

Majda LICINA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA İZOLATLARINA KARŞI LİTİK
BAKTERİYOFAJIN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE FAJIN N-ASETİL SİSTEİN
İLE BİYOFİLM ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Majda LICINA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA İZOLATLARINA KARŞI LİTİK
BAKTERİYOFAJIN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE FAJIN N-ASETİL SİSTEİN
İLE BİYOFİLM ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Majda LICINA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Anabilim Dalı
.....Programında tezi olarak kabul
edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı :
(Ünvanı, Adı Soyadı)
(Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı)
(Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı)
(Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı)
(Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı)
(Üniversite)

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun
görölmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve
...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Majda LICINA

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tez çalışmamın her aşamasında değerli katkılarını sunan danışman hocam Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a, akademik bilgi birikimi ve engin deneyimlerinden faydalanma imkânı sunduğu için derin teşekkürlerimi sunarım. Bakteriyofaj çalışmaları konusundaki derin bilgi ve deneyimlerini bana aktaran ve bu alanda gelişimimde büyük katkıları bulunan Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, katıldığım bakteriyofaj kursu sayesinde bu alana olan ilgimin başlaması ve çalışmalarımın yönlendirilmesinde belirleyici rol oynadığı için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamdaki değerli yardımları için Pınar BAHŞİ'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Emel KAYNAKCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan Öğr. Gör. Dr. Kübra YILDIRIM ve Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK'e, laboratuvarında birlikte çalışmaktan her zaman büyük keyif aldığım Dr. Orhan KOÇAK, Esra TANYEL AKÇİT, Cemilenur ATAŞ'a ve tüm ekip arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan aileme ve sevgiliime teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Kistik fibrozis (KF) hastalarında baskın enfeksiyon kaynağı olan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarına karşı etkili litik bakteriyofaj izole etmek ve bu fajın N-asetil sistein (NAC) ile birlikte *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini değerlendirmek.

Yöntem: Bu çalışmada, bakteriyofajlar geleneksel kültür yöntemleri kullanılarak izole edilmiştir. Biyolojik karakterizasyon kapsamında fajın litik spektrumu, pH stabilitesi, termal stabilitesi, enfeksiyon çokluğu, tek adımda büyüme ve patlama boyutu belirlenmiştir. Genomik karakterizasyon, faj DNA ekstraksiyonu, restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ve faj genom analizini kapsamıştır. KF *P. aeruginosa* izolatlarının *in vitro* biyofilm oluşumu, kristal viyole boyama ile mikrotitre plak testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: MLPa10 fajı, KF hastalarından izole edilen *P. aeruginosa*, özellikle *P. aeruginosa* 1Pa ve *P. aeruginosa* 316Pa, indikatör konak olarak kullanılarak kanalizasyon suyundan izole edilmiştir. KF hastalarından izole edilen klinik *P. aeruginosa* izolatlarının %94,11'ine karşı bakteriyofaj MLPa10, güçlü litik aktivite göstermiştir. Fajın latent ve patlama süreleri sırasıyla 30 ve 40 dakika, patlama boyutu ise 89 PFU/enfekte hücre olarak ölçülmüştür. MLPa10 fajı, pH 6 ve pH 8'de ve 1 saat boyunca 40, 50, 60°C'de stabil kalmıştır. Bu fajın genom analizi, taksonomik olarak Caudoviricetes sınıfından litik bir faj olarak olduğunu çıkarmıştır. Faj genomunda, hiçbir virülans faktör veya antimikrobiyal direnç geni tespit edilmemiştir. Çalışma, MLPa10 fajının KF *P. aeruginosa* izolatlarının %76,9'unda olgun biyofilmleri etkili bir şekilde azalttığını ve aynı zamanda olguların %65,38'inde biyofilm oluşumunu engellediğini göstermiştir. Ek olarak, NAC tek başına da biyofilmlere karşı etkinlik göstermiştir. Bununla birlikte, MLPa10 fajı NAC ile birleştirildiğinde daha düşük etkinlik göstermiştir.

Sonuç: MLPa10 fajının kapsamlı karakterizasyonu, KF *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı terapötik bir ajan olarak kullanılma potansiyelinin altını çizmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, bakteriyofaj, kistik fibrozis, n-asetil sistein, biyofilm

ABSTRACT

Objective: To isolate lytic bacteriophage effective against *Pseudomonas aeruginosa* isolates, the main source of infection in cystic fibrosis (CF) patients, and to evaluate the effect of this phage together with N-acetyl cysteine (NAC) on *P. aeruginosa* biofilm formation.

Method: In this study, bacteriophages were isolated using traditional culture methods. Biological characterization included determination of lytic spectrum, pH stability, thermal stability, multiplicity of infection, one-step growth and burst size. Genomic characterization included phage DNA extraction, restriction fragment length polymorphism (RFLP) and phage genome analysis. In vitro biofilm formation of CF *P. aeruginosa* isolates was performed using microtiter plate assay with crystal violet staining.

Results: MLPa10 phage was isolated from sewage water using *P. aeruginosa* isolated from CF patients, specifically *P. aeruginosa* 1Pa and *P. aeruginosa* 316Pa, as indicator hosts. The bacteriophage MLPa10 showed strong lytic activity against 94.11% of clinical *P. aeruginosa* isolates from CF patients. The latent and burst periods of the phage were 30 and 40 minutes, respectively, and the burst size was measured as 89 PFU/infected cell. MLPa10 phage was stable at pH 6 and pH 8 and at 40, 50, 60°C for 1 hour. Genome analysis of this phage revealed it to be taxonomically a lytic phage of the class Caudoviricetes. No virulence factors or antimicrobial resistance genes were detected in the phage genome. The study showed that MLPa10 phage effectively reduced mature biofilms in 76.9% of CF *P. aeruginosa* isolates and also inhibited biofilm formation in 65.38% of cases. In addition, NAC alone also showed efficacy against biofilms. However, the MLPa10 phage showed lower efficacy when combined with NAC.

Conclusion: The extensive characterization of MLPa10 phage underlines its potential as a therapeutic agent against CF *P. aeruginosa* infections.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriophage, cystic fibrosis, n-acetyl cysteine, biofilm

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	
SİMGELER ve KISALTMALAR	
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
2.1.1. <i>P. aeruginosa</i> Hücre Duvarı	2
2.1.2. <i>P. aeruginosa</i> Genomu	3
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biyofilmi	3
2.3. Kistik Fibroziste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biyofilmlerine Karşı N-Asetil Sistein	5
2.5. Bakteriyofajlar	6
2.5.1. Bakteriyofaj Sınıflandırması	6
2.5.2. Bakteriyofaj Yaşam Döngüleri	8
2.6. Bakteriyofaj Terapisi	8
2.6.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biyofilmlerine Karşı Bakteriyofajlar	10
2.6.2. Kistik Fibrozis Hastalarında <i>Pseudomonas</i> Faj Tedavisi	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1. Gereç	14
3.1.1. Kistik Fibrozis Hastalarından <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatları	14
3.1.2. Çevresel Örnekler	14
3.1.3. Besiyeri	14
3.1.4. Çözeltiler ve Kimyasallar	16
3.2. Yöntem	17

3.2.1. Çevresel Örneklerden Bakteriyofaj İzolasyonu	17
3.2.1.1. Agar Spot-Test ile Faj Aktivitelerinin Belirlenmesi	18
3.2.1.2. Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofaj Saflaştırma	18
3.2.2. Bakteriyofaj Titresinin Belirlenmesi	19
3.2.3. Bakteriyofajların Klinik KF <i>P. aeruginosa</i> İzolatları Üzerindeki Litik Etkisi	19
3.2.4. Bakteriyofaj Genomu	21
3.2.4.1. Bakteriyofaj DNA İzolasyonu	21
3.2.4.2. Faj DNA'sının Restriksiyon Profilinin Belirlenmesi	22
3.2.4.3. Tüm Genom Sekanslama	22
3.2.5. Bakteriyofajın Biyolojik Karakterizasyonu	23
3.2.5.1. Faj Konak Aralığının Belirlenmesi	23
3.2.5.2. Enfeksiyon Çokluğu (MOI)	24
3.2.5.3. Tek Adımlı Büyüme Eğrisi	24
3.2.5.4. Bakteriyel Redüksiyon Analizi	24
3.2.5.5. Bakteriyofajın Termal ve pH Stabilitesi	25
3.2.6. Klinik KF <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı	25
3.2.7. Klinik KF <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Biyofilm Oluşumu	26
3.2.8. Bakteriyofajın <i>P. aeruginosa</i> Biyofilmleri Üzerindeki Etkisi	27
3.2.9. <i>P. aeruginosa</i> Biyofilmlerine Karşı N-Asetil Sistein	27
3.2.10. <i>P. aeruginosa</i> Biyofilmlerine Karşı Bakteriyofajlar ve N-Asetil Sistein	27

4. BULGULAR

4.1. Bakteriyofajların İzolasyonu	29
4.1.1. İzole Edilmiş Bakteriyofajların Saflaştırılması	29
4.1.2. Faj Titresi Hesaplama	30
4.2. Saflaştırılmış Fajların Klinik <i>P. aeruginosa</i> İzolatları Üzerindeki Litik Aktivitelerinin Belirlenmesi	31
4.3. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu	33
4.3.1. Bakteriyofajlardan Total DNA İzolasyonu	33
4.3.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	33

4.3.3. Bakteriyofajın Tüm Genom Analizi	35
4.4. Konak Aralığı Analizi	36
4.4.1. Optimal MOI Hesaplaması	38
4.4.2. Tek Adımlı Büyüme Eğrisi	38
4.4.3. Bakteriyel Redüksiyon Analizi	39
4.4.4. Bakteriyofajın Termal ve pH Stabilitesi	40
4.5. Klinik KF <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı	41
4.5.1. Klinik KF <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Biyofilm Oluşumu	42
4.5.2. Bakteriyofajın <i>P. aeruginosa</i> Biyofilmleri Üzerindeki Etkisi	43
4.5.3. <i>P. aeruginosa</i> Biyofilmlerine Karşı N-Asetil Sistein	45
4.5.4. <i>P. aeruginosa</i> Biyofilmlerine Karşı Bakteriyofajlar ve N-Asetil Sistein	47
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	57
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1.	Plak morfolojisine göre saflaştırılmış fajların titre hesaplaması	31
Tablo 4.2.	KF hastalarından izole edilen klinik <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında bakteriyofajların lizis etkinliği	32
Tablo 4.3.	MLPa10 fajının konak aralığı analizi	37
Tablo 4.4.	Planktonik KF <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının MİK değerleri	42
Tablo 4.5.	Biyofilm oluşumunun belirlenmesi ve sınıflandırılması	42
Tablo 4.6.	KF <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Biyofilm Oluşumu	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da Biyofilm Gelişim Döngüsü	4
Şekil 2.2.	Bakteriyofajın yapısı	7
Şekil 2.3.	Litik ve lizojenik ve döngüde faj	8
Şekil 2.4.	Bakteriyofaj anti-biyofilm mekanizmaları	11
Şekil 3.1.	Spot test sonucunda bakteriyofajlar varlığı ile oluşan plaklar. A1, A2: Plak morfolojisine göre saflaştırılan fajların KF hastalarından alınan klinik <i>P. aeruginosa</i> izolatları (18/1960 & 18/3799) üzerinde "++": duyarlı, "+": daha az duyarlı ve "-": dirençli olarak sınıflandırılan spot testi. B1, B2: Plak morfolojisine göre saflaştırılan fajların bir kontrol konak bakterisi (316Pa ve 1Pa) üzerinde spot testi.	20
Şekil 4.1.	Çevresel örneklerden bakteriyofaj izolasyonu. A) Antalya Su ve Atıksu İdaresi Genel Müdürlüğü tarafından toplanan ve teslim edilen numuneler. B) KF hastasından elde edilen konak <i>P. aeruginosa</i> 316 izolatına karşı faj varlığının doğrulanması için spot test (kaynak 1 ve 2'de lizis-pozitif plak). C) KF hastasından izole edilen <i>P. aeruginosa</i> 1'e karşı faj varlığının doğrulanması için spot test (kaynak 2 ve 3'te lizis-pozitif plak).	29
Şekil 4.2.	Morfolojilerine göre seçilen farklı faj plakları	30
Şekil 4.3.	Tek plak izolasyon yöntemi ile saflaştırılan bakteriyofajların görüntüleri	30
Şekil 4.4.	Genomik faj DNA izolasyonunun jel görüntüsü. (M): lambda DNA/HindIII marker; (1-11): Plak morfolojilerine göre saflaştırılmış bakteriyofajların genomik DNA'sı (sırasıyla MLPa1 ila MLPa11).	33

Şekil 4.5.	HindIII enzimi ile kesim	34
Şekil 4.6.	EcoRI enzimi ile kesim	34
Şekil 4.7.	MLPa10 litik bakteriyofaj genomunun BLAST sorgusu	36
Şekil 4.8.	MLPa10 faj genomu için sonuçların ağacı	36
Şekil 4.9.	MLPa10 fajı için optimal MOI	38
Şekil 4.10.	MLPa10 fajının tek adımlı büyüme eğrisi	39
Şekil 4.11.	MLPa10 fajının bakteriyel redüksiyon sonucu	40
Şekil 4.12.	MLPa10 fajının pH stabilitesi	41
Şekil 4.13.	MLPa10 fajının termal stabilitesi	41
Şekil 4.14.	MLPa10 fajı (10^{10} PFU/mL) ile muamele edilen olgun biyofilmler	44
Şekil 4.15.	MLPa10 fajı (10^{10} PFU/mL) ile biyofilm inhibisyonu	44
Şekil 4.16.	10 mg/ml N-Asetil Sistein'in KF <i>P. aeruginosa</i> izolatlarına karşı etkisi	46
Şekil 4.17.	20 mg/ml N-Asetil Sistein'in KF <i>P. aeruginosa</i> izolatlarına karşı etkisi	46
Şekil 4.18.	10 mg/ml NAC ve MLa10 fajının (10^{10} PFU/mL) KF <i>P. aeruginosa</i> izolatlarına karşı etkisi	48
Şekil 4.19.	20 mg/ml NAC ve MLa10 fajının (10^{10} PFU/mL) KF <i>P. aeruginosa</i> izolatlarına karşı etkisi	48

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMD	: Antimikrobiyal direnç
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: Base pairs
CAT	: Metiyonin
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CFTR	: Kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyicisini
CFU	: Colony forming unit
ÇİD	: Çoklu ilaç dirençli
CRISPR	: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
EPS	: Hücre dışı polimerik maddeler
EUA	: Acil kullanım izni
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	: Food and Drug Administration
G+C	: Guanin ve Sitozin
GTC	: Aspartat
GTT	: Asparajin
ICTV	: Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
KF	: Kistik fibrozis

LPS	: Lipopolisakkarit
mbp	: Million base pairs
MIK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ml	: Mililitre
MLC	: Mikro yapılı lipid taşıyıcılar
mm	: Milimetre
MOI	: Multiplicity of Infection
NAC	: N- Asetil Sistein
NAG	: N-asetilglukozamin
NAM	: N-asetilmuramik asit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
nm	: Nanometre
OD	: Optical Density
ORF	: Açık okuma çerçevesi
PFU	: Plaque forming unit
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: revolutions per minute
SM	: Salin Magnezyum
TAA	: Lösin
TGG	: Prolin
TGT	: Treonin
tRNA	: Taşıyıcı RNA
UV	: Ultra viyole

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre



1. GİRİŞ

Artan antimikrobiyal direnç (AMD) tehdidi, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı ile tetiklenen küresel halk sağlığı için acil bir sorun teşkil etmektedir. Bu yaygın antibiyotik kullanımı, bakteri popülasyonları üzerinde seçici baskılar oluşturarak dirençli suşların ortaya çıkmasını ve yayılmasını teşvik etmiştir. Bunlar arasında *Pseudomonas aeruginosa*, çoklu ilaç direnci (ÇİD) geliştirme eğilimi ve intrinsik virülans faktörlerine sahip olmasıyla ayırt edilen önemli bir endişe kaynağı olarak ortaya çıkmaktadır. Hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde dirençli biyofilmler oluşturma kabiliyeti, klinik ortamlarda kalıcılığını artırması ve başta KF hastaları olmak üzere bireyleri kronik solunum yolu enfeksiyonlarına yatkın hale getirmesi özellikle önemlidir. KF hastalarındaki anormal mukus salgısı *P. aeruginosa* kolonizasyonu ve çoğalması için ideal bir niş oluşturmaktadır ve sonuç olarak ortaya çıkan kronik solunum yolu enfeksiyonları ilerleyici akciğer bozulmasını hızlandırmaktadır. Geleneksel antibiyotiklerin *P. aeruginosa* biyofilmlerine karşı etkisizliği göz önüne alındığında, araştırmacılar alternatif tedavi yöntemlerine yönelmiş ve faj terapisi umut verici bir yol olarak ortaya çıkmıştır (Basseti ve ark., 2018; Chegini ve ark., 2020; M. Thi ve ark., 2020) .

Bu çalışmanın amacı iki yönlüdür: KF hastalarında başlıca enfeksiyon kaynağı olarak kabul edilen *P. aeruginosa* izolatlarına karşı etkili litik bakteriyofajları izole etmek ve izole edilen bu litik fajların NAC ile birlikte *P. aeruginosa* biyofilmi üzerindeki sinerjik etkisini değerlendirmektir. AMD giderek artan tehdidi KF hastalarının bakımında önemli zorluklar yaratırken, alternatif terapötik yolların araştırılması zorunlu hale gelmektedir. Faj terapisi, özgüllüğü ve bakteriyel patojenleri hedef alma yeteneği nedeniyle umut verici bir strateji sunmakta ve geleneksel antibiyotiklerin sınırlamalarını potansiyel olarak aşmaktadır. Ayrıca, mukolitik özellikleriyle bilinen NAC, *P. aeruginosa* biyofilmlerini bozmak için tamamlayıcı bir yaklaşım sunmakta ve böylece biyofilmle ilişkili enfeksiyonlarla mücadelede faj tedavisinin etkinliğini artırmaktadır. Bu çalışma, litik fajların ve NAC'nin *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerindeki kombine etkisini aydınlatarak, KF ile ilişkili enfeksiyonların yönetiminde yeni terapötik müdahale yaklaşımları için değerli bilgiler katmayı amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, çeşitli çevresel koşullarda varlığını sürdürebilen, çubuk şeklinde, monoflagellalı, Gram-negatif bir bakteridir. Sadece bitkileri ve hayvanları enfekte etmekle kalmaz, aynı zamanda insanları da etkileyerek bağışıklık sistemi zayıflamış kanser hastalarında, ciddi yanık yaralanmaları olanlarda ve KF bireylerde ciddi enfeksiyonlara yol açar (Wu ve ark., 2015). ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, *P. aeruginosa*'yı, 6700'ü çoklu ilaç dirençli ve 440'ı ölümle sonuçlanan yılda 51.000 enfeksiyona neden olduğu için tehlike arz eden bir patojen (seviye 2) olarak sınıflandırmaktadır (<https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>, Erişim tarihi: 8 Nisan 2024). Ayrıca, bu patojen giderek artan çoklu ilaca dirençli ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) patojenleri arasında yer almaktadır (<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>, Erişim tarihi: 8 Nisan 2024). *P. aeruginosa*, sayısız antibiyotik direnci, agresif virülans mekanizmaları ve kalıcı, uzun süreli enfeksiyonlar oluşturma kapasitesi nedeniyle, önemli bir klinik risk oluşturmaktadır (Rice, 2008).

2.1.1. *P. aeruginosa* Hücre Duvarı

P. aeruginosa gibi gram-negatif bakteriler sadece hücre duvarının en dış katmanını olan bir dış zara sahiptir. Bu zar çoğunlukla proteinler, fosfolipidler ve lipopolisakkaritlerden (LPS) oluşur. LPS, *P. aeruginosa*'nın patojenitesini artıran bir endotoksindir. Ayrıca, bakteriyi deterjanlardan, bazı antibiyotiklerden ve diğer tehlikeli kimyasallardan koruyan bir bariyer görevi görmektedir. Hücreye yapısal destek sağlayan peptidoglikan tabaka dış zarın altında yer almakta ve kısa peptit zincirleri, N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) tekrarlayan birimlerini çapraz bağlayarak hücre duvarını oluşturmaktadır. İç zar, bakterinin sitoplazmasını çevreleyen bir fosfolipid çift katmandır ve hücresel solunum ve enerji üretimi için gereklidir (Dhar ve ark., 2017).

