kaydedilmiştir. Çalışmada kontrol ilacı olarak da amfoterisin B kullanılmıştır.

Uygulama iki kez tekrarlanmıştır. Testlerde, pozitif kontrol kuyucuğunda rengin maviden pembeye değişmesi, negatif kontrol kuyucuğunda herhangi bir renk değişikliği gözlenmemesi beklenmektedir.

3.3.3. Trikomonasidal aktivite

T.vaginalis trofozoitlerinin hazırlanması

Trikomonasidal aktivite çalışmasında, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarından sağlanan *T.vaginalis* suşları kullanıldı. İzolasyon için aksenik triptikaz maya özütü maltoz (trypticase yeast extract maltose; TYM) besiyerine *T.vaginalis* suşlarının ekimleri yapıldı. Parazitin canlılığını sürdürmesi için, 48-72 saatte bir TYM besiyerinde pasajlandı. TYM besiyeri hazırlanırken; 20,0 g trypticase, 10,0 g yeast extract, 5,0 g maltose, 1,0 L-Cysteine HCl, 0,2 g L-Ascorbic acid, 0,8 g KH₂PO₄, 0,8 g K₂HPO₄, 0,5 g Bacto agar ve 900,0 ml damıtık su kullanıldı ve pH 6 olarak ayarlandı. Çözünme ve sterilizasyon sağlaması için hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 45 °C'ye kadar soğutulan besiyeri içine önceden

56 °C’de 30 dakika inaktive edilmiş 100 ml steril Fetal sıgır serumu (FBS) aseptik olarak eklendi. Antibiyotik olarak 100 IU/ml streptomisin ve 100 IU/ml penisilin eklenerek 10’ar ml vida kapaklı tüplere dağıtıldı. Saf kültürler elde edildikten sonra trikomonasidal etki için *in vitro* deney düzeneği oluşturuldu.

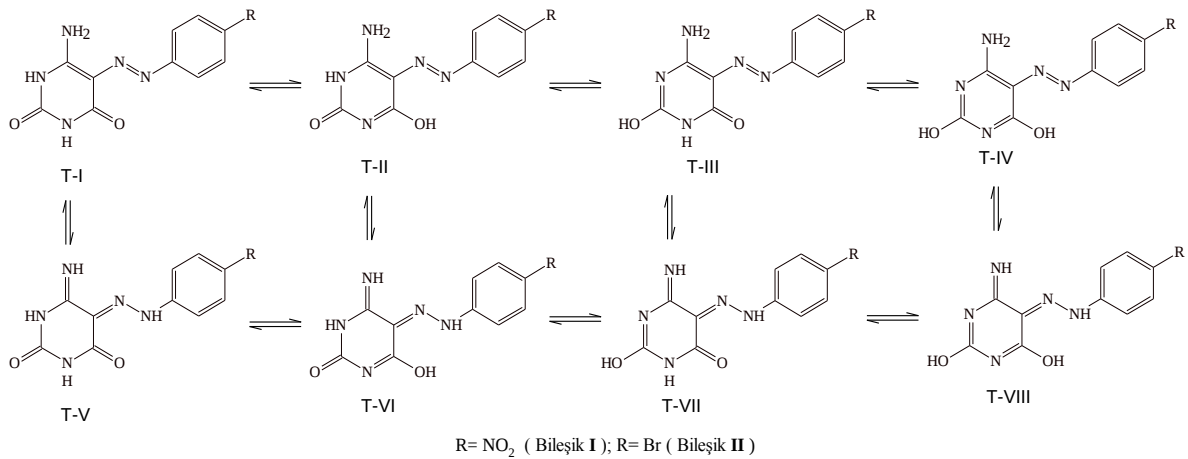
In vitro trikomonasidal aktivite deneyi

T.vaginalis suşu, antibiyotik (penisilin+streptomisin) ve FBS içeren TYM besiyerinde beş kez pasaj yapılarak çalışmaya başlandı. Bileşik I ve II, 100’er mg olarak eppendorf tüplerde saklandı. Çözücü olarak %100 DMSO kullanıldı ve hazırlanan stok çözeltinin son konsantrasyonları 10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 625, 312.5 156.2, 78.1, µg/ml olacak şekilde ayarlandı. Pozitif kontrol olarak metronidazole temin edildi ve son konsantrasyonlar 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.1 1.56 µg/ml olacak şekilde TYM besiyeri ile sulandırıldı. Bileşik I ve II’nin *in vitro* duyarlılık testleri, 96 kuyucuklu U tabanlı steril hücre kültürü plaklarında dilüsyon yöntemiyle araştırıldı. Plaklar bir saat 37°C’de bekletildikten sonra 10⁶/ml trofozoit olacak şekilde *T.vaginalis* trofozoitleri eklendi ve 37°C’de aerobik ortamda 48 saat inkübe edildi. Deney düzeneği hücre kültürü plaklarında üç kuyucuk olacak şekilde üç kez tekrarlandı. İnkübe edilen plaklar 16, 24, ve 48 saatlerde invert mikroskopunda ve %0,5’lik trypan blue ile MLK değeri *in vitro* olarak değerlendirildi. Lethal yüzde için $100 - (\text{canlı hücre sayısı} / \text{toplam hücre sayısı} \times 100)$ formülü kullanıldı (Strober, 2015). Ayrıca MLK için hareketsiz *T.vaginalis*’lerin bulunduğu kuyucuklardan alınan trofozoitlerin canlı olmadıklarını kanıtlamak için yeni besiyeri kuyucuğuna ekilip, 16, 24, ve 48 saatlerde üreme kontrolü yapılarak tanımlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Teorik Hesaplamalar

Urasil içeren azo boyarmaddeleri; 6-amino-5 - [(4-nitrofenil) diazenil] pirimidin-2,4 (1 H, 3H) -dion (**I**) ve 6-amino-5 - [(4-bromofenil) diazenil] pirimidin-2,4 (1H, 3H) -dion (**II**)'in teorik çalışmasında, öncelikle bileşiklerin Şekil 4.1'de verilen olası tautomerik formlarındaki moleküler yapıları optimize edilmiş ve moleküler toplam enerjileri hesaplanmıştır. En düşük enerjili ve dolayısıyla en kararlı tautomerik form belirlenmiş ve hesaplamalar bileşiklerin bu yapıları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Bileşik I ve II'nin yapısal ve spektral parametreleri DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) yöntemi ile elde edilmiş, teorik IR ve ^1H -NMR verileri deneysel olanlarla karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.1. Urasil içeren azoboyarmaddeleri, Bileşik I (R=NO₂) ve Bileşik II'nin (R=Br) olası tautomerik formları.

4.1.1. Geometri optimizasyonu

Bileşik I ve II'nin, olası tautomerik formlarının; gaz fazında ve DMSO çözücünde DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) yöntemi ile elde edilen optimize edilmiş yapılarının toplam moleküler enerjileri kcal/mol biriminde Çizelge 4.1'de verilmektedir.

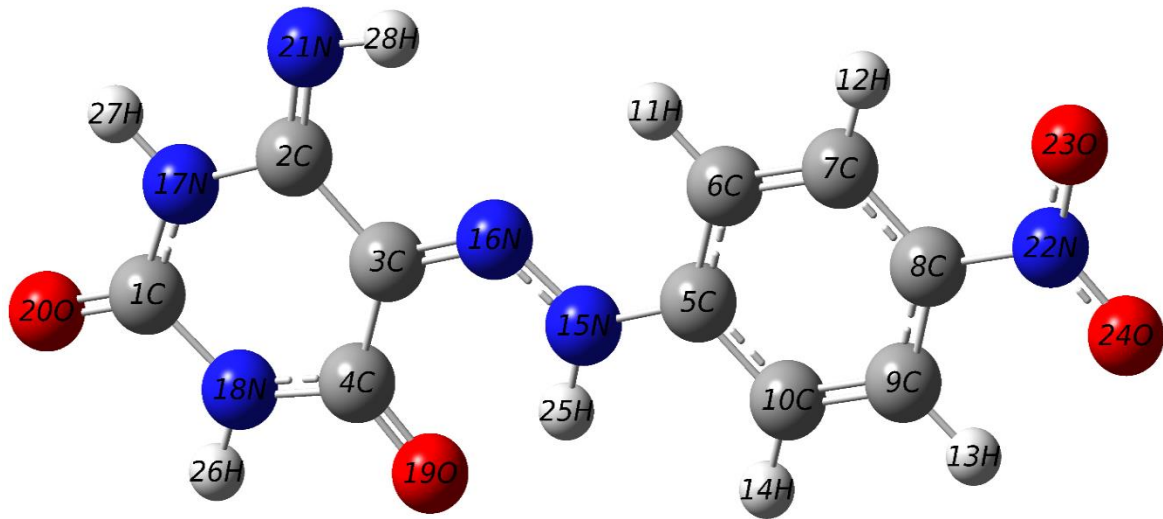
Çizelge 4.1 den de görülebileceği gibi Bileşik I ve II için, gaz fazında ve DMSO çözücünde en düşük enerjili ve dolayısıyla en kararlı form T-V ile temsil edilen imin-diketo hidrazon

formudur. Bu sonuç dikkate alınarak; teorik çalışmadaki tüm hesaplamalar, bileşiklerin imin-diketo-hidrazon formundaki yapıları üzerinden gerçekleştirilmiştir.

