

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ**

**BİPİRİDİN LİGANDI İÇEREN RUTENYUM BİLEŞİĞİNİN
ANTİBİYOFİLM VE ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA HİLAL DENİZLİ

DENİZLİ, NİSAN - 2021

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**BİPİRİDİN LİGANDI İÇEREN RUTENYUM BİLEŞİĞİNİN
ANTİBİYOFİLM VE ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA HİLAL DENİZLİ

DENİZLİ, NİSAN - 2021

Bu tez alışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Koordinatrlėu tarafından 2018FEBE017 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Tuğba Hilal DENİZLİ

ÖZET

**BİPİRİDİN LİGANDI İÇEREN RUTENYUM BİLEŞİĞİNİN
ANTİBİYOFİLM VE ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TUĞBA HİLAL DENİZLİ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)**

DENİZLİ, NİSAN - 2021

Bu çalışmanın amacı bipyridin ligandı içeren rutenyum (RuCS91) bileşiğinin antikanser ve antibiyofilm aktivitesini belirlemektir. RuCS91'in antibiyofilm aktivitesi *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 karşı, Kristal viyole yöntemi ile değerlendirildi. Biyofilm inhibisyonu 2,5 ve 5,5 µg/ml'de maksimum %76 olarak belirlendi. Ru CS91' in Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) 8 µg/ml'dir. Ru CS91'in antibiyofilm etkisi doza bağlıydı ve hücre hareketliliğini de inhibe etti. Antibiyofilm etki SEM, FT-IR analizi, ışık ve floresan mikroskopisiyle doğrulandı. Rutenyum ile muamale edilen hücrelerde, hücre zarı geçirgenliğinin artması, hücre zarı morfolojisinin bozulması ile ilişkilidir. Bu değişiklik, FT-IR analizi ile hücre yüzeyindeki protein ve karbonhidratlardaki bazı grupların germe ve şişme pikleri ile gösterildi. RuCS91' in sitotoksik etkisi MTT analizi ile değerlendirildi ve EC50 değeri 1,22 µM olarak bulundu. MDA-MB-231 hücre hattında tümör baskılayıcı genlerin hücresel mRNA seviyesinde artışa neden oldu ve apoptoza yol açtı.

ANAHTAR KELİMELELER: Rutenyum, antibiyofilm, antikanser, gen ekspresyonu, floresan mikroskopi, SEM

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIBIOFILM AND ANTICANCER ACTIVITY OF RUTHENIUM COMPLEX WITH BIPYRIDINE LIGAND

MSC THESIS

TUĞBA HİLAL DENİZLİ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

DENİZLİ, APRIL 2021

The aim of present study was to determine anticancer and antibiofilm activity of ruthenium (RuCS91). The antibiofilm activity on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was evaluated using the Crystal violet assay. Biofilm inhibition percentage was found maximum 76% at concentrations of 2.5 and 5.5 µg/ml. Minimum Bactericidal Concentration (MBK) was 8 µg / ml. The antibiofilm effect of RuCS91 was a dose-dependent and ruthenium inhibited bacterial motility. Antibiofilm effect of RuCS91 was verified by analysis of SEM, FT-IR, light and fluorescent microscopy. The increasing of the membrane permeability was related to the disturbing of the cell membrane morphology. This disturbing was determined via FT-IR analysis that shows vibrations some changes in the protein and carbohydrate groups in the cell surface. The cytotoxic activity of RuCS91 was also evaluated by MTT assay and EC50 value was determined 1.22 µg/ml. RuCS91 were found to have significant anticancer activity. According to the our findings, RuCS91 caused an increase in the cellular mRNA level of tumor suppressor genes in MDA-MB-231 cell line. RuCS91 induced apoptosis in the MDA-MB-231 cell line.

KEYWORDS: Ruthenium, antibiofilm, anticancer, gene expression, fluorescence microscopy, SEM

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	9
2. Literatür Taraması.....	11
2.1 Rutenyum Kompleksleri.....	11
2.2 Biyofilm Nedir?	12
2.3 Rutenyum Bileşiklerinin Antimikrobiyal Özellikleri.....	14
2.4 Rutenyum Bileşiklerinin Hücre Etki Mekanizmaları.....	18
2.5 Rutenyum Bileşiklerinin Antikanser Etkileri	19
2.6 FT-IR Analizleri ile Rutenyum Bileşiklerinin Biyolojik Etkileri	20
2.7 Çalışmanın Amacı.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1 Materyal.....	24
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	24
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	24
3.2 Metod.....	25
3.2.1 Ru CS91 ve Test Bakterileri	25
3.2.2 Ru CS91'in Antibiyofilm Aktivitesi	25
3.2.3 Ru CS91' in Oluşmuş Biyofilm Üzerine Parçalama Etkisi	26
3.2.4 Ru CS91' in <i>S. aureus</i> Hücre Zarı Geçirgenliğine Etkisi.....	26
3.2.5 Hücre Hareketliliği İnhibisyonu.....	27
3.2.6 Işık Mikroskop Analizi.....	27
3.2.7 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi	27
3.2.8 Floresan Mikroskop Analizi	28
3.2.9 FT-IR Görüntüleme Analizi.....	28
3.2.10 Hücre Kültürü	29
3.2.11 Meme Kanseri Hücre (MDA) Kültürünün Hazırlanması ve Sitotoksite Analizi	29
3.2.12 Toplam RNA İzolasyonu	29
3.2.13 cDNA Sentezi	30
3.2.14 MDA-MB 231 Hücre Hattında Apoptoz Tayini	30
3.3 İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1 Ru CS91' in <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 Biyofilmi ve Hücre Hareketliliğine İnhibisyon Etkisi	31
4.2 RuCS91' in Hücre Zarı Geçirgenliğine Etkisi.....	36
4.3 Ru CS91' in <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Escherichia coli</i> Üzerine Hücre Hareketi İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi	38
4.4 Ru CS91' in Antibiyofilm Etkilerinin Işık Mikroskopu ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile İncelenmesi	39

4.5	Ru CS91' in Antibiyofilm Etkilerinin Floresan Mikroskop ile İncelenmesi	41
4.6	FT-IR Görüntüleme Sonuçları	43
4.7	Ru CS91' in Sitotoksosite ve Antikanser Etkisi	45
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	56
6.	KAYNAKLAR	57
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1:Biyo-film oluşum basamakları.....	13
Şekil 2:Rutenyumun bakteri hücresindeki olası hedefleri.	15
Şekil 3:Rutenyum bileşiklerinin kanser hücrelerindeki hedef bölgeleri ve önerilen etki mekanizmaları.	19
Şekil 4:Bazı organik moleküllerin FT-IR spektroskopisinde karşılık gelen dalga spektrumları.....	22
Şekil 5:Ru CS91 konsantrasyonuna bağlı biyo-film inhibisyonu.....	33
Şekil 6:Ru CS91 bileşiğinin oluşmuş biyo-filmde degradasyon aktivitesi.....	35
Şekil 7: Ru CS91 ile muamele edilen <i>S. aureus</i> hücreleri tarafından kristal viyole emilimi (Hücre zarı geçirgenliği).....	37
Şekil 8 :Ru CS91' in anti-hareketlilik görüntüsü.	39
Şekil 9:Ru CS91'in antibiyo-film etkisinin ışık mikroskop analizi.....	40
Şekil 10: Ru CS91 ile muamele edilmiş <i>S. aureus</i> bakterisinin SEM analizi....	41
Şekil 11: <i>S. aureus</i> bakterisinin biyo-film yapısının floresan mikroskop görüntüsü.....	42
Şekil 12: RuCS91 ile muamele edilen <i>S. aureus</i> ATCC 29213'ün FT-IR analizi.....	44
Şekil 13:MDA hücreleri üzerine Ru CS91' in sitotoksik etkisi	46
Şekil 14:Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında CDK4 mRNA seviyesine olan etkisi.. ...	49
Şekil 15:Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun insan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında CDKN1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	50
Şekil 16: Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında CYCLIN D2 mRNA seviyesine olan etkisi.....	50
Şekil 17:Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında BCL2 mRNA seviyesine olan etkisi.. ...	52
Şekil 18:Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında BAX mRNA seviyesine olan etkisi..	52
Şekil 19:Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında CASP3 mRNA seviyesine olan etkisi....	53
Şekil 20:RuCS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında P53 mRNA seviyesine olan etkisi.	53
Şekil 21:Ru CS91'in MDA-MB-231 hücre hattında canlı, ölü ve apoptotik etkisi (%).	55

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1:Farklı konsantrasyonlarda Ru CS91'in antibiyofilm yüzdesi	32
Tablo 2:Ru CS91 bileşğinin oluşmuş biyofilm parçalama aktivitesi	35
Tablo 3:Ru CS91 ile muamele edilen <i>S. aureus</i> hücreleri tarafından kristal viyole Emilimi.....	37
Tablo 4:Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.....	47
Tablo 5: cDNA sentez karışımları ve protokolü.....	48
Tablo 6:Gerçek zamanlı-PZR reaksiyon ortamı	48
Tablo 7:Polimeraz zincir reaksiyon koşulları.....	49

SEMBOL LİSTESİ

µg/mL	:	Mikrogram / Mililitre
M	:	Molar
mM	:	Milimolar
pH	:	Power of Hydrogen (Hidrojen Gücü)
µL	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
nM	:	Nanomolar
cm²	:	Santimetrekare
mm	:	Milimetre
nm	:	Nanometre
ng/mL	:	Nanogram / Mililitre
U/rxn	:	Unit / reaksiyon
U/µL	:	Unit / mikrolitre
O.D.	:	Optik Dansite
rpm	:	Revolutions per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
g	:	Gravite (Relative Centrifugal Force / Field), Göreceli Santrifüj Kuvveti
°C	:	Derece santigrat
%	:	Yüzde
SFT	:	Serum Fizyolojik Tampon
dH₂O	:	Distile Su
RuCS91:		Rutenyum CS91
Ru	:	Rutenyum
TSB	:	Triptik Soy Broth Besiyeri
TSA	:	Triptik Soy Agar Besiyeri
ATCC	:	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyon
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
DMSO	:	Dimetil Sülfoksid
RPMI	:	Roswel Park Memorial Enstitü
MRSA	:	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
QS	:	Quorum Sensing (çoğunluğu algılama)
K.V	:	Kristal Viyole boya

ÖNSÖZ

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Koordinatörlüğü tarafından desteklenen bu çalışmada Rutenyum bileşiklerinin antikanser ve antibiyofilm özellikleri incelenmiştir. Gerekli malzemelerin teminatı ve bütçe desteğinden dolayı Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım. Çalışmada kullanılan Bipiridin Ligandı İçeren Rutenyum bileşiğini sentezleyen, Pamukkale Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim görevlisi Doç. Dr. Çiğdem ŞAHİN' e katkılarından dolayı teşekkür ederim. Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN' a tez çalışmalarımın araştırma, deneysel aşama ve geliştirme aşamalarındaki tez danışmanlığı ve bilgileri ile sağladığı katkılarından dolayı sonsuz teşekkür ederim. Çalışmanın rutenyum bileşiklerinin kanser hücreleri üzerindeki etkileri bölümünde gerek laboratuvar kaynaklarının kullanımı gerekse çalışmanın başarı ile sonuçlanabilmesi için bilgilendirmelerinden dolayı Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü başkan yardımcısı Prof. Dr. Şevki ARSLAN' a teşekkür ederim. Yüksek oranda dikkat ve özverili çalışma sistemi gerektiren tez çalışmalarını döneminde manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

1. GİRİŞ

Biyofilm oluşturma yeteneğine sahip patojen mikroorganizmaların artan hızda geliştirdiği antibiyotik direnci, dünyanın her yerinde tehlikeli derecede yüksek seviyelere ulaşmış ve acil çözümlenmesi gereken bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Mikroorganizmaların farklı metabolik aktiviteleri ile birlikte etkileşime geçtikleri kimyasal maddelere karşı geliştirdikleri bilinen direnç mekanizmalarına her geçen gün yeni direnç mekanizmalarının ilave olması, bu sorunun ciddiyetini ve salgınlar halinde yayılan bulaşıcı hastalıkları tedavi etme yeteneğimizi tehdit etmektedir. Özellikle dünyada yaşanan salgınlar mikroorganizmalar mücadelede, küçük bir yaralanmanın bile insanı öldürebileceği, antibiyotik sonrası bir döneme girmek üzere olduğumuzu göstermektedir. Son zamanlarda bilim camiası aşılarda, yeni antibiyotikler, bağışıklığı güçlendirici ilaçlar veya sentetik ilaçların üretilmesi gibi yenilikçi yaklaşımlarla antibiyotik direnciyle savaşmanın yollarını araştırmaktadır. Özellikle her hücrenin metabolik iz yolundaki farklılık, biyofilm oluşum mekanizmasının ve onunla mücadelenin detaylı anlaşılmasını da olumsuz etkilemektedir.

Çok farklı yapıda sentetik veya doğal antimikrobiyallerin gelişimi, tıp bilimindeki en büyük gelişmelerden biri olmakla birlikte, bu ilaçların yanlış ve yaygın kullanımı sonucunda ilaca dirençli mikroorganizma populasyonları ortaya çıkmıştır. Mikroorganizmalar arasındaki bu direnç artışı, bilinen iskele analoglara dayanan ilaçlardan ziyade, tümüyle yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Günümüzde biyofilm oluşturan patojenlerle mücadelede yeni yaklaşımlar arasında, tez çalışmasının konusunu da oluşturan rutenyum bazlı komplekslerin sentezi, kimyası ve onların biyolojik özellikleri üzerine çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Örneğin, rutenyum bileşiklerinin nükleik asit ve proteinlere güçlü bağlanma özelliklerinin yanısıra biyolojik moleküllere bağlandığında demiri taklit etme özelliğinden dolayı antikanser ve antimikrobiyal ajanlar olarak terapötik potansiyelleri kanıtlanmıştır (Li ve diğ. 2015). Nitekim, platinyum antikanser ajanlarının başarısı, bilim camiasını metallere ilişkili olan terapötik ajanlara ve özellikle de rutenyum komplekslerinin geliştirilmesine yöneltmiştir (Rieter ve diğ.

2008). Çoklu hedef ve toksisite mekanizmaları olan rutenyum kompleksleri nükleik asitler ve proteinlere güçlü bağlanabilme özellikleri nedeniyle yeni nesil ilaç hammaddesi arayışındaki bileşikler içerisinde en fazla dikkat çeken maddelerdir. Rutenyum metalinin oktahedral geometrisi de farklı ligandları bağlayarak amaca uygun komplekslerin sentezine izin vermektedir. Böylece komplekslerin DNA ve RNA ile etkileşimlerini artıracak grupların tercihi ile yüksek biyolojik aktivite göstermesi sağlanmaktadır (Du ve diğ. 2014).

2. Literatür Taraması

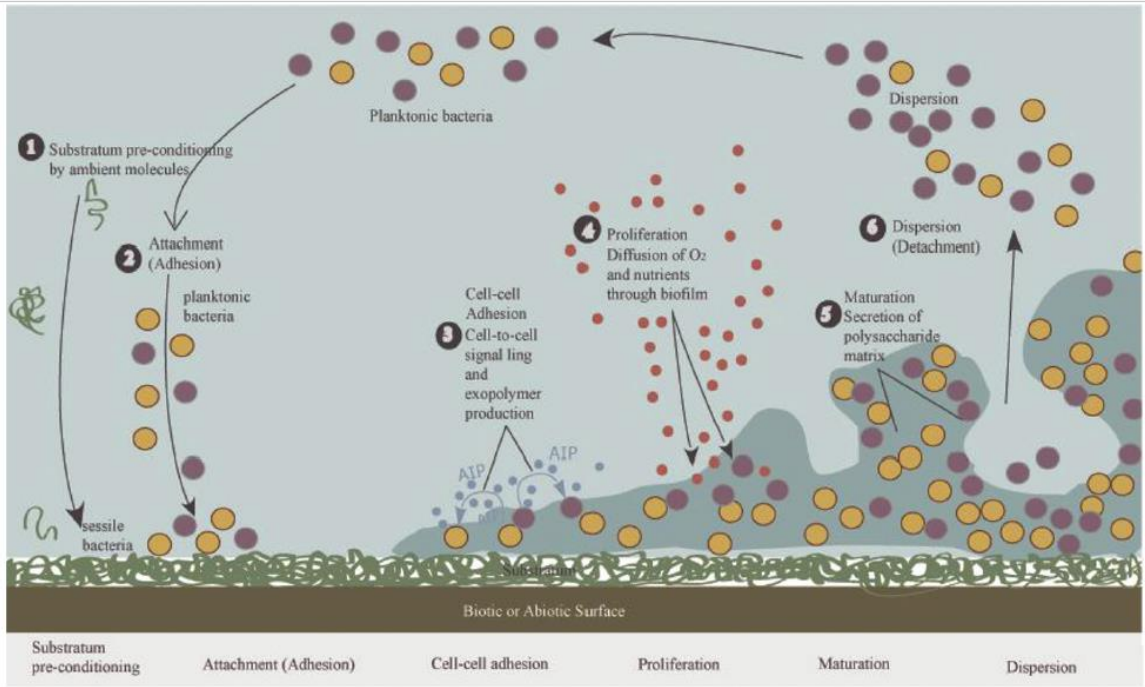
2.1 Rutenyum Kompleksleri

Çok çeşitli metal bileşikleri, önemli biyolojik aktiviteleri nedeniyle günümüzde metalofarmosötik sanayide birçok hastalığın tedavisinde kullanılma potansiyelleri araştırılmaktadır ve hatta bu komplekslerden bazıları ticari olarak satılmaktadır. Örneğin, bu metal ilaçların en iyi bilineni sisplatinin (cis-diamminedikloridoplatinum (II), [cis-PtII (NH₃)₂Cl₂])'dir. Metal bileşiklerinin sürekli gelişimi, sisplatinin ilaç direncinin ve yan etkilerinin üstesinden gelmeyi amaçlamıştır (Ronconi ve Sadler 2007). Metalik ilaçlardan biri olan rutenyum bazlı kompleksler, günümüzde başta tıbbi uygulamalar olmak üzere multidisipliner araştırmalarda büyük ilgi gören yeni nesil metal bazlı antitümör ilaçlardandır. Bu kompleksler, termodinamik ve kinetik açısından iyi bir stabiliteye sahiptir ve hücrel bölünme süreçleri açısından sisplatinine benzer. Hipoksi, asidik pH ve yüksek seviyeli glutatyon gibi biyolojik koşullar altında ön ilaçlar olarak kullanılabilir (Lin ve diğ. 2018). Mükemmel fotofiziksel ve kimyasal özelliklere ve aynı zamanda çoklu değiş-tokuş ligandlara sahiptir. Nanomateriyaller olarak uygulanabilirlikleri mevcut olup önemli antitümör etkinliği gösterirler (Deubel ve Lau 2006, Reedijk 2008). Demiri taklit etme yeteneğinden dolayı insan serum albümini ve demir taşıma protein transferi gibi birçok biyomoleküle bağlanır. Bu yüzden toksisiteleri sisplatininkinden daha düşüktür (Sava ve diğ. 1998, Ang ve Dyson 2006). Rutenyum komplekslerinin biyolojik aktiviteleri ilk olarak 1950'lerde bildirilmiştir ve sonrasında da bir dizi rutenyum kompleksi sentezlenmiş ve incelenmiştir (Dwyer ve diğ. 1952, Meggers ve diğ. 2007, De Lima ve diğ. 2010).

2.2 Biyofilm Nedir?

Biyofilm, biyotik veya abiyotik yüzeye sıkıca tutunmuş ve hücre dışı bir polimerik madde (EPS) matriksi içine yerleştirilmiş mikroorganizmalar topluluğudur. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar, bu oluşum içinde gen ekspresyonu, protein sentezi, büyüme hızı ve metabolik aktiviteler açısından yeni karakterler kazanır (Donlan 2002, Leroy ve diğ. 2020). Yüzey koşulları, kimyasal ve fiziksel büyüme faktörleri, hücresel yapılar ve diğer çevresel faktörler, biyofilm üretimini etkiler ve bu etkileşim biyofilmin yapısını da belirler (Kostakioti ve diğ. 2013). Biyofilm oluşumunda mikroorganizmaların bağlanma hızı ve boyutu, substratın yüzey özelliklerinden etkilenir. Genel olarak (istisnalar olsa da), daha pürüzlü ve daha hidrofobik malzemeler biyofilmleri daha hızlı geliştirir. Yüzey tabakanın özelliklerine ek olarak biyofilm oluşumunda mikroorganizma hücre yüzeyinin özellikleri de önemlidir. Örneğin, flagella, pili, fimbriae veya glikokaliksin varlığı, mikrobiyal bağlanma oranını etkiler. Yüzeyle geri dönüşümsüz olarak yapışan hücreler, bölünerek mikro koloniler oluştururlar ve biyofilmin ana materyali olarak tanımlanan hücre dışı polimerleri üretirler. Bu hücre dışı polimerik maddeler (EPS) esas olarak polisakkaritlerden oluşur (Solmaz ve diğ. 2018). EPS matriks, yüksek oranda su içerir ve yüksek oranda hidratlanmış bu yapı su kanalları şeklinde organize olmuştur. Su kanalları, biyofilm içerisinde büyüyen hücrelere temel besin ve oksijenin taşınmasını sağlar (Rosenberg ve diğ. 1982).

Genetik bir özellik olan biyofilm oluşumu, patojen bakterilere spesifite gösterir. Bu yapıda, polisakkarit dışında, protein, eDNA, β -laktamaz ve toksin gibi ekzoenzimler de bulunur. Bu karmaşık yapı hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşiminin yanı sıra bakterinin virulansını da artırır. Örneğin *Staphylococcus epidermidis*'in hastalık oluşturması, onun biyofilm oluşturma kabiliyeti ve özellikle biyomalzemeleri kolonize etmesinden kaynaklanır (Fey ve Olson 2010, Moretro ve diğ. 2003). Biyofilm oluşum basamakları Şekil 1'de gösterilmiştir.