2.1.2. *P. aeruginosa* Genomu

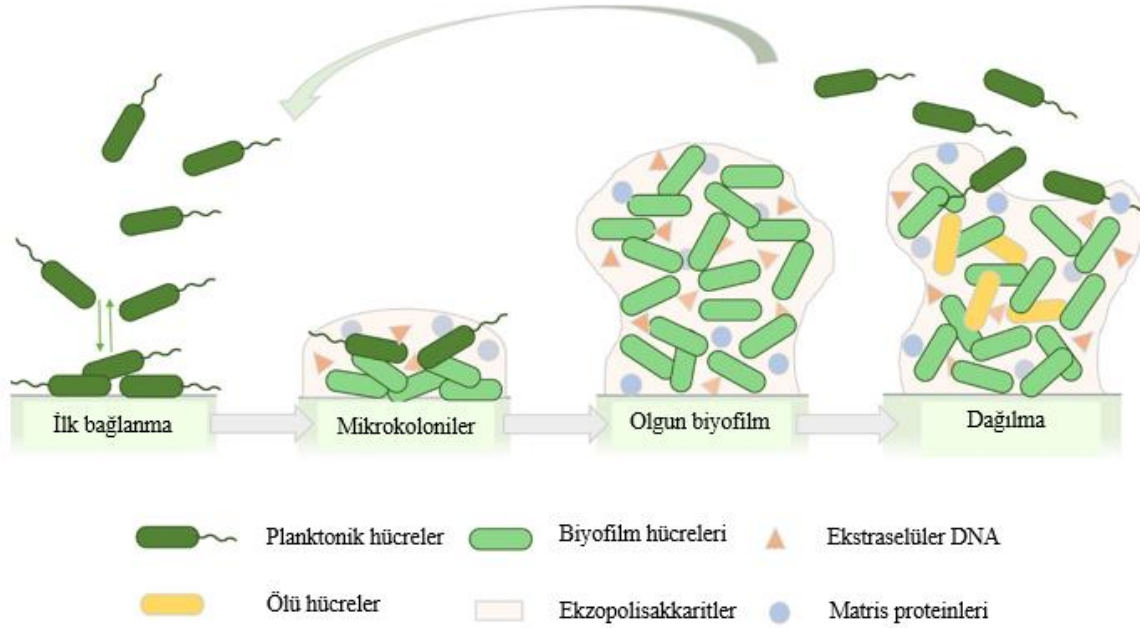
P. aeruginosa genom büyüklüğü 5,5 ila 7 Mbp arasında değişmekte olup G+C içeriği %65-67'dir. Neredeyse tüm *P. aeruginosa* suşlarında bulunan ve kökenine bakılmaksızın (çevresel, klinik veya laboratuvar) tüm *P. aeruginosa* suşlarında ortak olan bir dizi metabolik ve patojenik bileşeni kodlayan genler, *P. aeruginosa*'nın çekirdek genomu olarak adlandırılmaktadır. Tüm genomun yaklaşık %90'ı, suşlar arasında yüksek oranda korunmuş olan çekirdek genomdan oluşmaktadır. Öte yandan, bazı *P. aeruginosa* suşlarında bulunan ancak diğerlerinde bulunmayan genler aksesuar genomda yer almaktadır. Diğer türlerden elde edilen genler (aksesuar genomun büyük bir kısmını içeren) genellikle *P. aeruginosa* çekirdek genomundan daha düşük bir G+C içeriğine sahiptir (Kung ve ark., 2010; Stover ve ark., 2000).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilmi

P. aeruginosa oldukça adaptif olduğundan ve ilaçlara karşı yüksek bir intrinsik direnç sahip olduğundan, antibiyotikler gibi yaygın antimikrobiyal tedaviler genellikle çok az etkilidir ve bu da mortaliteyi artırmaktadır. Ayrıca, *P. aeruginosa*'nın bakteriyi dış stres faktörlerinden koruyan ve fagositozu önleyen, kolonizasyonu ve uzun süreli kalıcılığı teşvik eden biyofilm üretme yeteneği, bu enfeksiyonların tedavisini daha zor hale getirmektedir (Moradali ve ark., 2017). *P. aeruginosa* mikrobiyal popülasyonları içinde hücreden hücreye iletişimin etkili bir yöntemi olan *quorum* algılama, bu yeteneği desteklemektedir. Bu durum, persistan rinosinüzit, akciğer enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları gibi uzun süreli enfeksiyonlardan şikayetçi olan bireylerde sıklıkla görülen son derece organize biyofilmlerin oluşumuna yol açmaktadır (Römling ve ark., 2012). Biyofilm, hücrelerin kaynakların yakınında kalmasını sağlamakta, genetik materyal alışverişini kolaylaştırmakta ve hücreleri fagosit yutması gibi çeşitli kimyasal ve çevresel stres faktörlerinden korumaktadır (Davey ve O'toole, 2000). Bir biyofilm çoğunlukla su (%97) ile proteinler (<%2), DNA (<%1), polisakkaritler (<%2) ve RNA (<%1) içeren bir matriksten oluşmaktadır (Al-Wrafy ve ark., 2017).

P. aeruginosa'nın biyofilm yapısı oluşturma sürecinde dört temel adım vardır (Şekil 2.1) (Kostakioti ve ark., 2013; Saxena ve ark., 2019; Yin ve ark., 2022). Başlangıçta tutunma ilk aşamadır. Bu noktada yapışma tersine çevrilebilir olduğundan, bakteriler yüzeye

yapışabilmekte ya da tekrar planktonik hücelere dönebilmektedir. Biyofilm oluşumunun ikinci aşamasında, bakteri hüceleri geri dönüşümlü bağlanmadan geri dönüşümsüz bağlanmaya geçmekte ve bağlanan bakteriler giderek çoğalarak daha özerk bir yapıya dönüşmektedir. Bu noktada bakteriler çoğalmaya, mikro koloniler oluşturmaya ve hücre dışı polimerik maddeler (EPS'ler) üretmeye başlamaktadır. Bu EPS'ler biyofilm hüceleri ile çevreleri arasında bir bariyer görevi görerek onları antibiyotiklere maruz kalma veya bağışıklık hüceleri saldırısı gibi farklı stres faktörlerinden korumaktadır. Biyofilm geliştikçe bakteriler çevresel stres faktörlerine ve ilaçlara karşı daha iyi bir direnç geliştirmektedir. Ayrılma, biyofilm oluşumundaki son aşamadır. Biyofilm ayrıldığında, biyofilm hüceleri biyofilmden planktonik büyüme moduna geçmekte, burada diğer biyomoleküllerin yüzeyine yapışabilmekte veya yeni bir biyofilm oluşumu döngüsü başlatabilmektedir (Kim ve Lee, 2016; Olivares ve ark., 2020; Thi ve ark., 2020).



Şekil 2.1. *Pseudomonas aeruginosa* 'da Biyofilm Gelişim Döngüsü(Yin ve ark., 2022) .

2.3. Kistik Fibroziste *Pseudomonas aeruginosa*

Vücutun çeşitli epitel yüzeylerini ozmotik bir dengede tutan bir klorür ve bikarbonat iyon taşıma kanalı olan “kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyicisi” (CFTR) membran proteinini kodlayan gendeki mutasyon, kistik fibrozis ile sonuçlanmaktadır (Vallières ve ark., 2014). Mutasyon sonucu gelişen CFTR disfonksiyonu klorür ve bikarbonat iyonlarının epitel boyunca taşınmasını düzenleme yeteneğinin bozulmasıyla çoklu organ hastalıklarına neden olur. KF'nin başlıca klinik belirtileri arasında mekonyum ileusu, distal bağırsak tıkanıklığı, ekzokrin pankreas yetmezliği, büyüme bozukluğu, erkek infertilitesi ve fırsatçı patojenlerin neden olduğu kronik ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonları yer almaktadır (Boeck ve ark., 2017; Cutting, 2015). Ter klorür testi, hastalığın teşhisi için altın standarttır. Diyabet ve anksiyete ve depresyon gibi ruh hali sorunları KF'nin diğer uzun vadeli sonuçlarıdır; ne yazık ki, akciğer yetmezliği hala neredeyse tüm KF hastalarının başına gelmektedir (Chin ve ark., 2017). *P. aeruginosa*, KF ile yakından ilişkilidir ve kalıcı akciğer enfeksiyonlarının başlıca nedenidir. Yetişkin KF hastalarının yaklaşık %75'i, KF'li bireyleri etkileyen en yaygın patojen olan *P. aeruginosa* ile enfekte olur (Malhotra ve ark., 2019).

2.4. *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilmlerine Karşı N-Asetil Sistein

NAC uzun zamandan beri ekonomik ve güvenli bir ilaç olarak piyasada bulunmaktadır. NAC, glutatyon S-transferaz aktivitesini artıran ve yapışan mukus akıntılarını hafifleten iyi tolere edilen mukolitik bir ilaçtır (Mokhtari ve ark., 2017). NAC serbest radikalleri temizlemekte, detoksifikasyonu kolaylaştırmakta ve glutatyon üretimini artırmaktadır. Güçlü bir antioksidandır ve serbest oksijen radikallerinin üretiminin gerçekleştiği durumlar için olası bir terapötik ajandır. Ayrıca, NAC antibakteriyel özelliklere sahiptir. Hücre dışı polisakkarit matriks ve bakteriyel biyofilm oluşumunu engellerken olgun biyofilmlerin parçalanmasını teşvik etmektedir (Guerini ve ark., 2020; Pinto ve ark., 2021; Sempere ve ark., 2022).

Zhao ve Liu, çoğu *P. aeruginosa* izolatu için minimum NAC inhibitör konsantrasyonlarının 10 ila 40 mg/ml olduğunu ve NAC ve siprofloksasin kombinasyonunun *P. aeruginosa* suşlarına karşı sinerji (%50) gösterdiğini veya etkileşim göstermediğini (%50) bulmuştur. 0,5 mg/ml NAC olgun *P. aeruginosa* biyofilmlerini

degrade edebilmiştir. Bozunma NAC konsantrasyonları ile orantılı olmuş ve biyofilmler 10 mg/ml NAC'de tamamen bozunmuştur. NAC'ın *P. aeruginosa*'ya karşı anti-bakteriyel özelliklere sahip olduğunu ve *P. aeruginosa* biyofilmlerini bozabildiği ileri sürülmüştür (Zhao ve Liu, 2010). Guerini ve ark. *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu inhibe etmek için kitosan bazlı ve NAC içeren mikro yapıli lipid taşıyıcılar (MLC'ler) geliştirmiştir. Çalışmada, NAC yüklü MLC'nin biyofilm büyümesini azaltma oranı son derece yüksek olup, 0,5 mg/mL ve 2 mg/mL'de sırasıyla %64,74±6,2 ve %83,74±9,95'tir. Mukolitik ve antibakteriyel özelliklerine ek olarak NAC, KF hastalarına fayda sağlayabilecek anti-enflamatuvar özelliklere sahiptir. Kalıcı enflamasyon KF'nin semptomlarından biri olduğu için bu özellikle kritiktir (Guerini, Condò, ve ark., 2022).

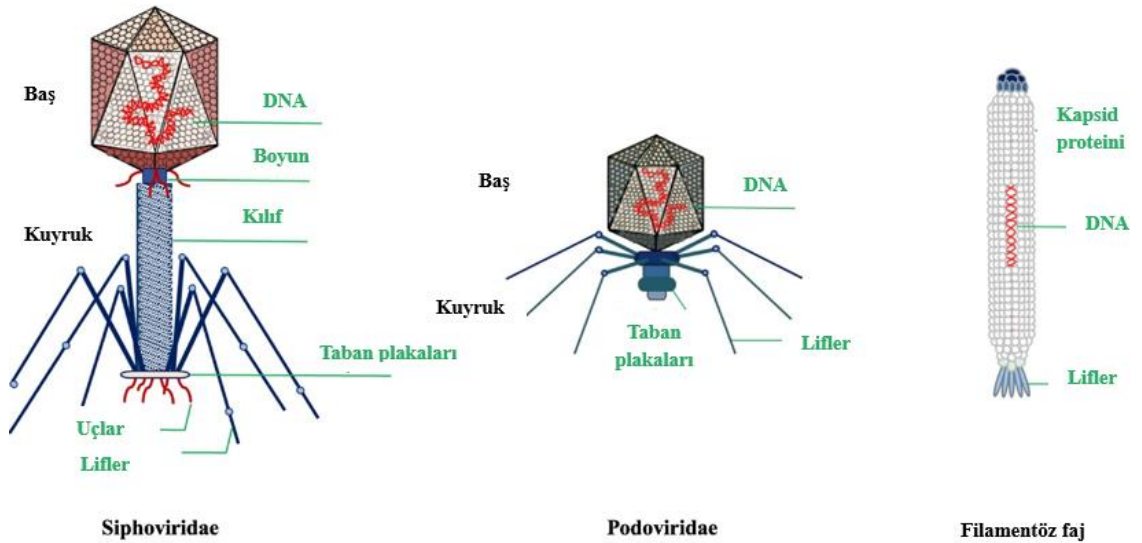
2.5. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar küresel ekolojide önemli bir role sahiptir. Bakteriyofajların, bakterilerin bulunduğu her yerde var olması ve bakteriyofaj miktarının bakteri sayısını en az on kat aşması beklenmektedir. Biyosferdeki en yaygın organizma olan bakteriyofajların sayısının 10^{31} olduğu düşünülmektedir. Bakteriyofajlar yaşam döngüsüne katkıda bulunmakta ve her gün okyanustaki bakterilerin yaklaşık yüzde ellisini yok etmektedir (Breitbart ve ark., 2015; Clokie ve ark., 2011). Ernest Hankin, Ganj nehri suyunu analiz ettikten sonra 1896 yılında bakteriyofajların varlığını keşfetmiş ve "*Yuma ve Ganj sularının kolera mikrobu üzerindeki bakterisidal etkisi*" başlıklı bir makale yazmıştır (Hankin, 1896). Frederick Twort ilk olarak 1913 yılında "*bakterileri enfekte ederek öldüren bir ajan*" olarak tanımlamıştır. Ancak bakteriyofajların antimikrobiyal etkisini ilk duyuran kişi 1917 yılında "*dizanteri basilinin görünmez bir mikrobunu*" keşfeden ve bu mikroorganizmalara "bakteriyofaj" adını veren Felix d'Herelle olmuştur (D'Herelle, 1917). Antibakteriyel bir ajanın keşfi ve bunun hem tedavi hem de koruyucu tıpta uygulanması, özellikle d'Herelle'in çalışmasıyla, ölümlerin başlıca nedeni olduğu o yıllarda bulaşıcı hastalıklarla mücadelede önemli bir ilerleme sağlamıştır. Ancak antibiyotiklerin keşfi faj çalışmalarının kapsamını sınırlamıştır.

2.5.1. Bakteriyofaj Sınıflandırması

Faj sınıflandırması ilk olarak 1971 yılında Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından fajların çeşitli özelliklerine dayanılarak yapılmaya çalışılmıştır.

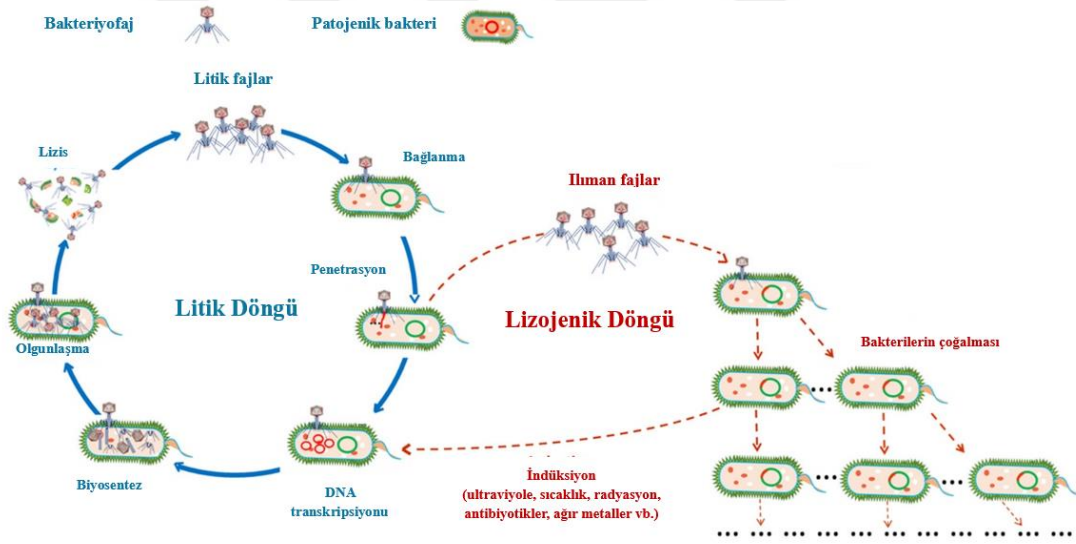
Ackermann sınıflandırması bugün hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriyofajların %95'inden fazlası Caudovirales takımı altında sınıflandırılan çift sarmallı DNA (dsDNA) kuyruklu virüslerdir. Caudovirales'i oluşturan üç aile Siphoviridae, Myoviridae ve Podoviridae'dir. Bakteriyofajların yüzde altmışı uzun, esnek kuyruklara; yüzde yirmi beşi çift sarmallı, kısaltılabilir kuyruklara; yüzde on beşi ise kalın, kısa kuyruklara sahiptir. Bu üç aile Siphoviridae, Myoviridae ve Podoviridae'dir (Ackermann, 2007). Siphoviridae, Podoviridae, Myoviridae ve Filamentous faj aileleri morfoloji ve nükleik asit (DNA/RNA dizisi veya türü) temelinde birbirlerinden ayırt edilebilmektedir. Tipik bir faj yapısı, genetik materyali (DNA veya RNA) barındıran baş, boyun, kuyruk ve kuyruk liflerinden oluşmaktadır (Şekil 2.3) (Nobrega ve ark., 2018; Ye ve ark., 2019). Fajlar tipik olarak 20-200 nm uzunluğundadır. Fajların küçük bir yüzdesi tek sarmallı DNA (ssDNA), çift sarmallı RNA (dsRNA) veya tek sarmallı RNA (ssRNA) genomları içerir, ancak çoğunluğu çift sarmallı DNA (dsDNA) genomlarına sahiptir (Simmonds ve Aiewsakun, 2018; Ye ve ark., 2019).



Şekil 2.2. Bakteriyofajın yapısı (Ye ve ark., 2019)

2.5.2. Bakteriyofaj Yaşam Döngüleri

DNA genomlarının bakteri genomuna entegre olup olmamasına bağlı olarak, fajlar litik veya lizojenik (ılıman) olarak sınıflandırılmaktadır (Bao ve ark., 2018; Ye ve ark., 2019). Litik fajların üreme döngüsü (Şekil 2.3) altı aşamadan oluşmakta: bağlanma, penetrasyon, transkripsiyon, biyosentez, olgunluk ve lizis (Ye ve ark., 2019). Bu süreçler tipik olarak enfekte konak bakterinin ortadan kaldırılmasına yol açmaktadır. Öte yandan, lizojenik fajlar tipik olarak genomlarını konak bakteri kromozomuna dahil etmekte ve konak bakterinin üremesi sırasında faj DNA bilgisini sonraki bakteri soyuna aktarmaktadır (Erez ve ark., 2017). Bir stres faktörünün (UV ışığı, yüksek sıcaklıklar, iyonlaştırıcı radyasyon, antibiyotikler veya ağır metaller gibi) etkisi altında, ılıman fajlar litik döngüye girme ve konakçı bakteriyi parçalama eğilimindedir (M. Kim ve ark., 2018; Ye ve ark., 2019).



Şekil 2.3. Litik ve lizojenik döngüde faj (Ye ve ark., 2019).

2.6. Bakteriyofaj Terapisi

Patojenik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için fajların terapötik bir ajan olarak kullanılması faj terapisi olarak bilinmektedir. Fajlar, 1920'lerden 1940'lara kadar antibakteriyel ajanlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Fakat, penisilinin ilk endüstriyel ölçekli üretimi ile bakteriyofajların kullanımı geride kalmıştır. Tehlikeli bakterilere karşı antibiyotik çağı, Alexander Fleming'in 1928'de penisilini keşfetmesi ve

1944'te büyük ölçekli üretimiyle başlamıştır (Ye ve ark., 2019). Ancak patojen bakterilerde artan AMD son yıllarda acil küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir. AMD'nin küresel sağlık üzerindeki etkisine ilişkin 2022 yılında yapılan ilk kapsamlı değerlendirmeye göre, 2019 yılında 4,95 milyon ölüm AMD ile bağlantılıdır ve bunların 1,2 milyonu doğrudan ilişkilidir (Strathdee ve ark., 2023).