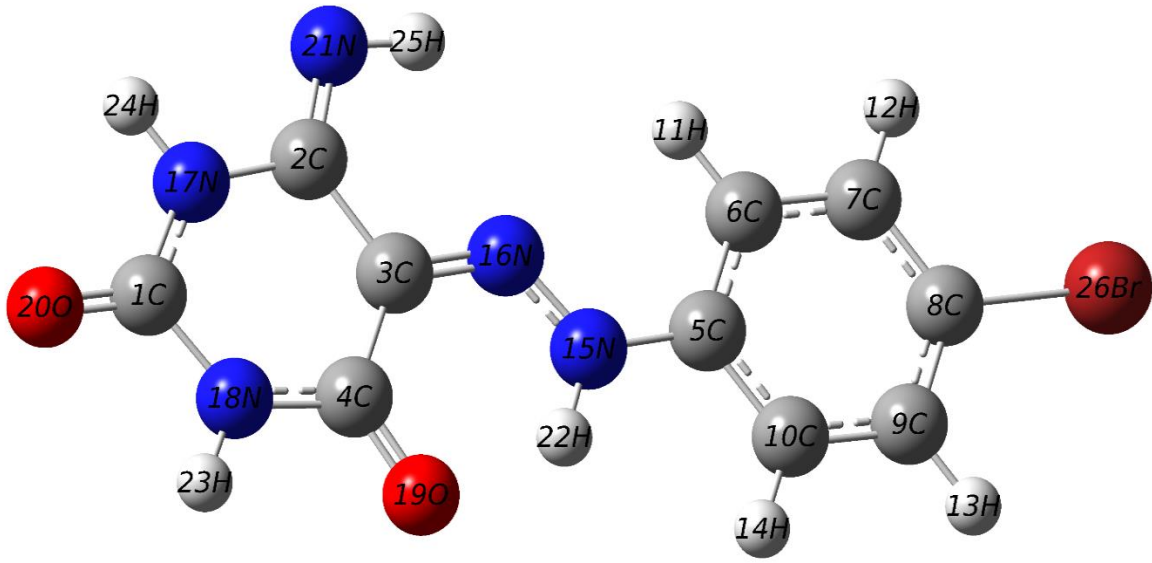
Çizelge 4.1. Bileşik I ve II'nin olası tautomerik formlarının optimize yapılarının toplam moleküler enerji değerleri.

Tautomerik formlar	Moleküler Toplam Enerji (kcal/mol)			
	Bileşik I		Bileşik II	
	Gaz fazında	DMSO çözücünde	Gaz fazında	DMSO çözücünde
T-I	-637.217,9245	-637.238,4632	-2.123.752,0124	-2.123.769,2692
T-II	-637.212,3128	-637.234,2574	-2.123.747,0222	-2.123.765,6480
T-III	-637.212,3033	-637.228,5193	-2.123.746,0502	-2.123.759,2638
T-IV	-637.215,6497	-637.229,2520	-2.123.750,4153	-2.123.760,9209
T-V	-637.226,0562	-637.240,1926	-2.123.760,4652	-2.123.771,1053
T-VI	-637.204,5896	-637.222,4125	-2.123.739,0123	-2.123.753,4402
T-VII	-637.205,9427	-637.222,0158	-2.123.739,9742	-2.123.752,7362
T-VIII	-637.188,4565	-637.206,8224	-2.123.722,6581	-2.123.737,8115

Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon formunda optimize edilmiş moleküler yapıları Şekil 4.2 ve 4.3'de, yapısal parametreleri, Çizelge 4.2-4.4'te sunulmaktadır.



Şekil 4.2. Bileşik I'in imin-diketo-hidrazon (T-V) formunda DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle optimize edilmiş moleküler yapısı.



Şekil 4.3. Bileşik II'in imin-diketo-hidrazon (T-V) formunda DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle optimize edilmiş moleküler yapısı.

Bileşiklerin geometri optimizasyonu ile elde edilen yapısal parametreleri, tek kristal yapıli bileşiklerin X-ışını difraksiyonu ile elde edilen yapısal parametreleri karşılaştırılarak kullanılan yöntemin ve seçilen baz setinin uygunluğu ortaya konulabilir. Bu karşılaştırma spektral parametrelerin de doğru belirlenebileceğinin bir göstergesi olarak önemlidir. Bu nedenle, Bileşik I ve Bileşik II'nin imin-diketo-hidrazon formları için elde edilen bazı yapısal parametreleri, literatürde verilen, tek kristal yapıli benzer bileşiklerin yapısal parametreleri ile karşılaştırıldı.

Bileşik I ve Bileşik II'nin urasil halkarındaki, C=O bağı uzunlukları, imin-diketo-hidrazon formları için sırasıyla 1.21/1.21 Å olarak hesaplanmıştır. Literatürde, bu uzunluk 1.225 Å'dur. C-N bağı uzunlukları, sırasıyla, 1.37/1.37 Å olarak hesaplanmıştır. Literatürde, bu uzunluk 1.373 Å'dur (Das, Saikia, Sridhar ve Thakur, 2008). Bileşik I ve Bileşik II'nin urasil halkarındaki N17-C1-N18 bağ açıları, imin-diketo-hidrazon formları için sırasıyla 114.34/114.30° olarak hesaplanmıştır. Literatürde, bu açı 117.11° olarak verilmiştir (Das ve diğerleri, 2008). Bileşik I ve Bileşik II'nin C6-C5-N15 bağ açıları, imin-diketo-hidrazon formları için sırasıyla 122.17/122.26° olarak hesaplanmıştır. Literatürde, bu açı 122.3° olarak yer almaktadır. Bileşik I'in N16-N15-H25 ve Bileşik II'nin N16-N15-H22 bağ açısının imin-diketo-hidrazon formları için hesaplanan değerleri sırasıyla 117.70/117.70°'dir. Literatürde, bu açı 115.0° olarak verilmektedir.

C10–C5–N15–N16 torsiyon açısı Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon formları için sırasıyla 180.0/179.9° olarak hesaplanmıştır. Literatürde, bu açı 179.2° olarak verilmektedir (Kennedy, McKellar ve Okoth, 2010). Bileşik I ve Bileşik II'nin, literatürdeki benzer tek kristal yapıları bileşiklerin yapısal parametreleri ile uyumlu değerlere sahip olması nedeniyle, uygun yöntemin ve baz setinin seçildiği sonucuna varılabilir.

Çizelge 4.2. Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon (T-V) formları için DFT/B3LYP//6-311++G(d,p) yöntemi ile elde edilen bağ uzunlukları.

Bağ uzunlukları (Å)	Bileşik I	Bağ uzunlukları (Å)	Bileşik II
C1–N17	1,373	C1–N17	1,373
C1–N18	1,403	C1–N18	1,401
C1–O20	1,209	C1–O20	1,211
C2–C3	1,487	C2–C3	1,483
C2–N17	1,401	C2–N17	1,402
C2–N21	1,272	C2–N21	1,273
C3–C4	1,474	C3–C4	1,468
C3–N16	1,307	C3–N16	1,311
C4–N18	1,376	C4–N18	1,379
C4–O19	1,231	C4–O19	1,232
C5–C6	1,401	C5–C6	1,398
C5–C10	1,403	C5–C10	1,399
C5–N15	1,398	C5–N15	1,405
C6–C7	1,386	C6–C7	1,390
C6–H11	1,080	C6–H11	1,081
C7–C8	1,393	C7–C8	1,393
C7–H12	1,081	C7–H12	1,082
C8–C9	1,392	C8–C9	1,392
C8–N22	1,473	C8–Br26	1,913
C9–C10	1,385	C9–C10	1,390
C9–H13	1,081	C9–H13	1,082
C10–H14	1,084	C10–H14	1,085
N15–N16	1,309	N15–N16	1,303
N15–H25	1,026	N15–H22	1,026
N17–H27	1,012	N17–H24	1,012
N18–H26	1,013	N18–H23	1,012
N21–H28	1,018	N21–H25	1,018
N22–O23	1,225	-----	-----
N22–O24	1,226	-----	-----

Çizelge 4.3. Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon (T-V) formları için DFT/B3LYP//6-311++G(d,p) yöntemi ile elde edilen bağ açıları.

Bağ açıları (°)	Bileşik I	Bağ açıları (°)	Bileşik II
N17-C1-N18	114,3	N17-C1-N18	114,3
N17-C1-O20	124,1	N17-C1-O20	124,1
N18-C1-O20	121,5	N18-C1-O20	121,6
C3-C2-N17	114,4	C3-C2-N17	114,4
C3-C2-N21	127,8	C3-C2-N21	128,0
N17-C2-N21	117,8	N17-C2-N21	117,6
C2-C3-C4	120,1	C2-C3-C4	120,3
C2-C3-N16	116,3	C2-C3-N16	116,2
C4-C3-N16	123,6	C4-C3-N16	123,5
C3-C4-N18	115,8	C3-C4-N18	115,9
C3-C4-O19	123,3	C3-C4-O19	123,5
N18-C4-O19	120,9	N18-C4-O19	120,6
C6-C5-C10	120,3	C6-C5-C10	120,0
C6-C5-N15	122,2	C6-C5-N15	122,3
C10-C5-N15	117,5	C10-C5-N15	117,7
C5-C6-C7	119,6	C5-C6-C7	119,7
C5-C6-H11	119,8	C5-C6-H11	119,9
C7-C6-H11	120,6	C7-C6-H11	120,4
C6-C7-C8	119,5	C6-C7-C8	119,9
C6-C7-H12	121,1	C6-C7-H12	119,9
C8-C7-H12	119,5	C8-C7-H12	120,2
C7-C8-C9	121,6	C7-C8-C9	120,8
C7-C8-N22	119,3	C7-C8-Br26	119,6
C9-C8-N22	119,1	C9-C8-Br26	119,6
C8-C9-C10	119,0	C8-C9-C10	119,4
C8-C9-H13	119,7	C8-C9-H13	120,5
C10-C9-H13	121,3	C10-C9-H13	120,1
C5-C10-C9	120,0	C5-C10-C9	120,2
C5-C10-H14	120,0	C5-C10-H14	120,1
C9-C10-H14	120,0	C9-C10-H14	119,7
C5-N15-N16	121,6	C5-N15-N16	121,8
C5-N15-H25	120,7	C5-N15-H22	120,5
N16-N15-H25	117,7	N16-N15-H22	117,7
C3-N16-N15	121,4	C3-N16-N15	121,5
C1-N17-C2	128,1	C1-N17-C2	128,0
C1-N17-H27	115,9	C1-N17-H24	116,0
C2-N17-H27	116,0	C2-N17-H24	116,0
C1-N18-C4	127,2	C1-N18-C4	127,1
C1-N18-H26	115,6	C1-N18-H23	115,7
C4-N18-H26	117,2	C4-N18-H23	117,2
C2-N21-H28	110,3	C2-N21-H25	110,1
C8-N22-O23	117,7	-----	-----
C8-N22-O24	117,6	-----	-----
O23-N22-O24	124,7	-----	-----

Çizelge 4.4. Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon formları (T-V) için, DFT/B3LYP//6-311++G(d,p) yöntemi ile elde edilen torsiyon açıları.