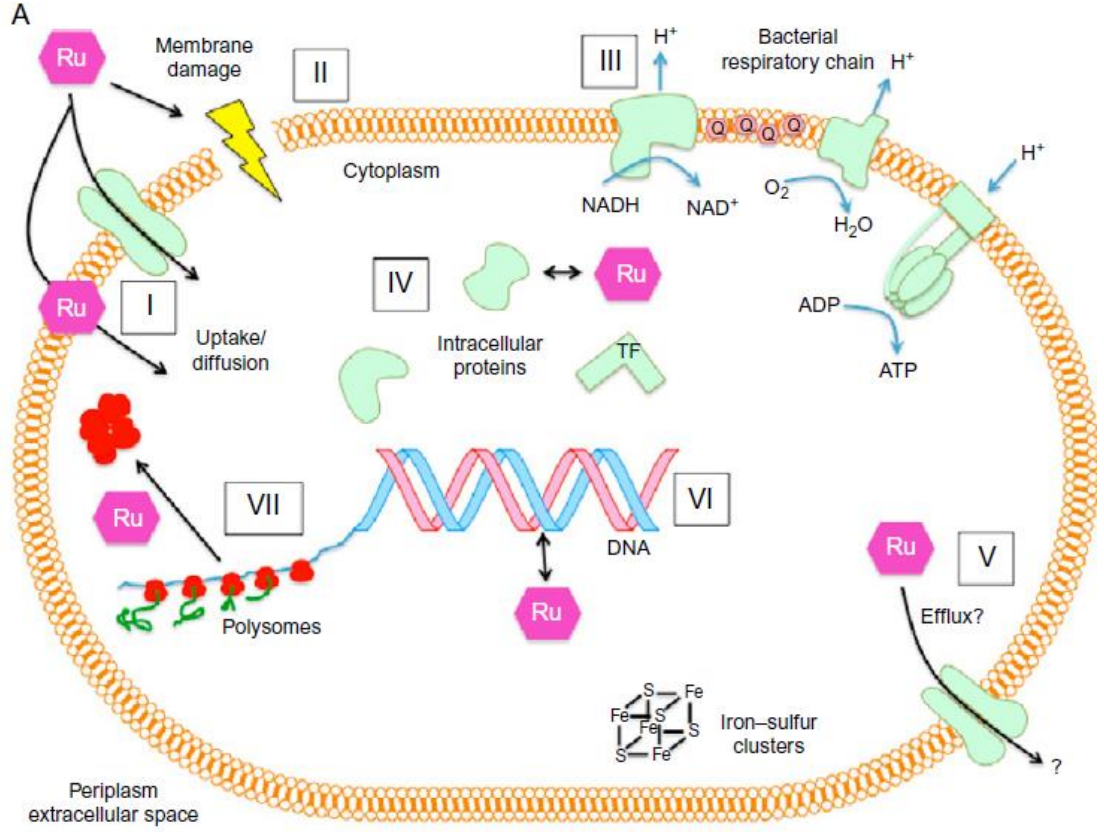
Şekil 1: Biyofilm oluşum basamakları (Kirmusaoglu 2016).

Çevresel koşullar bakterilerin gelişebileceği elverişli hale geldikten sonra, mikrobiyal yapışma için yüzeye tutunma ile başlayan biyofilm oluşumu, hücre-hücre etkileşimi ile devam eder (Kuroda ve diğ. 2008). Bu yüzeye tutunma aktivitesinde teikoik asit, lipoteikoik asit, çeşitli proteinler ve otolizinler görev alır. Stafilokokların biyotik ve abiyotik yüzeylere yapışmasından sonra, ica operon (ica bağımlı form) tarafından PIA veya PNAG gibi ekzopolisakkarit (EPS) üretilir ve hücre dışı matriks oluşurken aynı zaman da bakteri kolonileri de olgunlaşır (Stoodley ve diğ. 2002, Speziale ve diğ. 2014). Hücre duvarına sabitlenmiş proteinler sadece bakteriyel yapışma sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücreler arası adezyon, biyofilm birikimi ve olgunlaşma da sağlar (Speziale ve diğ. 2014).

Antibiyotik direnci, biyofilmdeki büyümenin doğal bir sonucu olarak veya ekstrakromozomal DNA'ların biyofilmdeki duyarlı organizmalara aktarılması nedeniyle gelişebilir. Biyofilmle ilişkili mikroorganizmalar, antimikrobiyal ajanlara planktonik organizmalardan çok daha dirençlidir. Günümüzde mikrobiyal bağlanma süreci ve ilk biyofilm oluşumu hakkında çok şey bilinmektedir. Özellikle biyofilm oluşumu, büyümesi ve antimikrobiyal direncin mekanizmaları bilim insanları tarafından yoğun olarak araştırılmış olsa da, biyofilm ile ilişkili organizmalara karşı etkili tedavilere hala ihtiyaç vardır.

2.3 Rutenyum Bileşiklerinin Antimikrobiyal Özellikleri

Rutenyum komplekslerinin biyosensör, oksijen sensör, optoelektronik ve katalizör olmak üzere birçok uygulama alanı bulunur (Moehl ve diğ. 2013, Du ve diğ. 2014, Monro ve diğ. 2019). Özellikle nükleik asitler ve proteinlere bağlanabilmesi nedeniyle önemli derecede biyolojik aktivite göstermektedir (Du ve diğ. 2014). Rutenyum metalinin oktahedral geometrisi, farklı ligandları bağlayarak amaca uygun komplekslerin sentezine izin vermektedir. Böylece komplekslerin DNA ve RNA ile etkileşimlerini artıracak grupların tercihi ile yüksek biyolojik aktivite göstermesi sağlanmaktadır. Artan bakteriyel direnç gelişimi ile yeni ilaç geliştirme stratejilerini oluşturmuştur. Rutenyum gibi metal bazlı sentetik bileşikler, bakterilerde daha önce hedeflenmemiş birden çok ilaçların hedef bölgesine müdahale edebildikleri için yararlı klinik ilaçlar olabilir. Antibiyotiklerle kıyaslandığında daha az aktivite kaybı en göze çarpan özellikleridir. Bu tür bileşiklerin ilave ligandlarla oluşturulan çeşitli kombinasyonları, dirençli mutantları geliştirme riskini de azaltabilir. Rutenyum kompleksinin antimikrobiyal potansiyelinin belirlenmesiyle birlikte, farklı rutenyum bileşiklerinin *Staphylococcus aureus*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *E. coli* gibi gram negatif ve gram pozitif bakteriler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Rutenyum bileşiğine metil gruplar ilave edilerek lipofilikliği ve antimikrobiyal etkinliği büyük ölçüde arttırılmıştır. Üstelik İnfluenza virüsüne karşı da antiviral etkisi olduğu da belirtilmiştir (Dwyer ve diğ. 1952, Dwyer ve Mellor, 1964). Rutenyumun bir bakteri hücresindeki etki mekanizması Şekil 2’de verilmiştir (Southam ve diğ. 2017).



Şekil 2: Rutenyumun bakteri hücresindeki olası hedefleri (Southam ve diğ. 2017).

I) Bileşiğin lipofilikliğine bağlı olarak, bir membran taşıyıcı protein tarafından kolaylaştırılmış difüzyon veya çift lipit tabakası boyunca doğrudan difüzyon yolu ile hücre içine alınması II) Doğrudan veya kolaylaştırılmış difüzyon, depolarizasyona veya sitoplazmik membranın geçirgenliğinin artmasına neden olur. III) Membran işlev bozukluğu, aerobik solunum gibi membrana bağlı süreçlerin bozulmasına neden olur. IV) Non-kovalent etkileşimler ile hücre içi proteinlerle tersine çevrilebilir ilişki, muhtemelen enzim işlev bozukluklarına neden olur. V) Hücresel atık maddeler bakteriyel akış pompaları aracılığıyla hücre dışına gönderilir. VI) DNA bazları ile ligand interkalasyonu veya negatif yüklü DNA ile katyonik Ru merkezleri arasındaki elektrostatik etkileşimler yoluyla tersine çevrilebilir ilişkiler kurulur. VII) Ribozomlarda RNA ile kurulan tersine çevrilebilir ilişki polisomların hücre kutuplarında toplanması ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olur (Southam ve diğ. 2017).

Antimikrobiyal etkisi olduğu bilinen rutenyum kompleksleri hastalıklarla mücadelede umut vaat etmektedir. Örneğin, bir çalışmada rutenyum II karbonil komplekslerinin *E. coli* hariç, *Pseudomonas* ve *Bacillus* türleri üzerine antibakteriyel aktivitesi test edilmiş ve rutenyumun artan konsantrasyonuna bağlı olarak

antibakteriyel aktivitede artış bildirilmiştir (Jayabalakrishnan ve Natarajan 2001). DNA'ya bağlanarak kompleks oluşturan rutenyum(II), gram negatif bir bakteri olan *E. coli*'ye aktivite göstermezken *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a belirgin bir aktivite göstermiştir. Aynı çalışmada ise rutenyum II'nin *Caenorhabditis elegans* nematodu üzerine toksik etkisi olmadığı da ifade edilmiştir (Bolhuis ve diğ. 2011).

Triphenylphosphine/arsine ONS donör ligandı içeren bir rutenyum (III) kompleksinin *Escherichia coli* ve *Pseudomonas* sp. üzerine antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemine göre test edilmiş, kompleks ve ligandların artan konsantrasyonları bakteriler üzerinde inhibisyon etki göstermiş ancak bu etki Streptomisin'in etkinliğine ulaşamamıştır (Prabhakaran ve diğ. 2006).

[Ru(Hdpa)2PPIP]2p, [Ru(Hdpa)2PIP]2p ve [Ru(Hdpa)24HEPIP]2p olmak üzere üç adet rutenyum kompleksinin DNA'ya bağlanma özelliği ve antimikrobiyal aktivitesi (*E.coli* ve *Neurospora crassa*) test edilmiş, [Ru(Hdpa)2PPIP]2p'nin yüksek antimikrobiyal aktivitesi, rutenyum kompleksinin DNA'ya bağlanma aktivitesinin diğer rutenyum bileşiklerinden daha güçlü olmasına bağlanmıştır (Devi ve diğ. 2013). Benzer bir başka çalışmada ise Ru(II) ([Ru(bpy)2BDPPZ]2+, [Ru(dmb)2BDPPZ]2+ ve [Ru(phen)2BDPPZ]2+) komplekslerinin DNA'ya bağlanma özellikleri test edilmiş ve her üç rutenyum kompleksinin de *E. coli*, *S. aureus* ve *Aspergillus niger* üzerine antimikrobiyal etkili olduğu görülmüştür. Özellikle [Ru(phen)2BDPPZ]2+'nin antimikrobiyal aktivitesinin standart ilaçlardan daha fazla olduğu bulunmuştur (Kumar ve diğ. 2009).

[RuX(Z3 - Schiff)(Eph3)2] (Eph3 = triphenylphosphine/arsine, X = Cl veya Br) gibi değişken ligand içeren rutenyum komplekslerinin *B. subtilis* ve *E.coli* üzerine antibakteriyel aktivitesi değişken olmayan ligand içeren tiplerinden daha etkili oldukları tespit edilmiştir (Thilagavathi ve diğ. 2010).

Rutenyum' un Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerine antibakteriyel aktivitesi Lam ve arkadaşları (2014) tarafından test edilmiştir. Ru-C7 kompleksinin MİK değeri 6.25 µg/mL ve MBK değeri 25 µg/mL olduğu rapor edilmiştir. Ru-C7 kompleksinin antibakteriyel aktivitesinin Ru-C6 kompleksinden (MİK 25 µg/ mL, MBK >100 µg/ mL) daha fazla olduğu görülmüştür. Her iki (Ru-

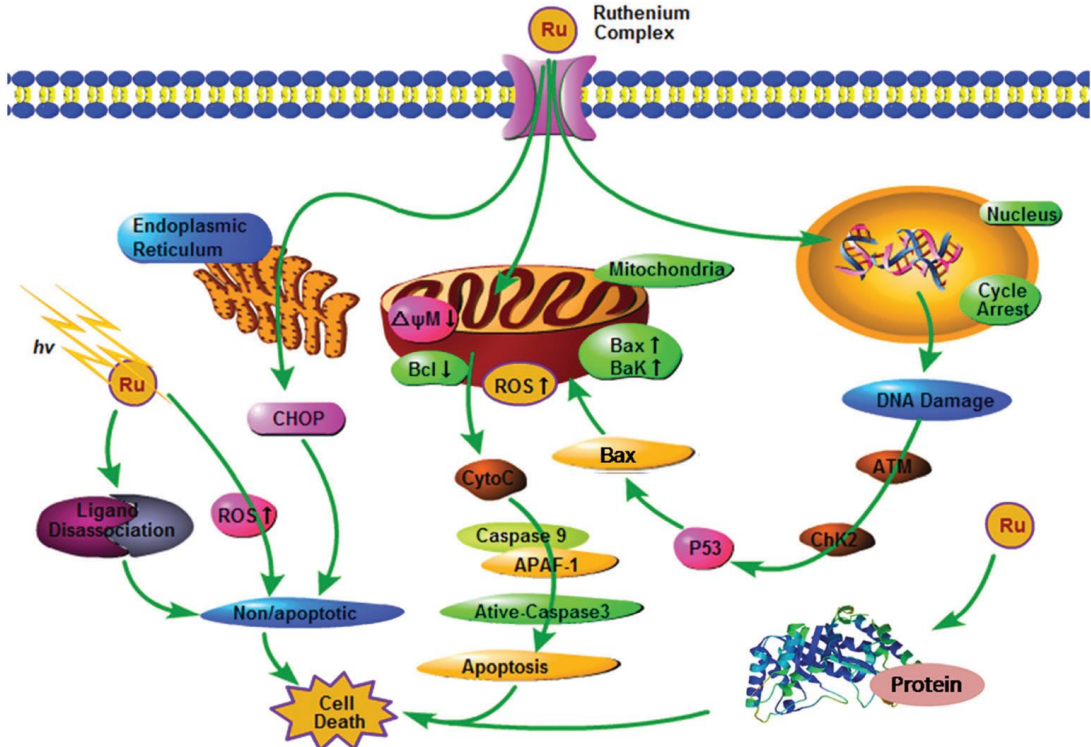
C6 ve Ru-C7) kompleksin insan deri keratinoidleri üzerine toksik etkisi olmadığı da rapor edilmiştir. Rutenyum komplekslerin MRSA'da reaktif oksijen türlerinin üretimini önemli ölçüde arttırdığı ve antibakteriyel aktivitenin reaktif oksijen türlerinin neden olduğu DNA hasarına bağlı olabileceği de bildirilmiştir. Rutenyum bileşiğinin fotoaktivasyonu ile iyi bir antimikrobiyal aktivite sergilemesinin, rutenyum kompleksinin özellikle fotodinamik antimikrobiyal kemoterapide kullanımını umut vericidir (Gall ve diğ. 2018, Monro ve diğ. 2019). Benzer bir başka çalışmada, potensiyel antikanser ilaç adayı olarak bir seri rutenyum kompleksini ([Ru(phen)2(nmit)]Cl₂ (Ru1), [Ru(bpy)2(nmit)]Cl₂ (Ru2), [Ru(phen)2(icpl)]Cl₂ (Ru3), Ru(bpy)2(icpl)]Cl₂ (Ru4) (phen5,10-phenanthroline; bpy5,2,9-bipyridine; nmit5N-methyl-isatin-3-thiosemicarbazone, icpl5isatin-3-(4-Cl-phenyl)thiosemicarbazone), [Ru(phen)2(aze)]Cl₂ (Ru5), [Ru(bpy)2(aze)]Cl₂ (Ru6) (aze5acetazolamide), [Ru(phen)2(R-tsc)](ClO₄)₂ (R5methyl (Ru7), ethyl (Ru8), cyclohexyl (Ru9), 4- Cl-phenyl (10), 4-Br-phenyl (Ru11), 4-EtO-phenyl (Ru12), tsc5thiosemicarbazone)) sentezlemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre Ru5 ve Ru6 dışında tüm rutenyum komplekslerin belirgin derecede antibakteriyel aktiviteleri olduğu gözlemlenmiştir (Mazumder ve diğ. 2004).

Bu komplekslerin çoklu hedefleri ve çoklu toksisite mekanizmaları olması muhtemeldir (Du ve diğ. 2014). Rutenyum metalinin oktahedral geometriye sahip olması, farklı ligandları bağlayarak amaca uygun komplekslerin sentezine izin vermektedir. Böylece komplekslerin DNA ve RNA ile etkileşimlerini artıracak grupların tercihi ile yüksek biyolojik aktivite göstermesi sağlanmaktadır. Rutenyum komplekslerinin kanser tedavisinde kullanılmak üzere nükleik asit etkileşimi detaylı olarak çalışılmıştır. Bu komplekslerin çoğunun ökaryotik hücrelere önemli sitotoksosite sergilediği de bildirilmiştir. Prokaryotlar ve ökaryotlar arasında nükleik asitler ve proteinler gibi makromoleküllerin bazı temel hedefleri korunduğu için bu şaşırtıcı değildir. Bu sitotoksosite, rutenyum komplekslerinin antimikrobiyal ajanlar olarak gelecekteki klinik gelişimini sınırlandırabilir. İncelemek için daha fazla in vivo çalışma gereklidir (Southam ve diğ. 2017).

2.4 Rutenyum Bileşiklerinin Hücre Etki Mekanizmaları

Rutenyum komplekslerinin hücre içerisine zardan geçerek alımı kanserleşmiş hücre üzerinde etkili bir tedavi uygulanabilmesi için önemlidir. Hücre zarı, hücrelere madde giriş çıkışını kontrol eden çeşitli proteinler ve lipitler içerir. Ru (II) kompleksinin, pasif difüzyon, aktif taşıma ve endositoz gibi çoklu mekanizmalar yoluyla hücrelere girdiği bilinir (Gill ve Thomas 2012). Örneğin bir çok nanoyapılı rutenyum kompleksi, hücrelere endositoz yoluyla girer (Zhou ve diğ. 2015, Liang ve diğ. 2014). Hücre yüzeyi ve özellikle mitokondri, lizozom gibi organeller de bazı Ru (II) komplekslerinin antikanser aktivitesi için hedeftir (Green ve Reed 1998). Hücre içi taşıma, protein bozulması ve geri dönüşümü, endositoz ve apoptoz dahil birçok fizyolojik süreçte ve hücre sinyal yollarında önemli rol oynayan lizozomlar, nanomalzemeler olarak formüle edilen ilaçlar dahil birçok makromolekül için nihai hedeftir (Cho ve diğ. 2008).

Rutenyum ve DNA arasındaki bağlantı kovalent ve kovalent olmayan bağlarla gerçekleşir. Rutenyum bileşiği, DNA'ya kovalent bağla bağlandığında DNA omurgası bozulur ve sonuç olarak hem replikasyon ve hem de transkripsiyon engellenir. Kovalent olmayan DNA bağlantısı ise çift sarmaldaki bitişik baz çiftleri arasında olur ve genellikle tersine çevrilebilir (Chen ve diğ. 2003, Turro 2011). Rutenyumun HeLa hücrelerindeki replikasyon çatalının ilerlemesini durdurduğu rapor edilen bir çalışmada, rutenyumun DNA hasarı kontrol noktalarını etkinleştirdiği, hücre döngüsünü G1 ve S evresinde bloke ederek hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Gill ve diğ. 2016). Yapılan bir başka çalışmada, bir b-karbolin alkaloidi içeren üç rutenyum kompleksi tasarlanmış ve hücre çekirdeğine nüfuz ederek sitotoksik etkisi gösterilmiştir (Tan ve diğ. 2010). Rutenyum bileşiklerinin antikanser ajan olarak önerilen etki mekanizmaları Şekil 3'te verilmiştir (Tan ve diğ. 2014).



Şekil 3: Rutenyum bileşiklerinin kanser hücrelerindeki hedef bölgeleri ve önerilen etki mekanizmaları (Tan ve diğ. 2014).

2.5 Rutenyum Bileşiklerinin Antikanser Etkileri

Rutenyum kompleksleri, çok sayıda metal bileşiği arasında dikkate değer bir antitümör aktivite göstermiştir. Ayrıca düşük toksisite ve düşük ilaç direnci nedeniyle yeni nesil platinyum ilaçlarla kıyaslandığında avantajlara sahiptir. Güçlü ilaç adayları olarak kabul edilen rutenyum komplekslerinin biyolojik aktivitelerinin anlaşılması önemlidir. Özellikle taşıma proteinleri, enzimler ve peptidlerle olan etkileşimi, onların biyolojik dağılımları ve etki mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Özellikle son zamanlarda rutenyum komplekslerinin DNA'yı hedeflemeden protein hedefleyici özelliklerinden dolayı kanser önleyici tedavinin geliştirilmesinde kullanım potansiyelleri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Yavaş ligand değişim kinetiği, çoklu oksidasyon durumları ve demiri taklit etme kabiliyeti gibi kimyasal özelliklerinden dolayı rutenyum kompleksleri tıbbi kullanım için çok uygundur ve kanser tedavisinde yeni nesil ilaç geliştirilmesinde aday haline gelmiştir (Nesic ve diğ. 2016). Transisyon-metal bazlı bileşikler, klinikte antitümör ve antiviral olarak yaygın şekilde kullanılan, ayrı bir kemoterapötik ajan sınıfıdır. Örneğin, sisplatin

[cis-diamminedichloroplatinum (II)] ve analogları, klinikte rutin olarak kullanılan antitümör metaloid ilaçlardır. Ancak ilaç direnci ve yan etkiler klinikteki kullanımlarını veya ilaçların yararlarını sınırlamaktadır. Bu sınırlamalardan dolayı daha etkili ve daha az toksik metal bazlı ajan arayışı başlamıştır (Brabec ve Novakov 2006, Chvalova ve diğ. 2007). Rutenyum komplekslerinin kanser tedavisinde kullanılmak üzere nükleik asit etkileşimi detaylı olarak çalışılmıştır. Bu komplekslerin birçoğu ökaryotik hücreler üzerinde sitotoksik etkilidir. Bu sitotoksik etki, dezavantaj olsa da, özellikle kanser hücreleri üzerindeki spesifik etkisi dikkat çekicidir.