AMD, özellikle tıp, hayvancılık ve gıda endüstrisinde antibiyotiklerin aşırı kullanımı ve suistimalinin nedeniyle artış göstermektedir ve ilaç şirketlerinin antibiyotik araştırma ve geliştirmeye giderek daha az yatırım yapması nedeniyle yeni antibiyotikler geliştirilememektedir. Mevcut eğilimler bozulmadan devam ederse, 2050 yılına kadar en az 10 milyon kişinin AMD'den etkileneceği ve hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (Strathdee ve ark., 2023). Genişleyen AMD salgını, bilim insanlarının yeni tedaviler aramasına neden olmakta ve bir asır önce keşfedilen ancak çoğunlukla unutilan faj terapisini yeniden gündeme getirmektedir. Hepsi olmasa da klinik açıdan önemli bakteri türlerinin çoğu için litik fajlar, yüzyılı aşkın bir süredir devam eden faj avcılığı yoluyla başarıyla toplanmıştır. Son birkaç yılda, daha büyük veri tabanlarının ve iyi karakterize edilmiş faj bankalarının mevcudiyeti nedeniyle fajlar klinik tıpta kullanımı daha fazla gündeme gelmeye başlamıştır.

Mart 2016'da California San Diego Üniversitesi'nde çoklu antibiyotiğe dirençli ciddi bir *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonunu tedavi etmek için bir faj preparatı kullanıldı ve bu, Amerika Birleşik Devletleri'nde intravenöz bakteriyofaj tedavisinin belgelenmiş ilk etkili klinik uygulaması olmuştur (Schooley ve ark., 2017). ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), antibiyotiğe dirençli bakteriyel enfeksiyonların yaygın etkileri nedeniyle bakteriyofaj tedavisine acil kullanım izni (EUA) vermiştir. Bu acil kullanım izni, vaka bazında gerçekleşmektedir. Yaygın kullanım için henüz onay verilmiş ticari faj preparatı yoktur. Araştırma ilaçlarının merhametli (compassionate) kullanımı olarak da adlandırılan genişletilmiş erişim, düzenleyici kurumların tam olarak onaylamadığı ürünlerin, bir klinisyen tarafından başka tedavi seçeneği olmadığı tespit edilen hastalara sağlanması anlamına gelmektedir. Bu merhametli tedavi vakaları, izlenen bir klinik ortamda gerçekleşmektedir. Sık akciğer enfeksiyonu geçirme olasılığı daha yüksek olan KF

hastaları gibi tekrarlayan ve kronik enfeksiyonları olan ve altta yatan hastalığın kronikleşmesiyle artan antibiyotik kullanımı olan hastalar, tipik olarak bakteriyofajların merhametli kullanımı için en iyi adaylardır. Bu hastaların sıklıkla sergilediği ciddi antibiyotik direnci nedeniyle, merhametli tedavi onayı ile faj tedavisi uygulamak geriye kalan tek tedavi yöntemi olabilmektedir (Hitchcock ve ark., 2023).

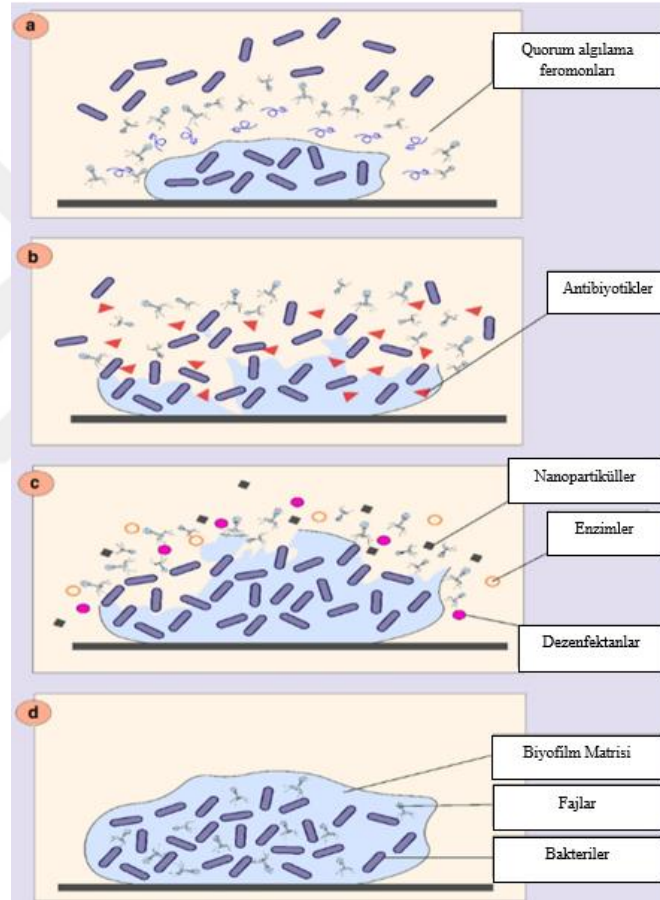
2005 yılında, Polonya'daki Ludwik Hirszfild İmmünoloji ve Deneysel Terapi Enstitüsü Faj Terapi Birimi Merkezi tarafından yürütülen bir faj terapi çalışması kapsamında, çok ilaca dirençli çeşitli hastalıkları olan 153 hasta değerlendirilmiştir. Faj terapisinin etkinliğinin yanı sıra güvenliğinin de değerlendirildiği çalışmanın bulgularına göre, inatçı bakteriyel enfeksiyonları olan hastaların önemli bir kısmı tedaviyi tolere edebilmiş ve olumlu klinik sonuçlar elde edilmiştir (Międzybrodzki ve ark., 2013).

Programların bir süredir uygulanmakta olduğu Gürcistan Cumhuriyeti ve Polonya'nın yanı sıra, Amerika Birleşik Devletleri, Belçika, Fransa ve İsveç'te de faj terapi programları mevcuttur. Avrupa ve Avustralya'daki iş birliği çabaları, terapötik kullanımları mümkün kılmak için standartlaştırılmış faj terapi rejimlerinin oluşturulmasında etkili olmuştur. Faj terapisi 2006 yılında Birleşik Krallık'ta bir yanık hastasına uygulanmış ve 2009 yılında fajlar kronik otit için faz I/II klinik araştırmanın konusu olmuştur (Sivera-Marza ve ark., 2006; Wright ve ark., 2009). Son dört yılda Great Ormond Street Hastanesi'nde (Londra, Birleşik Krallık) iki KF hastasının ve İskoçya'daki iki hastanede diyabetik ayak enfeksiyonu olan on hastanın tedavisinde kullanılmıştır (Jones ve ark., 2023).

2.6.1. *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilmlerine Karşı Bakteriyofajlar

P. aeruginosa biyofilm oluşumunu önlemek için anahtar stratejilerden biri faj tedavisidir. Fajlar hem planktonik hem de biyofilm bakteri türlerine karşı iyi performans göstermektedir (Ceyssens ve Lavigne, 2010; Martínez-Gallardo ve ark., 2023). Bakteriyofajlar, biyofilmlerin büyümesini engellemek için quorum algılama ve hücresel iletişimi engellemek gibi biyofilm üretimini önlemek için çeşitli stratejiler kullanmaktadır. Fajların ve antibiyotiklerin kombine tedavileri, *P. aeruginosa*

biyofilmleri üzerinde güçlü bir ölümcül etkiye sahiptir. Ayrıca, bakteriyofajların biyofilm karşıtı özelliklere sahip bileşiklerle birlikte kullanılması, biyofilmlerin ortadan kaldırılması için potansiyel göstermektedir. İlginç bir şekilde, bakteriyofajlar deliklerden derinlemesine nüfuz ederek ve dış matrikse zarar vermeden iç katmanların içinde çoğalarak biyofilmlerin içinde büyüme kapasitesi göstermektedir (Şekil 2.4) (Chegini ve ark., 2020).



Şekil 2.4. Bakteriyofaj anti-biyofilm mekanizmaları. a) Bakteriyofajlar quorum algılamayı inhibe ederek ve hücresel iletişimi azaltarak biyofilm oluşumunu engellemektedir. b) Faj ve antibiyotiklerin ardışık olarak uygulandığı kombine tedaviler *P. aeruginosa* biyofilmi üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. c) Bakteriyofajların biyofilm karşıtı özelliklere sahip moleküllerle birlikte kullanılması biyofilm yıkımına yardımcı olabilmektedir. d) Bakteriyofajlar dış matriksi bozmadan biyofilm boşluklarından biyofilmin iç katmanlarına nüfuz edebilmekte ve biyofilmin daha derin katmanlarında çoğalabilmektedir (Chegini ve ark., 2020).

Bakteriyel enfeksiyonların engellenmesi açısından, tek bir süspansiyonda farklı konak aralıklarına sahip iki veya daha fazla bakteriyofaj kombinasyonu yani bakteriyofaj kokteyli- kullanılması daha başarılı sonuçlar vermektedir. Bakteriyofaj kokteylleri, polisakkarit depolimeraz gibi enzimleri eğer kokteyldeki fajlardan yalnızca biri taşıyorsa diğer fajların da *P. aeruginosa* biyofilmine kolayca sızmalarını ve biyofilmdeki bakteriler üzerine litik etki gösterebilmelerine imkan verebilmektedir (Chegini ve ark., 2020).

Çok sayıda araştırmaya göre, *P. aeruginosa* biyofilmlerini *in vitro* olarak ortadan kaldırmak için en umut verici yaklaşımlardan biri bakteriyofajların kullanımıdır. Atık sudan izole edilen M-1 fajı, Adnan ve arkadaşları tarafından *P. aeruginosa*'nın çoklu ilaç dirençli izolatları tarafından oluşturulan biyofilmleri parçalamak için kullanılmıştır. Sonuçlar ayrıca, 6 saatlik bir tedavi süresinin ardından MA-1 bakteriyofajının biyofilmleri ve *P. aeruginosa*'nın büyüme hızını azalttığını göstermiştir. Bu çalışmanın 20 günlük *P. aeruginosa* biyofilmini yok etme kabiliyeti, temel bulgularından biri olmuştur (Adnan ve ark., 2020). Genel olarak, bakteriyofaj kokteyli olarak bilinen tek bir süspansiyonda farklı konak aralıklarına sahip iki veya daha fazla bakteriyofaj kombinasyonu kullanılarak bakteriyel enfeksiyonlar daha başarılı bir şekilde önlenmektedir (Gu ve ark., 2012).

Kronik rinosinüzitli hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* biyofilmi Pa193, Pa204, Pa222 ve Pa223 bakteriyofajları ile eradike edilmiştir. Fong ve arkadaşları, bu fajların hem bir kokteyl içinde hem de tek başına tek bir dozunun, 24 ve 48 saatlik tedaviden sonra biyofilm üretim oranını önemli ölçüde azalttığını keşfetmişlerdir. İzolatların biyofilmleri tek fajlar tarafından %53-73 oranında azaltılmış olsa da faj kokteylinin biyofilmlere karşı etkinliği %89 oranında artmıştır. Özellikle, bakterilerde çoklu ilaç direnci görülse bile dört fajdan oluşan bir kokteylin kullanımı durumunda biyofilm oluşumunun inhibe edildiği gösterilmiştir. Dolayısıyla ilaç direncinin varlığı ile fajların etkinliği arasında negatif bir ilişki olmadığı düşünülmektedir (Fong ve ark., 2017).

2.6.2. Kistik Fibrozis Hastalarında Pseudomonas Faj Tedavisi

KF hastalarında *P. aeruginosa* ve diğer bakteriyel enfeksiyonlar, farklı aşamalarda araştırılmakta olan çeşitli potansiyel terapötik yaklaşımlara sahiptir. Bunlar arasında faj

terapisi yakın zamanda antimikrobiyal peptitler, patojene özgü antikorlar ve bağışıklama arasında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyan ilk on yenilikçi antibakteriyel ilaç olarak listelenmiştir (Czaplewski ve ark., 2016). Hastalıkla ilgili raporlardan birinde *P. aeruginosa* ve *S. aureus* ile kalıcı enfeksiyon geliştiren genç (5 ve 7 yaşında) KF'li kadına ait iki farklı vaka raporu yer almaktadır. Bu kadınlar nebülize faj ve antibiyotik kombinasyonu ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiş, klinik durumlarında belirgin bir iyileşme ve balgamlarındaki bakteri sayısında azalma sağlanmıştır. Antibiyotik tedavisi her vakada enfeksiyonu ortadan kaldırmamıştır. Bir hasta dokuz seans boyunca her 4-6 haftada bir nebülize faj aldıktan sonra koloni oluşturan ünitelerde önemli düşüşler yaşanmıştır. Bu, KF hastalar için yönetilebilir bir tedavi planıdır (Kvachadze ve ark., 2011).

KF için önerilen bir tedavi, hastanın nebülize bir faj preparatını solumasını içermektedir. Aerosolize faj damlacıkları enfeksiyon bölgesini bulmak için hava yollarına girmekte ve enfeksiyon bölgesine ulaştığında faj virionları hava yolu epitelinin mukus tabakasına yapışmakta ve ardından spesifik olarak *P. aeruginosa* hücrelerine bağlanmaktadır. Fajlar hedeflenen bu hücrelerde çoğalarak yeni fajlar üretmekte ve böylece bakteriyi yok etmektedir. Bu, mukustaki *P. aeruginosa* popülasyonlarında önemli bir azalmaya yol açarak mikrobiyotanın yeniden dengelenmesine yardımcı olmaktadır (Trend ve ark., 2017).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kistik Fibrozis Hastalarından *Pseudomonas aeruginosa* İzolatları

Bu çalışmada kistik fibrozis hastalarından izole edilen toplam 36 *P. aeruginosa* izolatu test edilmiştir. Bu izolatlar daha önce kistik fibrozis tanısı almış hastalardan izole edilmiş ve Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Kültür Koleksiyonları Birimi'nde saklanmıştır. Etik Kurul onayı 13 Eylül 2023 tarihinde KAEK-691 karar numarası ile alınmıştır. Etik kurul onayının ardından, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Kültür Koleksiyonları Birimi'nden toplam 36 *P. aeruginosa* izolatu alınmıştır.

İndikatör bakteri kültürü

Bakteriyofajlar, KF hastalarından alınan *P. aeruginosa* 1Pa ve *P. aeruginosa* 316 Pa klinik izolatları indikatör konak olarak kullanılarak izole edilmiştir.

3.1.2. Çevresel Örnekler

Antalya'nın 3 farklı bölgesinden arıtılmamış kanalizasyon örnekleri bakteriyofaj izolasyonu için Antalya Su ve Atıksu İdaresi Genel Müdürlüğü'nden toplanmıştır. Örnekler geldiği anda kullanılmış ve bakteriyofajlar izole edilmiştir. Ayrıca foseptik çukurundan ve yapay göletten de örnekler toplanmış ancak bakteriyofaj varlığı tespit edilememiştir.

3.1.3. Besiyeri

Tryptic Soy Agar (TSA)

40 g besiyeri (BD Difco™, ABD) 1000 ml distile suda çözülmüş, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve ardından besiyeri steril Petri kaplarına dökülmüştür.

Tryptic Soya Broth (TSB)

15 g besiyeri (BD BBL™, ABD) 500 ml distile suda çözülmüş ve ardından otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Luria-Bertani (LB) Broth

10 g besiyeri (BD Difco™, ABD) 500 ml distile suda çözülmüş ve ardından otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Luria-Bertani (LB) Agar (%1,5 agar)

10 g LB broth besiyeri (BD Difco™, ABD) ve 7,5 g agar (Sigma-Aldrich, ABD) 500 ml distile suda çözülmüş ve son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde CaCl₂ (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiştir. Hazırlanan LB alt agar besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve ardından steril petri kaplarına ~20 ml dökülerek 4°C'de saklanmıştır.

Luria-Bertani (LB) Yumuşak Agar (%0,5 agar)

10 g LB broth besiyeri ve 2,5 g agar 500 ml distile suda çözülmüş ve son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde CaCl₂ eklenmiştir. Hazırlanan LB üst yumuşak agar besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra 55-60°C'ye soğutulmuş ve steril tüplere 5 ml dökülerek 4°C'de saklanmıştır.

Mueller Hinton II Broth (Katyon Ayarlı)

11 g besiyeri (BD BBL™, ABD) 500 ml distile suda çözülmüş ve ardından otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

MacConkey Agar

25 g besiyeri (BD BBL™, ABD) 500 ml distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve ardından besiyeri steril Petri kaplarına dökülmüştür.

3.1.4. Çözeltiler ve Kimyasallar

Salin Magnezyum tamponu (SM tamponu)

50 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 5,8 g NaCl ve 2 g MgSO₄·7H₂O eklenerek 1000 ml'ye kadar distile su ile doldurulmuş ve ardından 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Fosfat Tamponlu Salin (PBS)

1 tablet Fosfat Tamponlu Salin (Sigma Aldrich, ABD) 200 ml distile suda çözülmüş ve ardından otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

10X Tris-Borat EDTA (TBE) tamponu pH 8.0

Trizma Baz: 108g

Borik Asit: 55 g

EDTA: 8.3g

Tüm malzemeler bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüş ve son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 8'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

0,5 X TBE Tampon

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan 10x TBE tamponunun 50 ml'si distile su ile 1000 ml'ye seyreltilmiştir.

Tris-EDTA (TE) tamponu

1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.0) ve 0.2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Proteinaz K Çözeltisi

30 mg liyofilize proteinaz K (A.B.T.TM, Türkiye) steril bir Eppendorf tüpünde tartılmış, 1 ml 50 mM Tris-HCl ve 2 mM kalsiyum asetat (pH 8.0) içinde çözölmüş ve -20°C'de stok çözelti olarak saklanmıştır.

50 mM Tris-HCL: 0,12 g

2 mM Kalsiyum Asetat: 0.006 g

Son Distile Su Hacmi: 20 mL (pH 8.0)

%1 Agaroz Jel

%1'lik agaroz jel hazırlamak için 1 g agaroz tartılmış, 100 ml 0,5X TBE çözeltisi içinde çözölmüş ve mikrodalga fırında 1-2 dakika ısıtılmıştır. Ardından, yaklaşık 50°C'ye soğutuldu ve 10 µl Safe View jel görüntöleme boyası eklenmiştir. Elektroforez tankına dökölmüş ve uygun bir kuyu oluşturmak için taraklar takılmıştır.

N- Asetil Sistein Çözeltisi

NAC (Sigma-Aldrich, ABD) steril LB broth içinde çözölmüş ve kullanımdan önce çözeltinin pH değeri 7,2'ye ayarlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çevresel Örneklerden Bakteriyofaj İzolasyonu

Bakteriyofaj izolasyonu için Antalya Su ve Atıksu İdaresi Genel Müdürlüğü'nden alınan ham kanalizasyon örnekleri (şehrin 3 farklı bölgesinden) kullanılmıştır. Örnekler, tüm hücreleri ve diğer kalıntıları uzaklaştırmak için 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Ardından, süpernatant 0,22 µm membran filtreden (GVS, İtalya) geçirilmiş ve 4°C'de saklanmıştır (Karaynir ve ark., 2020).

3.2.1.1. Agar Spot-Test ile Faj Aktivitelerinin Belirlenmesi

Spot test yöntemi için, 100 µl gecelik indikatör bakteri kültürü (*P. aeruginosa* 1Pa ve 316Pa), 10mM CaCl₂ içeren 45-50°C'ye soğutulmuş 5ml üst agara (%0,5 w/v agar) eklenmiş ve karışım vortekslenerek önceden hazırlanmış LB alt agarın (%1,5 w/v agar) üzerine dökülmüştür. Üst agarın katılaşması için petri kapları oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, hazırlanan filtratlardan 10 µl Petri kapları üzerinde önceden işaretlenmiş alana damlatılmıştır. Petri kapları damlalar kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından bir gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün Petri üzerinde oluşan plaklar gözlemlenmiştir. Petri üzerine damlatılan filtrattan bakteriyofaj varlığı tespit edilmiş ve işaretli alanlarda plak oluşumu görülmüştür (Karaynir ve ark., 2020).

3.2.1.2. Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofaj Saflaştırma

Bakteriyofajların varlığının spot test ile doğrulandığı sıvı numunelerden litik bakteriyofajların saflaştırılması için ikili agar kaplama adı verilen bir teknik kullanılmıştır (Merabishvili ve ark., 2014).

- I. Kaynaktan alınan faj titresini seyreltmek için 900 µl SM tamponuna 100 µl faj filtratı eklenmiştir ve bu 1. seyreltmedir (10^{-1}). 1. seyreltmenin 100 µl'si bir sonraki Eppendorf tüpüne aktarılmış ve 10^{-6} seyreltmeye kadar devam edilmiştir.
- II. 100 µl gecelik indikatör bakteri kültürü ve 100 µl seyreltme örneği 45-50°C'ye soğutulmuş 5 ml LB yumuşak agara inoküle edilmiştir. Karışım vortekslenmiş ve önceden hazırlanmış LB alt agar (%1,5 w/v agar) üzerine yavaşça dökülmüştür. Bu işlem her seyreltme ve her indikatör bakteri kültürü (*P. aeruginosa* 1Pa ve 316Pa) için ayrı ayrı yapılmıştır.
- III. Petri kapları yumuşak agar katılaşana kadar oda sıcaklığında tutulmuş ve ardından gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, her bir dilüsyon için oluşan

faj plakları incelenmiş ve tek plak oluşumunun gözlemlendiği petri kaplarından sınırları belirgin bir plak seçilerek kesik bir pipet ucuyla çıkarılmıştır.