Torsiyon açıları (°)	Bileşik I	Torsiyon açıları (°)	Bileşik II
N18-C1-N17-C2	-0,16	N18-C1-N17-C2	-0,1
N18-C1-N17-H27	-179,9	N18-C1-N17-H24	-179,9
O20-C1-N17-C2	179,8	O20-C1-N17-C2	179,9
O20-C1-N17-H27	0,1	O20-C1-N17-H24	0,1
N17-C1-N18-C4	-0,2	N17-C1-N18-C4	0,0
N17-C1-N18-H26	-179,9	N17-C1-N18-H23	-179,9
O20-C1-N18-C4	179,9	O20-C1-N18-C4	179,9
O20-C1-N18-H26	0,04	O20-C1-N18-H23	0,0
N17-C2-C3-C4	-0,2	N17-C2-C3-C4	0,0
N17-C2-C3-N16	179,8	N17-C2-C3-N16	-180,0
N21-C2-C3-C4	179,8	N21-C2-C3-C4	-180,0
N21-C2-C3-N16	-0,14	N21-C2-C3-N16	0,0
C3-C2-N17-C1	0,25	C3-C2-N17-C1	0,1
C3-C2-N17-H27	179,9	C3-C2-N17-H24	179,9
N21-C2-N17-C1	-179,8	N21-C2-N17-C1	-179,9
N21-C2-N17-H27	-0,03	N21-C2-N17-H24	0,0
C3-C2-N21-H28	-0,01	C3-C2-N21-H25	0,0
N17-C2-N21-H28	-179,9	N17-C2-N21-H25	-179,9
C2-C3-C4-N18	0,06	C2-C3-C4-N18	0,0
C2-C3-C4-O19	-179,9	C2-C3-C4-O19	179,9
N16-C3-C4-N18	-179,9	N16-C3-C4-N18	179,9
N16-C3-C4-O19	0,03	N16-C3-C4-O19	0,0
C2-C3-N16-N15	179,9	C2-C3-N16-N15	-179,9
C4-C3-N16-N15	0,0	C4-C3-N16-N15	0,0
C3-C4-N18-C1	0,05	C3-C4-N18-C1	0,0
C3-C4-N18-H26	180,0	C3-C4-N18-H23	179,9
O19-C4-N18-C1	-179,9	O19-C4-N18-C1	-179,9
O19-C4-N18-H26	0,0	O19-C4-N18-H23	0,0
C10-C5-C6-C7	0,0	C10-C5-C6-C7	0,0
C10-C5-C6-H11	179,9	C10-C5-C6-H11	179,9
N15-C5-C6-C7	-179,9	N15-C5-C6-C7	179,9
N15-C5-C6-H11	0,0	N15-C5-C6-H11	0,0
C6-C5-C10-C9	0,0	C6-C5-C10-C9	0,0
C6-C5-C10-H14	179,9	C6-C5-C10-H14	-179,9
N15-C5-C10-C9	180,0	N15-C5-C10-C9	-179,9
N15-C5-C10-H14	0,0	N15-C5-C10-H14	0,0
C6-C5-N15-N16	0,0	C6-C5-N15-N16	0,0
C6-C5-N15-H25	179,9	C6-C5-N15-H22	179,9
C10-C5-N15-N16	180,0	C10-C5-N15-N16	179,9
C10-C5-N15-H25	0,0	C10-C5-N15-H22	0,0
C5-C6-C7-C8	0,0	C5-C6-C7-C8	0,0
C5-C6-C7-H12	179,9	C5-C6-C7-H12	-179,9
H11-C6-C7-C8	-179,9	H11-C6-C7-C8	-179,9

Çizelge 4.4. (devam) Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon formları (T-V) için, DFT/B3LYP//6-311++G(d,p) yöntemi ile elde edilen torsiyon açıları.

H11-C6-C7-H12	0,0	H11-C6-C7-H12	0,0
C6-C7-C8-C9	0,0	C6-C7-C8-C9	0,0
C6-C7-C8-N22	179,9	C6-C7-C8-Br26	-180,0
H12-C7-C8-C9	-179,9	H12-C7-C8-C9	-180,0
H12-C7-C8-N22	0,0	H12-C7-C8-Br26	0,0
C7-C8-C9-C10	0,0	C7-C8-C9-C10	0,0
C7-C8-C9-H13	179,9	C7-C8-C9-H13	180,0
N22-C8-C9-C10	-179,9	Br26-C8-C9-C10	180,0
N22-C8-C9-H13	0,0	Br26-C8-C9-H13	0,0
C7-C8-N22-O23	0,0	C8-C9-C10-C5	0,0
C7-C8-N22-O24	-179,9	C8-C9-C10-H14	179,9
C9-C8-N22-O23	180,0	H13-C9-C10-C5	179,9
C9-C8-N22-O24	0,0	H13-C9-C10-H14	0,0
C8-C9-C10-C5	0,0	C5-N15-N16-C3	-179,9
C8-C9-C10-H14	-179,9	H22-N15-N16-C3	0,0
H13-C9-C10-C5	179,9	-----	-----
H13-C9-C10-H14	0,0	-----	-----
C5-N15-N16-C3	179,9	-----	-----
H25-N15-N16-C3	0,0	-----	-----

4.1.2. IR ve ^1H -NMR hesaplamaları

Bileşik I ve II'nin IR ve ^1H -NMR hesaplamaları, en düşük enerjili ve dolayısıyla en kararlı tautomerik form olarak belirlenen imin-diketo-hidrazon formları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Teorik IR ve ^1H -NMR verileri deneysel verilerle karşılaştırılmış ve Bileşik I ve Bileşik II için teorik olarak elde edilen değerlerin deneysel veriler ile uyumluluğu tartışılmıştır.

IR hesaplamaları, Bileşik I ve II için gaz fazında ve imin-diketo-hidrazon formları dikkate alınarak; DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) düzeyde gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin yapılarını doğrulamak için dikkate alınan bazı titreşim bantları ve bu bantlara karşılık gelen teorik IR titreşim frekansları Çizelge 4.5'te verilmektedir.

Çizelge 4.5. değerlendirildiğinde; $\text{N}_{17}\text{-H}/\text{N}_{18}\text{-N}_{17}$ gerilme bantları; Bileşik I ve II'nin FTIR spektrumlarında (Ek Şekil 2 ve 4) sırasıyla, $3116/3116\text{ cm}^{-1}$ ve $3144/3144\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiş, Bileşik I için $3452/3444\text{ cm}^{-1}$ ve Bileşik II için $3455/3448\text{ cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. $\text{N}_{21}\text{-H}$ imin bandı, Bileşik I/II için $3116/3099\text{ cm}^{-1}$ olarak gözlenmiş ve

sırasıyla 3369/3369 cm^{-1} olarak hesaplanmıştır. $\text{N}_{15}\text{-H}$ hidrazon bandı; Bileşik I/II için 3168/3216 cm^{-1} 'de gözlenmiş 3198/3195 cm^{-1} olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.5'te verilen diğer gerilme bantlarının deneysel ve hesaplanan değerleri oldukça uyumludur.

Çizelge 4.5. Bileşik I ve II'nin deneysel ve, imin-diketo-hidrazon formları için DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle hesaplanmış teorik titreşim frekansları (cm^{-1}).

Seçilen titreşim frekansları	Deneysel (cm^{-1})		Hesaplanan (cm^{-1})	
	Bileşik I	Bileşik II	Bileşik I	Bileşik II
$\nu(\text{N}_{17}\text{-H})$	3116	3144	3452	3455
$\nu(\text{N}_{18}\text{-H})$	3116	3144	3444	3448
$\nu(\text{N}_{21}\text{-H})$ imin	3116*	3099**	3369	3369
$\nu(\text{N}_{15}\text{-H})$ hidrazon	3116*	3144****	3198	3195
$\nu(\text{C}_1=\text{O}_{20})$	1737	1728	1730	1724
$\nu(\text{C}_4=\text{O}_{19})$ $\nu(\text{C}_2=\text{N}_{21})$	1634 1634	1619 1619	1650, 1664	1643, 1662
$\nu(\text{C}=\text{C})$	1610	1619	1611	1600
$\nu(\text{C}_3=\text{N}_{16})$	1552, 1502, 1458	1580, 1455	1561, 1545, 1472	1554, 1459

Titreşim modları: ν , gerilme

*:3140-3092 aralığında 3116 cm^{-1} merkezli, **: 3130-3068 aralığında 3099 merkezli

***:3158-3130 aralığında 3144 merkezli

Şekil 4.2 ve 4.3'ten de görüldüğü gibi Bileşik I ve II'nin optimize moleküler yapıları $\text{N}_{15}\text{-H}\cdots\text{O}_{19}$ tipi molekül içi hidrojen bağlarının varlığını ortaya koyan en kararlı yapıda elde edilmiştir. Bu nedenle deneysel ve hesaplanan titreşim frekans değerleri arasındaki sapma değerleri küçüktür ve Bileşik I/II için sırasıyla 30/21 cm^{-1} olarak elde edilen değerler uyumlu kabul edilebilir. $\text{N}_{17}\text{-H}/\text{N}_{18}\text{-H}$ gerilme bantları ve $\text{N}_{21}\text{-H}$ imin bantları için gözlenen; Bileşik I için sırasıyla 336/328 cm^{-1} ve 253 cm^{-1} , Bileşik II için sırasıyla 311/304 cm^{-1} ve 270 cm^{-1} olarak hesaplanan dikkate değer sapmalar moleküller arası $\text{N-H}\cdots\text{O}$ tipi güçlü hidrojen bağlarının varlığı ile açıklanabilir.

Bileşik I ve II'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları, $\text{DMSO-}d_6$ içinde kaydedilmiştir. Bu nedenle, öncelikle boyarmaddelerin moleküler yapısı DMSO çözücü içinde DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) yöntemi ile imin-diketo-hidrazon (T-V) formu dikkate alınarak optimize

edilmiş ve GIAO ^1H -NMR hesaplamaları, DMSO çözücünde, DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Teorik ^1H -NMR spektral verileri deneysel değerleri ile birlikte Çizelge 4.6'da verilmektedir.