2.6 FT-IR Analizleri ile Rutenyum Bileşiklerinin Biyolojik Etkileri

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), uygun frekansta radyasyonla uyarılan bileşiklerin moleküler bağ titreşimlerinin ölçülmesi esasına dayanan bir tekniktir. Biyolojik materyallerin kimyasal analizlerinde 1910 yılından itibaren kullanılmaya başlanmış ve günümüzde biyomoleküllerin karakterizasyonu için kullanılabilirliği kabul edilmiştir (Margarita ve diğ. 2000). Mikroorganizmalar üzerindeki uygulamalarının temelleri 1950'li yılların sonlarına doğru atılmıştır (Riddle ve diğ. 1956, Greensteet ve Norris 1957, Goulden ve Sharpe 1958, Jackson ve Mantsch 1996). Günümüze kadar gelen bu süreçte bazı eleştirel çalışmalarda, bakteriyel suşların tespitinde FT-IR analizlerinin kullanılmayacağı bildirilse de (Riddle ve diğ. 1956, Maquelin ve diğ. 2002), bu tekniğin mikrobiyal tanımlamada yararlı bir araç olduğu bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir (Naumann ve diğ. 1988). FT-IR spektroskopisinin biyolojik makromoleküllerin (insan doku kesitleri, algler, çeşitli canlı türlerine ait hücreler gibi) incelenmesi için güçlü bir teknik olduğu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Levine ve Wetzel 1993, Murdock ve diğ. 2009, Siebert 1995, Jackson ve Sowa 1997, Diem ve Boydston-White 1999, Wenning ve diğ. 2002).

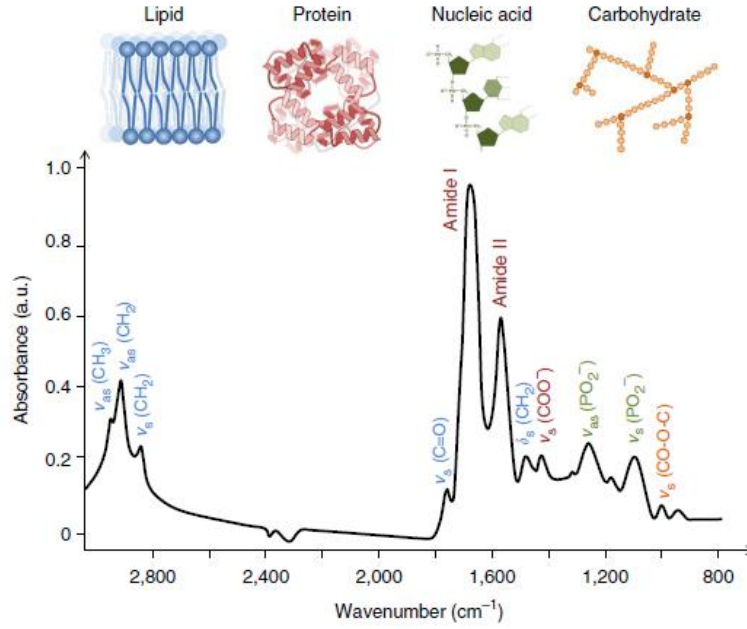
IR bölgesi (1 ila 100 μM), uzak (100 ila 25 μM), orta (25 ila 2.5 μM) ve yakın (2.5 ila 1 μM) IR olmak üzere üç bölgeye ayrılmıştır. Birincil moleküler titreşimleri gösteren orta IR bölgesi, kimya ve adli tıpta maddelerin analizi için yaygın kullanılan bölgedir. Biyolojik açıdan ilgi çeken kızılötesi bantların çoğu 4000 ile 1000 cm^{-1} arasındaki frekans aralığında meydana gelir. Bir hücrenin FT-IR spektrumu, protein, lipid, karbonhidratlar ve DNA dahil olmak üzere tüm hücresel makromolekülleri

gösterir. Makromoleküllerin spektrumları karmaşık olmasına rağmen, protein, lipitler ve DNA, FT-IR spektrumuna karakteristik ve örtüşmeyen katkılar sağlar. Çünkü titreşim spektrumlarındaki spektral bantlar moleküle özgüdür ve biyokimyasal bileşim hakkında doğrudan bilgi verir (Sacksteder ve Barry 2001, Naumann 1998).

Biyolojik numunelerin FT-IR spektrumlarını anlamak için, hücre bileşimi ve biyolojik numunelerdeki yapı bloklarının belirli yapıları hakkında bazı temel bilgiler gereklidir. Karmaşık biyolojik materyallerin kızılötesi spektrumlarının yalnızca hücrenin bileşimini tanımlamadığını aynı zamanda yapısal veya konformasyonel değişikliklere duyarlı olduğu ve numunenin fiziksel durumunun (hidrasyon veya toplama koşulları) FT-IR sonuçları üzerinde ciddi bir etkisinin olduğunu da bilmek önemlidir. Bu nedenle örneklerin hazırlanma koşulları tutarlı sonuçlar elde etmek amacıyla standart tutulmalıdır. (Naumann 1998). FT-IR spektroskopisinin en önemli avantajı, örneklerin sıvı, susuz veya toz halinde incelenmesine olanak sağlamasıdır.

Tüm hücre bileşenleri, genomun daha küçük veya daha büyük parçalarının ifadesine bağlı olduğundan, mikroorganizmaların FT-IR spektrumları, incelenen hücrelerin fenotipik ve genetik parmak izlerini belirli bir şekilde gösterir. Mikrobiyolojik örneklerin tespitinde iki yöntem kullanılmaktadır. İlki, nesnel sınıflandırmayı, örnek verilerinin kendi aralarında temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik küme analizlerinin kıyaslanmasını baz alırken ikincisi denetimli tekniklere dayanmaktadır ve örneklerin kimliği hakkında önceden tespit edilen bilgilere ihtiyaç vardır. Bazı araştırmacılar farklı tür ve suşlara ait bakteri hücrelerinin FTIR analizini yaparak teşhis ve tanımlamaya katkı sağlamışlardır. Araştırmacılar, FT-IR absorpsiyon spektrumlarının, mikrobiyal hücrelere spesifik parmak izleri olduğunu ve spektrumları analiz etmek için çok değişkenli istatistiksel yöntemler kullanıldığında, mikrobiyal karakterizasyonu alt tür seviyesine kadar mümkün kıldığını göstermiştir (Naumann ve Helm 1991, Naumann 1998). FT-IR, kapsüller, endosporlar veya depolama malzemeleri gibi belirli hücre bileşenlerini tespit etmek ve tanımlamak için de kullanılabilir. Daha önce yayınlanan çalışmalarda, hücre içi polisakaritlerin (Garry ve diğ. 1959, Levine ve diğ. 1953), poli- β hidroksibütirik asit (PHB) granüllerinin (Rouf ve Stokes 1962) ve endosporların (Norris ve Greenstreet 1958) tespiti, yazarlar tarafından dispersif kızılötesi spektroskopi kullanılarak rapor edilmiştir (Helm ve Naumann 1995). Bu nedenle FT-IR spektroskopisi yalnızca tanımlama yöntemi

sağlamakla kalmaz, aynı zamanda mikroorganizmaların, mikrobiyal metabolizma, antibiyotik duyarlılığı, ilaç geliştirilmesi ve diğer etkileşimler için de çok umut verici bir araç gibi görünmektedir (Orsini ve diğ. 2000).



Şekil 4:Bazı organik moleküllerin FT-IR spektroskopisinde karşılık gelen dalga spektrumları (Baker ve diğ. 2016).

2.7 Çalışmanın Amacı

Rutenyum komplekslerinin kanser tedavisinde kullanılmak üzere nükleik asit etkileşimi detaylı olarak çalışılmış olmakla birlikte, bu tür ilaç adaylarının sağlık sektöründe geniş bir kullanım alanına sahip olması istenir. Özellikle antimikrobiyal ve antibiyofilm gibi biyolojik etkilerinin olup olmadığının anlaşılması ya da bu etkilerin yeni ligandlar eklenerek geliştirilmesi ya da var olan bu özelliklerin iyileştirilmesi yeni çalışma konularındandır. Bizde bu çalışmada, Doç. Dr. Çiğdem ŞAHİN (Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü) tarafından sentezlenen Rutenyum CS91 bileşiğinin antibiyofilm ve antikanser özelliklerini belirlemeyi amaçladık. Rutenyum bileşiklerinin antikanser özellikleri ve hücreyel yerleşimi hakkında çok sayıda çalışma yapılmakla birlikte bu komplekslerin antibiyofilm özelliklerine ilgi çok yenidir. Sunulan araştırmada, rutenyum bileşiğinin antibiyofilm aktivitesinin yanı sıra antikanser özelliği detaylı olarak çalışılmıştır.

Antibiyofilm etki, ışık ve floresan mikroskop ile doğrulanmıştır. RuCS91 ile muamale edilen bakteri hücre yüzeyindeki değişiklik FTIR spektrometresi kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca çalışmada Ru CS91'in MDA kanser hücre hattı üzerine sitotoksik ve antikanser etkisi de araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Nutrient Broth (Merck), Tryptic Soy Broth (TSB-Biomark, BK046HA); Agar (Sigma, 05039); Kristal Viyole (Merck, 1.15940.01100); Glasiyal Asetik asit (Merck, 1.00056.2500); Sülfürik asit (Sigma, 30743); Soyum Klorür (NaCl, 31434); Baryum Klorür (Merck, 1.01719.0500); Peptone From Casein (Trypton, Fluka, 70169); Pepton Bacteriologic (Biolife, 4122592); D-Glucose (Sigma-49159); Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640, Sigma, R8758), Osmiumtetraoksit (Sigma), Gluteraldehit (Sigma), Au-Pd karışımı (Quarum 150RS), Giemsa (Sigma), İmmersion oil, Tripsin-EDTA (Gibco, 25200); Fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 10270); Etil alkol, Penisilin (Sigma, P4333); Dimetil sülfoksit (DMSO-Merck, 1.16743.1000), Yağsız süt tozu (Skim milk powder, Bioshop, SKI400.1); KiloGreen 2x qPCR MasterMix (Abm); Triton X-100 (Bio Basic, DB0198); 1 kb DNA ladder (Fermentas, SM0311), cDNA sentez kiti (Abm, G236); Annexin V - EGFP Apoptoz Kiti I (BioVision, K104), PI& Sybr Green (innuprep 2.0 kit).

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

-80 °C buzdolabı (Nüve, DF490), Buzdolabı (Beko), İnkübatör (Nüve, EN 120), CO₂ İnkübatörü (Nüve, EC 160), Taramalı Elektron Mikroskop (Zeiss Supra 40 vp), Spektrofotometre, Otoklav (Nüve, OT 4060), pH Metre (InoLap pH 720), Saf Su Cihazı, Santrifüj (Alfagen Süper Mini Santrifüj 14K; Hettich, EBA 20), Santrifüj (büyük- küçük), Hücre sayma ve analiz cihazı (NanoEntek Arthur); Emmiyet Kabini (Nüve MN120), Fourier transform infrared spektrofotometresi (Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR). Hücre sayma ve analiz cihazı (NanoEntek Arthur), İnverted mikroskop (Oxion Inverso Inverted, Gerçek zamanlı PZR cihazı (Applied Biosystems StepOne); Thermal Cycler (PZR cihazı, Optimus 96G Gradient TC-O96G), Floresan mikroskobu (Olympus BX53F Fluorescent Microscope), Mikroplaka Okuyucusu (Epoch, BioTek, USA).

3.2 Metod

3.2.1 Ru CS91 ve Test Bakterileri

Çalışmada kullanılan bipyridin ligandı içeren rutenyum CS91 ([Ru(2,2'-bipyridine)₂(4,4'-bis(3-ethylheptyl)-2,2'-bipyridine)] (PF₆)₂ bileşiği Doç. Dr. Çiğdem ŞAHİN ve arkadaşları (PAÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü) tarafından daha önce yapılan bir çalışmada sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir (Oner ve diğ. 2012). Çalışmada test bakterisi olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (anti-biyofilm tayini ve anti-kayma) ve *E. coli* ATCC 25922 (anti-yüzme) kullanılmıştır. Çalışmalarda Triptik Soy Broth (TSB) ve Triptik Soy Agar (TSA) besiyeri kullanılmıştır.

3.2.2 Ru CS91'in Antibiyofilm Aktivitesi

Antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi için Triptik Soy Broth (TSB, Merck) besiyerinde geliştirilen bir gecelik taze kültürler kullanılmıştır. 96 kuyulu mikroplakalara toplam hacim 200 µl olacak şekilde bakteri hücreleri, TSB ve arzu edilen konsantrasyonlarda Ru CS91 ilave edilmiş ve 24 saat biyofilm oluşumu için 37°C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda planktonik hücreler uzaklaştırılmış ve her bir kuyu 0,01 M PBS (pH 7,2) ile iki kez yıkanmıştır. Ardından %0,1 kristal viyole ile boyanan kuyular distile su ile yıkandıktan sonra 200 µL %20 galsiyal asetik asit ilave edilerek 25 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Biyofilm kütesinin optimal yoğunluğu 570 nm'de mikropate okuyucu ile belirlenmiştir. Aynı zaman da bakteri gelişimi de 600 nm spektrofotometrede okunarak takip edilmiştir. Biyofilm indirgeme yüzdesi aşağıda verilen formül ile belirlenmiştir. Rutenyum içermeyen bakteri kültürü (pozitif) ve bakteri içermeyen rutenyum (negatif) kontrol olarak kullanılmıştır (Nostro ve diğ. 2016; Bai ve diğ. 2019). Tüm çalışmalar iki paralelli çalışılmıştır.

$$\text{Biyofilm indirgeme (\%)} = \frac{(\text{Kontrol OD} - \text{Örnek OD})}{\text{Kontrol OD}} \times 100$$

3.2.3 Ru CS91' in Oluşmuş Biyofilm Üzerine Parçalama Etkisi

Ru CS91'in oluşmuş biyofilme parçalama etkisinin belirlenmesi için öncelikli olarak 24 ve 48 saatlik bakteriyel biyofilmler oluşturulmuştur. Oluşmuş biyofilm üzerine farklı konsantrasyonlarda (0,75 ng/ml, 1 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,5 µg/mL, 7 µg/mL, 8,5 µg/mL, 10 µg/ mL, 12,5 µg/ mL, 15 µg/ mL) Ru CS91 ilave edilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 0,01 M PBS (pH 7,2) ile her kuyucuk 2-3 kez yıkanarak plaka temizlenmiştir. Kuyucuklar %0,1 kristal viyole ile 5 dakika boyandıktan sonra kuyular distile su ile yıkanmıştır. Kuyulara 200 µL %20 glasiyal asetik asit ilave edilerek 25 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Biyofilm kütlelerinin optikal yoğunluğu 570 nm'de mikropilaka okuyucu ile belirlenmiştir. Biyofilm indirgeme yüzdesi aşağıda verilen formül ile belirlenmiştir (Nostro ve diğ. 2016; Bai ve diğ. 2019).

$$\text{Biyofilm degradasyon (\%)} = [100 - (\text{Kontrol OD} - \text{Örnek OD}) / \text{Kontrol OD}] \times 100$$

3.2.4 Ru CS91' in *S. aureus* Hücre Zarı Geçirgenliğine Etkisi

Bakteriyel membran geçirgenliğine RuCS91'in etkisi Kristal Viyole Absorbsiyon yöntemine göre belirlenmiştir. (Yadav ve diğ. 2019). +4°C, 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek toplanan hücreler, PBS (0,01 M; pH:7,4) ile 2 kez yıkanmıştır. Pelet içine 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL, 1 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2 µg/mL, 2,5 µg/mL konsantrasyonlarda Ru CS91 ilave edilerek 24 ve 48 saat 37 °C' de etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellete 10 µl Kristal viyole solüsyonu (0.01%) ilave edilerek 10 dakika bekletilmiş ve 13,400 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernetant 590 nm'de spektrofotometre ile okunmuştur.

$$\frac{OD_{590nm} \text{ örnek}}{OD_{590nm} \text{ kristal violet}} \times 100$$

formül yardımıyla geçirgenlikteki değişiklik yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.5 Hücre Hareketliliği İnhibisyonu

Ru CS91' in yüzme ve kayma hareketlerine karşı inhibisyon etkileri test etmek için *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri kullanılmıştır. Yüzme inhibisyonu için bir gecelik aktif *E. coli* ve kayma anhibisyonu için *S. aureus* kültürünün hücre yoğunluğu 0,5 MacFarlanda ayarlanmıştır. 7,5 µL bakteri kültüründen, farklı konsantrasyonlarda rutenyum içeren yüzme agar (% 1 tripton, % 0.25 NaCl ve % 0.5 agar) ve kayma agar petrilere nokta ekim yapılmıştır. Petrilere ters çevrilmeden 37°C'de 24 saat inkübe edilerek süre sonunda koloni çapları milimetrik olarak ölçülmüştür. DMSO negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Rutenyum içermeyen besiyerinde üreyen bakteriler pozitif kontrol olup ve % inhibisyon aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Monte ve diğ. 2014).

$$\% \text{ inhibisyon} = [(\text{kontrol zonu}-\text{örnek zonu}) / \text{kontrol zonu}] \times 100$$

3.2.6 Işık Mikroskop Analizi

Ru CS91' in antibiyofilm üzerine etkisini ışık mikroskobu ile gözlemlemek amacıyla, mikropilakaya kuyucuklarına cam diskler yerleştirilmiş ve mikropilakalar 24 saat 37 °C 'de biyofilm oluşumu için inkübe edilmiştir. Süre sonunda rutenyum içeren kuyucuklardan cam diskler alınarak 1/20 Giemsa solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve immersiyon yağı damlatılarak 100x büyütmede incelenmiştir (Daikh ve diğ. 2020).

3.2.7 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

S. aureus kültürü içeren 6'lı mikropilakalara yuvarlak lameller (14 mm) yerleştirildikten sonra her kuyuya farklı konsantrasyonlarda (0,75 µg/mL, 1 µg/mL ve 1,5 µg/mL) RuCS91 ilave edilmiştir. Biyofilm oluşumu için 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda lameller üç kez 5 dakika SFT (0,1 M pH: 7,4) solüsyonu ile yıkandıktan sonra 200 µL %2,5'luk gluteraldehit ile lamelin yüzeyi kaplanmıştır. 1 saat oda sıcaklığında bekletilen lameller SFT solüsyonu ile tekrar üç kez 10 dakika yıkamış ve 200 µL %1'lik Osmiyumtetraoksit ile kaplanmıştır. 1 saat oda

sıcaklığında bekletilen lameller yine SFT solusyonu ile üç kez 10 dakika yıkanarak 70 °C’de 45 dakika kurutulmuştur. Kurutulan lameller Au-Pd karışımı ile kaplanarak Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde incelenmiştir.

3.2.8 Floresan Mikroskop Analizi

RuCS91 ve 12 mm`lik yuvarlak lamel içeren bakteri kültürü (0.5 MacFarland) lamel yüzeyinde biyo film oluşumu için 24 saat 37⁰C` de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda lamel alınarak 1 defa steril dH₂O ile yıkanmış ve lamelin üzeri SYBR Green ve Propidyum iyodür (PI) karışımı ile kaplanmıştır. SYBR Green/PI karışımı 100µL dH₂O içerisinde 1:3 oranında hazırlanmıştır. Lameller boya solusyonunda karanlık odada 20 dakika bekletilerek boyama işlemi yapılmıştır. Süre sonunda lamel üzerine immersiyon yağı damlatılarak Floresan mikrokopta yeşil ve kırmızı ışıkta 100x büyütmede incelenmiştir (Feng ve diğ. 2018).

3.2.9 FT-IR Görüntüleme Analizi

Staphylococcus aureus ATCC 29213, farklı konsantrasyonlarda Ru CS91 içeren TSB besiyerinde 24 saat 37 °C`de geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre kültürü, 10.000 x g`de 5 dak santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre kütlesi (pelet) birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. Kontrol grubu olarak RuCS91 ile muamele edilmemiş *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır. RuCS91 ile muamele edilmiş ve muamele edilmemiş hücre peletinin IR çekimleri, 400-4000 cm⁻¹ arasında Kızılötesi Spektrometresi (Infrared Spektroskopi) ile yapılmıştır.

3.2.10 Hücre Kültürü

Meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) (Avrupa Hücre Kültür Koleksiyonu, EACC), 37°C' de %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda, %10 FBS ve %1 penisilin içeren RPMI-1640 besiyerinde büyütülmüştür. Hücre büyümesi ve gelişmesi, hücre yoğunluğuna göre pasajlama yapılarak takip edilmiştir. Hücreler Fosfat tamponu ile (PBS) ile yıkanmıştır. Steril 100 mm ve 25cm²'lik kültür kabında gelişen hücre yoğunluğu (~%80) artışı sağlandıktan sonra Tripsin-EDTA yardımıyla yüzeyden toplanarak santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre peleti besiyeri ile çözülerek taze besiyerine ekilmiştir. Hücre sayımında tripan mavisi ve toma lamı kullanılmıştır.