- IV. Plak 10 ml steril LB besiyerine aktarılmış ve vortekslenmiştir. Fajın besiyerine difüzyonu için 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından, plak ve LB besiyeri içeren tüpe 100 µl gecelik indikatör bakteri kültürü eklenmiştir.
- V. 50 µl CaCl₂ (1M) çözeltisi plak, LB broth ve bakteri içeren tüpe eklenmiş, vorteks ile iyice karıştırılmış ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
- VI. Ertesi gün kültür 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant 0,22 µm gözenek çaplı şırınga uçlu filtreden steril bir tüpe filtrelenmiştir. Faj filtratı +4 °C'de saklanmıştır (1. Plak saflaştırma). Saf faj izole etmek için ikili agar kaplama ve tek plak saflaştırma işlemi 4 kez tekrarlanmıştır.

3.2.2. Bakteriyofaj Titresinin Belirlenmesi

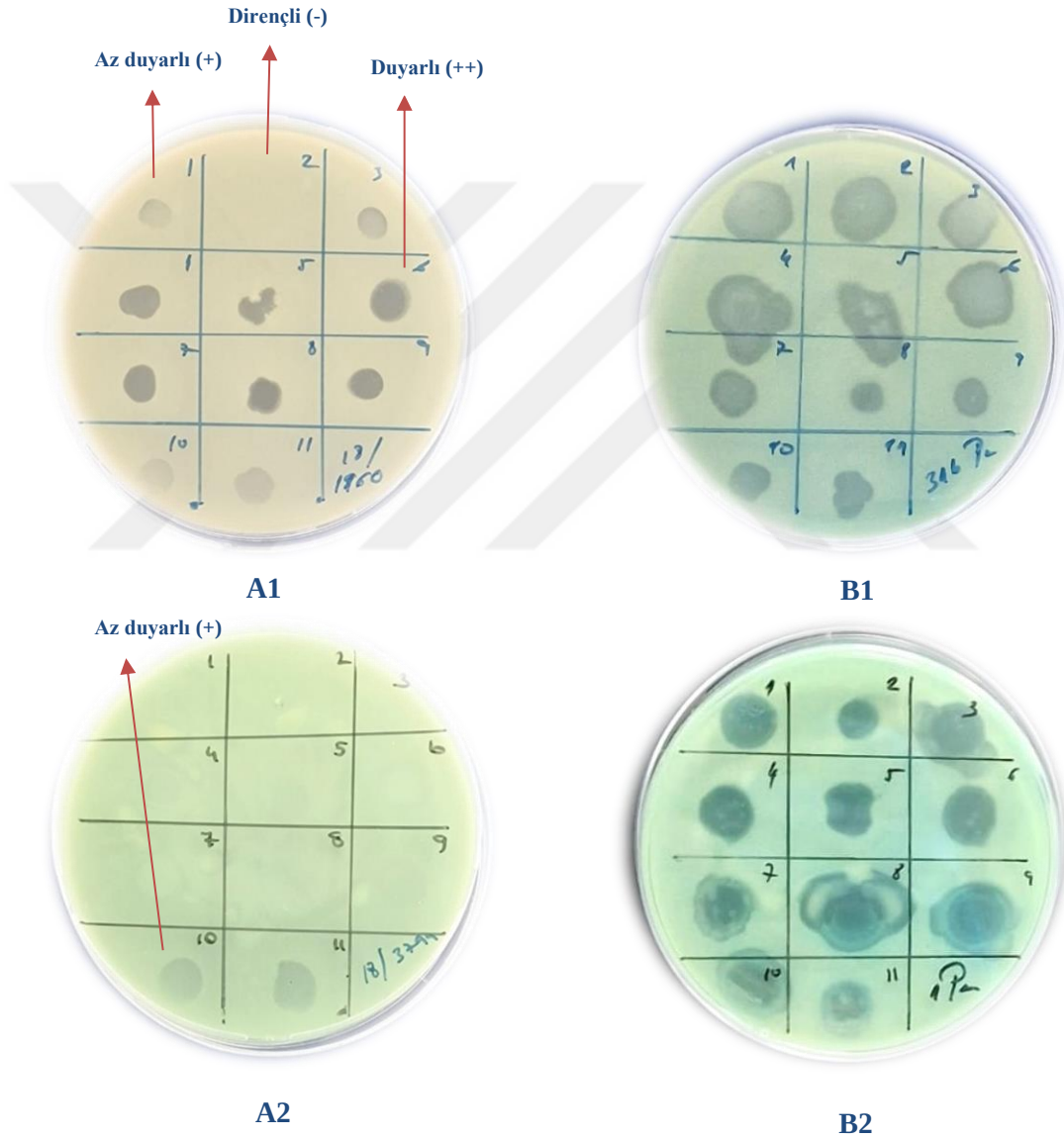
Tek plak izolasyonu ile saflaştırılan fajın titresini belirlemek için ikili agar kaplama yöntemi kullanılmıştır. Faj titresini seyreltmek için SM tamponu ile seyreltmeler hazırlanmıştır. 1. dilüsyondan 100 µl bir sonraki Eppendorf tüpüne aktarılmış ve 10⁻¹⁶'ya kadar devam edilmiştir. 100 µL faj dilüsyonu ve 100 µL gecelik konak bakteri, 45-50°C'ye soğutulmuş 5 mL LB yumuşak agar içinde karıştırılmış ve LB alt agar içeren petri kaplara dökülmüştür ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir (Ali ve ark., 2023). Bir gecelik inkübasyondan sonra, fajın **plak oluşturma birimi** (PFU/mL) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{PFU/ml} = (\text{Plak sayısı}) / (\text{Seyreltme faktörü} \times \text{Filtrat hacmi (µl)}) \times (1000 \text{ µl}) / \text{ml}$$

3.2.3. Bakteriyofajların Klinik KF *P. aeruginosa* İzolatları Üzerindeki Litik Etkisi

Tek plak saflaştırma yöntemiyle saflaştırılan 11 bakteriyofajın litik spektrumu, KF hastalarından elde edilen klinik *P. aeruginosa* (KF *P. aeruginosa*) izolatları arasında spot test yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Her bir gecelik bakteri kültüründen 100 µL, 45-50°C'ye soğutulmuş 5 mL LB yumuşak agara eklenmiş ve LB alt agar petrilerin üzerine dökülmüştür. Katılma sonrasında, 10 µL faj lizatı (10¹⁰ PFU/mL) belirtilen klinik izolatların üzerine damlatılmıştır. Petriler gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiş ve litik

zonların varlığı ya da yokluğu belirlenmiştir. Bu işlemler 36 klinik izolatin her birine uygulanmıştır. Ertesi gün, fajın uygulanan bölgelerdeki litik aktiviteler gözlemlenmiş ve oluşan plaklar Şekil 3.1'de gösterildiği gibi 3 farklı şekilde değerlendirilmiştir (Alves ve ark., 2014). Bunlar sırasıyla berrak plaklar (++/duyarlı), bulanık plaklar (+/daha az duyarlı-orta) ve plak yok (-/dirençli) olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1: Spot test sonucunda bakteriyofajlar varlığı ile oluşan plaklar. A1, A2: Plak morfolojisine göre saflaştırılan fajların KF hastalarından alınan klinik *P. aeruginosa* izolatları (18/1960 ve 18/3799) üzerinde "++": duyarlı, "+": daha az duyarlı ve "-": dirençli olarak sınıflandırılan spot testi. B1, B2: Plak morfolojisine göre saflaştırılan fajların bir kontrol indikatör konak bakterisi (316Pa ve 1Pa) üzerinde spot testi.

3.2.4. Bakteriyofaj Genomu

3.2.4.1. Bakteriyofaj DNA İzolasyonu

Faj DNA'sı, titresi en az 10^{10} pfu/ml olan fajlardan izole edilmiştir. Manuel DNA ekstraksiyonu için Fenol-Kloroform yöntemi kullanılmıştır (Salih ve ark., 2022).

- I. 2 ml faj filtratı 15000 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat santrifüj edilmiştir.
- II. Süpernatant atılmış ve pelet 100 μl SM tamponu ile homojenize edilmiştir.
- III. Faj süspansiyonuna 1 μl DNaz I (1 U/ μl) ve 1 μl RNaz A (10 mg/ml) eklenmiş ve 37°C 'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- IV. Enzim inaktivasyonu için tüpler 70°C 'de 10 dakika bekletilmiştir.
- V. Faj süspansiyonuna 3 μl Proteinaz K (30 mg/ml) eklenmiş ve 55°C 'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- VI. Hacim/Hacim (V/V) Fenol: Kloroform: İzamil alkol (25:24:1) karışımı eklenmiş, iyice karıştırılmış ve 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- VII. Sulu faz yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılmış ve 1/10 Hacim 3 M NaAsetat (pH:5) eklenmiştir.
- VIII. V/V %100 izopropanol eklenmiş, karıştırılmış ve -20°C 'de 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika boyunca 11000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- IX. Süpernatant pelleti bozmadan dikkatlice uzaklaştırılmış ve %70 etanol eklenerek 11000 rpm'de 5 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilmiştir.
- X. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış, pelet 50 μl TE tamponu (pH 7.5) ile çözülmüş ve ekstrakte edilen bakteriyofaj DNA'ları daha sonraki deneyler için -20°C 'de saklanmıştır.

İzole edilen faj DNA'sının konsantrasyonu ve saflığı Quawell Q9000 (Quawell Technology, Çin) ile belirlenmiştir. Konsantrasyon ve saflığı >50 ng/ μl , $\sim 1.8^{260/280}$ ve $>1.8^{260/230}$ olan örnekler sonraki adımlarda kullanılmıştır.

3.2.4.2. Faj DNA'sının Restriksiyon Profilinin Belirlenmesi

- İzole edilen bakteriyofaj DNA'sının restriksiyon profillerinin belirlenmesinden önce, total faj DNA'sı %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

Toplam 11 fajdan izole edilen DNA Hind III ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve restriksiyon profilleri belirlenmiştir.

HindIII (Thermo Scientific™, ABD) ve EcoRI (Thermo Scientific™, ABD) ile restriksiyon enzim kesimi:

- 10 µl Toplam Faj DNA'sı
- 2 µl Enzim Tamponu (10X)
- 1 µl HindIII Restriksiyon Enzimi veya 1 µl EcoRI Restriksiyon Enzimi
- 7 µl dH₂O

Her bir bakteriyofaj için yukarıdaki bileşenler karıştırılmış ve 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, kesilen ürününün 5µl'si %1 agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve jel görüntülenmiştir.

3.2.4.3. Tüm Genom Sekanslama

- MLPa10 fajı, restriksiyon profilleri ve KF hastalarından elde edilen klinik *P. aeruginosa* izolatları üzerindeki en yüksek litik etkisi nedeniyle genom karakterizasyonu için seçilmiştir.

İzole edilen MLPa10 faj DNA'sının konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve Qubit florometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile ölçülmüş ve MLPa10 fajının DNA konsantrasyonu sırasıyla 131,5 ng/µl ve 120 ng/µl olarak bulunmuştur. Faj DNA'sı ticari bir yerel şirkette sekanslanmıştır.

İzole edilen örneklerden NovaSeq 6000 Reagent Kit (Illumina, ABD) kullanılarak kütüphaneler hazırlanmış ve Illumina NovaSeq 6000 platformunda (Illumina, ABD) 2x150 döngü ile dizilenerek paired-end kütüphane oluşturulmuştur. FastQC programı ile kalite analizi yapılmış ve FastQC raporu elde edilmiştir. TrimGalore, düşük kaliteli

bazları, primerleri ve kalan adaptörleri kesmek için kullanılmıştır. Tüm olası bakteriyofaj genomu ve kontig dizileri, SPAdes v3.15.5 (Prjibelski ve ark., 2020) kullanılarak bir de novo genom birleştirme yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Annotasyon adımından önce, taksonomi belirleme için NCBI (National Center for Biotechnology Information) virüs veritabanına karşı kontiglerin BLASTn analizi yapılmıştır. Bakteriyofajların dizi hizalamasıyla taksonomik sınıflandırması için Phaser yazılımı ve tRNA'ların tespiti için ARAGORN aracı kullanılmıştır. Genomda istenmeyen genlerin varlığı CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database, <https://card.mcmaster.ca/>), VFDB (Virulence Factor Database, <http://www.mgc.ac.cn/>) programları ile taranmıştır.

3.2.5. Bakteriyofajın Biyolojik Karakterizasyonu

3.2.5.1. Faj Konak Aralığının Belirlenmesi

İzole edilen MLPa10 fajının sadece KF hastalarından elde edilen klinik *P. aeruginosa* izolatlarına karşı mı etkili olduğunu yoksa diğer izolatlara veya suşlara karşı litik olup olmadığını belirlemek için, yoğun bakım ünitesinden 10 klinik *P. aeruginosa* izolatları ve 10 ATCC suşu (*Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 29213, *Staphylococcus aureus* 25922, *Enterococcus faecalis* 29212, *Acinetobacter baumannii* 19606, *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Escherichia coli* 25922, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 43300, *Staphylococcus epidermidis* 12228, *Streptococcus pyogenes* 19615) değerlendirilmiştir.

Bu amaçla agar spot yöntemi kullanılmıştır. Her bir bakteri gecelik kültüründen 100 µL, 45-50°C'ye soğutulmuş 5 mL LB yumuşak agar içinde karıştırılmış ve LB alt agar petrilere dökülmüştür. Katılaşmanın ardından, belirlenen alanlara 10 µL faj lizatı (10^{10} PFU/mL) damlatılmıştır. 37 °C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra, izole edilen fajların konak aralıkları, lizis oluşumu (petrilerdeki berrak zonlar) gözlemlenerek belirlenmiştir. Spotlar için sınıflandırma şeması tam lizis (++), kısmi lizis (+) ve lizis yok (-) arasında değişmektedir (Kumar ve ark., 2022).

3.2.5.2. Enfeksiyon Çokluğu (MOI)

Enfeksiyon çokluğu, virüs partiküllerinin potansiyel konak hücrelere oranı olarak tanımlanır. LB besiyerinde (10^8 CFU/mL) çoğaltılan 500 µL indikatör bakteri MOI (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ve 0.0001 PFU/CFU) değerlerinde aynı hacimde faj ile karıştırılmıştır. 10 dakika adsorpsiyondan sonra, serbest fajlar 15.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Pellet 1 mL LB broth içinde yeniden süspanse edilmiş, ardından 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültür 15000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılmış ve 10µL kloroform eklenerek tekrar 15000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Faj titresi ikili agar kaplama yöntemiyle analiz edilmiştir. Ertesi gün, her MOI'nin plakları gözlemlenmiş ve en yüksek faj miktarını veren MOI değeri optimal MOI değeri olarak belirlenmiştir (Yang ve ark., 2010).

3.2.5.3. Tek Adımlı Büyüme Eğrisi

İndikatör konak kültürünün 0,5 ml'si, 0,1 MOI'de LB broth içinde 0,5 ml faj lizatu ile karıştırılmış ve ardından adsorpsiyon için 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, karışım 4 °C'de 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet (bakteri + faj) serbest fajları ortadan kaldırmak için LB broth ile muamele ettikten sonra, 50 ml taze LB broth içinde yeniden süspanse edilmiş ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Bunu takiben, 180 dakika boyunca her 10 dakikada bir 0,5 ml'lik alikotlar toplanmıştır. Alikotlar daha sonra %5 (v/v) kloroform ile karıştırılmış ve 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar faj titresinin hesaplanması için toplanmış ve faj plakları ikili agar kaplama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Plato fazındaki faj titresi latent fazdaki ortalama faj titresine bölünerek fajın patlama boyutu belirlenmiştir (Yazdi ve ark., 2018).

3.2.5.4. Bakteriyel Redüksiyon Analizi

Tedavi grubu (faj + bakteri) için, 100 µl faj filtratı (10^7 , 10^8 , 10^9 ve 10^{10} PFU/ml) sırasıyla 1 ml gecelik konak kültürü (OD_{600} :0.2) ile karıştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak, 100 µl steril LB broth gecelik konak kültürü (OD_{600} :0.2) ile karıştırılmış ve negatif kontrol olarak taze LB broth dahil edilmiştir. Daha sonra, 96 kuyucuklu plaka hazırlanan örneklerden

200 µl inoküle edilmiş ve 24 saat boyunca her 2 saatte bir 600 nm'de optik yoğunluk okumaları yapılmıştır (Karaynir ve ark., 2022).

3.2.5.5. Bakteriyofajın Termal ve pH Stabilitesi

pH stabilite deneyi için SM tamponunun geniş bir pH gradyanı (pH 2, 4, 6, 8, 10 ve 12) kullanılmıştır. Faj lizatu (10^{10} PFU/mL) SM tampon çözeltisi ile istenen pH'ta seyreltikten sonra karışım 37°C'de 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra faj titresini analiz etmek için ikili agar kaplama yöntemi uygulanmıştır.

Ayrıca, 5, 15, 30 ve 60 dakika boyunca, fajlar termal stabilitelerini değerlendirmek için çeşitli sıcaklık aralıklarında (40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C ve 100°C) inkübe edilmiştir. İşlenen her numune için, faj canlılık oranını belirlemek üzere ikili agar kaplama yöntemi kullanılmıştır (Shang ve ark., 2021).

3.2.6. Klinik KF *P. aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı

Bir antimikrobiyal için bir gecelik inkübasyon süresinden sonra bir mikrobun gözle görülür şekilde üremesini engelleyen en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak bilinir. Minimal inhibitör konsantrasyonlar, 2024-01-01'den itibaren geçerli olan EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi) kılavuzlarına göre bir broth mikrodilüsyon testi kullanılarak belirlenmiştir.

- I. KF hastalarından izole edilen toplam 36 *P. aeruginosa* izolatı TSA plağına inoküle edilmiştir. Ertesi gün birkaç koloni seçilmiş ve 2 ml Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (CAMHB) ile karıştırılmıştır. Daha sonra bakteri inokulum yoğunluğu McFarland dansitometresi (Biosan, Letonya) ile McFarland bulanıklık standardı No. 0.5'e ayarlanmış ve 1:100 dilüsyon yapılmıştır.
- II. 96 plakalı steril kuyucuklarda, tüm kuyucuklara 100 µl CAMHB eklenmiştir. Ardından, CAMHB kullanılarak 4096 µg/ml levofloksasin stokundan hazırlanan 8 µg/ml levofloksasin içeren çözeltilerden 100 µl kolon 2'nin kuyucuklarına eklenmiştir. Daha sonra 11. kolona kadar seri dilüsyonlar yapılmıştır. Bu işlem sonucunda kolon 2-11'deki antibiyotik konsantrasyonları sırasıyla 2 -1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 - 0,03125 - 0,015625 - 0,0078125 - 0,00390625 µg/ml olarak hazırlanmıştır.

- III. Her sıraya 100 µl farklı bakteri izolatı eklenmiştir (A - H satırları). İlk kolon pozitif kontrol için (CAMHB + inoküle edilmiş bakteri izolatları); son kolon sterilitate kontrolü için (inoküle edilmemiş CAMHB) kullanılmıştır.
- IV. 37°C'de 18-20 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra, bulanıklık göstermeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonları MİK olarak kaydedilmiştir.

3.2.7. Klinik KF *P. aeruginosa* İzolatlarının Biyofilm Oluşumu

Klinik KF *P. aeruginosa* izolatları biyofilm oluşturma kapasiteleri açısından taranmıştır. Birkaç bakteri kolonisi taze LB broth besiyerine inoküle edilmiş ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bir gecelik kültür LB broth besiyeri ile 1:100 oranında seyreltilmiştir. Ardından, seyreltilmiş bakteri kültürünün 200 µL'si düz tabanlı 96 kuyucuklu plaka ekilmiş ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak taze LB broth besiyeri kullanılmıştır. Tüm kuyucuklar üç tekrarlı olarak inoküle edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki bakteriler atılmış ve 200 µL steril fosfat tamponlu salin (PBS; pH 7.2) ile üç kez nazikçe yıkanmıştır. Biyofilmler 96 kuyucuklu plakta 60 °C'de 15 dakika inkübe edilerek sabitlenmiştir. Plak daha sonra 125 µL %1 kristal viyole (CV) ile boyanmış ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Fazla kristal viyole distile su ile durulanmış ve kuruması için ortam sıcaklığında bırakılmıştır. Kuyucuklara 125 µL %80 (v/v) etanol ve %20 (v/v) aseton karışımı eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD) bir plak okuyucu kullanılarak 595 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Optik yoğunluk sınır değerini (OD_c) belirlemek için steril LB broth ortamı içeren bir negatif kontrol kullanılmıştır. Biyofilm oluşumu analiz edilmiş ve kristal viyolette tutunan bakterilerin absorbansına göre kategorize edilmiştir. Böylece, ODs ≤ OD_c biyofilm oluşturmayanlar; OD_c < ODs ≤ 2 × OD_c zayıf biyofilm oluşturanlar; OD_c < ODs ≤ 4 × OD_c orta derecede biyofilm oluşturanlar ve 4 × OD_c < ODs güçlü biyofilm oluşturanlar olarak gruplandırılmıştır. OD_c negatif kontrolün ortalama OD₅₉₅'ini + (negatif kontrolün 3× standart sapması (SD)) ve ODs numunelerin OD₅₉₅'ini temsil etmiştir (Stepanović ve ark., 2007).