Çizelge 4.6. Bileşik I ve II'nin; DMSO- d_6 çözücünde deneysel ve, imin-diketo-hidrazon formları (T-V) için, DMSO içinde DFT/B3LYP/6-311G(d,p) yöntemiyle hesaplanmış ^1H izotropik kimyasal kaymaları (bütün değerler ppm biriminde).

Atom	Deneysel		Hesaplanan	
	Bileşik I	Bileşik II	Bileşik I	Bileşik II
N ₁₅ –H	14,03	14,02	13,76	13,65
N ₂₁ –H	11,06	10,96	8,88	8,60
N ₁₇ –H	10,80	10,53	7,220	7,16
N ₁₈ –H	10,89	10,71	7,14	7,03
H ₁₁	7,84-7,82	7,65-7,62	8,26	8,16
H ₁₂	8,32-8,29	7,60-7,52	8,66	7,75
H ₁₃	8,32-8,29	7,60-7,52	8,68	7,70
H ₁₄	7,84-7,82	7,65-7,62	7,32	7,29

Çizelge 4.6'da verilen, Bileşik I ve II'nin DMSO çözücünde kaydedilen ve hesaplanan ^1H -NMR kimyasal kaymaları değerlendirildiğinde; N₁₅ –H proton sinyalleri Bileşik I/II için sırasıyla 14,03/14,02 ppm'de gözlenmiş ve 13,76/13,65 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar Bileşik I ve II'nin optimize moleküler yapılarının gösterdiği N₁₅ –H...O₁₉ tipi molekül içi hidrojen bağlarının varlığı ile uyumludur. N₂₁–H, N₁₇–H ve N₁₈–H protonları; Bileşik I için, sırasıyla 11,06/10,80/10,89 ppm ve Bileşik II için 10,96/10,53/10,71 ppm'de gözlenmiştir. Bu değerlerin hesaplanan kimyasal kayma değerlerinden sapma miktarı, Bileşik I için, sırasıyla 2,18/3,58/3,75 ppm ve Bileşik II için sırasıyla 2,36/3,37/3,68 ppm'dir. Deneysel kimyasal kayma değerlerinin, hesaplanan değerlerden dikkate değer sapmaları N–H...O tipi moleküller arası hidrojen bağlarının varlığını ortaya koymaktadır.

Bileşik I ve II'nin birbirini destekleyen FTIR ve ^1H -NMR deneysel verilerinin (Ek Şekil 1-4), Çizelge 4.6 ve 4.7'deki teorik verilerle birlikte değerlendirilmesi sonucunda, her iki bileşik için öngörülen molekül içi ve moleküller arası güçlü hidrojen bağlarının varlığı literatür ile uyumludur (Seferoğlu ve diğerleri, 2007; Seferoğlu ve Ertan, 2008).

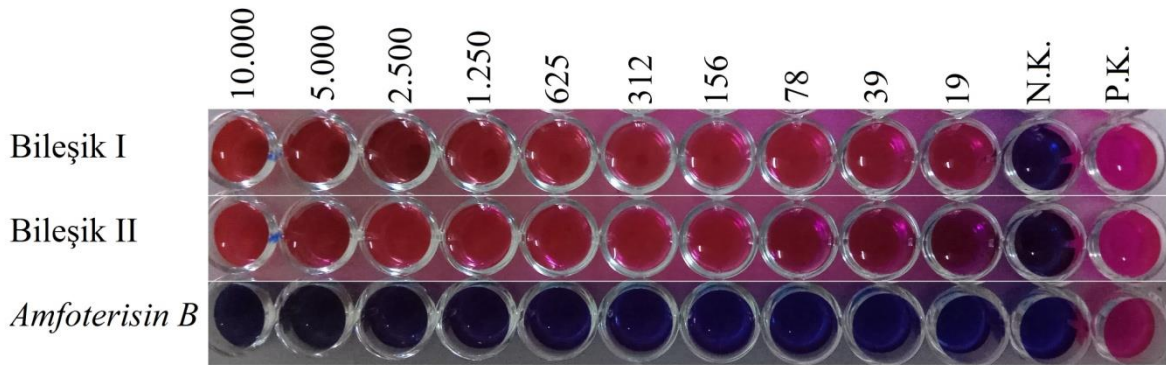
4.2. Antiparaziter Aktivite Sonuçları

4.2.1. Antilayşmanyaz aktivite sonuçları

Bileşik I ve II'nin *L.infantum*, *L.major* ve *L.tropica* promastigotlarına karşı antiparaziter aktiviteleri, Alamar mavisi eklenmiş sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile *in vitro* olarak belirlendi ve MİK değerleri elde edildi.

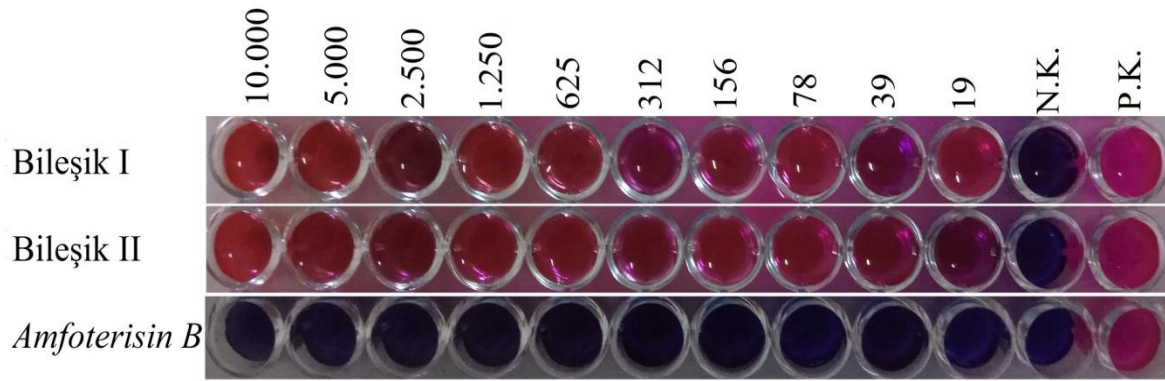
Antilayşmanyaz aktivitenin değerlendirilmesinde negatif kontrolde alamar mavisinin renk değiştirmemesi beklenir. Ayrıca pozitif kontrol olarak eklenen promastigotlarda herhangi bir inhibe edici madde eklenmediği için canlılığın devam etmesi beklendiğinden mavi rengin pembeye dönmesi gerekir. Negatif ve pozitif kontrollerin çalışması durumunda maddelerin değerlendirilmesi yapılabilir. Yani kuyucuklarda mavi rengin değişmemesi canlılığın olmadığını pembeye dönmesi ise canlılığın devam ettiğini belirler.

Sonuçlar Şekil 4.4 ve 4.5 ve 4.6'da gösterilmektedir. Testlerde elde edilen MİK değerleri Çizelge 4.7'de verilmektedir. Elde edilen verilere göre, Bileşik I'ın çalışılan tüm layşmanyaya türlerine karşı çalışılan konsantrasyonlarda etkisiz olduğu saptanmıştır. Bileşik II'nin ise sadece *L.major* promastigotlarına karşı etkili olduğu (MİK:2500) gözlenirken, diğer layşmanyaya türlerine karşı antilayşmanyaz aktiviteye sahip olmadığı saptanmıştır. Kontrol ilaç olarak kullanılan amfoterisin B'nin ise tüm layşmanyaya türlerine karşı çalışılan en düşük konsantrasyonunun (MİK:19) bile etkili olduğu belirlenmiştir.

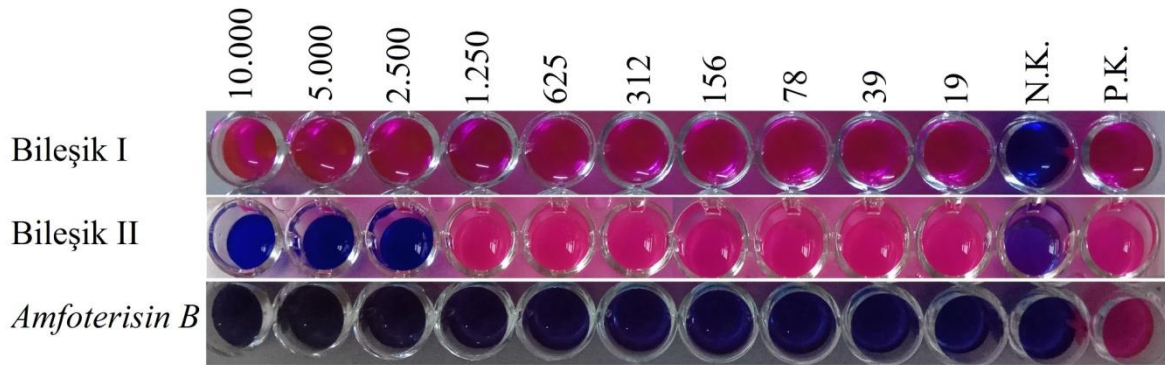


Şekil 4.4. *L.infantum* promastigotlarına karşı *in vitro* antilayşmanyaz aktivite; Bileşik I, Bileşik II, Kontrol İlacı, Amfoterisin B ve seyreltme konsantrasyonları 10.000-19 µg/mL.