3.2.11 Meme Kanser Hücre (MDA) Kültürünün Hazırlanması ve Sitotoksite Analizi

RPMI 1640 besi ortamında 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda geliştirilen MDA-MB-321 kanser hücreleri Tripsin ile kaldırılmış ve steril tüplerde 2000 rpm'de 24°C' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet 1 ml besiyerinde çözülmüş ve Tripan mavisi (1:1 seyreltilmiş) ile boyanarak Thoma lamında sayılmıştır. RuCS91'in sitotoksite etkisi, MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) metodu ile belirlenmiştir. 96 kuyulu mikropalakada her kuyucuğa 1x10³ hücre, son hacim 100 µL olacak şekilde besiyeri ve farklı konsantrasyonlarda RuCS91 uygulanmıştır. Bileşik eklenen hacimde Dimetil sülfoksit (DMSO) kontrol grubudur. 24 saat sonunda tüm kuyulardan besiyeri uzaklaştırılmış ve 100 µL besiyeri ve 10 µL MTT solüsyonunda 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından formazon kristalleri için DMSO ile çözülerek Epoch Mikropalaka Okuyuculu Spektroskopi cihazı yardımıyla 590 nm'de absorpsiyon değerleri ölçülmüştür.

3.2.12 Toplam RNA İzolasyonu

Apoptoz yolaklarında görev alan Siklin D1, CDK2, CDK4, CDKN1A, p53, BAX, BCL2 ve CASP3 gen ifadesinin belirlenmesi amacıyla, kontrol grubu ve RuCS91 ile muamele edilmiş hücrelerden Toplam RNA izole edilmiştir. Toplam RNA

İzolasyonu, innuPREP RNA Mini Kit (AnalitikJena, Almanya) yardımıyla üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. Elde edilen RNA, -80°C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.13 cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Easy Script Plus cDNA sentez kiti ile oligod(T) primeri ve Ters Transkriptaz enzimi (RT) kullanılmıştır. Sentez işlemi üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım protokolü ve yapılışı Tablo 3'te verilmiştir. RT-PZR yapmak üzere sentezlenen cDNA'lar, -20°C'de saklanmıştır.

3.2.14 MDA-MB 231 Hücre Hattında Apoptoz Tayini

Çalışmamızda, Annexin V Apoptoz Saptama Kiti I kullanılarak meme kanseri hücre hattında apoptoz etkisi de belirlendi. Bu amaçla, önce MDA-MB-231 hücreleri 2 defa fosfat tampon çözeltisiyle (PBS) çöktürüldü. Pelet, 100µl 1X Bağlanma Tamponunda 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyondan sonra 5 µl Annexin-V eklenip 20 dakika buzda karanlık ortamda bekletildi. Reaksiyon tüpü 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelete 100 µl Bağlanma Tamponu ile 1µl PI eklendi ve 10 dakika buzda karanlıkta bekletildi. Son olarak 25 µl örnek tek kullanımlık plastik tabakaya yerleştirildi ve NanoEntek Arthur cihazında hücre sayımı ve analiz gerçekleştirildi.

3.3 İstatistiksel Analiz

Sonuçların varyans analizi SPSS paket istatistik programı (TEAM, EQX, SPSS Statistic version 16.0, 2007) ile yapılmıştır. İstatistiksel olarak farklılıkların önemli olması durumu $p < 0,05$ düzeyinde tespit edilmiştir. Oluşturulan tablolarda değerlerin standart sapmaları verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Ru CS91' in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Biyofilmi ve Hücre Hareketliliğine İnhibisyon Etkisi

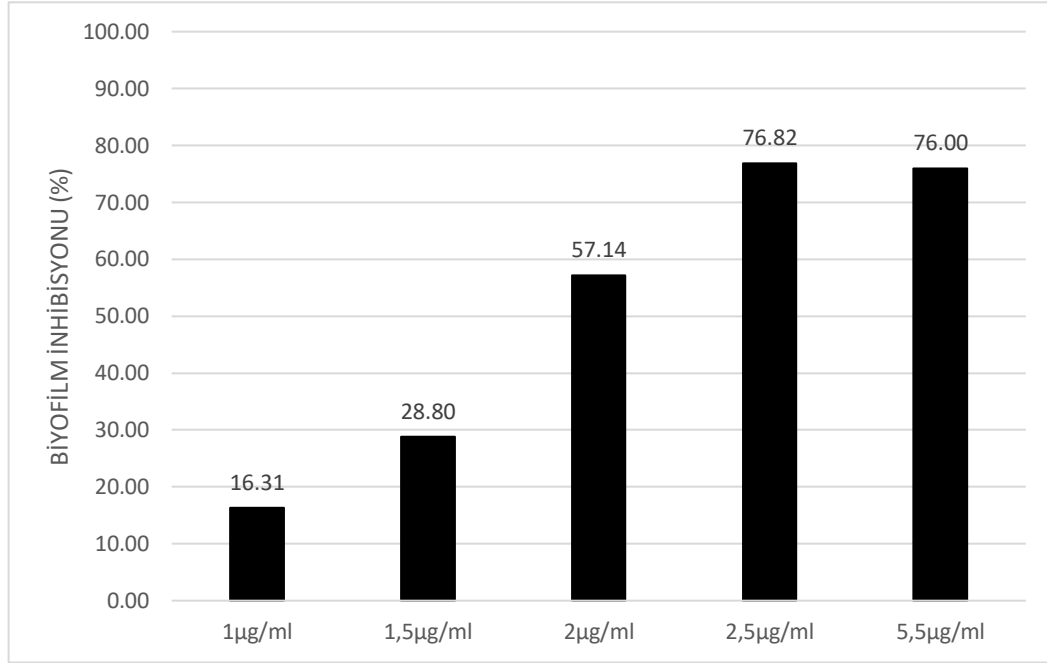
Biyofilm mikroorganizmaları her türlü çevresel etmenlerden koruma özelliğinden dolayı özellikle patojen bakterilerin sıklıkla korunmak amacıyla oluşturdukları bir yapıdır. Bu yapı içinde topluluk şeklinde yaşayan mikroorganizmalar, besin, su ve genetik materyal alışverişi gerçekleştirirler. Lateral gen transferlerinin sıklıkla gerçekleşmesi nedeniyle biyofilm yapısı içindeki bakteriler birçok ilaca ve kimyasal maddeye karşı direnç geliştirirler. Bu tür patojen bakteriler infeksiyon hastalık etkeni olup, bunlarla mücadele biyofilm tabakasının oluşumunun önüne geçilmesiyle mümkün olabilir. Biyofilm içindeki patojenler antibiyotiklere planktonik hücrelere göre 100-1000 kat daha fazla direnç gösterir ve üstelik bazı antibiyotiklerin varlığında biyofilm oluşumu indüklenebilir (Hoiby ve diğ. 2010, Hoffman ve diğ. 2005). Bu amaçla doğal ürünlerin yanısıra kimyasal sentez yoluyla elde edilen rutenyum kompleksleri gibi birçok bileşiğin antibiyofilm özellikleri araştırılmaktadır. Rutenyum bileşiğinin yapısı veya içerdiği farklı ligandlar, bu komplekslerin biyolojik etkinliğinde önemli rol oynar. Örneğin, Li ve diğ. (2011), bir dizi sentetik inert polipiridinerutenyum (II)'nin *S. aureus*, MRSA, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı etkinliğini araştırmışlar; bb12, bb14 ve bb16 ligandı içeren dinükleer rutenyum II komplekslerinin *S. aureus* ve MRSA'ya karşı MIK değerinin 1 µg/mL, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı ise 2-4 ve 8-16 µg/mL olduğunu rapor etmişlerdir. Mononükleer rutenyum kompleksinin ise MRSA ve iki gram negatif bakteriye az etki gösterdiği ancak *S. aureus*'a dinükleer rutenyum kompleksine benzer aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Güçlü antimikrobiyal aktivitenin aksine dinükleer rutenyum kompleksi kırmızı kan hücreleri ve THP-1 hücrelerine daha az toksik etki göstermiştir. Sentezlenen üç ayrı rutenyum bileşiğinin disk difüzyon testi ile antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve Ru(I)'in *S.aureus*'a karşı 8,5 mM ve *E. coli*'ye karşı 7,8 mM yüksek aktivite gösterirken, 2 ve 3 komplekslerinin daha az aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Mallepally ve diğ. 2017). Beeton ve diğerleri 2014 yılında çamur bakır bileşiklerinin biyofilm üzerindeki etkilerini vancomisin gibi antibiyotikler ile kıyaslamış ve bakır bileşiklerinin yaklaşık olarak 25 µg / mL ve üzeri

konsantrasyonlarda biyofilmi önemli ölçüde uzaklaştırdığını tespit etmiştir. Ayrıca, inkübasyon süresi arttıkça vancomisin varlığında biyookütle artarken Cu³ bileşiğinin varlığında bu artışın daha düşük oranda olması, bakterilerin geleneksel antibiyotiklere daha hızlı direnç geliştirdikleri bildirilmiştir.

Bu kapsamda biz de bipyridin ligandı içeren bir rutenyum bileşiği olan Ru CS91'in staphylococcus biyofilminin oluşumuna olan inhibisyon etkisini inceledik. Çalışmanın ilk aşamasında Ru CS91' in planktonik bakteri gelişimi üzerine etkisi analiz edilmiştir. Bu amaçla 1,0 - 5,5 µg/mL konsantrasyonlarda rutenyum çözeltileri hazırlanmıştır. Geliştirilen *S. aureus* bakterisinin hücre yoğunluğu 0,5 McFarlanda göre ayarlandıktan sonra arzu edilen konsantrasyonlarda rutenyum ile muamele edilmiştir. Rutenyum içeren bakteri kültürleri 24 saat 37°C' de inkübe edilerek 600 nm'de mikropilaka okuyucuda okunmuştur. Her konsantrasyondan katı besiyerine ekimler yapılarak koloni gelişimi kontrol edilmiştir. Çalışma sonunda bakteri koloni gelişiminin olmadığı en düşük konsantrasyon olan 8,5 µg/mL Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) olarak kaydedilmiştir. Rutenyum bileşiğinin güçlü bakterisidal etkisinin olduğu görülmüştür. Çalışmada rutenyum bileşiğinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri tam olarak belirlenememiştir. Bu nedenle belirlenen her konsantrasyonda anti-biyofilm aktivitesi incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 1 ve Şekil 5'de verilmiştir.

Tablo 1:Farklı konsantrasyonlarda Ru CS91'in antibiyofilm yüzdesi (p<0,05)

Ru CS91 Konsantrasyonu (µg/mL)	Biyofilm inhibisyonu (%)
1	16,31 ± 0,042
1,5	28,8 ± 0,070
2	57, 14 ± 0,070
2,5	76,82 ± 0,001
5,5	76,00 ± 0,070



Şekil 5:Ru CS91 konsantrasyonuna bağlı biyofilm inhibisyonu ($p<0,05$)

Ru CS91, *S. aureus* biyofilminin inhibisyonu açısından değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlardan, rutenyum bileşiğinin etkili bir antibiyofilm ajanı olduğu anlaşılmıştır. Kristal viyole (KV) ile yapılan antibiyofilm aktivite analizine göre, rutenyum bileşiği bakteri biyofilmini etkili bir şekilde azaltmıştır (Şekil 5). Ru CS91'in artan konsantrasyonuna bağlı olarak biyofilm inhibisyon etkisinde de ciddi oranda bir artış gözlenmiştir. 1 µg/mL rutenyum konsantrasyonunda %16,31 oranında bir inhibisyon gözlenirken 2,5 ve 5,5 µg/mL' de bu oran %76 olarak tespit edilmiştir. Biyofilmin %100 giderim yaptığı konsantrasyon rutenyumun toksik etkisinin güçlü olmasından dolayı tespit edilememiştir. KV analizine göre, rutenyum bileşiğinin maksimum inhibisyonu, 2,5 ve 5 µg/mL'de gözlenirken (%76), 1 µg/mL rutenyumun biyofilm üzerinde düşük etkisi olmasına rağmen konsantrasyon artışına bağlı olarak etkinin arttığı ve rutenyumun bakteri biyofilm oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği dikkat çekmiştir. Çalışmamızda rutenyum bileşiğinin minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) 8 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

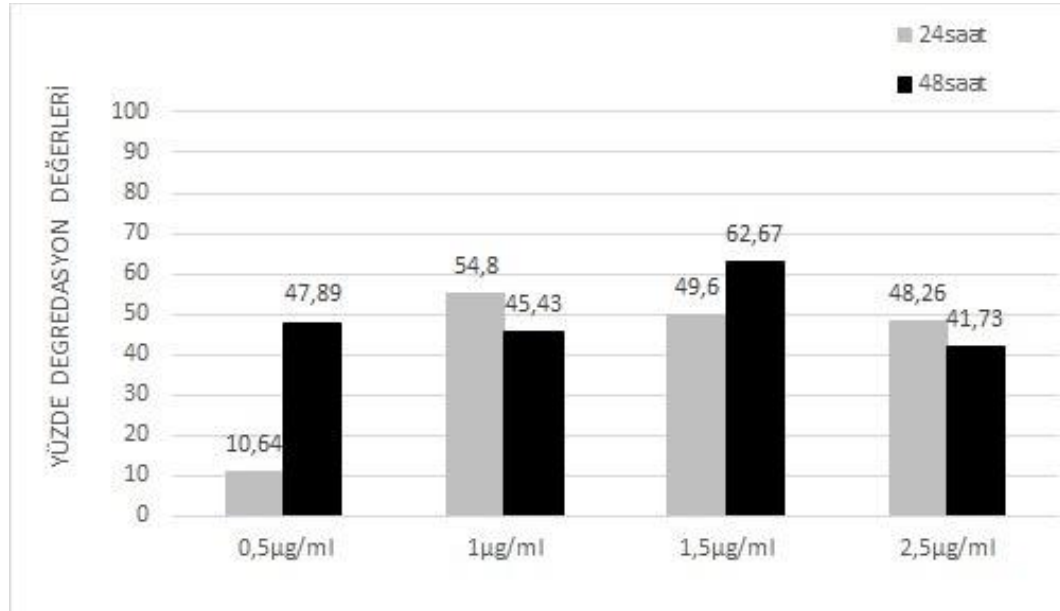
Ru CS91 bileşiğinin, oluşmuş biyofilmi parçalama etkisi de analiz edilmiştir. Bunun için öncelikli olarak *S. aureus* bakterisi mikropalakalara ekilerek 24 ve 48 saat 37°C' de etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteriyel biyofilm oluşumu tamamlanmış kuyulara farklı konsantrasyonlarda rutenyum bileşiği ilave edilmiştir.

Ru CS91 içeren mikroplakalar 24 saat inkübe edilmiştir. Bu sürede rutenyum bileşiğinin oluşmuş biyofilm yapısını parçalama kapasitesi Şekil 6'de verilmiştir. Ru CS91 bileşiği her iki inkübasyon süresi sonunda oluşturulan bakteriyel biyofilm tabakası üzerinde birbirine yakın düzeyde inhibisyon göstermiştir (0,5 µg/mL konsantrasyon hariç). Konsantrasyon artışının genel olarak biyofilm parçalamaya belirgin bir etkisinin olmadığı da görülürken, 1,5 µg/mL konsantrasyon hariç, bu etkinin 24 saatte 48 saate göre daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, biyofilm yapısının 48 saatlik sürede daha güçlü olduğunun bir göstergesidir. Chen ve diğerlerine göre, biguanid iridium(III) kompleksleri, MRSA dahil gram pozitif ve gram negatif patojenler ile insan patojeni mayalar üzerinde nanomolar seviyesinde antimikrobiyal etkili olup, bu tür patojenlerden kaynaklı hastalıklarla mücadelede bu tür komplekslerin sentezi ilaç üretiminde önemlidir (Chen ve diğ. 2018). Biguanid ligandları ile süslenmiş nanopartiküller hücre zarlarına kolayca nüfuz edebilir ve önemli derecede antibiyofilm aktivite gösterirler (Zhou ve diğ. 2015). Örneğin, Böttcher ve arkadaşları *B. subtilis* ve patojenik *S. aureus* tarafından üretilen biyo-filmleri bozma aktivitesi ile guanid ve biguanid bileşiklerini taklit eden norspermidin sentezlemişlerdir (Böttcher ve diğ. 2013). DNA'ya bağlanma aktivitesine sahip Rutenyum(II) bazlı kompleksin nematod *Caenorhabditis elegans* ve *E. coli*'ye karşı in vitro aktivitesi olmadığı bulunurken, *B. subtilis* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde aktif olduğu tespit edilmiştir (Bolhuis ve diğ. 2011). Rutenyum kompleksinin *C. elegans* üzerine toksik etki göstermemesi rutenyum kompleksinin ökaryotik organizmalar üzerine toksik etkili olmadığını bir göstergesidir (Leung ve diğ. 2008). Diğer taraftan, kurkumin bazlı rutenyum bileşiği, vankomisin ve levofloksasine kıyasla *S. aureus* biyofilminin %48'ini degrade etmiştir (Srivastava ve diğ. 2019). RuNN bileşiğinin, *S.aureus* biyofilmini inhibe ettiği ve hücre yüzey morfolojisini değiştirdiği SEM görüntüleri ile doğrulanmıştır (Andrade ve diğ. 2020). Bakteri hücre yüzey bozulmasının bakteri biyofilminin oluşması için gerekli olan birbirine bağlanma yeteneğini engellediği (Sharma ve diğ. 2012) ve bakteriyel EPS'lerin üretimi ve stabilitesi bozulmalarla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Murray ve diğ. 2012). Biyofilm oluşumunda quorum sensing mekanizmasının önemli rol oynadığı bilinir (Simoes ve diğ. 2010). Çalışmamızda kullandığımız Ru CS91 bileşiği 24 saatlik biyofilm oluşumunun rutenyumun artan konsantrasyonu bağlı olarak (1 µg/mL' de %16,31; 2,5 ve 5,5 µg/mL'de %76) ciddi oranda inhibe olduğu belirlendi (Tablo 1, Şekil 4). Minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) 8 µg/mL olarak

tespit edildi. Srivastava ve arkadaşları, iki oktahedral rutenyum(II) polipiridil kompleksinin ([Ru(NN)₂(cur)](PF₆)[NN = bpy (1), phen (2)]) *S. aureus* biyofilmine karşı inhibitör etkisinin 10 x MIC = 1 µg mL⁻¹ olduğu biyofilmin %48 ini indirgediğini tespit etmişlerdir (Srivastava ve diğ 2019). Bu rutenyum kompleksleri ile kıyaslandığında RuCS91'in (2,5µg/mL için %76) üstünlüğü daha iyi anlaşılmaktadır.

Tablo 2:Ru CS91 bileşiminin oluşmuş biyofilmi parçalama aktivitesi (p<0,05)

	0,5 (µg/ml)	1 (µg/ml)	1,5 (µg/ml)	2,5 (µg/ml)
24 saat	10,64 ± 0,636	54,8 ± 3,676	49,6 ± 0,00	48,26 ± 2,828
48 saat	47,89 ± 0,777	45,43 ± 0,014	62,67 ± 1,343	41,73 ± 0,721



Şekil 6:Ru CS91 bileşiminin oluşmuş biyofilmi degridasyon aktivitesi (24 ve 48 saatlik bakteriyel biyofilm yapısına rutenyum ilave edildikten sonra 24 saat inkübe edilmiştir). (p<0,05).

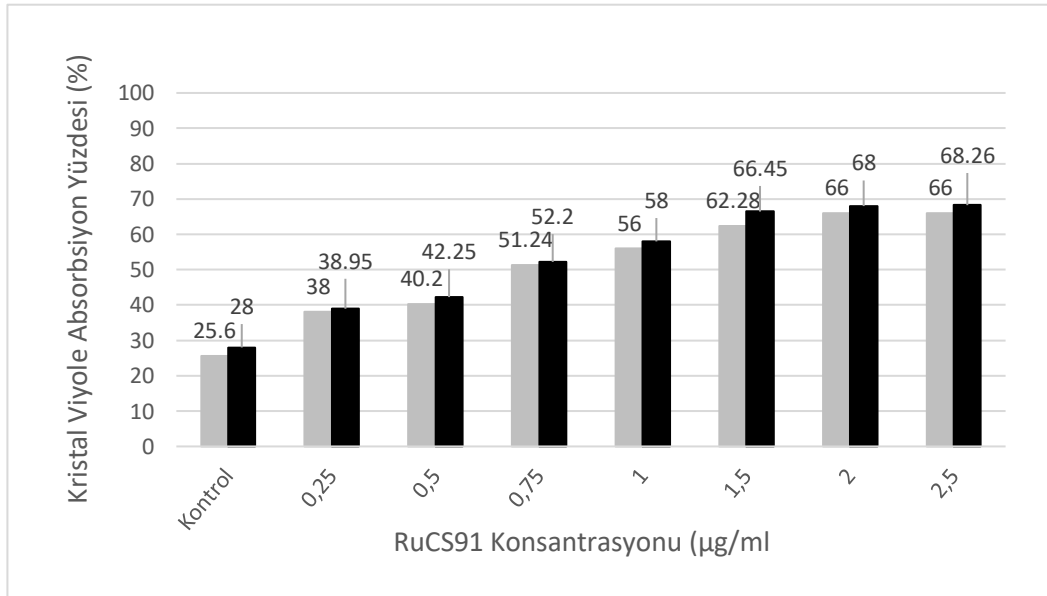
4.2 RuCS91' in Hücre Zarı Geçirgenliğine Etkisi

Ru CS91 ile muamele sonucunda bakteri hücre zarı geçirgenliğindeki değişiklikleri belirlemek için bir kristal viyole (KV) emilim deneyi yapılmıştır. Bu analiz, Ru CS91 bileşiği ile muamele edilmemiş hücelere kıyasla rutenyum bileşiği ile muamele edilmiş bakteriler tarafından KV emiliminin arttığını göstermiştir. Muamele edilmemiş bakteriler tarafından KV alımı (kontrol) 24 saatlik biyofilmde yaklaşık % 25 ve 48 saatlik biyofilmde ise %28 olmuştur. Bununla birlikte, Ru CS 91 ile muamele edilen bakteriler, konsantrasyon artışına bağlı olarak kontrole göre daha yüksek kristal viyole emilimi göstermiştir (Tablo 3, Şekil 7). Ru CS91 ile muamele edilen bakteri hücreleri tarafından artan KV emilimi, bakteri hücre zarı geçirgenliğinin değiştiğini göstermektedir. Benzer şekilde Yadav ve diğerleri (2019), viniferin ile muamele edilen bakteri hücre zarı geçirgenliğindeki değişiklikleri belirlemek için bir KV emilim deneyi yapmışlar ve viniferin ile muamele edilmemiş hücelere kıyasla viniferin ile muamele edilmiş bakteriler tarafından kristal viyole boyasının emiliminin arttığını göstermişlerdir. Araştırmacılara göre, kontrol grubu tarafından KV alımı yaklaşık % 40 iken, ϵ -viniferin ile muamele sonrasında bakteriler %74 oranında KV alımını göstermiştir. Tablo 3 ve Şekil 7'de de görüldüğü gibi, yaptığımız çalışmada Ru CS91 ile muamele edilmemiş kontrol bakteri hücreleri %25 ve %28 KV emilimi gösterirken, rutenyum ile muamele edilmiş bakteriler tarafından emilen kristal viyole boyasındaki (%66 ve %68) emilimin artışı, hücre zarı geçirgenliğindeki değişikliğin dolayısıyla da rutenyumun bakteri hücresi üzerine inhibisyon etkisinin bir diğer kanıtıdır.