3.2.8. Bakteriyofajın *P. aeruginosa* Biyofilmleri Üzerindeki Etkisi

Fajların biyofilmi önleme ve yok etme kapasitesi değerlendirilmiştir. Biyofilm eradikasyonu için, gecelik kültür LB broth besiyeri ile 1:100 oranında seyreltilmiş ve ardından süspansiyonun 200 µL'si 96 kuyucuklu plaka inoküle edilmiştir. Planktonik hücreler 37°C'de 24 saatlik bir inkübasyon süresinin ardından uzaklaştırılmış ve biyofilme 200 µL faj (10¹⁰ PFU/mL) eklenmiştir. Plak gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından, kuyucuklar PBS ile 3 kez durulanmış ve biyofilm oluşumu kristal viyole boyama testi ile ölçülmüştür.

Fajın biyofilm oluşumunu engelleme kabiliyeti de araştırılmıştır. Başlangıçta, 20 µL faj (10¹⁰ PFU/mL) gecelik kültüre (1:100 dilüsyon) eklenmiştir. Pozitif kontrol için, seçilen bakterilerin 200 µL'sine 20 µL PBS eklenmiştir. Ayrıca, negatif kontrol olarak 200 µL taze LB'ye 20 µL PBS eklenmiştir. 96 kuyucuklu plak gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiş ve biyofilm oluşumu yukarıda belirtildiği şekilde ölçülmüştür (Ali ve ark., 2023).

3.2.9. *P. aeruginosa* Biyofilmlerine Karşı N-Asetil Sistein

Bir gecelik kültürler LB broth besiyeri ile seyreltilmiş (1:100) ve ardından süspansiyonun 200 µL'si 96 kuyucuklu plaka inoküle edilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra planktonik hücreler uzaklaştırılmış ve biyofilm sırasıyla 10 mg/ml ve 20 mg/ml NAC 200 µL'si ile muamele edilmiştir. Plaklar gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Ardından, kuyucuklar PBS ile 3 kez durulanmış ve biyofilm oluşumu kristal viyole boyama testi ile ölçülmüştür (Zhao ve Liu, 2010).

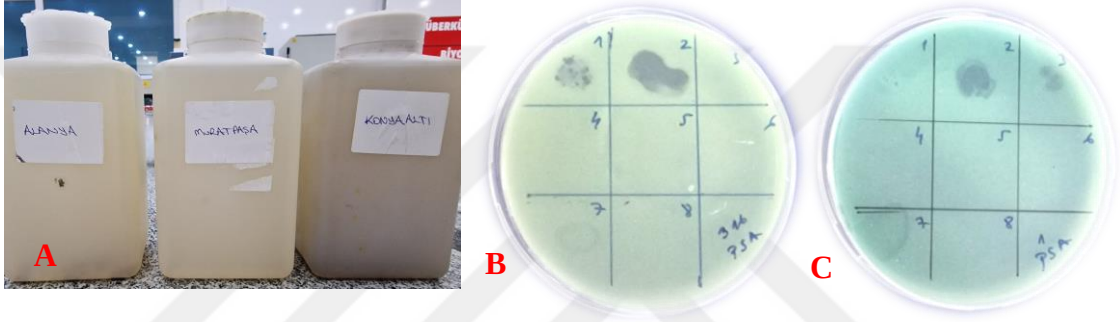
3.2.10. *P. aeruginosa* Biyofilmlerine Karşı Bakteriyofajlar ve N-Asetil Sistein

Ayrıca, NAC (10 mg/ml ve 20 mg/ml) ve fajın birlikte uygulanmasının *P. aeruginosa* biyofilmine karşı tedavi potansiyeli üzerindeki etkisi araştırılmıştır. NAC ve fajların ayrı ayrı etkinliğini belirledikten sonra, birlikte kullanım modelleri test edilmiştir. Bir gecelik kültürler LB broth besiyeri ile seyreltilmiş (1:100) ve ardından süspansiyonun 200 µL'si 96 kuyucuklu plaka inoküle edilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra planktonik hücreler uzaklaştırılmış ve biyofilm 100 µL NAC (10mg/ml ve 20mg/ml) ve 100 µL faj (10¹⁰ PFU/mL) ile muamele edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Bakteriyofajların İzolasyonu

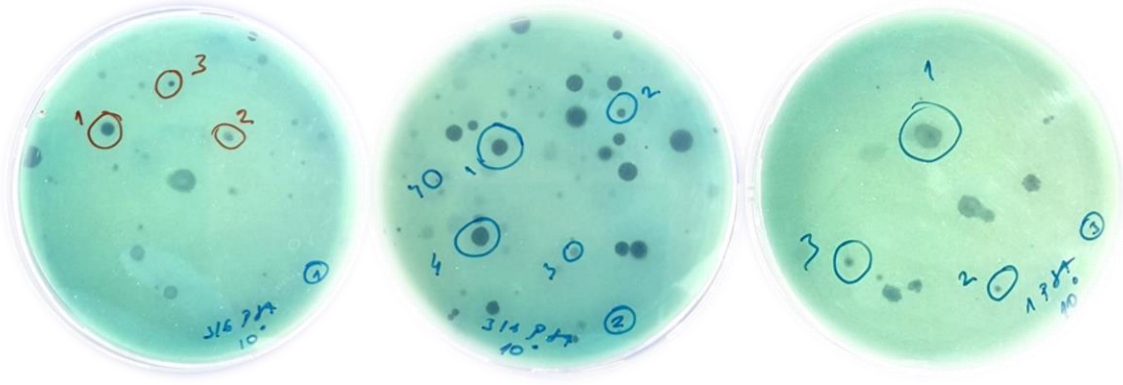
Bu çalışmada, Antalya'nın 3 farklı bölgesinden alınan arıtılmamış atık su örnekleri bakteriyofaj izolasyonu için kullanılmıştır. Örnekler santrifüj edilmiş, filtrelenmiş ve sırasıyla 1-Alanya, 2-Muratpaşa ve 3-Konyaaltı olarak işaretlenmiştir.



Şekil 4.1. Çevresel Örneklerden Bakteriyofaj İzolasyonu. A) Antalya Su ve Atıksu İdaresi Genel Müdürlüğü tarafından toplanan ve teslim edilen numuneler. B) KF hastasından elde edilen konak *P. aeruginosa* 316Pa izolatına karşı faj varlığının doğrulanması için spot test (kaynak 1 ve 2'de lizis-pozitif plak). C) KF hastasından izole edilen *P. aeruginosa* 1Pa'a karşı faj varlığının doğrulanması için spot test (kaynak 2 ve 3'te lizis-pozitif plak).

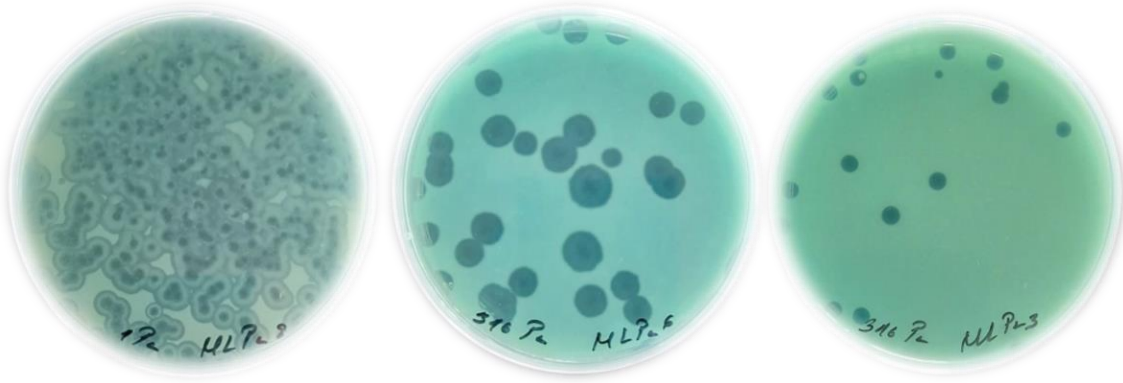
4.1.1. İzole Edilmiş Bakteriyofajların Saflaştırılması

P. aeruginosa bakteriyofajlarını saflaştırmak için, faj varlığının tespit edildiği kaynağın filtrelenmesi ile elde edilen faj çözeltilerinden hazırlanan seri dilüsyonlar ve konak bakteri olarak seçilen *P. aeruginosa* 316Pa ve *P. aeruginosa* 1Pa kullanılmıştır. Tek plak izolasyonu ikili agar kaplama tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Morfolojilerine göre seçilen farklı faj plakları

Şekil 4.2'de gösterildiği gibi oluşturulan faj plakları steril kesilmiş pipet ucu ile petri kabından alınan indikatör konakları ile inkübe edilmiştir. Faj plaklarının saflaştırıldığından en iyi şekilde emin olmak için konak bakteri yeniden enfekte edilmiş ve tek bir plak morfolojisi elde etmek için plak saflaştırma işlemi 4 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen fajlar sırasıyla MLPa1 ila MLPa11 olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.3. Tek plak izolasyon yöntemi ile saflaştırılan bakteriyofajların görüntüleri

4.1.2. Faj Titresi Hesaplama

İzole edilen ve plak morfolojilerine göre saflaştırılan *P. aeruginosa* bakteriyofajlarının titreleri ikili agar kaplama yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Numunenin her mililitresindeki bakteriyofaj sayısı, 4. tek plak saflaştırması ile elde edilen saf faj filtratlarının seri dilüsyonları ile indikatör bakterilerin inkübasyonu ile oluşan gözle

görülebilen berrak plakların sayısı sayılarak hesaplanmış ve sonuçlar plak oluşturma birimi (pfu/ml) olarak verilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Plak morfolojisine göre saflaştırılmış fajların titre hesaplaması

Bakteriyofaj	İndikatör Bakteri	Plak Oluşturma Birimi (pfu/ml)
MLPa1	316Pa	2.4×10^{19}
MLPa2	316Pa	6.4×10^{20}
MLPa3	316Pa	5.8×10^{18}
MLPa4	316Pa	1.8×10^{16}
MLPa5	316Pa	9.2×10^{15}
MLPa6	316Pa	4.4×10^{18}
MLPa7	316Pa	1×10^{15}
MLPa8	1Pa	6.6×10^{16}
MLPa9	1Pa	1×10^{17}
MLPa10	1Pa	7×10^{21}
MLPa11	1Pa	5×10^{21}

4.2. Saflaştırılmış Fajların Klinik *P. aeruginosa* İzolatları Üzerindeki Litik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Toplamda, plak morfolojisine göre çevresel örneklerden saflaştırılan 11 faj, KF hastalarından elde edilen 36 klinik *P. aeruginosa* izolatına karşı test edilmiş ve bu fajların 32/34 (%94,11) *P. aeruginosa* izolatına karşı etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, fajların litik etki spektrumu MLPa1 için 19/34 (%55.88), MLPa2 için 22/34 (%64.70), MLPa3 için 20/34 (%58.82), MLPa4 için 20/34 (%58.82), MLPa5 için 23/34 (%67.64), MLPa5 için 20/34 (%58,82), MLPa6 için 20/34 (%58,82), MLPa7 için 22/34 (%64,70), MLPa8 için 22/34 (%64,70), MLPa9 için 17/34 (%50), MLPa10 için 23/34 (%67,64) ve MLPa11 için 23/34 (%67,64)'dir.

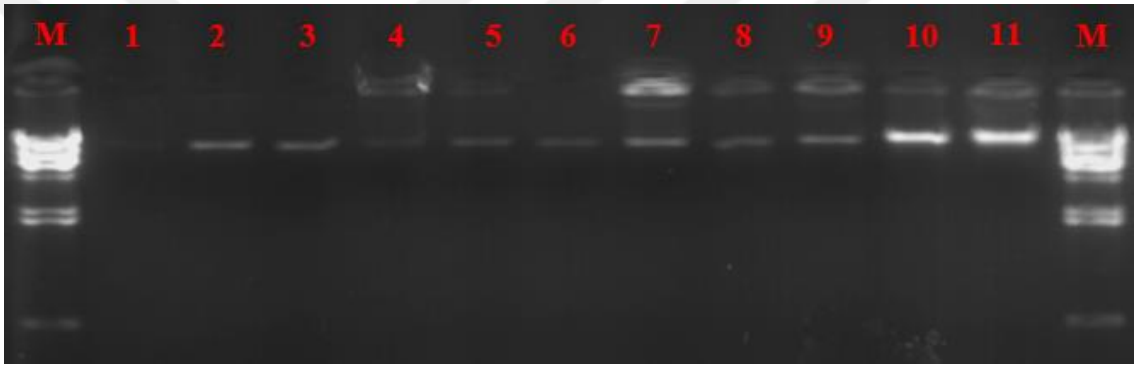
Tablo 4.2. KF hastalarından izole edilen klinik *P. aeruginosa* izolatlarında bakteriyofajların lizis etkinliği

Klinik KF <i>P. aeruginosa</i> İzolatları	Bakteriyofajlar										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4185	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
17/2410	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++
3930	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
19/213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6641	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
19/2055	++	++	++	++	++	++	-	-	-	++	++
6642	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
4040	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
8349	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++
18/6501	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++
1142921	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
17/2355	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
457	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
912405	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
18/1960	+	-	+	++	++	++	++	++	++	+	+
1516	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-
19/2053	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
100416372	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
8720	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
1905	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++
4389	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++
5030	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
1158	++	++	++	++	++	++	-	-	-	++	++
4455/21	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
17/2596	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
5367	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
19/1680	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
19/2152	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++
1564	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5368	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
19/2405	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4092	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	++
18/3799	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Konak- 316 Pa	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Konak- 1 Pa	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

4.3. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu

4.3.1. Bakteriyofajlardan Total DNA İzolasyonu

Plak morfolojilerine göre saflaştırılan 11 bakteriyofajın (MLPa1, MLPa2, MLPa3, MLPa4, MLPa5, MLPa6, MLPa7, MLPa8, MLPa9, MLPa10 ve MLPa11) peletlerini elde etmek için uzun süreli yüksek hızlı santrifüj kullanılmıştır. Konsantre faj peletlerinden DNA izolasyonu daha sonra fenol-kloroform yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve DNA'lar jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görselleştirilmiştir (Şekil 4.4).

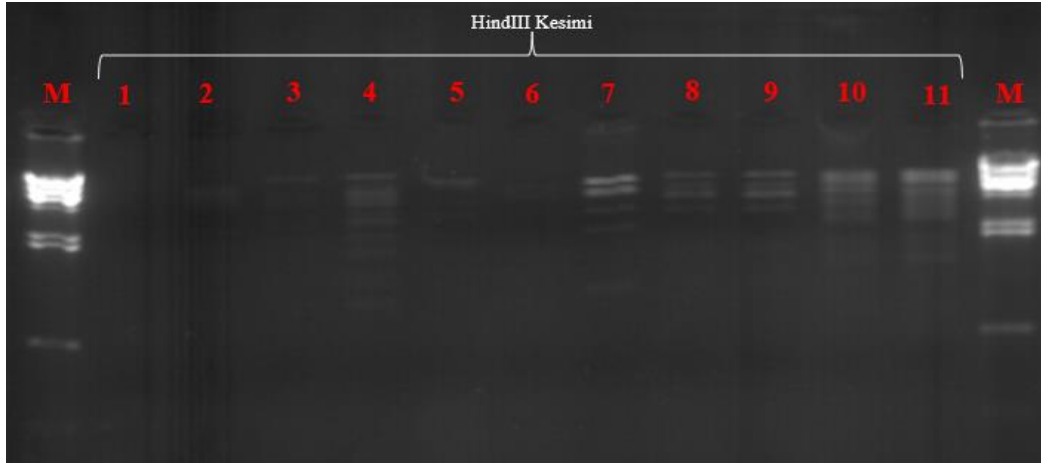


Şekil 4.4. Genomik faj DNA izolasyonunun jel görüntüsü. (M): lambda DNA/HindIII marker; (1-11): Plak morfolojilerine göre saflaştırılmış bakteriyofajların genomik DNA'sı (sırasıyla MLPa1 ila MLPa11).

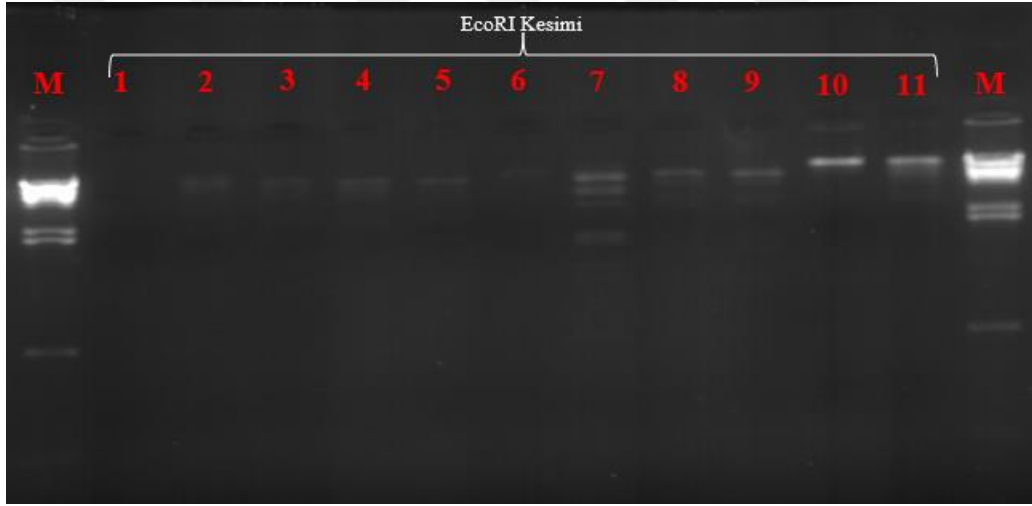
** MLPa1 fajından izole edilen DNA konsantrasyonu düşük bulunmuştur.

4.3.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

İzole edilen tüm faj DNA'ları HindIII ve EcoRI enzimleriyle kesilerek jel elektroforezinde görüntülenmiş ve fajlar restriksiyon profillerine göre tanımlanmıştır (Şekil 4.5, Şekil 4.6).



Şekil 4.5. HindIII enzimi ile kesim



Şekil 4.6. EcoRI enzimi ile kesim

Restriksiyon profilleri belirlenen bakteriyofajlar oluşturdıkları fragmanlara göre gruplandırılmıştır. Bu gruplandırma işlemi sonucunda moleküler olarak farklı 4 grup tespit edilmiştir.

1. Grup: MLPa3, MLPa4, MLPa5

2. Grup: MLPa7

3. Grup: MLPa8, MLPa9

4. Grup: MLPa10, MLPa11

5. Grup: MLPa1, MLPa2, MLPa6- DNA konsantrasyonu düşük bulunmuştur.

Plak morfolojisi ve etki spektrumu açısından MLPa10 fajı ileri çalışmalar için seçilmiş ve ileri genotipik ve fenotipik çalışmalar bu faj ile gerçekleştirilmiştir.

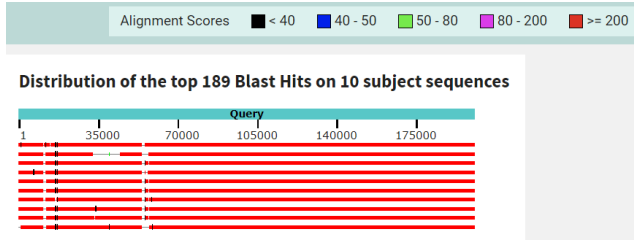
4.3.3. Bakteriyofajın Tüm Genom Analizi

- MLPa10 fajı, restriksiyon profilleri ve KF hastalarından elde edilen klinik *P. aeruginosa* izolatları üzerindeki en yüksek litik etkisi nedeniyle genom analizi için seçilmiştir.