N.K. : Negatif Kontrol, P.K.: Pozitif Kontrol



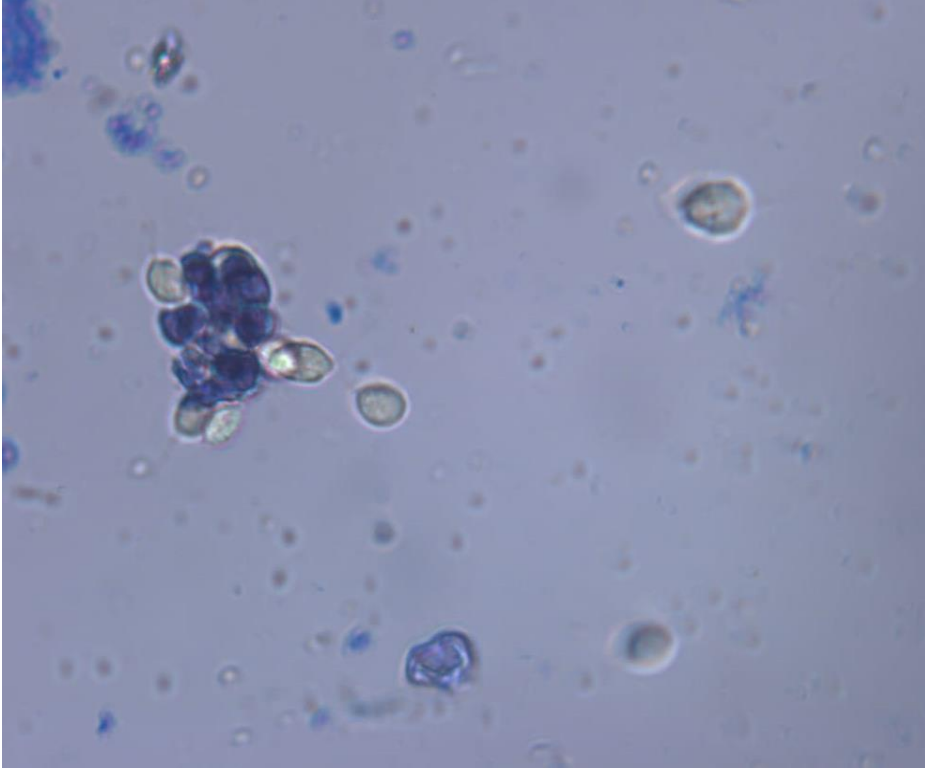
Şekil 4.5. *L.tropica* promastigotlarına karşı in vitro antilayşmanyaz aktivite; Bileşik I, Bileşik II, Kontrol İlacı, Amfoterisin B ve seyreltme konsantrasyonları 10.000-19 µg/mL.
N.K. : Negatif Kontrol, P.K.: Pozitif Kontrol



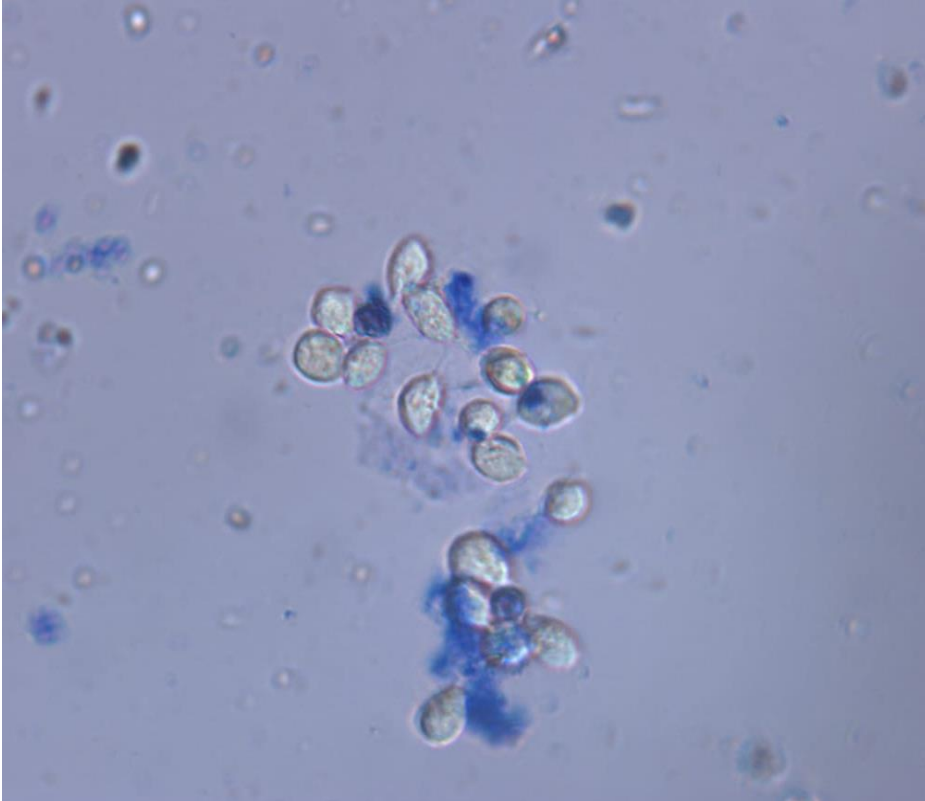
Şekil 4.6. *L.major* promastigotlarına karşı in vitro antilayşmanyaz aktivite; Bileşik I, Bileşik II, Kontrol İlacı, Amfoterisin B ve seyreltme konsantrasyonları 10.000-19 µg/mL.
N.K. : Negatif Kontrol, P.K.: Pozitif Kontrol

Çizelge 4.7. Standart layşmanya promastigotlarına karşı elde edilen Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri.

Bileşikler	MİK Değerleri (µg/mL)		
	<i>L.infantum</i>	<i>L.tropica</i>	<i>L.major</i>
Bileşik I	>10.000	>10.000	>10.000
Bileşik II	>10.000	>10.000	2.500
Amfoterisin B	<19	<19	<19



Şekil 4.7. Bileşik I'in *T.vaginalis* trofozoitlerine karşı 48 saat sonra göstermiş olduğu trikomonasidal aktivitenin mikroskopik görüntüsü



Şekil 4.8. Bileşik II'nin *T.vaginalis* trofozoitlerine karşı 48 saat sonra göstermiş olduğu trikomonasidal aktivitenin mikroskopik görüntüsü

Arshad ve ark. dört seri heterosiklik bileşik olan tetrahidro-2H-1,3,5-tiyadiazin tiyon türevleri sentezlemişler ve bunların, *Leishmania major*'e (promastigotlar) karşı *in vitro* antilayşmanyaz aktiviteleri için değerlendirmişler. Bileşiklerin çoğunun standart pentamidin ($IC_{50} = 14.95 \mu M$) ilaç ile karşılaştırıldığında $IC_{50} = 15.48-39.36 \mu M$ aralığında belirgin antilayşmanyaz aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Arshad ve diğerleri, 2018).

Fonksiyonelleştirilmiş tetrahidrokinolinler ve kinolinin iyi derecede antilayşmanyaz aktiviteye sahip olduğu, standart ilaç amfoterisin B'ye *L.infantum* amastigotlarına karşı benzer aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Tejería ve diğerleri, 2019).

Süleymanoğlu ve ark. morfolinli 1,2,4-triazole türevlerinin antilayşmanyaz aktivitelerini alamar mavisi eklenmiş mikrodilüsyon yöntemiyle değerlendirmişler, her bileşiğin antiparaziter aktiviteye sahip olduğunu, ancak bileşiklerden birinin anlamlı bir farkla daha etkili olduğunu belirlemişlerdir (Süleymanoğlu ve diğerleri, 2018).

Raj ve ark. 22 farklı triazol, b-laktameizatinriazol konjugat ailesi içindeki anti-*T.vaginalis* yapı aktivitesini incelemişler, bileşiklerin *T.vaginalis*'e karşı *in vitro* aktiviteleri her bileşik için 10 ve 100 mM'de belirlemişler, sentezlenen hibritlerin 18'nin 100 mM'de % 100 büyüme inhibisyonu gösterdiğini belirtmişler (Raj ve diğerleri, 2013).

Yeni şistosomisidal ajanlar geliştirmek için *S. mansoni*'ye karşı çeşitli yapılarda birçok azo bileşiği test edilmiştir. Bu bileşiklerin çoğu etkisiz olmasına rağmen, *S. mansoni*'ye karşı fare, hamster ve maymunlarda 5- (4-amino-1 – naphthyloazo) uracil (ANU) (II) bileşiğinin yüksek düzeyde aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Elslager ve Worth, 1963).

Sentezlenmiş altı yeni heterosiklik azo bileşikleri; benzimidazol, benzoksazol ve benzotiazol, diazo birleşiklerini *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* suşlarına karşı *in vitro* antibakteriyel aktivitesi için Resazurin mikrotitre deney yöntemi (REMA) ile değerlendirmişler. Antibakteriyel aktiviteler, minimum inhibitör konsantrasyonu ($\mu g / mL$ cinsinden MIC) kullanılmıştır. Bu bileşiklerin, *in vitro* olarak iyi ile orta veya yüksek antibakteriyel aktivite sergilediği belirtilmiştir (Mishra ve diğerleri, 2019).

Urasil içeren azo boyarmaddeleri Bileşik I ve II'nin *in vitro* antilayşmanyaz ve trikomonasidal aktivitelerinin belirlenmesi, ilaç tasarımı ve geliştirme çalışmalarına önemli bir katkı sağlayabilir ve farmakolojik araştırmalarda kullanılabilecek bileşiklerin çeşitliliğinin artırılması açısından, bu çalışmalarda dikkate alınacak kimyasalların belirlenmesine rehberlik edebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde; literatürde verilen yönteme (Yazdanbakhsh ve diğerleri, 2010; Seferoğlu ve Ertan, 2008) göre sentezlenmiş ve moleküler yapıları, FTIR ve ^1H -NMR spektroskopik yöntemleri kullanılarak doğrulanmış, 6-amino-5 - [(4-nitrofenil) diazenil] pirimidin-2,4 (1H, 3H) -dion (**I**) ve 6-amino-5 - [(4-bromofenil) diazenil] pirimidin-2,4 (1H, 3H) -dion (**II**) bileşikleri üzerine moleküler modelleme çalışması ve antiparaziter aktivite çalışması gerçekleştirilmiştir.

Moleküler modelleme çalışmasında; hesaplamalar DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş, öncelikle Bileşik I ve II'nin olası tautomerik formlarının moleküler yapıları optimize edilmiş ve en düşük enerjili dolayısıyla en kararlı tautomerik formlar belirlenmiştir. Hesaplamalar her iki bileşiğin, gaz fazında ve DMSO çözücü içinde en kararlı formlarının imin-diketo-hidrazon formu (T-V) olduğunu göstermektedir.