SPSS paket programı kullanılarak yapılan istatistiki analiz sonuçlarına göre, RuCS91'in konsantrasyon artışının biyofilm inhibisyonu, biyofilm degradasyonu ve membran geçirgenliğine etkisi, istatistiki açıdan önemli olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 3:Ru CS91 ile muamele edilen *S. aureus* hücreleri tarafından kristal viyole Emilimi (24 ve 48 saat kristal viyole Emilimi testi, hücre zarı geçirgenliği ifade etmektedir ve % cinsinden verilmiştir.) ($p<0,05$)

	Kontrol	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	0,75 µg/mL	1 µg/mL	1,5 µg/mL	2 µg/mL	2,5 µg/mL
24	25,6 ± 0,707	38,0 ± 0,00	40,20 ± 0,070	51,24 ± 0,537	56,00 ±0,00	62,28 ±0,070	66,0 ± 0,00	66,00 ± 0,00
48	28,0 ±0,00	38,95 ± 0,353	42,25 ± 0,070	52,20 ± 0,141	58,00 ± 0,00	66,45 ± 0,353	68,00 ± 0,00	68,26 ± 0,07



Şekil 7: Ru CS91 ile muamele edilen *S. aureus* hücreleri tarafından kristal viyole Emilimi (Hücre zarı geçirgenliği) ($p<0,05$).

4.3 Ru CS91' in *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* Üzerine Hücre Hareketi İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

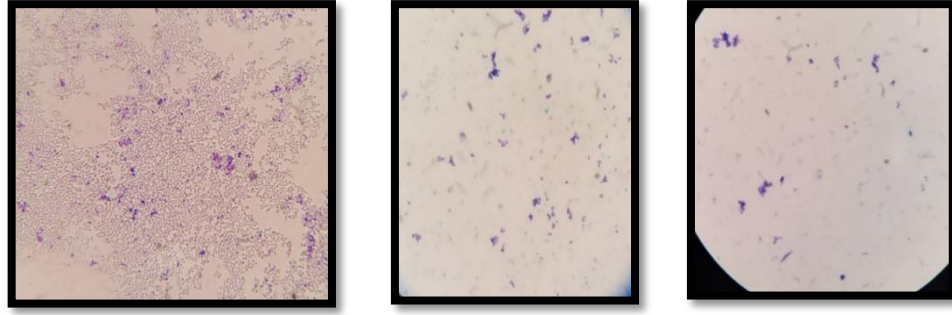
Hareketlilik, yapışma ve biyofilm oluşumu, bakteriyel patogeneizde ve antimikrobiyal direnç gelişiminde ana adımlar arasında sayılabilir (Simoes ve diğ. 2010). *P. aureginosa* gibi gram negatif bakterilerde yüzmek, seğirmek ve kaymak olmak üzere üç çeşit yüzey hareketi vardır (Rashid ve Kornberg 2000). Flagellalı bir bakteri olan *E. coli* ise hem yüzme hem de kayma odaklı iki hareket tipi gösterir (Gomez-Gomez ve diğ. 2007). Gram negatiflerin aksine, *S. aureus* flagellaya sahip olmayıp koloni yayılımı şeklinde hareket eder (Tsompanidou ve diğ. 2011). Çalışmada Ru CS91' in anti-kayma ve anti-yüzme etkisi *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinde test edilmiştir. Rutenyum bileşiklerinin (0,5; 1,5; 2,5 ve 8µg/mL) her iki bakteride de hareketliliği tamamen inhibe ettiği görülmüştür. Sadece en düşük doz olarak çalışılan ve biyofilm inhibisyonu gözlenmeyen 0,5 µg/mL rutenyum varlığında, *S. aureus* bakterisinin kayma aktivitesi üzerine %28,57 inhibisyon olduğu görülmüştür (Şekil 8). 0,5 µg/mL oranda dahi *E. coli*'nin hareketi üzerine %100 inhibisyon etkisinin olması dikkat çekicidir. *S. aureus* bakterisi flajella veya piliden bağımsız bir hareket gerçekleştirirken *E. coli* bakterisi flagellar hareket yapmaktadır. Bu sonuç bize, düşük dozda *E. coli*'nin hareketini tümüyle inhibe etmesi rutenyum bileşiğinin flagellar hareket üzerine daha etkili olduğunu düşündürmüştür. Nitekim fitokimyasal sinnamaldehid, hücrenin yüzeye bağlanmasını önleyerek *E. coli*'nin yüzme hareketliliğini inhibe etmektedir (Niu ve Gilbert 2004). İlerde daha detaylı çalışmalarla rutenyum bileşiğinin bakteri tipi, türü ve hareket çeşitlerine etkisinin araştırılmaya değer bir konu olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle bakteriyel hareketliliği engelleyen rutenyum ve benzeri metal bazlı bileşiklerin tanımlanması, ileride bakteriyel yüzey kolonizasyonunun sınırlandırılması için potansiyel çalışma konusudur.



Şekil 8 :Ru CS91' in anti-hareketlilik görüntüsü A: Ru CS91 içermeyen kayma agarda *S. aureus* koloni yapısı (Kontrol), B: 0,5 µg/mL Ru CS91 içeren kayma agarda *S. aureus* koloni yapısı, C: Ru CS91 içermeyen yüzme agarda *E.coli* koloni yapısı.

4.4 Ru CS91' in Antibiyofilm Etkilerinin Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile İncelenmesi

Çalışmada ışık mikroskop ve SEM analizi de yapılmış ve 24 saatlik inkübasyon sonunda rutenyum ile muamele edilmiş biyofilm yapılarının kontrol biyofilminden daha gevşek olduğu ışık mikroskopunda açıkça görülmüştür (Şekil 9). SEM mikrograflarında, rutenyum içeren ortamda bakteri hücrelerinin yüzeyinde pürüzlü yapı ve yer yer bozulmalar görülmüştür. Kontrol grubunda bakteri hücre yüzey morfolojisi düzgün ve pürüzsüzken rutenyum bileşiğinin varlığında geliştirilen bakteri hücre yüzey yapısındaki bu bozulmalar, RuCS91'in bakteri hücrelerinde makromolekül yapısında yol açtığı değişikliklerin bir nedeni olabilir. Diğer bir deyişle, elektron mikroskop analizi Ru CS91'in düşük konsantrasyonlarda dahi biyofilm yapıdaki bozulma rutenyumun antibiyofilm potansiyelini kanıtlar niteliktedir (Şekil 10).

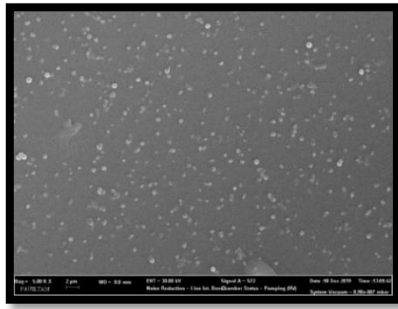


A

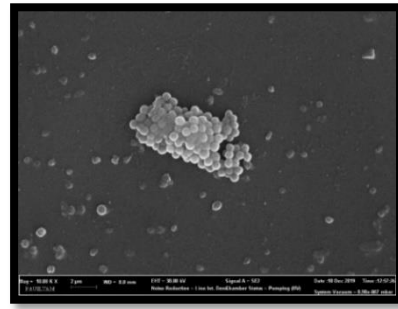
B

C

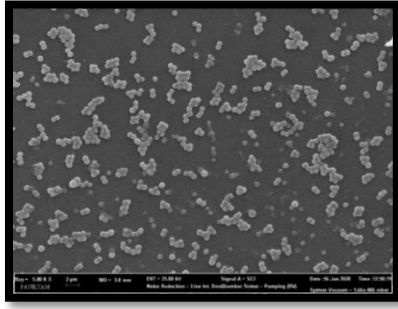
Şekil 9: Ru CS91'in antibiyofilm etkisinin ışık mikroskop analizi, A: Kontrol, rutenyum ile muamele edilmemiş bakteri biyofilm görüntüsü, B: 1,5 µg/mL ve C: 2,5 µg/mL rutenyum ile muamele edilmiş bakteri biyofilm görüntüsü.



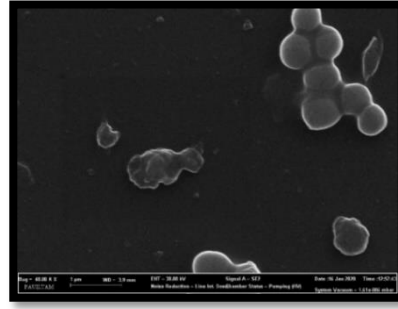
A



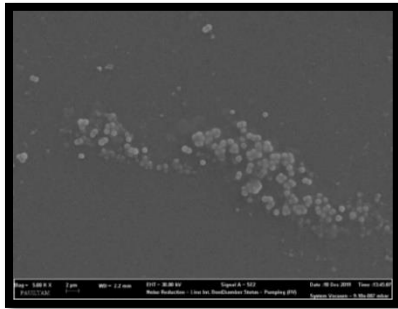
B



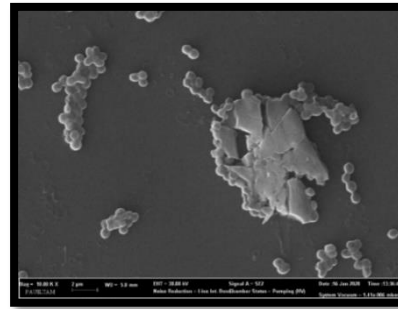
C



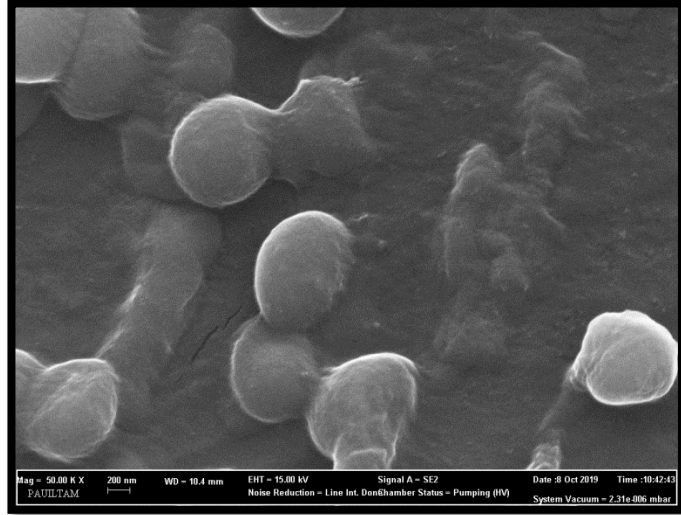
D



E



F

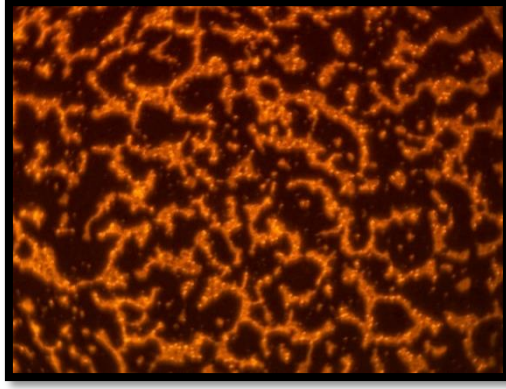


G

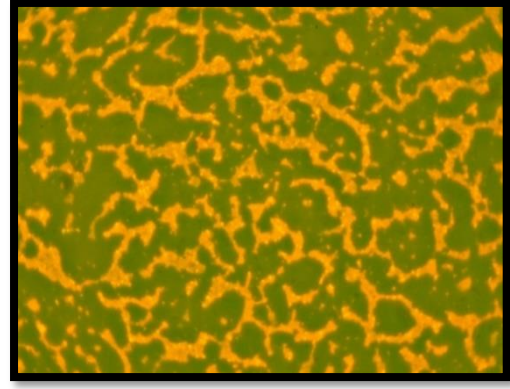
Şekil 10: Ru CS91 ile muamele edilmiş *S. aureus* bakterisinin SEM analizi (A ve B kontrol grubu, C ve D: 0,75 µg/mL Ru CS91, E ve F: 1 µg/mL Ru CS91, G: 1 µg/mL rutenyum içeren ortamda bakteri hücrelerinin SEM analizi)

4.5 Ru CS91' in Antibiyofilm Etkilerinin Floresan Mikroskop ile İncelenmesi

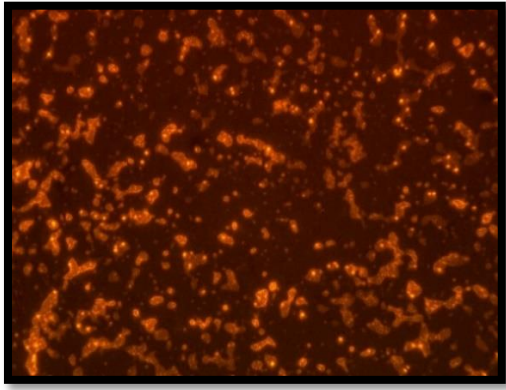
Ru CS91 ile muamele edilmiş ve edilmemiş *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısı floresan mikroskopta da incelenmiştir (Şekil 11). Ru CS91 ile muamele edilmemiş kontrol grubundaki bakteri biyofilm (Şekil 11 A ve 11 B) yapısının kompakt ve yoğun topluluk halinde ve her topluluğun birbiriyle ilk olarak Rosenberg ve diğerlerinin 1982'de bahsettiği su kanalları ile bağlantılı olduğu belirgin şekilde görülmektedir. RuCS91 ile muamele edilmiş bakteri biyofilm oluşumunda gözle görülür derecede bir azalma gözlenirken, özellikle biyofilm topluluklarının bozulduğu ve topluluklar arasındaki su kanallarında kopmalar ve sayılarında ciddi azalmalar dikkat çekmiştir. Canlı hücre (parlak) sayısındaki azalış ve ölü hücre (mat) sayısındaki artış, kontrole göre belirgin derecededir (Şekil 11). Floresan mikroskop analiz sonuçları, SEM ve ışık mikroskop analiz sonuçlarıyla kıyaslandığında birbirini doğrular nitelikte olup, Ru CS91'in bakteriyel biyofilm oluşumunu önlediğinin somut bir kanıtıdır.



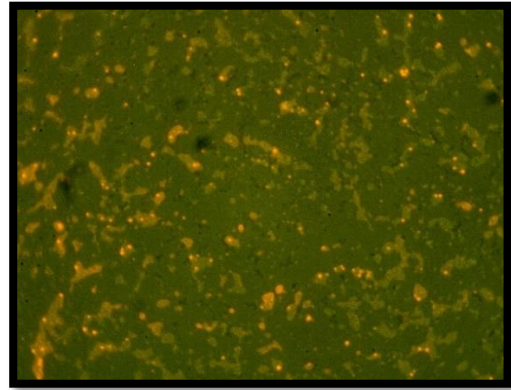
A



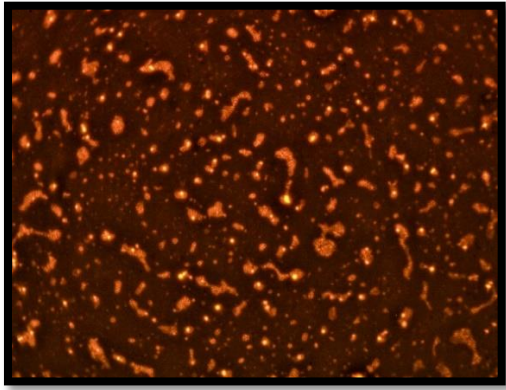
B



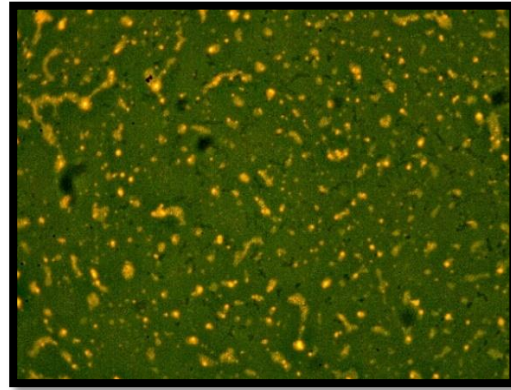
C



D



E



F

Şekil 11: *S. aureus* bakterisinin biyofilm yapısının floresan mikroskop görüntüsü. Örnekler kırmızı ve yeşil filtre ile incelenmiştir. Ru CS91 ile muamele edilmemiş kontrol grubu (A ve B), 0,50 µg/mL (C ve D) ve 1,5 µg/mL Ru CS91 (E ve F) ile muamele edilmiş bakteriyel biyofilm yapısı.

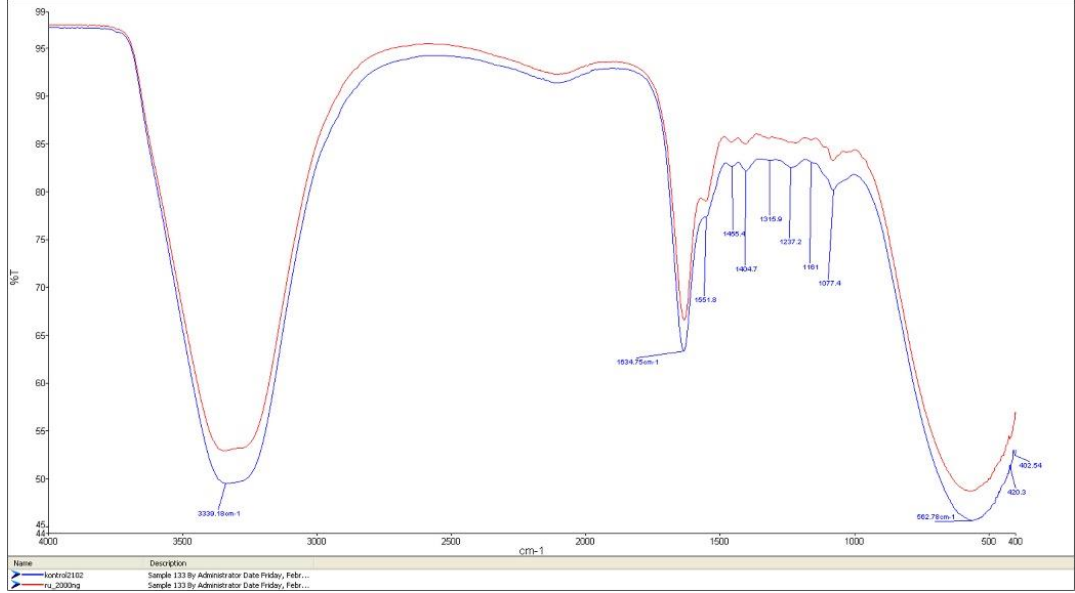
4.6 FT-IR Görüntüleme Sonuçları

FT-IR görüntüleme, bakteri, hücre, membran veya kanserli doku gibi biyosistemleri analiz etmek için kullanılmıştır (Ngo-Thi ve diğ. 2003, Yang ve diğ. 1995). Bu teknik, nükleik asit, lipit, ve protein analizini içeren çeşitli uygulamalar için rekabetçidir (Goormaghtigh ve diğ. 1999, Kazarian ve Chan 2006). Biyomoleküllere ait farklı spektrum görünümleri, germe, şişme, farklı frekanslardaki pikler, yoğunluk veya bant genişlikleri, moleküllerdeki fonksiyonel grupların tanımlanmasını sağlamaktadır (Beekes ve diğ. 2007). Özellikle, proteinlerin ikincil yapısını karakterize etmek için uzun süredir kullanılan bu teknik, daha sonra karbohidratların analizinde de yaygın olarak kullanılmıştır (Mantsch 2001; Beekes ve diğ. 2007).