MLPa10 faj genom büyüklüğü 280674 bp olup G+C içeriği %36,81'dir. Genomda 360 açık okuma çerçevesi (ORF) ve 6 tRNA kodlayan gen tanımlanmıştır. ORF'lerin 243'ü işlevi bilinmeyen proteinler olarak tanımlanmış ve ORF'lerin 34'ü varsayımsal proteinler olarak tanımlanmıştır. Viryon yapısal proteinlerinin 29'u tanımlanmış, 3 faj kuyruğu ve 9 baş yapısal proteini tanımlanmıştır. Altı protein DNA paketlemesinde ve 29 protein replikasyonda rol oynamaktadır. Yedi protein lizis ile ilgilidir. Treonin (TGT), Asparajin (GTT), Aspartat (GTC), Metiyonin (CAT), Prolin (TGG) ve Lösin (TAA) kodlayan altı tRNA tanımlanmıştır.

Analiz sadece MLPa10 fajının nükleotid uzunluğu dağılımını incelemekle kalmamış, aynı zamanda taksonomik sınıflandırma, öngörülen yaşam tarzları ve potansiyel konak organizmalar dahil olmak üzere biyolojik özelliklerini de araştırmıştır. Örneğin, MLPa10 fajının virülen bir yaşam tarzına sahip olduğu belirlenmiş, Pseudomonata filumu potansiyel konakçı organizmalar olarak belirtilirken, taksonomik olarak Caudoviricetes altında sınıflandırılmıştır. Ayrıca, kapsamlı ve derinlemesine biyoinformatik analizlere rağmen, MLPa10 faj genomunda virülans faktörler, antimikrobiyal direnç ve CRISPR Array genlerine dair hiçbir bulgu tespit edilmemiştir.

MLPa10 faj genomuna en benzer genomları belirlemek için NCBI hizalama arama motoru aracı olan BLAST kullanılmıştır. Yüksek benzerlik ve sorgu kapsamı gösteren fajlar belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda MLPa10 fajı, *Pseudomonas* fajı P7, tam genomu (GenBank: MZ444140.1) ile %98,82 benzerlik göstermiştir (Şekil 4.7).



Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

10

☒ select all 10 sequences selected

[GenBank](#)

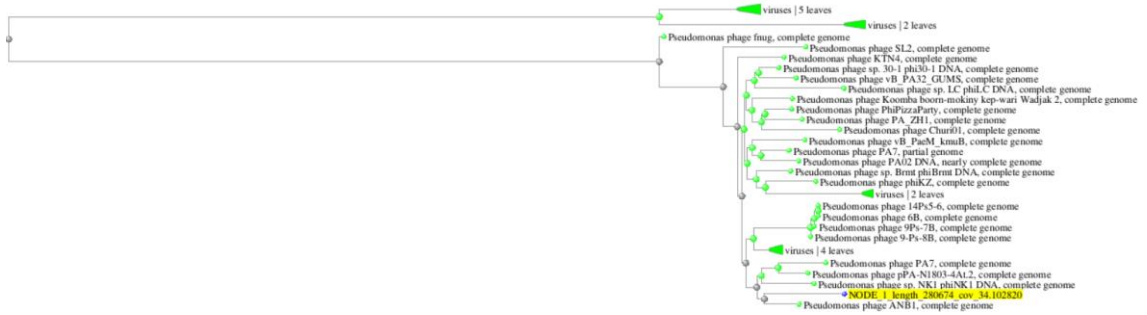
[Graphics](#)

[Distance tree of results](#)

[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Pseudomonas phage PA7, complete genome	Pseudomonas phage PA7	2.575e+05	3.469e+05	98%	0.0	98.82%	282378	MZ444140.1
☒	Pseudomonas phage PA7, partial genome	Pseudomonas phage PA7	2.528e+05	3.244e+05	92%	0.0	98.57%	266743	NC_042060.1
☒	Pseudomonas phage PA02 DNA, nearly complete genome	Pseudomonas phage PA02	2.524e+05	3.469e+05	98%	0.0	98.64%	279095	AP019418.1
☒	Pseudomonas phage vB_PaeM_kmuB, complete genome	Pseudomonas phage vB_PaeM_kmuB	2.521e+05	3.447e+05	98%	0.0	98.39%	266592	MW057919.1
☒	Pseudomonas phage 14Ps5-6, complete genome	Pseudomonas phage 14Ps5-6	2.517e+05	3.463e+05	98%	0.0	98.55%	277590	OR608736.1
☒	Pseudomonas phage 6B, complete genome	Pseudomonas phage 6B	2.517e+05	3.463e+05	98%	0.0	98.55%	277851	OR608733.1
☒	Pseudomonas phage sp. NK1 phiNK1 DNA, complete genome	Pseudomonas phage sp. NK1	2.517e+05	3.490e+05	98%	0.0	98.74%	278676	LC727701.1
☒	Pseudomonas phage 9-Ps-8B, complete genome	Pseudomonas phage 9-Ps-8B	2.517e+05	3.464e+05	98%	0.0	98.55%	277851	OR608734.1
☒	Pseudomonas phage 9Ps-7B, complete genome	Pseudomonas phage 9Ps-7B	2.517e+05	3.458e+05	98%	0.0	98.55%	277488	OR608735.1
☒	Pseudomonas phage sp. Brmt phiBrmt DNA, complete genome	Pseudomonas phage sp. Brmt	2.494e+05	3.429e+05	97%	0.0	98.45%	278203	LC727695.1

Şekil 4.7. MLPa10 litik bakteriyofaj genomunun BLAST sorgusu



Şekil 4.8. MLPa10 faj genomu için sonuçların ağacı

4.4. Konak Aralığı Analizi

MLPa10 fajının *P. aeruginosa* haricindeki konak spektrumunu belirlemek için KF hastalarından izole edilen isolatlar dışında 10 ATCC suşu (*Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 29213, *Staphylococcus aureus* 25922, *Enterococcus faecalis* 29212, *Acinetobacter baumannii* 19606, *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Escherichia coli* 25922, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 43300, *Staphylococcus epidermidis* 12228, *Streptococcus pyogenes* 19615) ve Yoğun Bakım

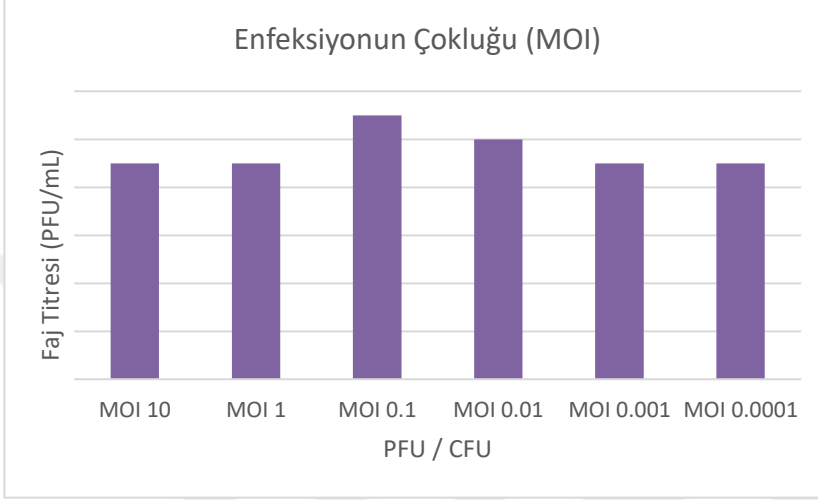
Ünitesi hastalarından izole edilen 10 klinik *P. aeruginosa* izolatları kullanılmıştır (Tablo 4.3). Tablo 4.3'te görüldüğü gibi, MLPa10 fajı homolog konağı dışında hiçbir bakteriye karşı litik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3. MLPa10 fajının konak aralığı analizi

Bakteri	Referans Kodu	MLPa10 Fajı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25922	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	ATCC 43300	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 1564083	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 2281065	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 2219055	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 2209214	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 15447	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 2116203	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 1305597	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 2394303	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 1945204	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik İzolat - 2361728	-

4.4.1. Optimal MOI Hesaplaması

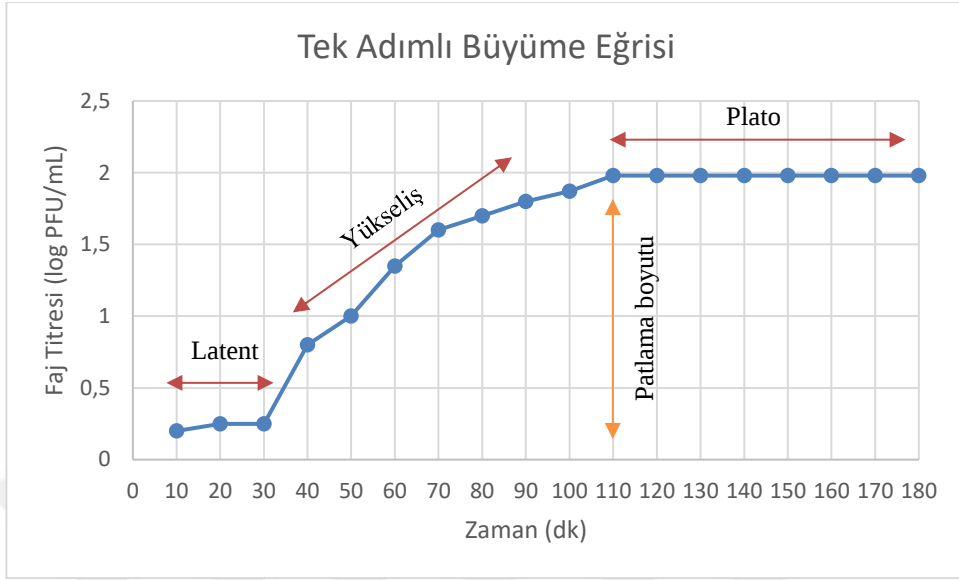
MLPa10 fajı için 0,0001-10 aralığındaki MOI değerleri test edilmiş ve MLPa10 fajı için optimum MOI 0,1 olarak bulunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. MLPa10 fajı için optimal MOI

4.4.2. Tek Adımlı Büyüme Eğrisi

Bir faj enfeksiyon sürecinin farklı aşamalarını karakterize etmek için tek adımlı büyüme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Enfeksiyondan sonra latent dönem ve patlama boyutu belirlenmiştir (Şekil 4.10). MLPa10'un latent ve patlama süreleri sırasıyla 30 dakika ve 40 dakikada ölçülmüş ve patlama boyutu 89 PFU/enfekte hücre olarak belirlenmiştir.

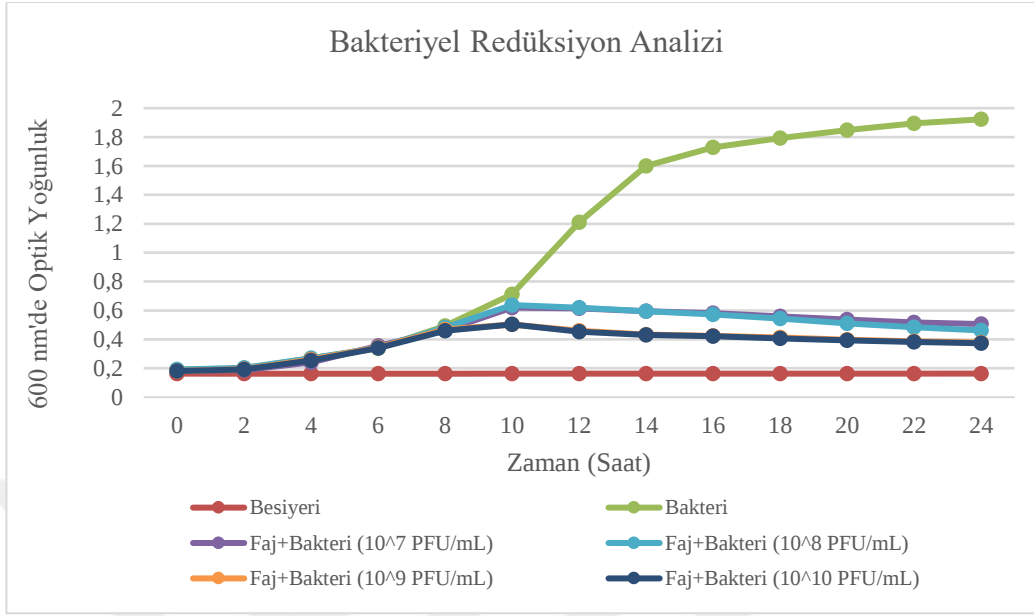


Şekil 4.10. MLPa10 fajının Tek Adımlı Büyüme Eğrisi

4.4.3. Bakteriyel Redüksiyon Analizi

Bakteriler 24 saat boyunca çeşitli titrelerde fajlarla enfekte edilerek bakteri büyümesindeki azalma belirlenmiştir. Optik yoğunluk (OD_{600}) değişimleri kontrol kültürü (faj içermeyen) ile karşılaştırılmıştır. Değerlendirilen tüm faj titreleri bakterilerin azaldığına dair kanıtlar göstermiştir, ancak en önemli azalma daha düşük PFU/mL'ye kıyasla daha yüksek faj titrelerinde görülmüştür. İnkübasyonun ilk sekiz saati boyunca bakteri (pozitif kontrol) ve tedavi grubu (faj + bakteri) arasında gözle görülür bir fark olmamıştır. Sekiz saatlik inkübasyondan sonra tedavi gruplarında (faj + bakteri) önemli bir düşüş olmuştur.

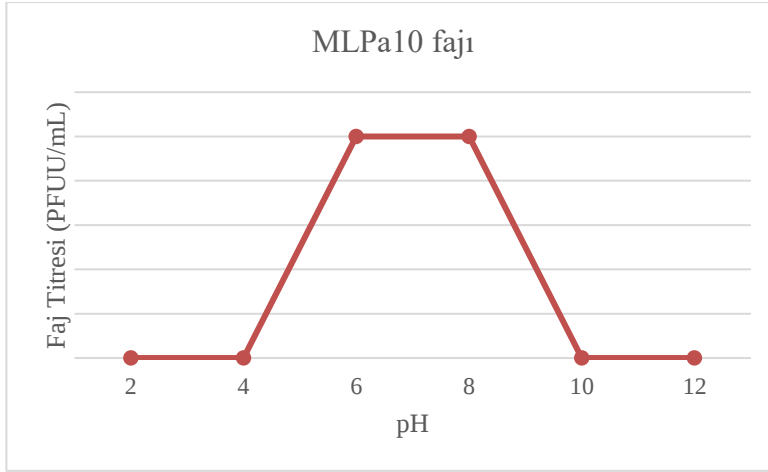
Değerlendirilen tüm faj titreleri OD_{600} 'de kontrole kıyasla düşüş göstermiştir. İki MOI'de (100 ve 10) maksimum düşüş olmuştur. MOI'de (100 ve 10) 10. saatte 1,212'den 0,453'e önemli bir düşüş gözlenmiş ve bu düşüş 16 saat boyunca devam etmiştir (Şekil 4.11).



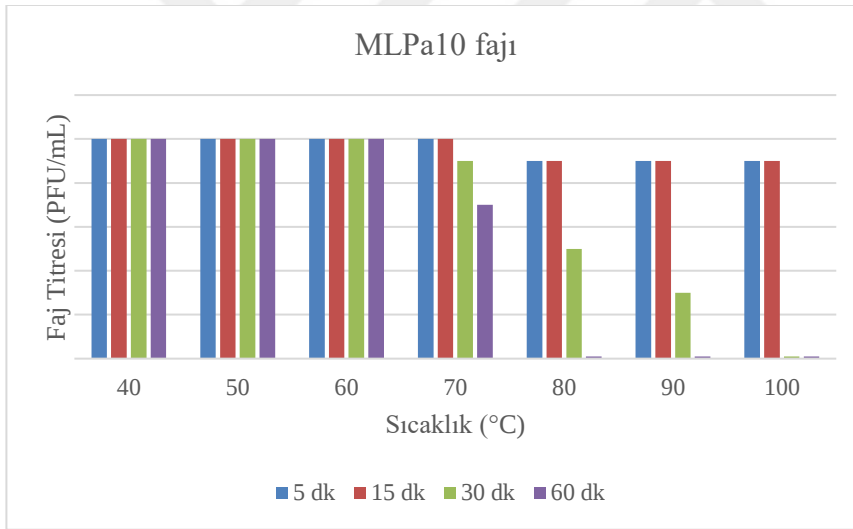
Şekil 4.11. MLPa10 fajının bakteriyel redüksiyon sonucu

4.4.4. Bakteriyofajın Termal ve pH Stabilitesi

MLPa10 fajının stabilitesi geniş bir pH ve sıcaklık aralığında değerlendirilmiştir. Faj pH 6 ve pH 8'de stabil iken, faj aktivitesi sırasıyla pH 2, 4, 10 ve 12'de tamamen azalmıştır (Şekil 4.12). Ayrıca, fajlar 5, 15, 30 ve 60 dakika boyunca çeşitli sıcaklık aralıklarında (40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C ve 100°C) inkübe edilmiştir. Faj 1 saat boyunca 40, 50 ve 60°C'de stabil kalmıştır. 70°C'de, faj ilk 30 dakika boyunca stabil kalmıştır, ancak 60 dakikada bir düşüş meydana gelmiştir. 80°C ve 90°C'de, faj ilk 15 dakika boyunca stabil kalmıştır; 30 dakika ve 60 dakikada faj titresinde bir düşüş gözlenmiştir; hem 80°C hem de 90°C'de faj aktivitesi gözlenmemiştir. Son olarak, 100°C'de faj 5 ve 15 dakika boyunca stabil kalmıştır, ancak 30 ve 60 dakikalarda tamamen inaktivasyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. MLPa10 fajının pH stabilitesi



Şekil 4.13. MLPa10 fajının termal stabilitesi

4.5. Klinik KF *P. aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı

Broth mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre, KF *P. aeruginosa* izolatlarının %61,1'i levofloksasine duyarlı ve %38,9'u levofloksasine dirençlidir.