Bu nedenle hesaplamalar, Bileşik I ve II için en olası tautomerik form olarak belirlenen imin-diketo-hidrazon formları için gerçekleştirilmiş; bileşiklerin moleküler yapıları optimize edilerek yapısal parametreleri, bağ uzunlukları, bağ açıları ve torsiyon açıları elde edilmiştir. Bileşik I ve II'nin imin-diketo-hidrazon formundaki yapıları dikkate alınarak; IR titreşim frekansları gaz fazında ve ^1H -NMR kimyasal kayma değerleri DMSO çözücünde hesaplanmış ve teorik spektral veriler bileşiklerin FTIR ve ^1H -NMR spektrumlarından elde edilen deneysel verilerle karşılaştırılmıştır. Bileşiklerin imin-diketo formundaki optimize yapıları N-H...O tipi molekül içi bağları ortaya koyan en kararlı durumda elde edilmiştir. Bu nedenle ilgili IR ve NMR spektral dataları deneysel olanlarla uyumludur. Bununla beraber; imin-diketo-hidrazon formlarında bulunan Bileşik I ve II'nin; IR ve ^1H -NMR spektral verilerinde gözlenen ve birbirini destekleyen, deneysel değerlerden dikkate değer sapmalar, bileşiklerin moleküler yapısında N-H...O tipi moleküller arası güçlü hidrojen bağlarının varlığını göstermektedir.

Bileşiklerin antiparaziter aktiviteleri; *L. infantum*, *L. major* ve *L. tropica* promastigotları ve *T.vaginalis* trofozotlerine karşı sıvı mikrodilüsyon yöntemi (Microdilution broth assay) ile *in vitro* olarak test edilmiştir. Antilayşmanyaz aktivite MİK değerleri ve trikomonasidal aktivite, MLK değerleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

Antiparaziter aktivite çalışmasında; Bileşik I ve II, *L.infantum*, *L.tropica* ve *L.major* promastigot parazitlerine karşı ilk kez test edilmiş ve *in vitro* antilayşmanyaz aktiviteler, alamar mavisi eklenmiş sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Testlerde antiparaziter aktivite, bileşikler için elde edilen MİK değerleri standart kontrol ilaç Amfoterisin B için elde edilen MİK değerleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlar; incelenen konsantrasyonlarda, Bileşik I'ın, hiçbir layşmanya türüne karşı antilayşmanyaz aktiviteye sahip olmadığını, Bileşik II'nin *L. major* promastigotlarına karşı etkili olduğunu ve çalışılan diğer layşmanya türlerine karşı antilayşmanyaz aktiviteye sahip olmadığını göstermektedir. Daha yüksek konsantrasyonların çalışılması durumunda, bileşikler antiparaziter olarak etkili bulunabilir.

In vitro trikomonasidal aktivite testlerinde, 16. saatteki ilk değerlendirmede pozitif kontrol de dahil olmak üzere, Bileşik I ve II eklenen tüm kuyucuklarda, hareketli *T.vaginalis* trofozoitleri saptanmıştır. 24. saat sonundaki ikinci değerlendirmede, Bileşik I ve II herhangi bir lethal etki göstermemiştir. Pozitif kontrolde ise kullanılan metronidazolün en yüksek konsantrasyondan (800µg/ml) itibaren diğer dilüsyonlarda (400, 200, 100, 50 µg/ml) sırasıyla %75, %59, %43, %25 ve %10 lethal etki gösterdiği belirlenmiştir.

Urasil içeren azo boyarmaddelerinin, *T.vaginalis* trofozitlerine karşı 48. saat değerlendirilmesinde, Bileşik II'nin 10.000 µg/ml dilüsyonda %79, 5000 µg/ml dilüsyonda %35 lethal etki gösterdiği belirlenmiştir. *T.vaginalis* trofozoitlerine karşı *in vitro* olarak %100 lethal etki gösteren Bileşik I'ın konsantrasyonun 10.000 µg/ml olduğu saptanmıştır. Bu konsantrasyonda üreme olup olmadığını belirlemek için deney sonunda kuyucuktaki parazitler tekrar TYM besi ortamına alınarak kontrol edilmiştir. Besi ortamında parazitin üremesi saptanmamış ve %100 lethal etki doğrulanmıştır. Ayrıca Bileşik I'ın, Bileşik II'den daha etkili olduğu ve 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml ve 625 µg/ml dilüsyonlarda sırasıyla %96, %74, %61, %33 oranında lethal etki gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, trikomonasidal aktivite çalışmasında, urasil içeren azo boyarmaddelerinin %33 ile %100 oranında letal etki gösterdiği ve ayrıca *T.vaginalis* trofozoitlerine karşı kullanılan maddelerin *in vitro* olarak doza bağlı etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bileşik I ve II'nin antiparazitler aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; iyi bir ilaç adayı olabilmeleri için, ayrıca deneysel hayvan modellerinde *in vivo* kontrol çalışmalarına ve toksitite testlerine ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abbas, A., Gökce, H., Bahçeli, S. ve Naseer, M. M. (2014). Spectroscopic (FT-IR, Raman, NMR and UV-vis.) and quantum chemical investigations of (E)-3-[4-(pentyloxy) phenyl]-1-phenylprop-2-en-1-one. *Journal of Molecular Structure*, 1075, 352-364.
- Akgenç, B. (2010). *Elektronik Yapılarda DFT Tabanlı Hesaplamalar ve Nano Düzeydeki Molekül Bağlılıklarının İletim katsayısı*. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Aksoy Gökmen, A., Kayalar, H., Pektaş, B. ve Kaya, S. (2018). Çörek Otu (*Nigella sativa*) Yağının *Trichomonas vaginalis*'e Karşı in vitro Anti-trikomoniya Etkisinin Araştırılması. *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 3(3), 7-10.
- Alcolea Palafox, M., Tardajos, G., Guerrero-Martínez, A., Rastogi, V.K., Mishra, D., Ojha, S. P. and Kiefer, W. (2007). FT-IR, FT-Raman spectra, density functional computations of the vibrational spectra and molecular geometry of biomolecule 5-aminouracil. *Chemical Physics*, 340, 17-31.
- Altıntaş K. (2002). *Tıbbi Parazitoloji*. Ankara: Nobel Yayınları, 96.
- Arısoy, M. ve Temiz-Arpacı, Ö. (2016). Molecular Modelling Studies of some Benzoxazole Derivatives. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40(1), 1-15.
- Aronson, N. and Magill, A. (2020). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Netherlands, Elsevier, 776-798.
- Arshad, N., Hashim, J., Irfanullah, Minhas, M.A., Aslam, J., Ashraf, T., Hamid, S.Z., Iqbal, T. and Javed, S. (2018). New series of 3,5-disubstituted tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazine thione (THTT) derivatives: synthesis and potent antileishmanial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(19), 3251-3254.
- Arslan, T. (2005). *Shiff Bazları ve Shiff Bazlarının Lantanit Kompleksleri Üzerinde DeneySEL ve Teorik Çalışmalar*. Doktora Tezi, İonnina Üniversitesi, Yunanistan ve Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Başer, İ. ve İnancı, Y. (1990). *Boyarmadde Kimyası*. İstanbul: Marmara Üniversitesi Yayınları, 49-67.
- Başköse, Ü. C. (2011). *Rasajilin ve Tuzlarının Moleküler Yapıları ve Titreşimsel Spektrumlarının Teorik Olarak İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Baygar, T. (2015). *Mikrobiyal Olarak Sentezlenmiş Nanopartikül Katkılı Doğal Biyopolimer Film Geliştirilmesi*. Doktora Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.

- Becke, A.D., 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, 98, 5648.
- Belazzoug, S. (1992). Leishmaniasis in Mediterranean countries. *Veterinary Parasitology*. Netherlands: Elsevier, 44, 15-19.
- Burt, S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Cattand, P., Desjeux, P., Guzman, M. G., Jannin, J., Kroeger, A., Medici, A., Musgrove, P., Nathan, M. B., Shaw, A. and Schofield, J. C. (2006). Tropical Disease Lacking Adequate Control Measures: Dengue, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis, Disease Control Priorities in Developing Countries. Washington, DC: World Bank and Oxford University Press.
- Clemmensen, L., Hansen, M., Frisvad, J., and Ersboll, B. (2007). A method for comparison of growth media in objective identification of *Penicillium* based on multispectral imaging. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 249-255.
- Courvalin, P., Leclercq, R. and Rice, L. B. (2010). *Antibiogram*. Portland, Or.: ESKA publisher/ASM Press.
- Cudmore, S.L., Delgaty, K.L., Hayward-McClelland, S.F., Petrin, D.P. and Garber, G.E. (2004). Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 2004, 17(4), 783-93.
- Das, S., Saikia, B. K., Sridhar, B. and Thakur, A. J. (2008). 6-[(Dimethyl-amino)methyl-ene-amino]-1,3-dimethyl-pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione dihydrate. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, 64, 1662.
- Demirpek, U., ve Dizer, U. (2010). Tuberculous meningitis: evaluation and review of 32 ases. *Clinical Microbiology & Infection*, 16.
- Dennington, R., Keith, T. and Millam, J. (2009). *Gauss view version 5* Shawnee Mission, Kansas.. Semichem Incorporated Company.
- Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, 95, 239-243.
- Dirlik, O. (2013). 3-Bromofenil Boronik Asit Molekülünün Moleküler Yapı Parametreleri ve Titreşim Frekanslarına Çözücü Etkisinin DeneySEL ve Teorik Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, 8-41.
- Ditchfield, R. (1972). Molecular orbital theory of magnetic shielding and magnetic susceptibility. *The Journal of Chemical Physics*, 56(11), 5688-5691.
- Eckert, J. and Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 2004, 17(1), 107-35.