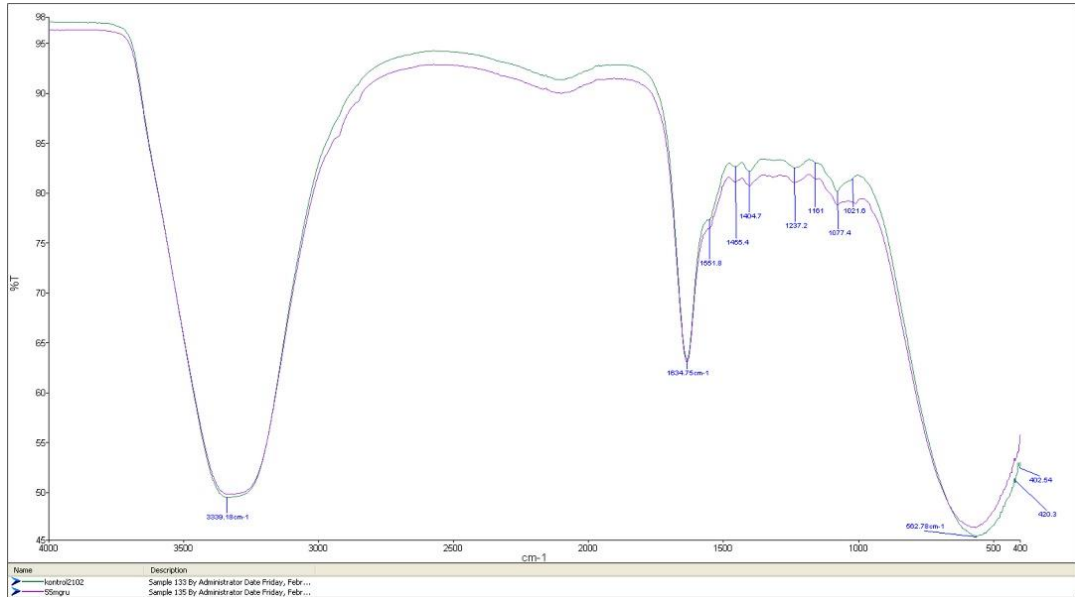
FT-IR görüntüleme ile kültür edilemeyen bakterilerin belirlenmesinde kullanım potansiyelleri ile ilgili yapılan çalışmalar da mevcuttur (Wehrli ve diğ. 2014, Huleihel ve diğ. 2009). Örneğin, süt ve gıda patojeni *S. aureus* teşhisinde hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Lamprell ve diğ. 2006; Hegazi ve diğ. 2019). 3400-3440 cm^{-1} aralığında N-H titreşimi meydana gelmektedir. Bir peptidin amino grubu hidrojen bağı içerdiğinde bu titreşim yaklaşık 3300 cm^{-1} gibi daha düşük frekanslara doğru kayar (Sionkowska ve diğ. 2004, Kochan ve diğ. 2020). Davis ve Mauer (2010) 'e göre, 1500-1200 cm^{-1} arasında bulunan pikler, hem yağ asidi hem de proteinlere karakteristik iken, 1200-900 cm^{-1} arasında bulunan pikler hücre duvarındaki karbonhidratları işaret etmektedir. Şekil 12' de Ru CS91 ile muamele edilmiş *Staphylococcus aureus* ve kontrol grubu FT-IR spektrumu görülmektedir.

Genel olarak hücre membranında pik kayması ya da spektrum bantlarında gerilme gözlenmiştir. 1500-900 cm^{-1} arasındaki titreşimler, aslında hücre duvarındaki protein ve karbonhidratlardaki gruplarda bazı değişiklikleri göstermektedir. Metal bazlı bileşiklerle muamele edilmiş hücre yüzeylerinde olası değişikliklerin gösterildiği FT-IR analizi literatür bilgilerinde rastlanılmamıştır. Ancak farklı doğal ürünlerle muamele edilen bakteri yüzeyleri incelenmiş ve FT-IR görünümünde bazı bölgelerde şiddetlenme veya kaymalar rapor edilmiştir. Örneğin, *H. rhamnoides* ve *L. leaves* bitki özütlerinin *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Alternaria alternata* ve *Aspergillus parasiticus* ve *Penicillium digitatum* üzerine antimikrobiyal aktivitesi test edilmiş ve bu etki FT-IR analizi ile de incelenmiştir. Bakteri hücre duvarındaki OH,

C-H, C=C, C=O, C=O ve aromatik amid varlığı FT-IR ile gösterilmiştir (Ahmad ve Ali 2013). Benzer şekilde bir başka çalışmada β -Lapachon ve Lapachol Oxime'nin *S. aureus* ATCC 25923'e antibakteriyal etkisinin, hücre membran lipid deformasyonu şeklinde gerçekleştiği FT-IR analizi ile kanıtlanmıştır. (Fernandes ve diğ. 2017).



A



B

Şekil 12: RuCS91 ile muamele edilen *S. aureus* ATCC 29213'ün FT-IR analizi (A: 2 μ g/ml ve B: 5.5 μ g/ml)

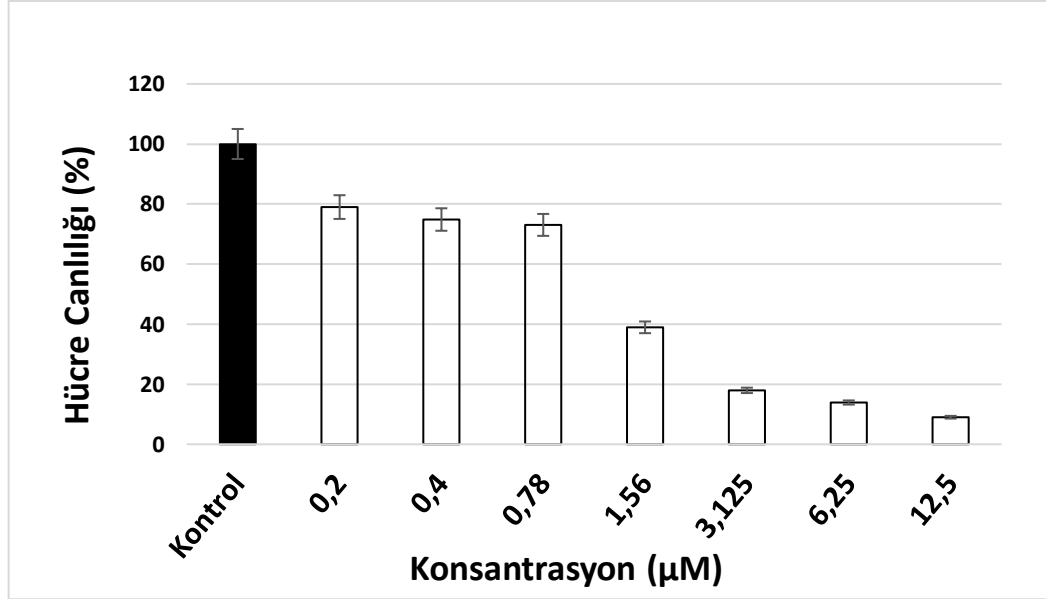
S. aureus' un 2 µg/ml Ru CS91 ile muameleden önceki ve sonraki FT-IR spektrum analizi, hücre yüzeyindeki piklerde şiddetlenme veya kaymalara neden olmadığı ve pratikte kontrol grubu ile üst üste bindirilebilir olduğu görülmektedir. Buna karşılık, 5 µg/ml Ru CS91 muamale sonrasında özellikle protein bantlarının yoğunluğunda bir azalma gözlenmiştir (Şekil 12 A ve B). Bu da *S. aureus* proteinlerinin ikincil yapısında bir değişiklik veya muhtemelen denatürasyon olarak yorumlanmıştır. Literatür taramalarımızdan elde ettiğimiz verilere göre, metal bazlı bileşiklerle muamale edilen bakteri hücre yüzeylerindeki değişikliklerin gösterildiği detaylı çalışmalar olmadığı için, rutenyum sonrasında hangi fonksiyonel gruplarda bozulmalar olduğu anlaşılamamıştır. Buna ek olarak, FTIR analizimiz istenilen kalitede elde edilmemiştir. Bu sonucun, FTIR görüntülemeye yetersiz yanal çözünürlük, zayıf hassasiyet veya uygun olmayan veri işlemlerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. İlerde daha detaylı çalışmalarla analizin tekrar edilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir.

4.7 Ru CS91' in Sitotoksosite ve Antikanser Etkisi

DNA'ya bağlanma özelliğine sahip küçük moleküllerin sentezi özellikle yeni terapötik reaktiflerin ve DNA moleküler problemlerinin geliştirilmesinde çok önemlidir. Biyotıp ve antikanser ilaç arayışında, son yıllarda DNA'ya bağlanan geçiş metali kompleksleri üzerinde yoğun çalışmalar mevcuttur (Metcalf ve Thomas 2003, Foxon ve diğ. 2007, Zeglis ve diğ. 2007). Bu çerçevede tümörler için seçici özelliğinden dolayı rutenyum kompleksleri de aktif olarak çalışılmaktadır (Ang ve diğ. 2006, Scolaro ve diğ. 2005, Deepika ve diğ. 2016).

Yüksek sitotoksosite ve güçlü DNA'ya bağlanma özelliklerinden dolayı umut verici antitümör aktivitesi gösteren farklı ligand tiplerine sahip Ru (II) komplekslerinin araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla çalışmamızda bipyridin ligandı içeren Ru CS91'in meme hücre hattı üzerine sitotoksosite ve antikanser etkisi 0,2-12,5 µM arasında test edilmiştir (Şekil 13). Sitotoksik aktivitede doza bağlı artış olmuştur. Diğer bir deyişle, yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında belirgin derecede azalma olmuştur. 1,22 µM rutenyum bileşiği, kanser hücresinin %50'sini öldürmüştür (EC50: 1,22 µM). Benzer bir çalışmada Ru(II) polipiridil komplekslerin (L = phen (1), bpy (2) ve dmb (3) çeşitli kanser hücre hatları sitotoksik etkisi incelenmiş ve 32.50

μM rutenyum 1 kompleksi HeLa kanser hücrelerinin %50'sini öldürmüştür. Kanser hücre tipine ve kompleksin yapısına göre EC50 farklılık göstermiştir. Çalışmada rutenyum komplekslerin apoptozisi teşvik ettiği de bildirilmiştir (Mallepally ve diğ. 2017). Bu makalede kullanılan Ru(II) polipiridil kompleksinin sitotoksik dozu ile RuCS91'in sitotoksik dozu kıyaslandığında, bipiridin ligandı içeren RuCS91'in daha etkili olduğu söylenebilir. Bu farklılık kanser hücre tipinden kaynaklı olabileceği gibi, kompleksin yapısıyla ilişkili olduğu daha güçlü bir varsayımdır.



Şekil 13:MDA hücreleri üzerine Ru CS91' in sitotoksik etkisi

Ru CS91'in kanser ile ilişkili genler üzerinde etkisinin belirlenmesi için Tablo 4'te verilen primer dizileri kullanılmıştır. Primer diziler NCBI/Primer-BLAST veri tabanından doğrulandıktan sonra Sentegen Biyoteknoloji (Ankara) firmasına (100 nM) sentezlettirilmiştir. Gerçek zamanlı PZR (RT-PCR) çalışmaları için $+4^{\circ}\text{C}$ ' de stoklanmıştır. cDNA karışımı, RT-PCR koşulları ve reaksiyon koşulları Tablo 5-6' de verilmiştir.

Tablo 4:Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.

Seçilmiş Genler	İleri Primer (<i>f</i>) (5'→3') Geri Primer (<i>r</i>) (5'→3')	Yapışma sıcaklığı
Siklin D2 (Siklin D2)	CGCCCCACCCCTCCAG	63 ⁰ C
	CCGCCCAGACCCTCAGACT	
CDK4 (Sikline bağımlı kinaz 4)	GCTAGCAGACTTTGGACTAGCCAG	60 ⁰ C
	AGCTCGGTACCACAGGGTCA	
CDKN1A (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1)	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	52 ⁰ C
	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC	
P53 (Tümör protein p53)	ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT	61 ⁰ C
	GTGGTACAGTCAGAGCCAACC	
BAX (BCL-2 ilişkili X proteini)	AGAGGATGATTGCCGCCGT	61 ⁰ C
	CAACCACCCTGGTCTTGGATC	
BCL2 (B-hücreli lenfoma 2)	TGCACCTGACGCCCTTCAC	62 ⁰ C
	AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG	
CASP3 (Kaspaz 3)	GCA GCAAACCTC AGG GAA AC	56 ⁰ C
	GCT GGA ATT ACC GCG GCT	
B-Aktin (Beta aktin)	TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG	62 ⁰ C

Tablo 5: cDNA sentez karışımları ve protokolü

Bileşenler	Hacim	Son konsantrasyon
Total RNA	2,5µg/ml
Oligo (dT) Primer	1µl	0.5 µM
dNTP Karışımı (herbiri 10mM)	1µl	500µM
RNAaz içermeyen su	14.5µl
Hazırlanan karışım 65°C'de 5 dakika bekletildikten sonra buza alınır.		
5X RT Tamponu	4µl	1X
Ribonükleaz İnhibitörü (40U/µl)	0.5µl	20U/rxn
Reverse Transkriptaz Enzimi (200U/µl)	1µl	200U/rxn
Karışım cDNA sentezi için 50°C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 85°C'de 5 dakika bekletilir.		

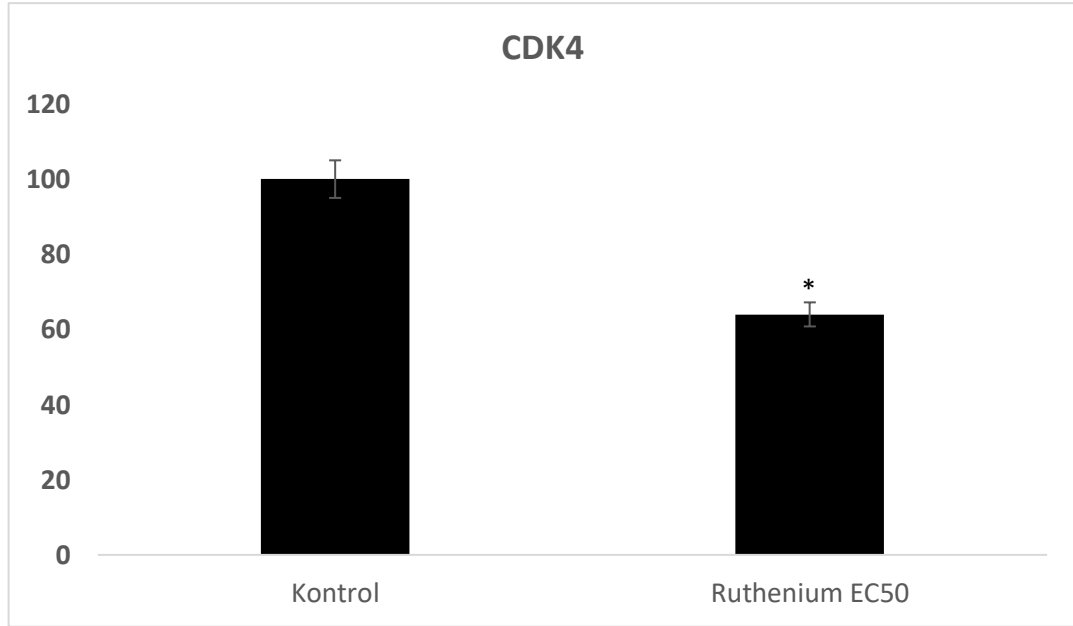
Tablo 6: Gerçek zamanlı-PZR reaksiyon ortamı

Bileşenler	Hacim	Son konsantrasyon
KiloGreen 2X qPZR Master Mix	10µL	1X
Şablon DNA	≤100 ng/reaksiyon
İleri Primer	300 Nm
Geri Primer	300 Nm
RNAaz içermeyen su	20 µL` ye tamamlanır	-
Total Hacim	20 µL	-

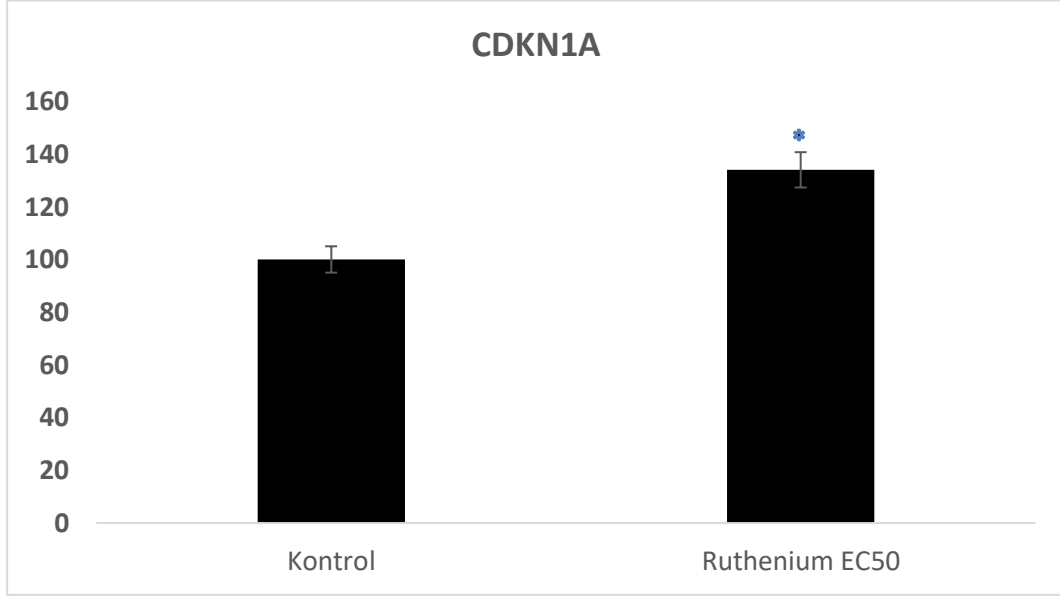
Tablo 7:Polimeraz zincir reaksiyon koşulları

Ön denetürasyon			PZR döngüsü x40				Erime Eğrisi Analizi		
	95°C		95°C			95°C			
	10:00		00:15			00:15			
A			b	c	72°C	e	f		
				60°C		00:30	60°C		
			00:30	d			01:00		

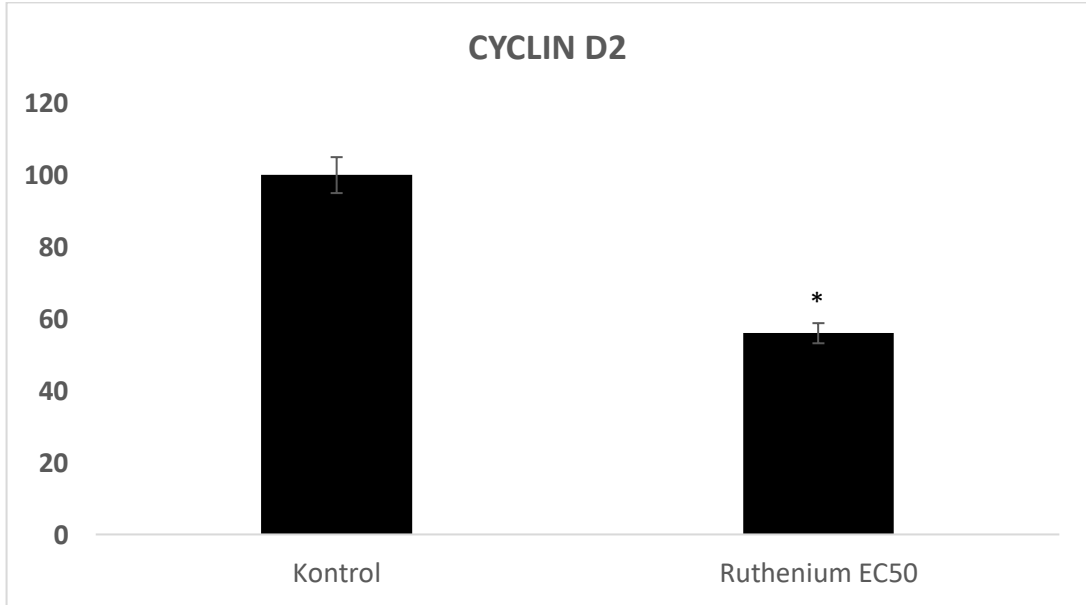
MDA-MB-231 hücre hattı Ru CS91 ile muamele edildikten sonra ilgili genlerdeki mRNA seviyesinde değişimler incelenerek antikanser etkisi doğrulanmıştır. Hücre döngüsünü düzenleyici olan CDK4, CDKN1A ve Cyclin D2 genlerinin mRNA seviyesinde değişimleri sırasıyla şekil 14, şekil 15, şekil 16' da verilmiştir.



Şekil 14:Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında CDK4 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-ACTIN ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0,05).



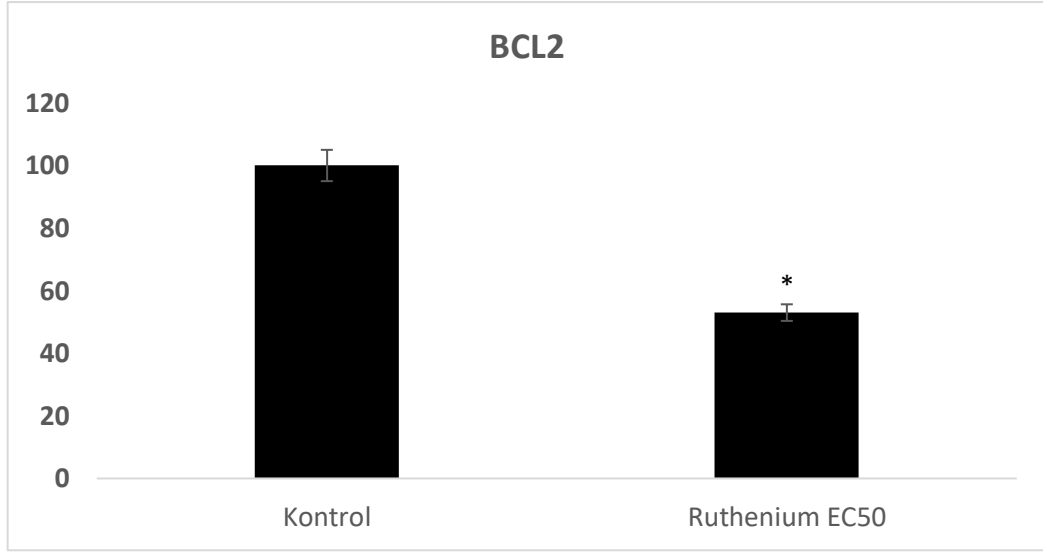
Şekil 15: Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun insan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında CDKN1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-ACTIN ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).