MİK değerleri 1 izolat için 0,03125 µg/ml, 1 izolat için 0,0625 µg/ml, 1 izolat için 0,125 µg/ml, 4 izolat için 0,25 µg/ml, 10 izolat için 0,5 µg/ml, 5 izolat için 1 µg/ml, 6 izolat için 2 µg/ml ve 8 izolat için >2 µg/ml'dir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Planktonik KF *P. aeruginosa* izolatlarının MİK değerleri

KF <i>P. aeruginosa</i> İzolatları	MİK (µg/ml)	İzolat Sayısı
Levofloksasine Duyarlı (n=22)	0.03125	1
	0.0625	1
	0.125	1
	0.25	4
	0.5	10
Levofloksasine Dirençli (n=14)	1	5
	2	6
	>2	8

4.5.1. Klinik KF *P. aeruginosa* İzolatlarının Biyofilm Oluşumu

KF *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri, negatif kontrolün OD değerleriyle karşılaştırmalı olarak mikropkaya okuyucuda okunan OD değerlerine göre değerlendirilmiştir (Tablo 4.5). Buna göre, KF *P. aeruginosa* izolatlarının sırasıyla %92,30 ve %7,70'inin zayıf ve orta düzeyde biyofilm üretim kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4.5. Biyofilm oluşumunun belirlenmesi ve sınıflandırılması

Ortalama OD Değeri	Biyofilm Oluşumu
$OD_s \leq OD_c^*$	Yoktur
$OD_c < OD_s \leq 2 \times OD_c$	Zayıf
$OD_c < OD_s \leq 4 \times OD_c$	Orta düzeyde
$4 \times OD_c < OD_s^{**}$	Güçlü

* OD_c, negatif kontrolün ortalama OD₅₉₅'ini + (negatif kontrolün 3×SD'si);

**OD_s, numunelerin OD₅₉₅'ini temsil etmektedir.

Tablo 4.6. KF *P. aeruginosa* İzolatlarının Biyofilm Oluşumu

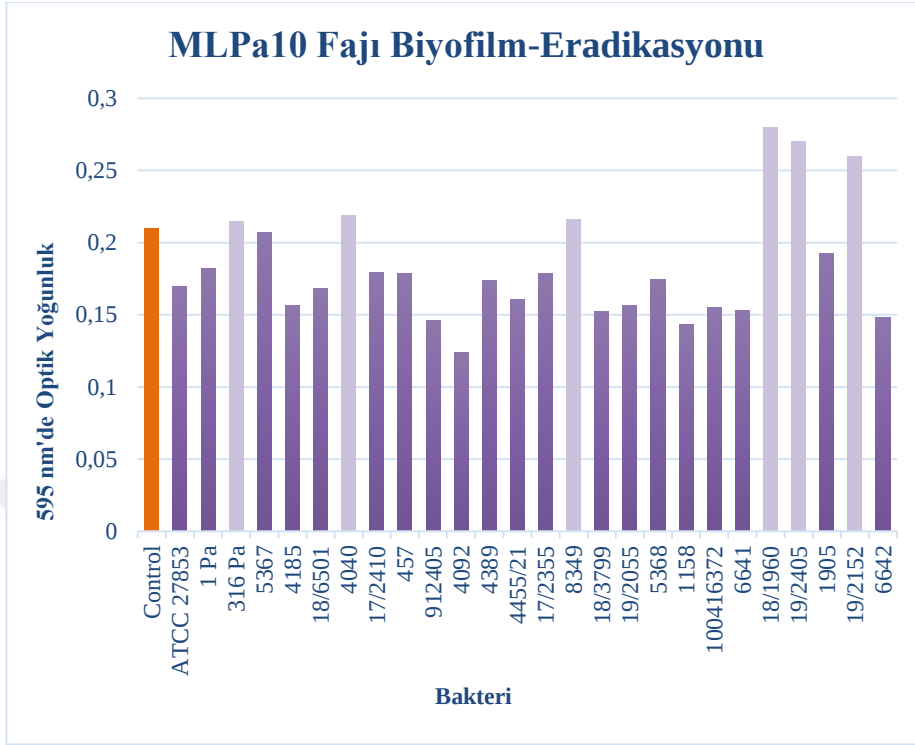
	Biyofilm oluşturmayanlar	Zayıf biyofilm oluşturanlar	Orta derecede biyofilm oluşturanlar	Güçlü biyofilm oluşturanlar
KF <i>P. aeruginosa</i> İzolatları (n=25)	-	23	2	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (n=1)	-	1	-	-

4.5.2. Bakteriyofajın *P. aeruginosa* Biyofilmleri Üzerindeki Etkisi

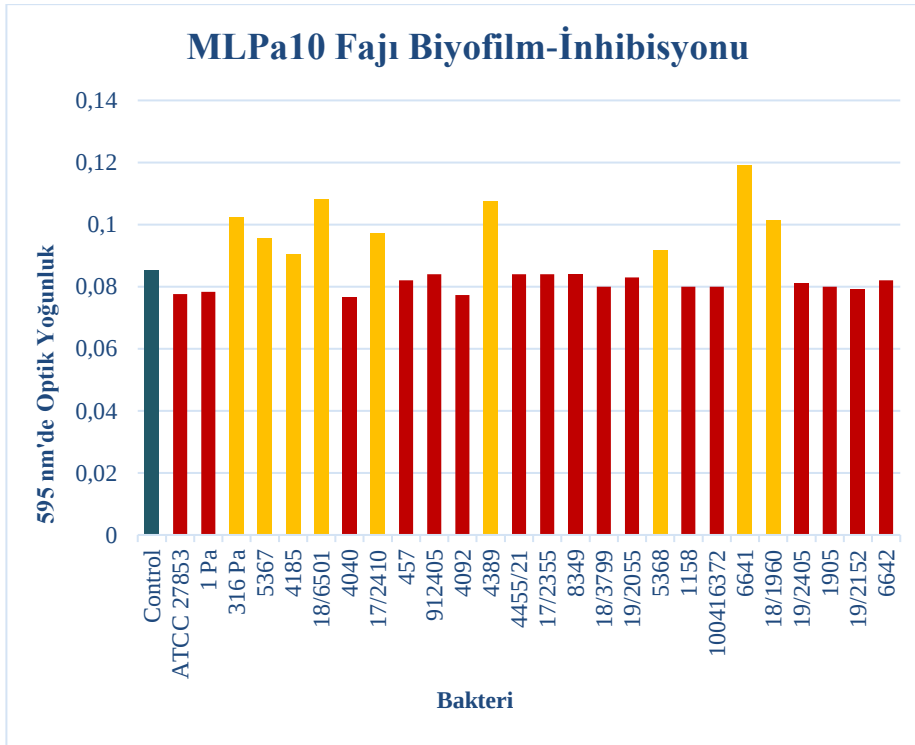
MLPa10 fajının olgun biyofilmler üzerindeki etkisini ve biyofilm oluşumunda istenen inhibisyonu gözlemlemek için hem biyofilm oluşturabilen hem de kullanılan faja pozitif litik yanıt veren KF *P. aeruginosa* izolatları seçilmiştir. Bu amaçla, her iki özellikte de pozitiflik gösteren 25 KF *P. aeruginosa* izolatı kullanılmıştır.

MLPa10 fajının biyofilmi inhibe etme ve ortadan kaldırma kapasitesi değerlendirilmiştir. Verilere göre MLPa10 fajı, KF *P. aeruginosa* izolatları tarafından üretilen olgun biyofilmleri azaltmıştır (Şekil 4.14). MLPa10 fajı, 20 izolatta genel olgun biyofilmi ortalama 1,3 kat azaltmıştır. MLPa10 fajı için en yüksek eradikasyon oranı 1,7 kat ile *P. aeruginosa* 4092 izolatında, en düşük ise 1,05 kat ile *P. aeruginosa* 1905 izolatında gözlenmiştir. MLPa10 fajı 6 izolatta olgun biyofilmleri yok etmemiş, dolayısıyla biyofilm oluşumunda 1,13 kat artışa neden olmuştur.

Biyofilm inhibisyon verileri, MLPa10 fajının 17 izolatta biyofilm oluşumunu ortalama 1,05 kat inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.15). *P. aeruginosa* 4040 izolatı 1,11 kata ulaşarak en yüksek MLPa10 faj inhibisyon oranını sergilemiştir. Bununla birlikte, MLPa10 fajı 9 izolatta biyofilm oluşumunu inhibe etmemiş, dolayısıyla biyofilm oluşumunda 1,2 kat artışa neden olmuştur.



Şekil 4.14. MLPa10 fajı (10^{10} PFU/mL) ile muamele edilen olgun biyofilmler



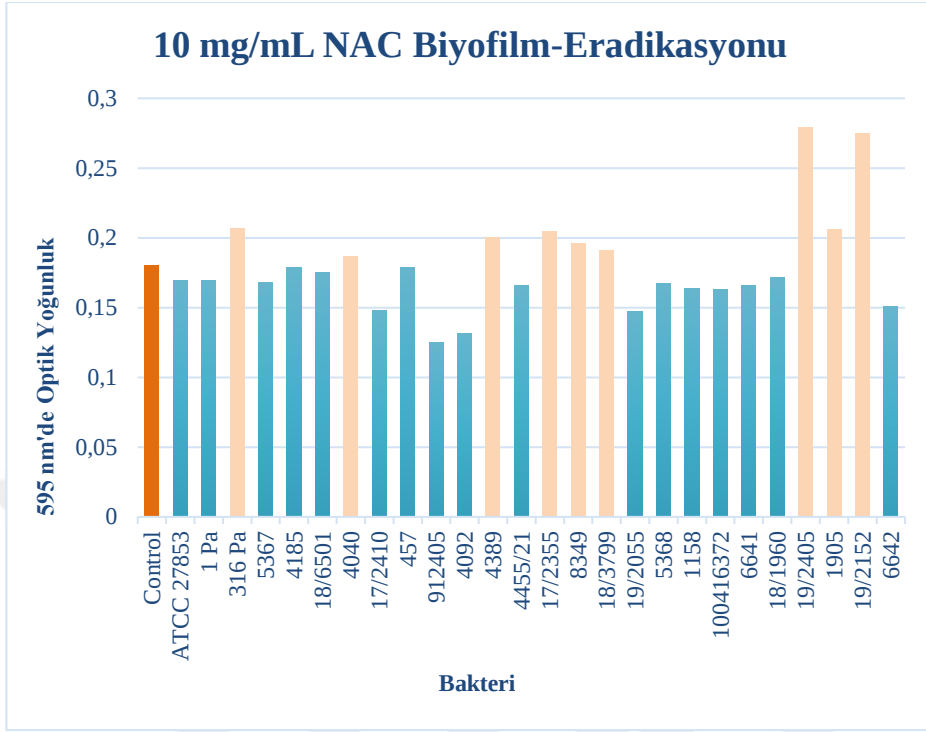
Şekil 4.15. MLPa10 fajı (10^{10} PFU/mL) ile biyofilm inhibisyonu

4.5.3. *P. aeruginosa* Biyofilmlerine Karşı N-Asetil Sistein

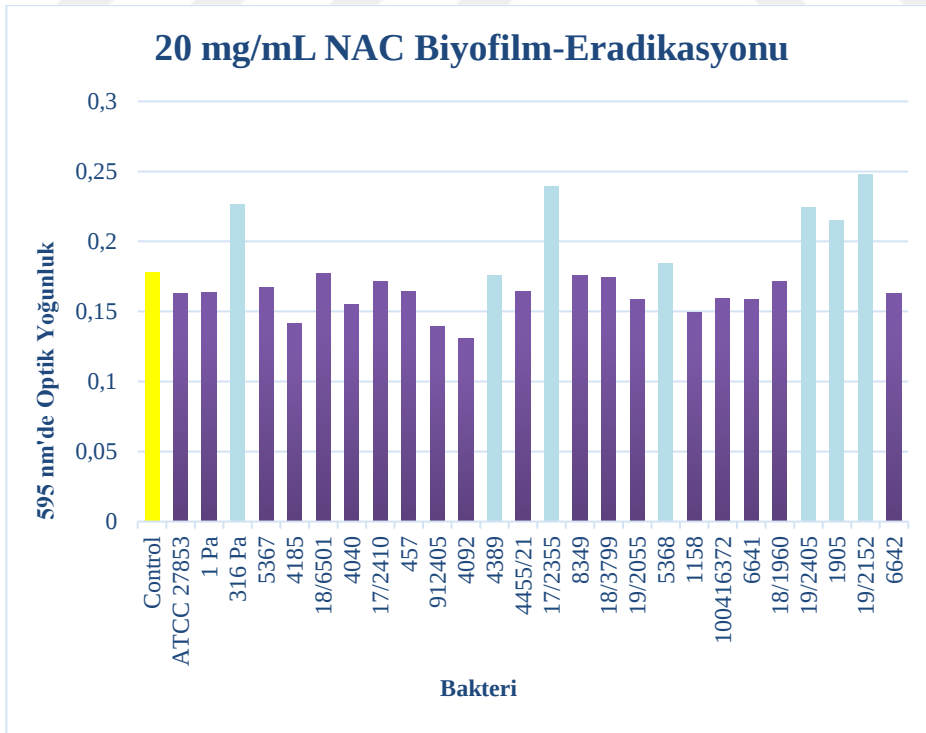
10 mg/ml NAC'ın biyofilmi yok etme kabiliyeti incelenmiştir.

Verilere göre 10 mg/ml NAC, KF *P. aeruginosa* izolatları tarafından üretilen olgun biyofilmleri azaltmıştır (Şekil 4.16). NAC'ın 10 mg/ml'si 17 izolatta toplam olgun biyofilmi ortalama 1,14 kat azaltmıştır. NAC'ın 10 mg/ml'si için en yüksek eradikasyon oranı 1,45 kat ile *P. aeruginosa* 912405 izolatında, en düşük ise 1,01 kat ile *P. aeruginosa* 457 izolatında gözlenmiştir. 10 mg/ml NAC, 9 izolatta olgun biyofilmleri ortadan kaldırmamış, dolayısıyla biyofilm oluşumunda 1,19 kat artışa neden olmuştur.

Verilere göre 20 mg/ml NAC, KF *P. aeruginosa* izolatları tarafından üretilen olgun biyofilmleri azaltmıştır (Şekil 4.17). 20 mg/ml NAC, 20 izolatta toplam olgun biyofilmi ortalama 1,12 kat azaltmıştır. NAC'ın 20 mg/ml'si için en yüksek eradikasyon oranı 1,41 kat ile *P. aeruginosa* 19/2152 izolatında, en düşük ise 1,01 kat ile *P. aeruginosa* 18/1960 izolatında gözlenmiştir. NAC'ın 20 mg/ml'si 6 izolatta olgun biyofilmleri ortadan kaldırmamış, dolayısıyla biyofilm oluşumunda 1,26 kat artışa neden olmuştur.



Şekil 4.16. 10 mg/ml N-Asetil Sistein'in KF *P. aeruginosa* izolatlarına karşı etkisi



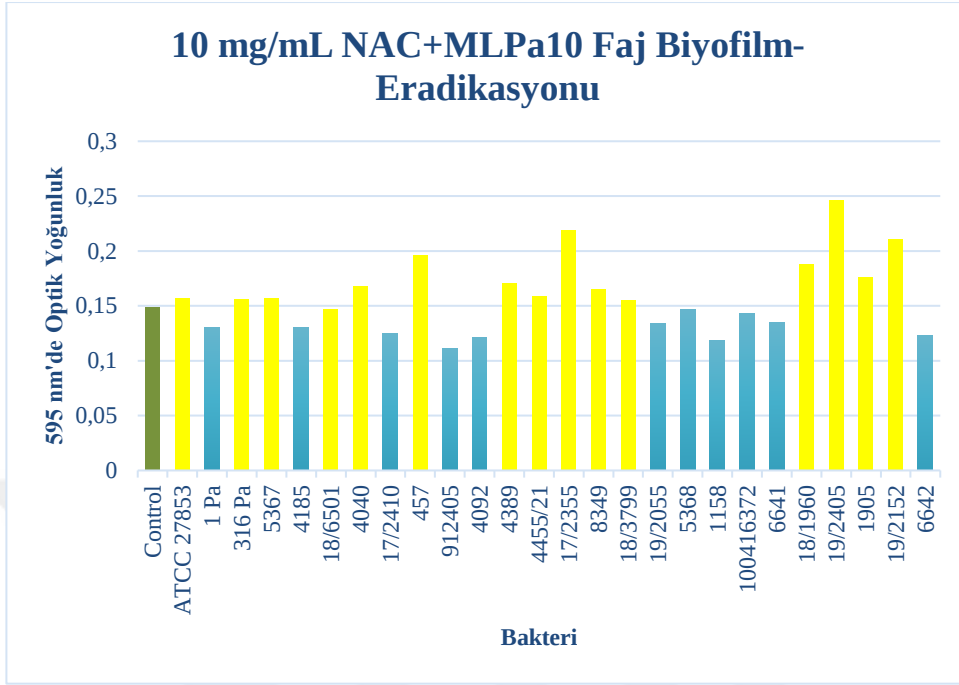
Şekil 4.17. 20 mg/ml N-Asetil Sistein'in KF *P. aeruginosa* izolatlarına karşı etkisi

4.5.4. *P. aeruginosa* Biyofilmlerine Karşı Bakteriyofajlar ve N-Asetil Sistein

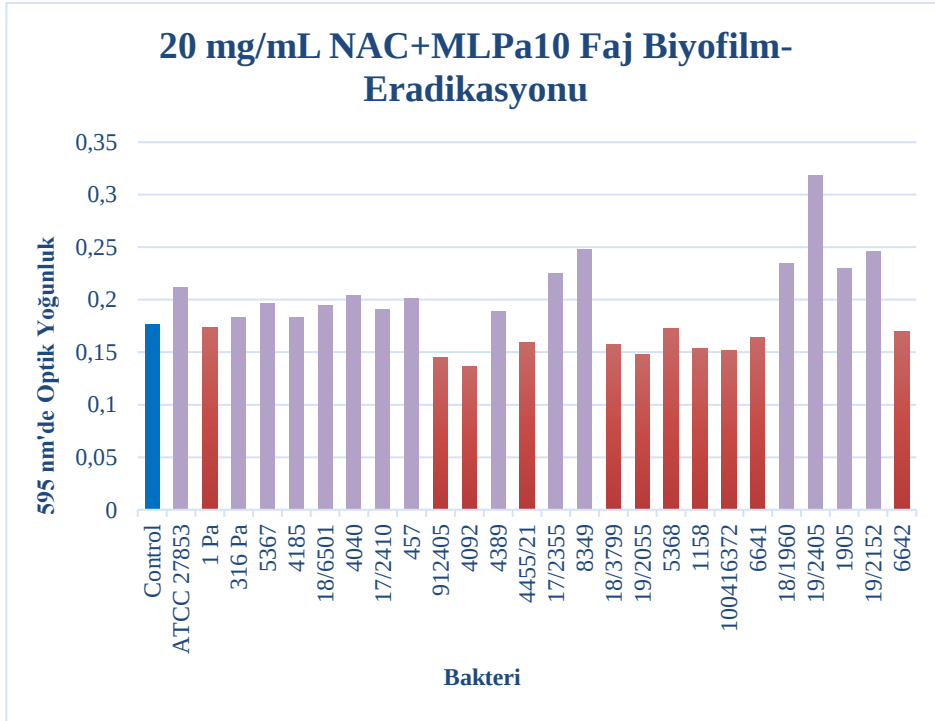
10 mg/ml NAC ve 10^{10} PFU/mL MLPa10 faj titresinin biyofilmi yok etme kabiliyeti değerlendirilmiştir.

10 mg/ml NAC ve 10^{10} PFU/mL MLPa10 faj titresi 11 izolatta toplam olgun biyofilmi ortalama 1,17 kat azaltmıştır. En yüksek eradikasyon oranı 10 mg/ml NAC ve 10^{10} PFU/mL MLPa10 faj titresi için 1,34 kat ile *P. aeruginosa* 912405 izolatında, en düşük ise 1,09 kat ile *P. aeruginosa* 5367 izolatında gözlenmiştir. 10 mg/ml NAC ve 10^{10} PFU/mL MLPa10 faj titresi 15 izolatta olgun biyofilmleri ortadan kaldırmamış, dolayısıyla biyofilm oluşumunda 1,19 kat artışa neden olmuştur.

20 mg/ml NAC ve 10^{10} PFU/mL MLPa10 faj titresi 11 izolatta toplam olgun biyofilmi ortalama 1,14 kat azaltmıştır. En yüksek eradikasyon oranı 20 mg/ml NAC ve 10^{10} PFU/mL MLPa10 faj titresi için 1,29 kat ile *P. aeruginosa* 4092 izolatında, en düşük ise 1,02 kat ile *P. aeruginosa* 1Pa izolatında gözlenmiştir. 20 mg/ml NAC ve 10^{10} PFU/mL MLPa10 faj titresi 15 izolatta olgun biyofilmleri ortadan kaldırmamış, dolayısıyla biyofilm oluşumunda 1,23 kat artışa neden olmuştur.



Şekil 4.18. 10 mg/ml NAC ve MLPa10 fajının (10^{10} PFU/mL) KF *P. aeruginosa* izolatlarına karşı etkisi



Şekil 4.19. 20 mg/ml NAC ve MLPa10 fajının (10^{10} PFU/mL) KF *P. aeruginosa* izolatlarına karşı etkisi

5. TARTIŞMA

Artan AMD tehdidi, küresel halk sağlığı için zorlu bir mücadele teşkil etmektedir. Bu krize katkıda bulunan çeşitli patojenler arasında *P. aeruginosa*, ÇİD geliştirme yeteneği ve kendine özgü virülans faktörleri nedeniyle önemli bir endişe kaynağı olarak öne çıkmaktadır. Antimikrobiyal direncin artmasının başlıca nedenlerinden biri hem sağlık hem de tarım ortamlarında antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanımıdır. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı, bakteri popülasyonları üzerinde seçici bir baskı oluşturarak dirençli suşların hayatta kalmasını ve çoğalmasını desteklemiştir. *P. aeruginosa*, doğasında var olan direnç mekanizmaları ve adaptasyon kabiliyeti ile antibiyotik maruziyetine yanıt olarak direncin hızlı evrimine örnek teşkil etmektedir. Sonuç olarak, *P. aeruginosa*'nın ÇİD suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar klinisyenler için önemli zorluklar oluşturmakta, tedavi seçeneklerini sınırlamakta ve olumsuz hasta sonuçlarına katkıda bulunmaktadır (Bassetti ve ark., 2018) .

Biyofilm oluşumu, antibiyotik maruziyetine rağmen bakterilerin varlığını sürdürebileceği koruyucu bir ortam sağlayarak tedavi stratejilerini daha da karmaşık hale getirmektedir. *P. aeruginosa*'nın biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneği, klinik ortamlarda kalıcılığını artırmakta ve hastane enfeksiyonlarının gelişimine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, bakterinin adaptasyon kabiliyeti ve genetik plastisitesi, konak savunmasından kaçmasına ve çoklu antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirmesine olanak tanıyarak enfeksiyon kontrolü ve tedavisi için önemli zorluklar ortaya çıkarmaktadır (Thi ve ark., 2020) .