- Elslager, E. F. and Worth, D. F. (1963). Synthetic Schistosomicides. III. 5-(4-Amino-1-naphthylazo)uracil and Related Heterocyclic Azo Compounds1. *Journal of Medicinal Chemistry*, 6(4), 444–447.
- Erhan, H., Emekdaş, G. ve Direkel, Ş. (2008). Mersin İli Mut İlçesi'ndeki Değişik Yaş Gruplarında Leishmania Antikor Düzeyleri. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(1).
- Ertabaklar, H., Malatyalı, E., Ertuğ, S. ve Yaman Karadam, S. (2016). Investigation of In vitro metronidazole resistance in the clinical isolates of trichomonas vaginalis. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 50(4), 552–558.
- Eyüboğlu, Ü., Okaygün, I. ve Yaraş, F. (1983). *Doğal Boyalarla Yün Boyama Uygulamalı ve Geleneksel Yöntemler*. İstanbul: Arkeoloji ve Sanat Yayınları.
- Foresman J.B. and Frisch A. (1996). *Exploring Chemistry With Electronic Structure Methods*, Second edition, Pittsburgh USA: Gaussian Inc.
- Foresman, J. B. and Frisch, A. E. (1996). *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. Pittsburgh: Gaussian Inc, 257-262.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H.B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A., Jr., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J. and D.J. Fox. (2009). Gaussian 09, Gaussian Inc., Wallingford CT.
- Garrett, R.H. and Grisham, C. M. (1997). *Principals of Biochemistry with a Human Focus*. United States: Cengage Learning Inc, 326.
- Gordon, P.F. and Gregory, P. (1983). *Organic Chemistry in Colour*. NewYork : Springer-Verlag, 108-111.
- Gouda, M. A., Fakhr, H., Margret, E., Girges, M. and Berghot, M. A. (2016). Synthesis and antitumor evaluation of thiophene based azo dyes incorporating pyrazolone moiety. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20(2), 151-157.
- Gökce, H., Öztürk, N., Taşan, M., Alpaslan, Y. B. ve Alpaslan, G. (2016). Spectroscopic characterization and quantum chemical computations of the 5-(4-pyridyl)-1 H-1, 2, 4-triazole-3-thiol molecule. *Spectroscopy Letters*, 49(3), 167-179.

- Gözütok, A. (2009). *1,4-Diaminobütan Molekülünün Titreşim Spektrumlarının Teorik Olarak İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 17-23.
- Gümrükçüoğlu, İ. E. ve Kocaokutgen, H. (1990). *Bazı Azo Boyar Maddelerinin Sentezi*. Samsun : OMÜ Yayınları, 1-3.
- Harbola, M. K. and Banerjee, A. (2003). Many-electron problem in terms of the density: From Thomas–Fermi to modern density-functional theory. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*, 2(02), 301-322.
- Herwaldt, B.L. (1999). Leishmaniasis. *Journal of The Lancet*, 354,1191-1199.
- İnternet: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2017). <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/> adresinden 01.05.2020’de alınmıştır.
- Jorgensen, J. H. and Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *In Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition, 1253-1273.
- Kaya, M. F. (2013). *Bazı Prolidin Türevlerinin Titreşim Spektroskopisi ile Deneysel ve Teorik Olarak İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Kennedy, A. R., McKellar, S. C. and Okoth, M. O. (2010). The cobalt(II) salt of the azo dye Orange G. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, 66, 1330-1331.
- Khanmohammadi, H., Arab, V., Rezaeian, K., Talei, G.R., Pass, M. and Shabani, N. (2017). Diaminomaleonitrile-based azo receptors: Synthesis, DFT studies and their antibacterial activities, *Journal of Molecular Structure*, 1129, 169-178.
- Kirkan, B. ve Gup, R. (2008). Synthesis of New Azo Dyes and Copper (II) Complexes Derived from Barbituric Acid and 4-Aminobenzoylhydrazon. *Turkish Journal of Chemistry*, 32, 9-17.
- Kissinger, P. and Adamski, A. (2013). Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sexually transmitted infections*, 89(6), 426-33.
- Kissinger P. (2015). Trichomonas vaginalis: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infectious Diseases*, 15, 307.
- Kurt, M. (2003). *Bazı metal(II) benzimidazol bileşiklerinin yapılarının kırmızı altı spektroskopisi yöntemiyle araştırılması ve 1,2-bis(4-pyridyl) ethane molekülünün titreşim spektrumunun teorik olarak incelenmesi*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Leach, AR. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Harlow: Prentice Hall, 88-92.

- Lewars, E. G. (2016). *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*, 3. Edition. Netherlands: Springer.
- Lycka, A., Jirman, J. And Hansen, P. E. (1989). Two-dimensional ^1H - and ^{13}C -NMR Spectra of some azo dyes containing amino or acetamido groups. *Dyes and Pigments*, 10, 259-268.
- Mann, C.M. and Markham, J.L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538–544.
- Mishra, V.R., Ghanavatkar, C.W., Mali, S.N., Qureshi, S.I., Chaudhari, H.K. and Sekar, N. (2019). Design, synthesis, antimicrobial activity and computational studies of novel azo linked substituted benzimidazole, benzoxazole and benzothiazole derivatives. *Computational Biology and Chemistry*, 78, 330-337.
- Mohammadi, A., Khalili, B. and Tahavor, M. (2015). Novel push–pull heterocyclic azo disperse dyes containing piperazine moiety: Synthesis, spectral properties, antioxidant activity and dyeing performance on polyester fibers, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 150, 799-805.
- Murray, P., Baron, J. E., Jorgensen, J. H. and Landry, L. M. (2009). *Klinik Mikrobiyoloji* (Başustaoğlu, A. , Çev.). Ankara : Atlas Kitapçılık, 455-737.
- Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T. A., Ustaçelebi, Ş. ve Tümbay, E. (1999). Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflandırılması. Ş. Ustaçelebi (Ed.). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1015-1021.
- Nagy, A. (1998). Density functional. Theory and application to atoms and molecules. *Physics Reports*, 298(1), 1-79.
- Özcel, M.A., Özbel, Y. ve Ak, M. (2007). Trikomoniyaz. *Özcel'in Tıbbi Paraziter Hastalıkları*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 431-447.
- Özçelik, B., Kartal, M. ve Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49(4), 396-402.
- Patai, S. (1975). *The Chemistry of the Hydrazo, Azo and Azoxy Groups*. London : John Wiley&Sons, Vol. 1, 597.
- Peng, C., Ayala, P.Y., Schlegel, H.B. and Frisch, M.J. (1996). Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *Journal of Computational Chemistry*, 17(1), 49-56.
- Pitt, J. I. (1973). An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia*, 65(5), 1135-1157.

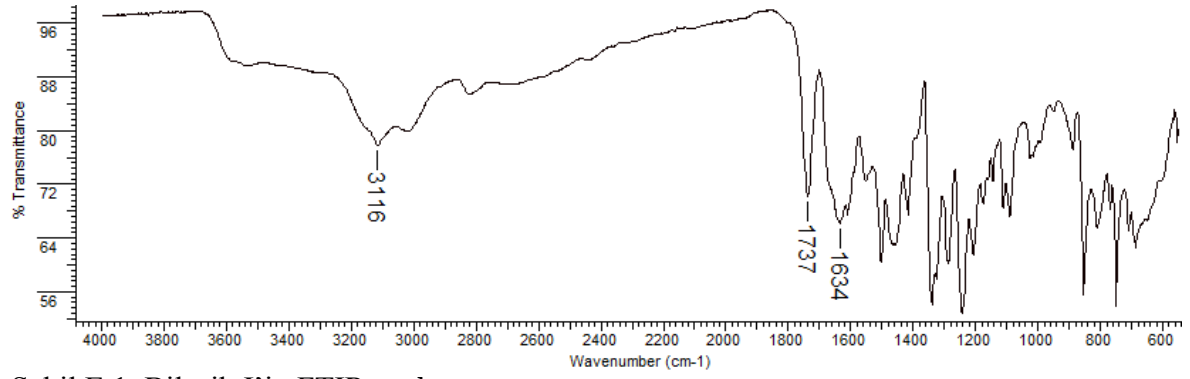
- Popelier, P. (2000). *Atom in Molecules*. UK : Pearson Education.
- Pulay P. (1969). Ab initio calculation of force constants and equilibrium geometries in polyatomic molecules - I. Theory. *Molecular Physics*, 17, 197-204.
- Pulay, P. (1987). *Analytical Dervative Methods in Quantum Chemistry, Ab Initio Methods in Quantum Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd.
- Raj, R., Singh, P., Haberkern, N.T., Faucher, R.M., Patel, N., Land, K.M. and Kumar, V. (2013). Synthesis of 1H-1, 2, 3-triazole linked β -lactam–isatin bi-functional hybrids and preliminary analysis of in vitro activity against the protozoal parasite *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63, 897-906.
- Ramachandran, K. I., Deepa, G. and Namboori, K. (2008). *Computational Chemistry and Molecular Modelling, Principles and Applications*. Berlin : Heidelberg Springer-Verlag, 134-142.
- Rastogi, V. K. (2011). Vibrational Spectroscopy: An excellent tool for characterisation of biomolecules. 98. *Indian Science Congress*, Chennai, 4-34.
- Reichardt, C. and Welton, T. (1998). *Solvent and Solvent Effect in Organic Chemistry*. Germany : Wiley-VCH, 91-98, 302-305.
- Rios, J.L., Recio, M.C. and Villar, A. (1988). Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23, 127– 149.
- Saygı G. (2009). *Paraziter hastalıklar ve parazitler*. Sivas: Es-Form Ofset Ltd Şti, 79-86.
- Schoone, K., Smets, J., Ramaekers, R., Houben, L., Adamowicz, L. and Maes, G. (2003). Correlations between experimental matrix-isolation FT-IR and DFT(B3LYP) calculated data for isolated 1:1 H-bonded complexes of water and pyridine or imidazole derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 649, 61–68.
- Schwebke, JR. and Burgess, D. (2004). Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 794–803.
- Seferoğlu, Z., Hökelek, T., Şahin, E. ve Ertan, N. (2007). 6-Amino-1,3-dimethyl-5-(4-methylthiazol2-yl diazenyl)uracil. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, 63, 571-573.
- Seferoğlu, Z. ve Ertan, N. (2008). Synthesis, characterization and spectroscopic properties of some new phenylazo-6-aminouracil. *Central European Journal of Chemistry*, 6, 81–88.
- Seferoğlu, Z. (2009). Study on Tautomericequilibria of New Hetarylazo-6-aminouracils, *Arkivoc*, 8, 42-57.