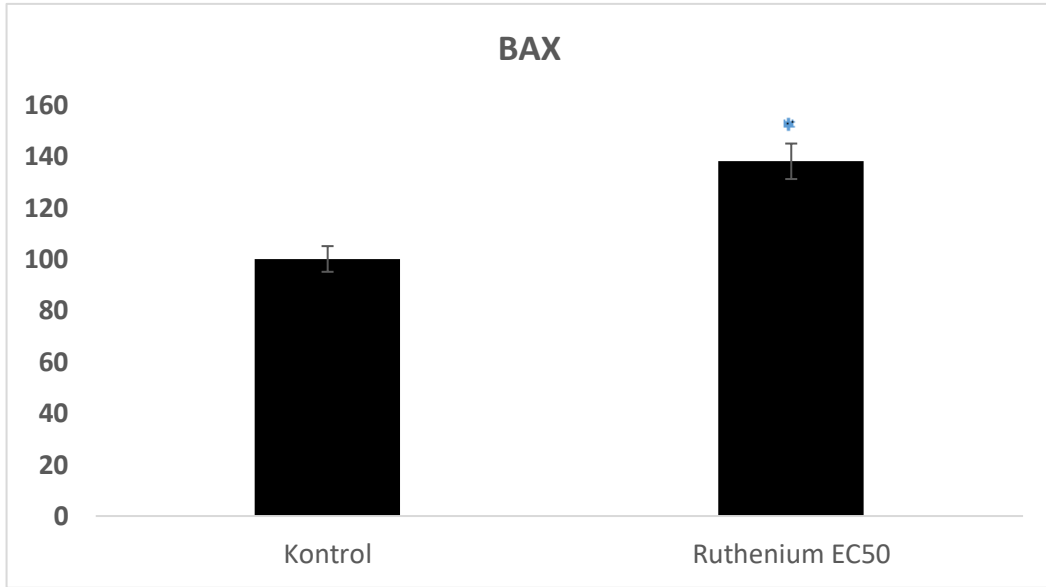
Şekil 16: Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında CYCLIN D2 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-ACTIN ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

Hücre döngüsü, CDK-siklin bağımlı kinazlar ve CDKI-siklin bağımlı kinaz inhibitör proteinleri tarafından kontrol edilir. Siklin-CDK ile inhibitör proteinler bağlanırlar ve bu oluşan kompleks moleküller hüce döngüsünün devamlılığını sağlar. Ancak bu proteinlerin inhibisyonu veya anlamsız artışı hücre döngüsünün bozulmasına neden olur (Chulu ve Liu 2009). RuCS91 meme kanser hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK4 ve CYCLIN D2 genleriyle ilişkili proteinlerin sentezinde % 40 oranında bir baskılanmaya sebep olurken (Şekil 14 ve Şekil 16) CDKN1A geninde kontrole göre 1,4x kat indüklenmeye sebep olmuştur (Şekil 15). İlgili genlerdeki baskılanma ya da teşvik, RuCS91'in hücre döngüsünde bozulmalara sebep olduğu, meme kanser hücre hattında antikanser etki gösterdiği ve apoptoza yol açtığını göstermiştir. Bilindiği gibi, anti-onkogen veya tümör baskılayıcı genler hücrede birçok olayları düzenlemektedir. Bu baskılayıcı genlerin en önemlisi olan P53 geni, kontrolsüz hücre poliferasyonunu engeller. Yaşamsal döngüde P53 geninde bir mutasyon olursa ve buna bağlı gerçekleşen fonksiyon kaybı hücrelerde tümörleşmeye neden olur (Vousden ve Lane 2007; Machado-Silva ve diğ. 2010). DNA'da hasar varsa P53 geninin ekspresyonunda artış olur ve P21 proteini sentezlenir. DNA'daki hasar tamir edilene kadar hücre döngüsü durur. CDKI ailesinin inhibisyon proteini olan P21'in CDK2 ile beraber oluşturduğu kompleks, döngünün devam etmesi için siklin/CDK kompleksini inhibe eder ve hücre diğer faza geçemez. Oluşan stres ile DNA tamirinde görev alan yardımcı proteinlerin ekspresyonunda artış olur ve P53, hücreyi apoptoza sürükler (Rother ve diğ. 2007; Chulu ve Liu 2009).

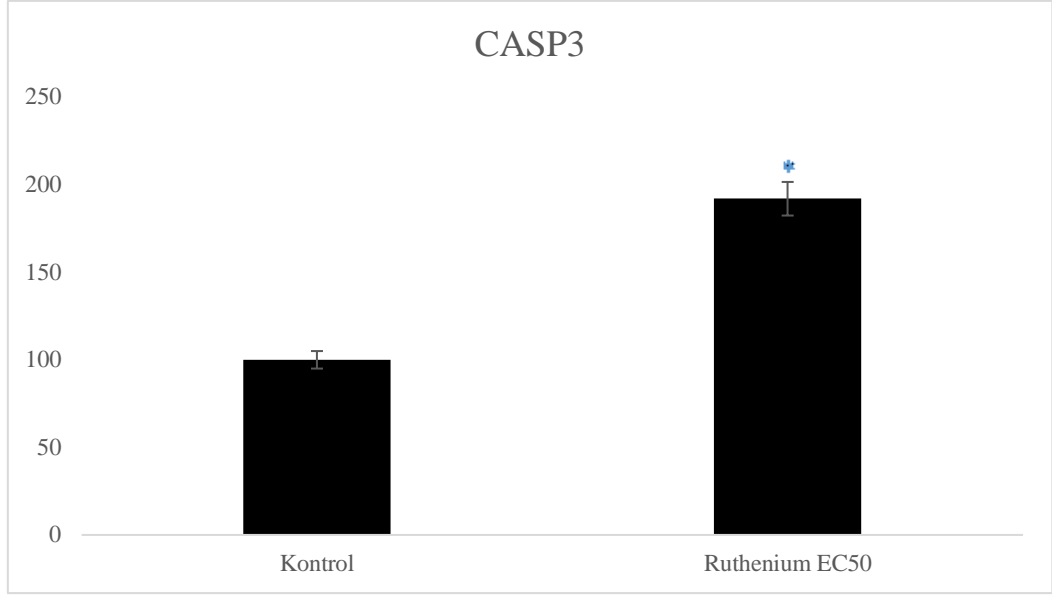
RuCS91, BCL2 geniyle ilişkili proteinlerin sentezinde % 40 oranında baskılanmaya neden olurken (Şekil 17), BAX, Casp3 ve P53 genleriyle ilişkili proteinlerin sentezi ise kontrole göre BAX: 1.4x , Casp3: 2x , P53: 1.6x katına çıkmıştır (Şekil 18-20). Bilindiği üzere DNA'da bir hasar varsa P53 geni indüklenir ve hücredeki hasar tamir edilene dek hücre döngüsü durur. Dolayısıyla RuCS91'in apoptoza yol açtığı görülmektedir.



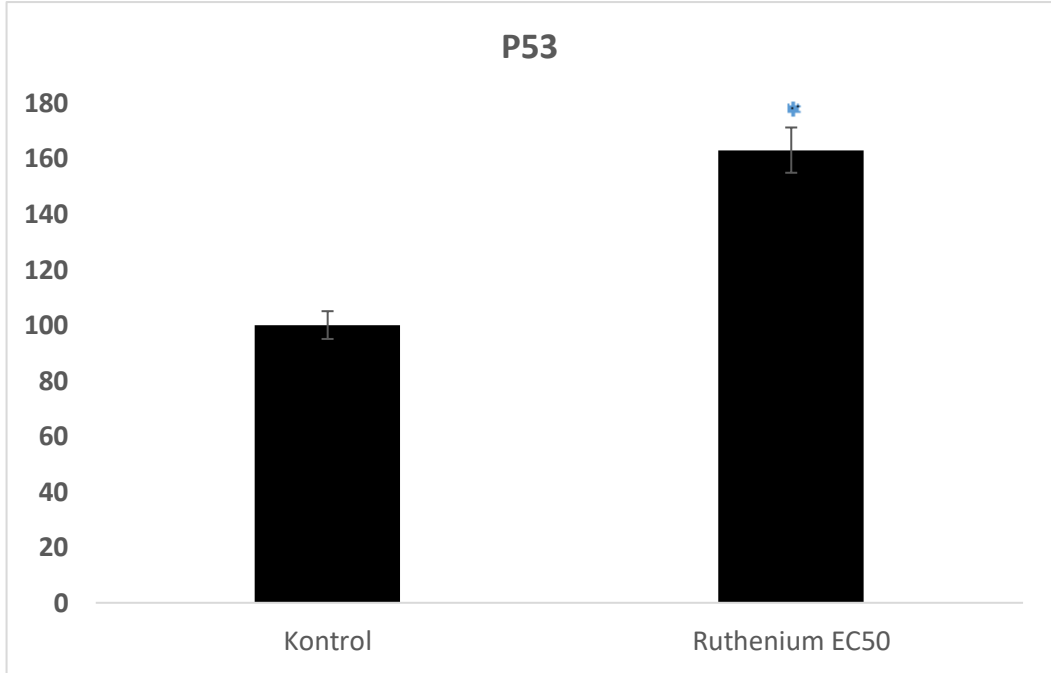
Şekil 17:Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında BCL2 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-ACTIN ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).



Şekil 18:Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında BAX mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-ACTIN ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

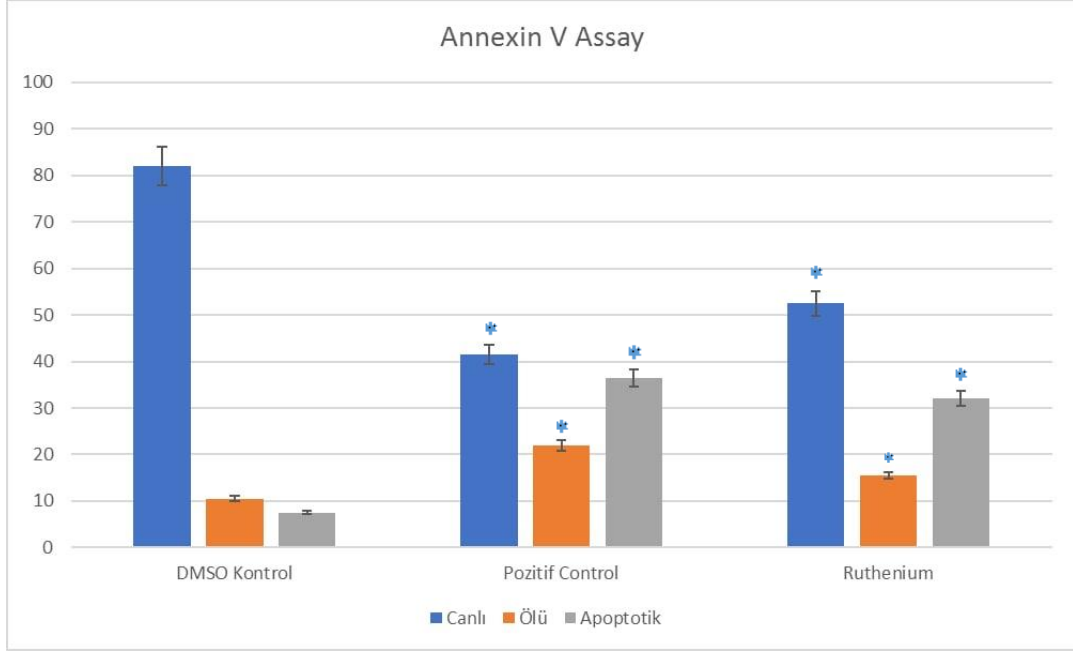


Şekil 19: Ru CS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında CASP3 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-ACTIN ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).



Şekil 20: RuCS91'in EC50 konsantrasyonunun İnsan meme kanseri hücre (MDA-MB231) hattında P53 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-ACTIN ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

RuPOP bileşiğinin kaspaz -3/-8/-9' un aktivasyonu yolu ile apoptozu etkili bir şekilde tetiklediği ve 2µM kadar düşük konsantrasyonlarda MDA-MB-213 hücrelerinde RAP'ı parçaladığı bildirilmiştir (Cao ve diğ. 2015). Diğer taraftan 40µM Λ-RM0627'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde çok az apoptoz indükleyici etki sergilediği, apoptozun geç aşamasında sadece %6,2 ve erken evresinde ise % 21,8 oranında hücre olduğu rapor edilmiştir (Hu ve diğ. 2016). Popolin ve diğ. 2017 yılında 4 farklı rutenyum kompleksi sentezleyerek MDA-MB231 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik, hücre yapışması, yayılması, istilası ve apoptoz indüksiyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaya göre, [Ru (CH₃CO₂) (dppb) (bipy)] PF6 [dppb = 1,4-bis (difenilfosfino) butan bipy = 2,2'- bipyridin bileşiği hücre proliferasyonunu inhibe eden en düşük IC₅₀'ye (31,16 ± 0,04 µM) sahiptir ve meme kanseri hücreleri üzerine apoptotik etki konsantrasyona bağlıdır. Kanser hücrelerinin 74.4'ü ve tümör dışı hücrelerin %14,9'ü 20µM rutenyum ile apoptoza uğramıştır. Ayrıca araştırmacılar BAX, Caspase -3 pro-apoptotik geni ekspresyonun arttığını ancak Bcl-2 antiapoptotik geninin ekspresyonunun etkilenmediğini de rapor etmişlerdir. Benzer bir diğer çalışmada ise, aren rutenyum (II) kompleksinin MDA-MB-231 hücreleri üzerine IC₅₀ değeri 20.8 µM olarak bildirilmiştir (Wu ve diğ. 2014). Literatür bilgileriyle kıyaslandığında RuCS91 (EC₅₀: 1,22 µM) çok düşük konsantrasyonlarda yüksek antikanser ve apoptotik etkisi ile dikkat çekicidir. Ru CS91 ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattındaki canlı, ölü ve apoptoza giren hücrelerin yüzdesi Şekil 21'de görülmektedir. Çalışmada kullanılan DMSO negatif kontrol ve hücreler üzerinde apoptotik etkisi olduğu biline H₂O₂ (hidrojen peroksit) ise pozitif kontroldür. Sonuçlar değerlendirildiğinde MDA-MB-231 hücreleri üzerinde hidrojen peroksitin yaklaşık olarak % 38 oranında apoptotik etkisi olurken, RuCS91'in yaklaşık olarak %32 oranında apoptotik etkisi olmuştur.



Şekil 21: Ru CS91'in MDA-MB-231 hücre hattında canlı, ölü ve apoptotik etkisi (%). *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bipiridin ligandı içeren rutenyum (Ru CS91) bileşiğinin antikanser ve antibiyofilm aktivitesi karakterize edilmiştir. Deney sonuçlarına göre, bipiridin ligandı içeren rutenyum bileşiği *S. aureus* biyofilm oluşumunu etkilemiştir. Ayrıca bakterilerde hareketliliği önleme mekanizmasına da sahip olduğu görülmüştür. Antibiyofilm aktivitesi floresan mikroskop analizi ile de doğrulanmıştır. Kristal viyole emilim testine göre, Ru CS91'in bakteri üzerindeki inhibisyon etkisinin bakteri hücre zarının geçirgenliğini bozarak göstermektedir. Dolayısıyla, *S. aureus* bakterisi ile etkileşimde olduğu ve bu etkileşimin esas olarak bakteri hücrelerinin dış bölgesini içerdiği söylenebilir. Çünkü rutenyumun hücre yüzey morfolojisinde bozulmalara yol açtığı bu etki SEM ve FTIR analizleri ile de tespit edilmiştir. Ayrıca Ru CS91' in sitotoksik ve apoptoz etkisi olduğu ve muhtemelen canlı hücrelerde DNA hasarına yol açtığı ve güçlü antikanser etkili bileşik olduğu anlaşılmıştır. Üstelik Ru CS91'in çok düşük konsantrasyonlarda meme kanser hücre hattında BAX (1.4x) ve Casps3 (2x) genleriyle ilişkili genlerin sentezinde artışa neden olarak MDA-MB231 hücrelerini %32 oranında apoptoza götürdüğü de gösterilmiştir. Sonuç olarak, Ru CS91'in güçlü antibiyofilm ve antikanser etkisini dikkate alarak, bu çalışma ile elde edilen sonuçlar gelecekte önemli antibiyofilm etkili komplekslerin geliştirilmesi için bilgi sağlayabilir. Konfokal mikroskop analizi ile bakteriyel biyofilmin yapısı ve kalınlığının daha detaylı incelenerek rutenyumun etkisinin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca biyofilm oluşumundan sorumlu genlerin inhibisyonu başta olmak üzere ek deneylerle RuCS91'in literatürde mevcut diğer rutenyum komplekslerinden üstünlüğünün kanıtlanması gerekmektedir. MDA-MB231 hücreleri ve diğer kanser hücrelerine karşı anti-kanser etkisinin belirlenerek, kanser tedavisinde sisplatin kemoterapisi alan hastalarda meydana gelen yan etkilerin azaltılması ve kazanılmış dirence karşı yeni ilaç geliştirme çalışmalarına alternatif olarak RuCS91'in geliştirilme potansiyeli olduğu düşünülmüştür. Son olarak, RU CS91' in in vivo kanser modellerinde etkinliğinin aydınlatılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

Ahmad, B., Ali, J., “Physiochemical, minerals, phytochemical contents, antimicrobial activities evaluation and fourier transform infrared (FTIR) analysis of Hippophae rhamnoides L. leaves extracts.”, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(7), 375–388, (2013).

Andrade, A. L., de Vasconcelos, A. M., de Sousa Arruda, F. V., do Nascimento Neto, L. G., da Silveira Carvalho, J. M., Gondim, A. C. S., de França Lopes, L. G., Sousa, E. H. S., Teixeira, E. H., “Antimicrobial activity and antibiotic synergy of a biphosphinic ruthenium complex against clinically relevant bacteria”, *Biofouling*, (2020). DOI: 10.1080/08927014.2020.1771317

Ang, W.H., Dyson P.J., “Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy”, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2006 (20), 4003–4018, (2006).

Bai, J. R., Zhong, K., Wu, Y. P., Elena, G., Gao, H., “Antibiofilm activity of shikimic acid against *Staphylococcus aureus*”, *Food Control*, 95, 327–333, (2019).

Baker, M. J., Hussain, S. R., Lovergne, L., Untereiner, V., Hughes, C., Lukaszewski, R. A., Sockalingum, G. D. “Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review”. *Chemical Society Reviews*, 45(7), 1803–1818,(2016).

Beekes, M., Lasch, P., Naumann, D., “Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research.”, *Veterinary Microbiology*, 123(4), 305–319, (2007).

Bolhuis A., Hand L., Marshall J.E., Richards A.D., Rodger A., Wright J.A., “Antimicrobial activity of ruthenium-based intercalators”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42 (4), 313–317, (2011).

Böttcher , T., Kolodkin-Gal, I., Kolter, R., Losick, R., Clardy, J., “Synthesis and activity of biomimetic biofilm disruptors.”, *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (8), 2927–2930, (2013).

Brabec, V., Novakova, O., “DNA Binding Mode of Ruthenium Complexes and Relationship to Tumor Cell Toxicity”, *Drug Resistance Updates*, 9 (3), 111–122, (2006).

Cao W., Zheng W., Chen T., “Ruthenium polypyridyl complex inhibits growth and metastasis of breast cancer cells by suppressing FAK signaling with enhancement of TRAIL-induced apoptosis”, *Sci Rep.*, 5:9157,(2015).

Chen, H., Parkinson, J. A., Morris R. E., Sadler P. J., “Highly Selective Binding of Organometallic Ruthenium Ethylenediamine Complexes to Nucleic Acids: Novel Recognition Mechanisms”, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (1), 173-186, (2003).

Chen, F., Moat, J., McFeely, D., Clarkson, G., Hands-Portman, I.J., Furner-Pardoe, J.P., Harrison, F., Dowson, C.G., Sadler, P.J., “Biguanide Iridium(III) Complexes with Potent Antimicrobial Activity”, *J. Med. Chem.*, 61 (16), 7330–7344, (2018).

Chulu, J. L. C., Liu, H. J., “Recent Patents on Cell Cycle Regulatory Proteins”, *Recent Patents on Biotechnology*, 3 (1), 1-9, (2009).

Cho, K., Wang, X., Nie, S., Shin, M. D., Chen, Z., “Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer”, *Clinical Cancer Research*, 14 (5), 1310-1316, (2008).

Chvalova, K., Brabec, V., Kasparikova, J., “Mechanism of the formation of DNA–protein cross-links by antitumor cisplatin”, *Nucleic Acids Research*, 35 (6), 1812–1821, (2007).

Daikh, A., Segueni, N., Doğan, N. M., Arslan, S., Mutlu, D., Kivrak, I., Akkal, S., Rhouati, S., “Comparative study of antibiofilm, cytotoxic activity and chemical composition of Algerian propolis”, *Journal of Apicultural Research*, 59 (2), 160- 169, (2020).

Davis, R., Mauer, L.J., “Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria.” *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 2, 1582-1594, (2010).

Deepika, N., Shobha, Devi, C.S., Kumar, Y.P., Reddy, K.L., Reddy, P.V., Kumar, D.A., Singh, S.S., Satyanarayana, S., “DNA-binding, cytotoxicity, cellular uptake, apoptosis and photocleavage studies of Ru(II) complexes.” , *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 160, 142–153, (2016).

Deubel, D.V., Lau, J.K.C., “In silico evolution of substrate selectivity: comparison of organometallic ruthenium complexes with the anticancer drug cisplatin”, *Chemical Communications*, 23, 2451–2453, (2006).

Devi, C.S., Kumar, D.A., Singh, S.S., Gabra, N., Deepika, N., Kumar, Y.P., Satyanarayana S., “Synthesis, interaction with DNA, cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptotic inducing properties of ruthenium(II) molecular “light switch” complexes”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 410-421, (2013).

De Lima, A. P., Pereira, F. de C., Vilanova-Costa, C. A. S. T., Ribeiro, A. de S. B. B., Pavanin, L. A., Dos Santos, W. B., Silveira-Lacerda, E. de P. “The ruthenium complex cis-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 cells.”, *Journal of Biosciences* ,35(3), 371–378,(2010).

Diem, M., Boydston-White, S., “Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject”, *Appl. Spectrosc.*, 53, 148-161, (1999).

Donlan, R.M. “Biofilms: microbial life on surfaces”, *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), 881–890, (2002).

Du, W., Wang, Q., Wang, L., Yu, Z., “Ruthenium Complex Catalysts Supported by a Bis(trifluoromethyl)pyrazolyl–Pyridyl-Based NNN Ligand for Transfer Hydrogenation of Ketones”, *Organometallics*, 33(4), 974-982, (2014).

Dwyer, F. P., Gyarfás, E. C., Rogers, W. P., Koch, J. H., “Biological Activity of Complex Ions”, *Nature Research Journals*, 170, 190-191, (1952).

Dwyer, F. P. Mellor, D.P., *Chelating Agents and Metal Chelates*, 530, 63-16969, New York: Academic Press Inc. (London) LTD., (1964).

Feng, J., Yee, R., Zhang, S., Tian, L., Shi, W., Zhang, W. H, Zhang, Y., “A Rapid Growth-Independent Antibiotic Resistance Detection Test by SYBR Green/Propidium Iodide Viability Assay”, *Frontiers in Medicine*, 5, 1-11, (2018).

Fernandes, A, W. C., dos A. Santos, V. L., Araujo, C. R. M., da Cruz Araujo. E. C., de Oliveira, H. P., da Costa, M. M., “Antimicrobial activity and FTIR characterization of lapachol derivatives against *Staphylococcus aureus*.”, *African Journal of Microbiology Research*, 11(22), 915–919, (2017).

Fey P.D., Olson E.M., “Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*”, *Future Microbiology*, 5(6), 917-933, (2010).

Garry, N.D., Kupferberg, L.L. and Graf, L.H. “Characterization of intracellular, glucosidic polysaccharide produced by *Brucella suis*.”, *J. Bacteriol.*, 76, 359-364, (1959).

Gall T.L., Lemercier G., Chevreux S., Tecking K.S., Ravel J., Thetiot F., Jonas U., Schönherr H., “Ruthenium (II) Polypyridyl Complexes Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure-Activity Study on Clinical Bacterial Strains”, *ChemMedChem*, 13(20), 2229-2239, (2018).

Gill, M. R., Thomas, J. A., “Ruthenium(II) polypyridyl complexes and DNA- From structural probes to cellular imaging and therapeutics”, *Chemical Society Reviews*, 41(8), 3179–3192, (2012).

Gill, M. R., Harun, S. N., Halter, S., Boghozian, R. A., Ramadan, K., Ahmad H., Vallis, K. A. “A ruthenium polypyridyl intercalator stalls DNA replication forks, radiosensitizes human cancer cells and is enhanced by Chk1 inhibition”, *Sci. Rep.*, 6(1), 31973. (2016).

Goulden, J.D.S., Sharpe, M.E., “The infrared absorption spectra of lactobacilli”, *J.Gen.Microbiol.*, 19: 76-86 (1958).

Gómez-Gómez, J. M., Manfredi, C., Alonso, J.C., Blázquez, J., “ A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in Escherichia coli K-12”, *BMC Biology*, 5(1):14, (2007).

Greensteet, J.E., Norris, K.P., “The existence of differences between the infrared absorption spectra of bacteria”, *Spectrochim. Acta*, 9: 177-182 (1957).

Green, D. R., and Reed, J. C., “ Mitochondria and Apoptosis”, *Science*, 281(5381), 1309-1312, (1998).

Hegazi, A. G., El-Houssiny, A. S., Fouad, E. A., “Egyptian propolis 14: Potential antibacterial activity of propolis-encapsulated alginate nanoparticles against different pathogenic bacteria strains”, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, 10, 1-8, (2019).

Helm, D., Naumann D., “Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy”, *FEMS Microbiology Letters*, 126(1), 75-79, (1995).

Hu, S., Li, X., Xu, R., Ye, L., Kong, H., Zeng, X., Wang, H., Xie, W., “The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells”, “*Acta Biochimica et Biophysica Sinica*”, 48, 6, 528–535, (2016).

Huleihel, M., Pavlov, V., Erukhimovitch, V., “The use of FTIR microscopy for the evaluation of anti-bacterial agents activity.” ,*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 17–23, (2009).

Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., “Antibiotic resistance of bacterial biofilms”, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35, 322–332, (2010).

Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R.A., Miller, S. I., “Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation”, “ *Nature*” 436, 1171–1175, (2005).

Jackson, M., Mantsch, H., “Biomedical infrared spectroscopy”, In: H.H. Mantsch and D. Chapman (eds.), *Infrared spectroscopy of biomolecules*, Wiley-Liss, NY (1996).

Jackson, M., Sowa, M.G., “Infrared spectroscopy: a new frontier in medicine”, *Biophys. Chem.*, 68,109-125, (1997).

Kazarian, S.G. and Chan, K.L. ‘Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples’, *Biochim. Biophys., Acta* 1758, 858–867,(2006).

Kırmusaoğlu, S., *Microbial Biofilms - Importance and Applications*, “Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by

Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms” Croatia: Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, Chapter:10, 20, 189-209, (2016).

Kochan, K.; Lai, E.; Richardson, Z.; Nethercott, C.; Peleg, A.Y.; Heraud, P.; Wood, B.R. ‘Vibrational Spectroscopy as a Sensitive Probe for the Chemistry of Intra-Phase Bacterial Growth.’, *Sensors*, 20 (12), 3452,(2020).

Kostakioti, M, Hadjifrangiskou, M, Hultgren, SJ. “Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3 (4), p: a010306, (2013).

Kumar, K. A., Reddy, K. L., Vidhisha, S., Satyanarayana, S., “Synthesis, Characterization and DNA Binding and Photocleavage Studies of [Ru(bpy)2BDPPZ]2+, [Ru(dmb)2BDPPZ]2+ and [Ru(phen)2BDPPZ]2+ Complexes and Their Antimicrobial Activity”, *Applied Organometallic Chemistry*, 23 (10), 409–420, (2009).

Lam, P. L., Lu, G. L., Hon, K. M., Lee, K. W., Ho, C. L., Wang, X., Tang, J. C. O., Lam, K. H., Wong, R. S. M., Kok, S. H. L., Bian, Z. X., Li, H., Lee, K. K. H., Gambari, R., Chui, C. H., Wong, W. Y., “Development of Ruthenium(II) Complexes as Topical Antibiotics Against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*.”, *Dalton Transactions*, 43 (10), 3949-3957, (2014).

Lamprell, H., Mazerolles, G., Kodjo, A., Chamba, J. F., Noël, Y., Beuvier, E “Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from different species of *Staphylococcus* using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy”, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 125-129, (2006).

Leroy, S., Lebert, I., Andant, C., Talon, R., “Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus aureus*”, *International Journal of Food Microbiology*, 326, 108653, (2020).

Leung, M.C.K., Williamns, P.L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K.J., Aschner, M., Meyer, J.N., “Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology”, *Toxicology Sciences*, 106 (1), 5–28, (2008).

Levine, S. M., Wetzel, D. L.B., “Analysis of Brain Tissue by FT-IR Microspectroscopy”, *Applied Spectroscopy Reviews*, 28:4, 385-412, (1993).

Levine, S., Stevenson, H.J.R., Tabor, E.C., Bordner, R.H. and Chambers, L.A., “Glycogen of enteric bacteria.”, *J. Bacterial.*, 66, 664-670, (1953).

Li, F., Mulyan, Y., Feterl, M., Warner, J.M., Collins, J.G., Keene, F.R. “The antimicrobial activity of inert oligonuclear polypyridylruthenium(II) complexes

against pathogenic bacteria, including MRSA”, *Dalton Transactions*, 40 (18), 5032–5038, (2011).

Li, F., Grant, J. C., Keene, F. R., ‘Ruthenium Complexes as Antimicrobial Agents’, *Chem. Soc. Rev.*, 44, 2529, (2015).

Liang, R., Wei, M., Evans D. G. and Duan, X., ‘Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics’ , *Chemical Communications*, 50 (91), 14071-14081, (2014).

Lin, K., Zhou, Z.-Z., Bo, H.-B., Hao, X.-J., Wang, J.-Q., ‘Applications of Ruthenium Complex in Tumor Diagnosis and Therapy.’, *Frontiers in Pharmacology*, 9, (2018).

Machado-Silva, A., Perrier, S., Bourdon, J. C., ‘p53 family members in cancer diagnosis and treatment’, *Seminars in Cancer Biology*, 20 (1), 57-62, (2010).

Mallepally, R.R., Chintakuntla, N., Putta V.R., Nagasuryaprasad, K, Vuradi, R.K., Madhuri, P., Singh, S. S., Chitumalla, R.K., Jang, J., Penumaka, N., Sirasani, S. ‘Synthesis, Spectral Properties and DFT Calculations of new Ruthenium (II) Polypyridyl Complexes; DNA Binding Affinity and in Vitro Cytotoxicity Activity’, *Journal of Fluorescence*, 27, 1513–1530, (2017).

Mantsch, H., ‘Historical survey of infrared and Raman spectroscopy of biological materials. In: Gremlich, H. (Ed.), *Infrared and Raman spectroscopy of biological materials.*’, *Marcel Dekker*, New York, USA, pp. 1-14, (2001).

Margarita P., Quinteiro R., ‘Fourier Transform Infrared (FT-IR) Technology for the Identification of Organisms’, *Clinical Microbiology Newsletter*, (22), No.8 (2000).

Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.-P., van den Braak, N., Endtz, H. P., Naumann, D., Puppels, G., ‘Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy’, *Journal of Microbiological Methods*, 51(3), 255–271, (2002).

Mazumder, U. K., Gupta, M., Karki, S. S., Bhattacharya, S., Rathnasamy, S., Thangavel, S., ‘Synthesis, Anticancer and Antibacterial Activity of Some Novel Mononuclear Ru(II) Complexes’, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 52 (2), 178—185, (2004).

Meggers, E., Atilla-Gokcumen, G., Bregman, H., Maksimoska, J., Mulcahy, S., Pagano, N., Williams, D., ‘Exploring Chemical Space with Organometallics: Ruthenium Complexes as Protein Kinase Inhibitors.’, *Synlett*, 8, 1177–1189, (2007).

Metcalf, C., Thomas, J.A., ‘Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA’, *Chemical Society Reviews*, 32 (4), 215–224, (2003).

Moehl, T., Tsao, H. N., Wu, K. L., Hsu, H. C., Chi, Y., Ronca, E., De Angelis, F., Nazeeruddin, M. K., Grätzel, M., “High Open-Circuit Voltages: Evidence for a Sensitizer-Induced TiO₂ Conduction Band Shift in Ru(II)-Dye Sensitized Solar Cells”, *Chemistry of Materials*, 25 (22), 4497-4502, (2013).

Monro, S., Colón, K.L., Yin, H., Roque, J. III, Konda, P., Gujar, S., Thummel, R.P., Lilge, L., Cameron, C.G., McFarland, S.A., “Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433”, *Chemical Reviews*, 119 (2), 797–828, (2019).

Monte, J., Abreu, A.C., Borges, A., Simões, L.C., Simões, M., “Antimicrobial Activity of Selected Phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and Their Biofilms”, *Pathogens*, 3(2), 473-498, (2014).

Moretro, T., Hermansen, L., Holck, L.A., Sidhu, S. M., Rudi, K., Langsrud, S., “Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among Staphylococci from Food and Food Processing Environments”, *American Society for Microbiology*, 69 (9), 5648-5655, (2003).

Murdock, J. N., David L. Wetzel, D. L., “ FT-IR Microspectroscopy Enhances Biological and Ecological Analysis of Algae”, *Applied Spectroscopy Reviews*, 44:4, 335-361, (2009).

Murray, T. S., Okegbe, C., Gao, Y., Kazmierczak, B. I., Motterlini, R., Dietrich, L.E.P., Bruscia, E. M., 2012. “The carbon monoxide releasing molecule CORM-2 attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation”, *PLoS One.*, 7:e35499, (2012).

Naumann, D., Fijala, V., Labischinski, H., “The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier Transform Infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis”, *J.Mol.Struct.*, 174: 165-170 (1988).

Naumann, D., Helm, D., “Microbiological characterizations by Fourier transform infrared spectroscopy”, *Nature*, 351, 81-82 (1991).

Naumann, D., “Infrared and NIR Raman spectroscopy in medical microbiology”, In: Manch, H.H., Jackson, M. (Eds.), “*Infrared Spectroscopy: New Tool in Medicine, SPIE Proceeding Series (3257)*”, SPIE, Bellingham, WA, 245-257 (1998).

Nesic, M., Popovic, I., Leskovic, A., Petkovic, M., “Biological Activity and Binding Properties of [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] Complex to Bovine Serum Albumin, Phospholipase A₂ and Glutathione”, *Biometals*, 29, 921–933, (2016).

Ngo-Thi, N. ., Kirschner, C., Naumann, D., “Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry”, *Journal of Molecular Structure*, 661-662, 371–380,(2003).

Niu, C., Gilbert, E. S., “Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure”, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 6951–6956. doi:10.1128/aem.70.12.6951-6956,(2004).

Norris, K.P. and Greenstreet, J.E.S., “On the infrared absorption spectrum of *Bacillus megaterium*.”, *J. Gen. Microbiol.*, 19, 566-580, (1958).

Nostro, A., Guerrini, A., Marino, A., Tacchini, M., Di Giulio, M., Grandini, A., Akin, M., Cellini, L., Bisignano, G., Saraçoğlu, H.T. “In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria”, *International Journal of Food Microbiology*, 238, 33-39, (2016).

Oner, I., Sahin, C., Varlikli, C., “Electroluminescence from two new ruthenium(II) complexes as phosphorescent dopant: Positive effect of swallow-tail bipyridyl ligand”, *Dyes and Pigments*, 95, 23-32, (2012).

Orsini, F., Ami, D., Villa, A.M., “FT-IR microspectroscopy for microbiological studies”, *Journal of Microbiological Methods*, 42, 17-24 (2000).

Popolin, C. P., Reis, J. P. B., Becceneri, A. B., Graminha, A. E., Almeida, M. A. P., Corrêa, R. S., Cominetti, M. R., “Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells”, *PLOS ONE*, 12(9), e0183275. (2017).

Prabhakaran, R., Krishnan, V., Pasumpon, K., Sukanya, D., Wendel, E., Jayabalakrishnan, C., Bertagnolli, H., Natarajan, K., “Preparation, Spectral Characterization, Electrochemistry, EXAFS, Antibacterial and Catalytic Activity of New Ruthenium (III) Complexes Containing ONS Donor Ligands With Triphenylphosphine/arsine”, *Applied Organometallic Chemistry*, 20(3), 203–213, (2006).

Rashid, M.H. and Kornberg, A., “Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*” , *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4885-4890, (2000).

Reedijk, J., “ Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes Significance for effectiveness as anticancer drugs”, *Platinum Metals Review*, 52 (1), 2, (2008).

Riddle, J.W., Kabler, P.W., Kenner, B.A., Bordner, R.H., Rockwood, S.W., Stevenson, H. J.R., “Bacterial identification by infrared spectrophotometry”, *J.Bacteriol*, 72: 593- 603 (1956).

- Rieter, W.J., Pott, K.M., Taylor, K.M.L., Lin, W., “Nanoscale Coordination Polymers for Platinum-Based Anticancer Drug Delivery”, *Journal of the American Chemical Society*, 130 (35), 11584–11585, (2008).
- Rouf, M.A. and Stokes, J.L. “Isolation and identification of the sudanophilic granules of *Sphaerotilus natans*.”, *J. Bacteriol.*, 83. 343-347, (1962).
- Ronconi, L., Sadler, P.J., “Using coordination chemistry to design new medicines”, *Coordination Chemistry Reviews*, 251 (13-14), 1633–1648, (2007).
- Rosenberg, M., Bayer, E.A., Delarea, J., Rosenberg, E., “Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane”, *Appl Environ Microbiol* , 44(4), 929–937, (1982).
- Rother, K., Kirschner, R., Sanger, K., Bohlig, L., Mossner, J., Engeland, K., “p53 downregulates expression of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A”, *Oncogene*, 26, 1949-1953, (2007).
- Sacksteder, C., Barry, B.A., “Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Molecular Approach to an Organismal Question”, *Journal of Phycology*, 37, 197-199 (2001).
- Sava, G., Capozzi, I., Clerici, K., Gagliardi, G., Alessio, E., Mestroni, G., “Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex”, *Clinical & Experimental Metastasis*, 16 , 371–379, (1998).
- Scolaro, C., Bergamo, A., Brescacin, L., Delfino, R., Cocchietto, M., Laurency, G., Geldbach, T.J., Sava, G., Dyson, P.J., “In vitro and in vivo evaluation of ruthenium (II)- arene PTA complexes”, *Jouurnal of. Medicinal Chemistry*, 48(12), 4161–4171, (2005).
- Sharma, A., Gupta, S., Sarethy, I.P., Dang, S., Gabrani, R., “Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens”, *Food Chem.*, 135:672–675, (2012).
- Siebert, F., “Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems”, In: Sauer, K. (Ed), *Biochemical Spectroscopy, Methods in Enzymology*, 246: 501-526 (1995).
- Simoes, L.C., Simoes, M., Vieira, M.J., “Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 317–329, (2010).
- Solmaz, K.B., Ozcan, Y., Mercan Dogan, N., Bozkaya, O., Ide, S., “Characterization and Production of Extracellular Polysaccharides (EPS) by *Bacillus Pseudomycolides* U10”, *Environments*, 5(6), 63, 2018.

Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Kennedy, C.J., Wess, T.J., ‘Molecular interactions in collagen and chitosan blends.’, *Biomaterials*, 25, 795–801,(2004).

Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T.J., Geoghegan, J.A., ‘Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*.’, *Frontiers Cellular and Infection Microbiology*, 4, 171, (2014).

Srivastava, P., Shukla, M., Kaul, G., Chopra, S., Patra, A. K., ‘Rationally designed curcumin based ruthenium(ii) antimicrobials effective against drug-resistant *Staphylococcus aureus*’, *Dalton Transactions*, Issue 31, (2019).

Southam, H. M., Butler, Chapman, J.A., Poole ⁽¹⁾, R. K., "The Microbiology of Ruthenium Complexes", *Advances in Microbial Physiology*, 71, 1-96, (2017).

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., ‘Biofilms as complex differentiated communities’, *Annu Rev Microbiol*, 56,187–209, (2002).

Tan, C., Lai, S., Wu, S., Hu, S., Zhou, L., Chen, Y., Wang, M., Zhu, Y., Lian, W., Peng, W., ‘Nuclear permeable ruthenium(II) β -carboline complexes induce autophagy to antagonize mitochondrial-mediated apoptosis’, *Journal of medicinal Chemistry*, 53(21), 7613-7624, (2010).

Tan, C. P., Lu, Y. Y., Ji, L. N., Mao, Z. W., ‘Metalloomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds’, *Metalloomics*, 5, 978-995, (2014).

Thilagavathi, N., Manimaran, A., Jayabalakrishnan, C., ‘Synthesis, Characterization, Electrochemistry, Catalytic, and Antimicrobial Studies of Ruthenium(III) Complexes Containing ONO Donor Ligands.’, *Journal of Coordination Chemistry*, 63 (7), 1252-1262, (2010).

Tsompanidou, E., Sibbald, M. J. J. B., Chlebowicz, M.A., Dreisbach, A., Back, J.W., van Dijk, J.M., Buist, G., Denham, E.L., ‘Requirement of the agr Locus for Colony Spreading of *Staphylococcus aureus*’, *Journal of Bacteriology*, 193(5), 1267–1272, (2011).

Turro, C., ‘To intercalate or semiintercalate, or both?’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108 (43), 17573-17574, (2011).

Vousden, K. H., Lane, D. P., ‘p53 in health and disease’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 275 – 283, (2007).

Wenning, M., Seiler, H., Scherer, S., ‘Fouriertransform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeast’, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4717-4721,(2002).

Wehrli, P. M., Lindberg, E., Svensson, O., Sparén, A., Josefson, M., Dunstan, R. H., Gottfries, J. (2014). “Exploring bacterial phenotypic diversity using factorial design and FTIR multivariate fingerprinting”, *Journal of Chemometrics*, 28(8), S681–S686, (2014).

Yadav, M.K., Mailar, K., Masagalli, J.N., Chae, S.W., Song, J.J., Choi, W.J., “Ruthenium Chloride-Induced Oxidative Cyclization of Trans-Resveratrol to (\pm)- ϵ -Viniferin and Antimicrobial and Antibiofilm Activity Against *Streptococcus pneumoniae*.”, *Frontiers in Pharmacology*, 14 (10), 890, (2019).

Yang, D. B., Wolf, D., Wakamatsu, T., Holmes, M., “Characterization of cure profiles of anaerobic adhesives by real-time FT-IR spectroscopy. Part II. Surface activation” ,*Journal of Adhesion Science and Technology*, 9(10), 1369–1379, (1995).

Zhou, Y., Yu, Q., Qin, X., Bhavsar, D., Yang, L., Chen, Q., ... Liu, J. “Improving the Anticancer Efficacy of Laminin Receptor-Specific Therapeutic Ruthenium Nanoparticles (RuBB-Loaded EGCG-RuNPs) via ROS-Dependent Apoptosis in SMMC-7721 Cells.”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(24), 15000–15012, (2015).