- Soni, S.D., Srikrishnan, T. and Alderfer, J. L. (1996). Halogenated nucleic acids structure and conformational studies of 5-fluorocytidine by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nucleosides and Nucleotides*, 15, 1945-1957.
- Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F. N. and Frisch, M. J. (1994). Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(45), 11623-11627.
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols Immunology*, 111, A3.B.1 – A3.B.3.
- Süleymanoğlu, N., Ünver, Y., Ustabaş, R., Direkel, Ş. ve Alpaslan, G. (2017). Antileishmanial activity study and theoretical calculations for 4-amino-1,2,4-triazole derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1144, 80–86.
- Süleymanoğlu N, Ustabaş R, Direkel Ş, Alpaslan YB ve Ünver Y. (2018). 1, 2, 4-triazole derivatives with morpholine; DFT study and antileishmanial activity. *Canadian Journal of Physics*, 96, 719–723.
- Süleymanoğlu, N., Ustabaş, R., Ünver, Y., Alpaslan, Y. B., Direkel, Ş. ve Karaman, Ü. (2019). 5-Phenyl thiophene amino phenol derivatives: Synthesis, spectroscopic characterization, computational study and antimicrobial activity. *Journal of Molecular Structure*, 1182, 36-46.
- Şahin, M. (2013). *4 Tolilboronik Asit Molekülünün Titreşimsel Spektrumlarının Teorik ve Deneyisel Yöntemlerle İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir.
- Şener, N., Bayrakdar, A., Kart, H. H. ve Şener, I. (2017). A combined experimental and DFT investigation of disazo dye having pyrazole skeleton. *Journal of Molecular Structure*, 1129, 222-230.
- Tejeria, A., Perez-Pertejo, Y., Reguera, R.M., Carbajo-Andrés, R., Balana-Fouce, R., Alonso, C., Martin-Encinas, E., Selas, A., Rubiales, G. and Palacios, F. (2019). Antileishmanial activity of new hybrid tetrahydroquinoline and quinoline derivatives with phosphorus substituents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 162(15), 18-31.
- Wamhoff, H., Dzenis, J. and Hirota, K. (1992). *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 55, 129.
- Wolinski, K., Hinton, J. F. and Pulay, P. (1990). Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations. *Journal of the American Chemical Society*, 112(23), 8251-8260.
- World Health Organization. (2012). *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008*.

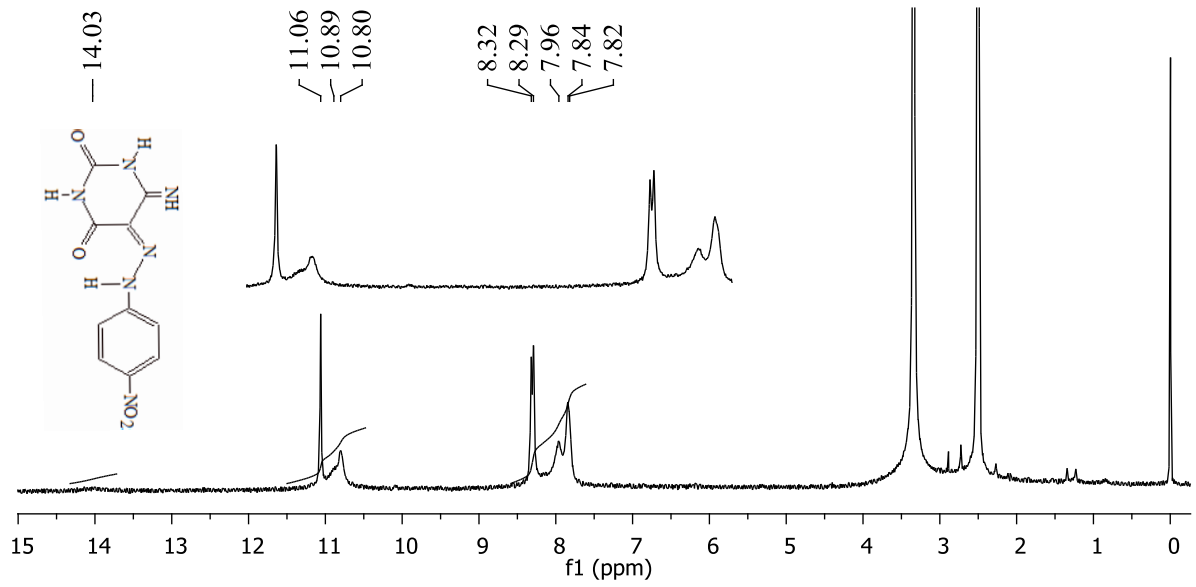
- Xiaohong, L., Ruizhou, Z. and Xianzhou, Z. (2010). Computational study of imidazole derivative as high energetic materials. *Journal of Hazardous Materials*, 183, 622-631.
- Yazdanbakhsh, M. R., Abbasnia, M., Sheykhan, M. and Ma'mani, L. (2010). Synthesis, characterization and application of new azo dyes derived from uracil for polyester fibre dyeing. *Journal of Molecular Structure*, 977(1-3), 266-273.
- Yılmaz, F. (2011). *Bazı imidazol türevlerinin metal kompleksleri üzerine yapılan kuantum kimyasal hesaplamalar*. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Zollinger, H. (1991). *Color chemistry: Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments*. Weinheim: VCH.

EKLER

EK-1. Bileşik I ve Bileşik II'nin FTIR ve ^1H -NMR Spektrumları

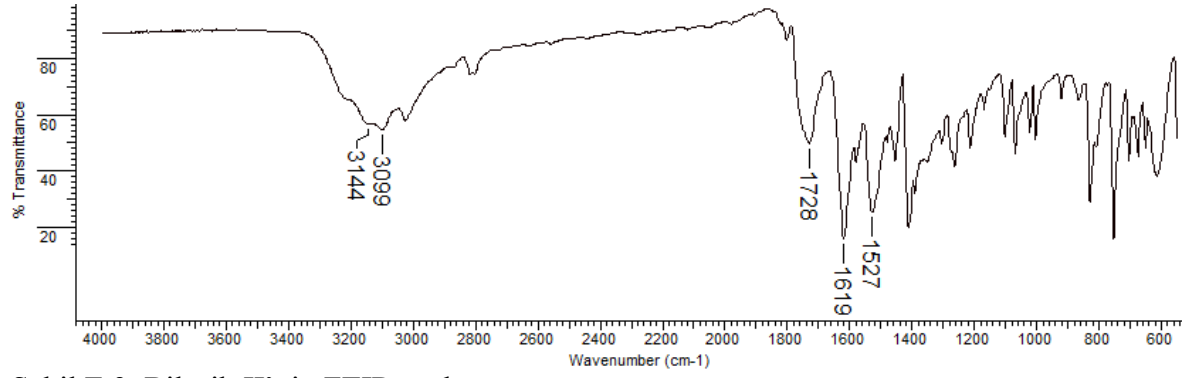


Şekil E.1. Bileşik I'in FTIR spektrumu

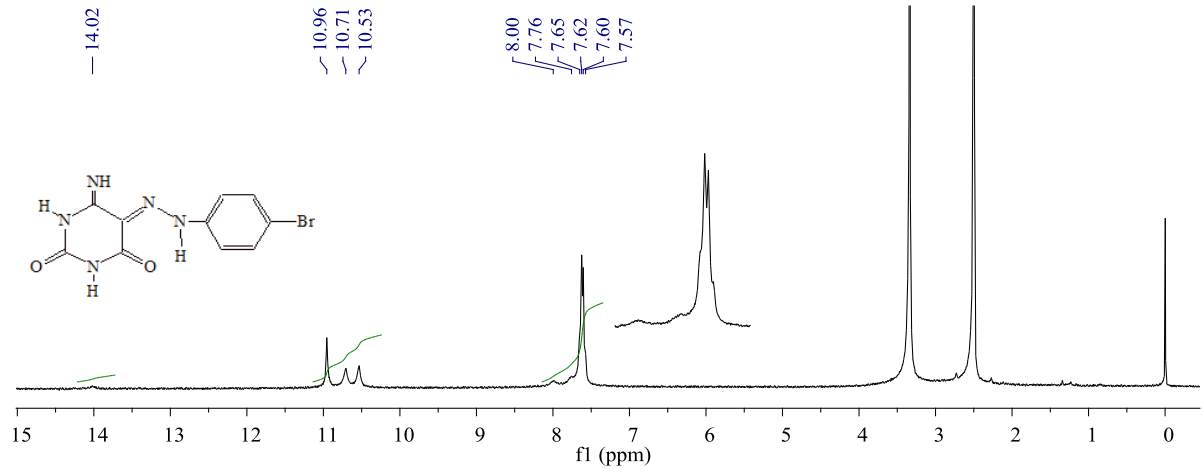


Şekil E.2. Bileşik I'in ^1H -NMR spektrumu

EK-1. (devam) Bileşik I ve Bileşik II'nin FTIR ve ^1H -NMR Spektrumları



Şekil E.3. Bileşik II'nin FTIR spektrumu



Şekil E.4. Bileşik II'nin ^1H -NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KUBAŞIK, Pınar
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 15.01.1992, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 542 250 46 70
 e-mail : pinar.kubasik.pk@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / İleri Teknolojiler	Devam ediyor
Lisans	Erciyes Üniversitesi / Biyomedikal Mühendisliği	2015
Lise	Özel Çağlayan Fen Lisesi	2010

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016-Halen	Türkiye İlaç Ve Tıbbi Cihaz Kurumu	Biyomedikal Mühendisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Kubasik, P., Süleymanoğlu, N., Direkel, Ş., Eyduran, F. ve Karaman, Ü. “Some azo dyes containing uracil; DFT study and antiparasitic activity”, Katılımcı kodu:1478823, Türk Fizik Derneği 35. Uluslararası Fizik Kongresi 4-8 Eylül 2019, Bodrum.

Projeler

Urasil Türevlerinin DFT çalışması ve antiparaziter aktiviteleri, Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri(BAP), Proje kodu ve no: 65/2019-03, **Araştırmacı**, 2019.



GAZİ GELECEKTİR..