KF'te anormal mukus, bakterilerin kolonizasyonu ve büyümesi için ideal bir ortam sağlayarak kronik solunum yolu enfeksiyonlarına ve ilerleyici akciğer hasarına yol açmaktadır. KF akciğer hastalığı ile ilişkili çok çeşitli patojenler arasında *P. aeruginosa*, KF hastalarında morbidite ve mortaliteye önemli katkıda bulunan bir etken olarak öne çıkmaktadır. KF hastalarında *P. aeruginosa* enfeksiyonunun edinilmesi, akciğer fonksiyonlarında hızlanan düşüş, şiddetlenen alevlenmelerin sıklığında artış ve beklenen yaşam süresinde azalma ile ilişkili olduğundan akciğer hastalığının ilerlemesinde kritik bir dönüm noktasını temsil etmektedir. Sonuç olarak, *P. aeruginosa*'nın KF hastalarının

hava yollarından eradike edilmesi önemli zorluklar teşkil etmekte ve genellikle agresif ve uzun süreli antibiyotik tedavisi gerektirmektedir (Davies, 2002).

P. aeruginosa'yı enfeksiyonun erken dönemlerinde yok etme çabalarına rağmen, birçok vakada başarılı bir eradikasyon gerçekleştirilememektedir. *P. aeruginosa*'nın KF hava yollarından eradike edilmesinin zorluğuna, bakterinin biyofilmelerde kalıcı olma yeteneği, antibiyotiklere karşı intrinsik direnci ve gelişmiş virülans ve adaptif potansiyele sahip genetik varyantların varlığı dahil olmak üzere çeşitli faktörler katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, KF akciğer hastalığının bozulmuş mukosiliyer klirens, kronik inflamasyon ve doku yeniden şekillenmesi ile karakterize ilerleyici doğası, bakteriyel kolonizasyon ve persistans için elverişli bir ortam yaratmaktadır. KF hastalarında *P. aeruginosa* enfeksiyonunun yönetimi, tekrarlayan enfeksiyon olgusu nedeniyle daha da karmaşıktır. İlk eradikasyonun başarılı olduğu durumlarda bile, *P. aeruginosa* ile yeniden enfeksiyon veya yeniden kolonizasyon yaygındır, tekrarlayan antibiyotik tedavisi gerektirmekte ve akciğer hasarı ve pulmoner fonksiyonda azalma döngüsüne katkıda bulunmaktadır (Döring ve ark., 2012) .

KF hastalarından elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının kullanılması, bu çalışmanın önemli bir yönünü oluşturmaktadır. Aynı hastalardan elde edilen izolatların çalışmaya dahil edilmesi, KF patolojisinde büyük önem taşıyan bir olgu olan tekrarlayan enfeksiyonların ortaya çıkışının altını çizmektedir. Özellikle, TSA besiyerinde üreme üzerine yeşil pigmentasyon ve *P. aeruginosa* ile ilişkili karakteristik kokunun gözlemlenmesi, bu izolatların fenotipik özellikleri hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Bu çalışmada, KF hastalarından elde edilen toplam 36 *P. aeruginosa* izolatında levofloksasin duyarlılığı araştırılmıştır. KF *P. aeruginosa* izolatının %61,1'i levofloksasine karşı duyarlı iken, geri kalan %38,9'u dirençli olduğu gözlenmiştir. Özellikle, KF *P. aeruginosa* izolatları arasında levofloksasin duyarlılık profillerindeki heterojenliği yansıtan 0.03125 µg/ml ile >2 µg/ml arasında değişen bir MİK değerleri spektrumu gözlenmiştir. Levofloksasine karşı yüksek düzey direncin göstergesi olan ve tedavi etkinliği ve klinik yönetim açısından önemli zorluklar teşkil eden 2 µg/ml'yi aşan MİK değerleri özellikle önemlidir.

Bakteriyofajlar, bakteriyel hücreleri spesifik olarak enfekte eden ve çoğalan, sonuçta parçalanmalarına ve ölümüne yol açan virüslerdir. Geniş bakteri spektrumlarını hedef alan geleneksel antibiyotiklerin aksine, fajlar dar konakçı özgüllüğü sergileyerek yararlı mikrobiyotayı korurken patojenik bakterilerin kesin olarak hedeflenmesine izin vermektedir. Bu özgüllük, özellikle solunum yollarındaki mikrobiyal toplulukların dengesini korumanın solunum sağlığını korumak için çok önemli olduğu KF bağlamında avantajlıdır (Düzgüneş ve ark., 2021).

Son yıllarda, geleneksel antibiyotiklerin alternatiflerine duyulan acil ihtiyaç nedeniyle, terapötik ajanlar olarak bakteriyofajlara olan ilgi yeniden canlanmıştır. Faj terapisi, spesifik bakteri suşlarını hedef alma, antibiyotik direnç mekanizmalarının üstesinden gelme ve konak dokulara verilen hasarı en aza indirme gibi çeşitli potansiyel avantajlar sunmaktadır. Dahası, bakteriyofajların *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının ayırt edici özelliği olan biyofilmlere penetre olabilmesi onları özellikle kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlara karşı etkili kılmaktadır (Chegini ve ark., 2020). *P. aeruginosa* kolonizasyonunun yaygın olduğu ve sıklıkla ilerleyici akciğer hastalığına yol açtığı KF bağlamında, bakteriyofaj tedavisi hedefe yönelik ve kişiselleştirilmiş bir tedavi yaklaşımı olarak umut vaat etmektedir. Çalışmalar, fajların *P. aeruginosa* bakteri yükünü azaltmada, akciğer fonksiyonunu iyileştirmede ve KF hastalarında inflamasyonu azaltmada etkinliğini göstermiştir (Law ve ark., 2019; Morello ve ark., 2011). Ayrıca, bakteriyofajların bakteriyel direnç mekanizmalarına yanıt olarak hızla evrilme yeteneği, gelişen antimikrobiyal direnç ortamına ayak uydurabilen dinamik ve uyarlanabilir bir terapötik strateji sağlamaktadır (Hraiech ve ark., 2015).

Arıtılmamış kanalizasyon suyundan bakteriyofajların izolasyonu ve karakterizasyonu, özellikle KF hastalarında *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı faj tedavisinin potansiyelini keşfetmeyi amaçlayan bu çalışmanın önemli bir yönünü temsil etmektedir.

Kanalizasyon suyunun çok çeşitli bakteriyofajları barındırdığı iyi bilinmektedir, bu da mikrobiyal çeşitlilik ve ekolojik nişler açısından zenginliği nedeniyle faj izolasyonu için ideal bir kaynak olmasını sağlamaktadır (Balleste ve ark., 2022).

Bu çalışmada, bir KF hastasından elde edilen iki klinik *P. aeruginosa* izolatu indikatör konak olarak kullanılarak çevresel örneklerden 11 faj (plak morfolojisine göre) izole edilmiştir. İzole edilen bu fajlar, KF hastalarından elde edilen toplam 36 klinik *P. aeruginosa* izolatına karşı umut verici litik aktivite sergilemiş ve 34 izolatın 32'sine (%94,11) karşı kayda değer bir etkinlik gözlemlenmiştir.

MLPa10 fajının genomik dizi analizi ve sonraki deneyler için seçilmesi, terapötik bir aday olarak potansiyelinin altını çizmektedir. MLPa10 fajının dar konakçı özgülüğü göstermesi ve yalnızca homolog konağı olan *P. aeruginosa*'ya karşı litik aktivite sergilemesi, fajların tipik davranışıyla tutarlıdır. Optimal enfeksiyon çokluğunun (MOI) belirlenmesi, faj aracılı bakteriyel azalma için en etkili MOI'nin 0,1 olduğunu ortaya koymuş ve maksimum etkinlik için faj-bakteri oranlarının optimize edilmesinin önemini vurgulamıştır.

MLPa10 fajının daha ileri karakterizasyonu, latent ve patlama süreleri ve patlama boyutu dahil olmak üzere litik aktivitesini yöneten temel parametreleri ortaya çıkarmıştır. Ölçülen 30 dakika ve 40 dakikalık latent ve patlama süreleri ile enfekte hücre başına 89 pfu patlama boyutu, faj replikasyonu ve konakçı lizisinin kinetiği hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca, bakteri redüksiyon deneyi, MLPa10 fajının bakteri sayısını azaltmadaki etkinliğini göstermiş ve daha yüksek faj titreleri bakteri yükünde daha önemli düşüşlere neden olmuştur.

MLPa10 fajının çeşitli pH ve sıcaklık koşulları altında stabilitesinin değerlendirilmesi, fajın depolanması ve uygulanması için kritik parametreleri ortaya çıkarmıştır. Faj, pH 6 ve pH 8'de stabilite göstererek asitlikteki orta düzeydeki dalgalanmalara karşı dirençli olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, pH 2, 4, 10 ve 12'de tamamen inaktivasyon meydana geldi ve faj canlılığı için pH nötrlüğünün korunmasının önemini vurgulamaktadır. Benzer şekilde, sıcaklık stabilitesi deneyleri MLPa10 fajının 60°C'ye kadar olan sıcaklıklarda uzun süre aktif kaldığını ve daha yüksek sıcaklıklarda kademeli inaktivasyon gözlemlendiğini göstermiştir. Özellikle, 70°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda tamamen inaktivasyon meydana gelmiş ve fajın ısı işleme duyarlılığının altı çizilmiştir. Genel olarak, bu çalışmada MLPa10 fajının kapsamlı biyolojik ve genomik

karakterizasyonu, KF hastalarında *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı terapötik bir ajan olarak potansiyeline ilişkin değerli bilgiler sağlamaktadır.

KF *P. aeruginosa* izolatları arasında biyofilm oluşturma kapasitesinin değerlendirilmesi, çoğunluğu zayıf ve daha küçük bir yüzdesi orta olarak sınıflandırılan bir biyofilm oluşturma yetenekleri spektrumunu ortaya çıkarmıştır. MLPa10 bakteriyofajının biyofilmleri inhibe ve eradike etmedeki etkinliğinin değerlendirmesi umut verici sonuçlar vermiş ve KF ile ilişkili enfeksiyonlarda biyofilm parçalayıcı bir ajan olarak potansiyelinin altını çizmiştir.

MLPa10 fajının, izolatların çoğunda olgun biyofilmleri etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiş ve bu oran ortalama 1,3 kat azalma olarak rapor edilmiştir. Bu önemli azalma, fajın KF hastalarında *P. aeruginosa* ile ilişkili kronik enfeksiyonlarla mücadelede kritik bir unsur olan oluşmuş biyofilmleri hedef alma ve bozma kapasitesini vurgulamaktadır. Bununla birlikte, bazı izolatlarında, MLPa10 fajı olgun biyofilmleri ortadan kaldırmada başarısız olmuş ve biyofilm oluşumunda hafif bir artışa neden olmuştur. Bu gözlem, faj tedavisine biyofilm yanıtlarındaki değişkenliğin altını çizmekte ve bazı izolatlarda direnç veya tolerans mekanizmalarının varlığına işaret etmektedir. Ayrıca, MLPa10 fajı biyofilm inhibisyon özellikleri sergilemiş ve izolatların önemli bir kısmında biyofilm oluşumunu azaltmıştır. İnhibisyonun büyüklüğü düşük olsa da bu bulgu MLPa10 fajının biyofilm gelişiminin erken aşamalarına müdahale ederek potansiyel olarak olgun biyofilmlerin oluşmasını ve ardından kolonileşmeyi önleyebileceğini düşündürmektedir.

NAC, *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilmlerle mücadelede potansiyel bir terapötik ajan olarak umut vaat etmektedir. Çeşitli çalışmalar NAC'ın *P. aeruginosa* biyofilmlerini bozmadaki etkinliğini araştırmış ve çok yönlü etki mekanizmalarını ortaya çıkarmıştır (Onger ve ark., 2016; Zhao ve Liu, 2010). NAC'ın, biyofilm gelişimi ve virülans faktörü üretiminin koordinasyonunda yer alan önemli bir düzenleme mekanizması olan quorum algılamaya müdahale ederek biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Lima ve ark., 2023). Ayrıca NAC, biyofilmin ayrılmasını ve dağılmasını teşvik ederek olgun *P. aeruginosa* biyofilmlerini destabilize etme yeteneğini göstermiştir. Bu biyofilm bozma etkisi, NAC'ın biyofilm matrisi içindeki disülfid bağlarını bozma, böylece yapısal bütünlüğünü tehlikeye atma ve bakteri hücrelerinin çevredeki ortama

salınmasını kolaylaştırma yeteneğine bağlanmaktadır. NAC, biyofilmle ilişkili bakterileri parçalayarak *P. aeruginosa*'nın antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılığını artırmakta ve enfeksiyonun daha etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasına olanak sağlamaktadır (Abo-Dya ve ark., 2022; Pedre ve ark., 2021). Ayrıca NAC, *P. aeruginosa* biyofilmi ile ilişkili enfeksiyonların yönetiminde terapötik etkinliğine katkıda bulunabilecek anti-enflamatuar özellikler sergilemektedir. NAC, biyofilm oluşumunun ortaya çıkardığı enflamatuar yanıtı zayıflatarak doku hasarını azaltabilmekte, semptomları hafifletebilmekte ve etkilenen bireylerde klinik sonuçları iyileştirebilmektedir (Guerini, Condorò, ve ark., 2022). Genel olarak, bu çalışmalardan elde edilen bulgular, NAC'nin *P. aeruginosa* biyofilmi ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde umut verici bir yardımcı tedavi olma potansiyelini vurgulamaktadır.

NAC ve MLPa10 bakteriyofajın *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerindeki kombine etkisini araştıran çalışmamızın sonuçları, biyofilm bozma stratejilerinin karmaşıklığı hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Beklentilerin aksine, NAC ve MLPa10 kombinasyonu, varsayıldığı gibi biyofilm bozulmasında sinerjik bir artış sağlamamıştır. Bunun yerine, her bir ajanın tek başına kullanımına kıyasla daha düşük bir eradikasyon oranıyla sonuçlanmıştır.

Bulgular, özellikle biyofilmle ilişkili enfeksiyonlar bağlamında, terapötik ajanlar arasındaki potansiyel sinerjik etkileşimlerin kapsamlı bir şekilde araştırılmasının önemini vurgulamaktadır. Önceki çalışmalar bakteriyofajlar ve antibiyotikler arasındaki sinerjik etkileri ortaya koymuş olsa da (Jo ve ark., 2016; Knezevic ve ark., 2013; Santamaría-Corral ve ark., 2023) bu çalışma bakteriyofaj ve NAC'ın *Pseudomonas* biyofilmleri üzerindeki kombine etkisini araştırmaya yönelik ilk çalışmayı temsil etmektedir.

Beklenen ve gerçek sonuçlar arasında gözlemlenen tutarsızlığa çeşitli faktörler katkıda bulunmuş olabilmektedir. Biyofilm mikroçevresinde NAC ve MLPa10 fajı arasındaki etkileşimin beklendiği kadar elverişli olmaması ve bunun da suboptimal biyofilm bozulmasına yol açması mümkündür. Ayrıca, MLPa10 fajının spesifik özellikleri ve *Pseudomonas* biyofilmleri ile etkileşimi, kombine tedavi rejiminin etkinliğini etkilemiş olabilmektedir.

Pseudomonas biyofilmlerinde NAC ve MLPa10 faj arasındaki etkileşimi yöneten altta yatan mekanizmaları aydınlatmak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Bu, farklı konsantrasyonların, tedavi rejimlerinin ve biyofilm gelişim aşamalarının kombine tedavinin etkinliği üzerindeki etkisinin araştırılmasını içermektedir. Ayrıca, alternatif terapötik stratejilerin araştırılması ve gelişmiş biyofilm parçalama özelliklerine sahip sinerjik kombinasyonların belirlenmesi, biyofilmle ilişkili enfeksiyonların tedavisi için yeni bilgiler sağlayabilecektir.

Sonuç olarak, bu çalışmanın sonuçları başlangıçtaki beklentilerle uyumlu olmasa da, biyofilm bozma stratejilerinin karmaşıklığına ilişkin değerli bilgiler sağlamakta ve terapötik ajanlar arasındaki potansiyel sinerjik etkileşimlere yönelik kapsamlı araştırmalara duyulan ihtiyacın altını çizmektedir. Araştırmacılar, biyofilm oluşumu ve eradikasyonunu yöneten altta yatan mekanizmaları daha iyi anlayarak, gelecekte biyofilmle ilişkili enfeksiyonlarla mücadele için daha etkili tedavi yöntemleri geliştirebilecektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, KF hastasından elde edilen klinik bir *P. aeruginosa* izolatını indikatör konak olarak kullanarak bakteriyofajların kanalizasyondan izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bu bakteriyofajlar, KF hastalarından toplanan toplam 36 klinik *P. aeruginosa* izolatının %94,11'ine karşı kayda değer litik aktivite sergilemiştir. Daha sonra, bakteriyofajlar restriksiyon profiline tabi tutularak oluşturdıkları fragmanlara göre kategorize edilmiştir. Bu süreç, izole edilen bakteriyofajlar arasında dört farklı moleküler grubun varlığını ortaya çıkarmıştır. KF *P. aeruginosa* izolatlarına karşı üstün litik etkinliği nedeniyle tanımlanan MLPa10 fajı, genom karakterizasyonu için seçilmiştir. Tüm genom dizileme analizi, MLPa10 faj genomunun boyutunun 280674 baz çifti olduğunu ve G+C içeriğinin %36,81 olduğunu ortaya koymuştur. Genom içinde 360 açık okuma çerçevesi ve 6 tRNA kodlayan gen tanımlanmıştır. BLAST analizi MLPa10 fajı ile *Pseudomonas* fajı P7 arasında %98,82 oranında önemli bir benzerlik olduğunu göstermiştir. Taksonomik olarak MLPa10 fajı, *Pseudomonata* filumuna ait potansiyel konak organizmalar ile *Caudoviricetes* takımı altında litik bir faj olarak sınıflandırılmıştır. Özellikle, kapsamlı biyoinformatik analizler MLPa10 faj genomu içinde hiçbir virülans faktör, antimikrobiyal direnç geni veya CRISPR Array geni tespit etmemiştir. Burada sunulan MLPa10 fajının kapsamlı biyolojik ve genomik karakterizasyonu, KF *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı terapötik bir ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, MLPa10 fajının biyofilmleri inhibe etme ve ortadan kaldırmadaki etkinliğinin değerlendirilmesi, biyofilm dinamikleri üzerindeki değişken etkisini aydınlatmıştır. MLPa10 fajı birkaç izolatta olgun biyofilmlerde kayda değer bir azalma sergilerken, bazı durumlarda biyofilmleri yok edememesi biyofilm oluşumunda hafif bir artışa yol açmıştır. Ayrıca, 10 mg/ml ve 20 mg/ml konsantrasyonlarda NAC ile 10^{10} PFU/mL MLPa10 faj titresi kombinasyonu karışık sonuçlar göstermiş, bazı izolatlarda biyofilm oluşumunda azalma görülürken diğerlerinde artış görülmüştür. Bu bulgular, faj tedavisi ve biyofilm dinamikleri arasındaki karmaşık etkileşimin altını çizmekte ve KF hastalarında biyofilmle ilişkili enfeksiyonlarla mücadele için tedavi stratejilerinin daha fazla araştırılması ve optimizasyonu ihtiyacını vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

Abo-Dya, N.E., Agha, K.A., Abbas, H.A., Abu-Kull, M.E., Alahmdi, M.I. and Osman, N.A., 2022. Hybrid N-Acylcysteines as Dual-Acting Matrix Disruptive and Anti-Quorum Sensing Agents Fighting *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Design, Synthesis, Molecular Docking Studies, and In Vitro Assays. *ACS omega*, 7(23), pp.19879-19891.

Ackermann, H.W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*, 152, pp.227-243.

Adnan, M., Shah, M.R.A., Jamal, M., Jalil, F., Andleeb, S., Nawaz, M.A., Pervez, S., Hussain, T., Shah, I., Imran, M. and Kamil, A., 2020. Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. *Biologicals*, 63, pp.89-96.

Ali, S., Karaynir, A., Salih, H., Öncü, S. and Bozdoğan, B., 2023. Characterization, genome analysis and antibiofilm efficacy of lytic *Proteus* phages RP6 and RP7 isolated from university hospital sewage. *Virus research*, 326, p.199049.

Alves, D.R., Gaudion, A., Bean, J.E., Perez Esteban, P., Arnot, T.C., Harper, D.R., Kot, W., Hansen, L.H., Enright, M.C. and Jenkins, A.T.A., 2014. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 80(21), pp.6694-6703.

Al-Wrafiy, F., Brzozowska, E., Górski, S. and Gamian, A., 2017. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*—the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 71, pp.78-91.

Ballesté, E., Blanch, A.R., Muniesa, M., García-Aljaro, C., Rodríguez-Rubio, L., Martín-Díaz, J., Pascual-Benito, M. and Jofre, J., 2022. Bacteriophages in sewage: abundance, roles, and applications. *FEMS microbes*, 3, p.xtac009.

Bao, H.D., Pang, M.D., Olaniran, A., Zhang, X.H., Zhang, H., Zhou, Y., Sun, L.C., Schmidt, S. and Wang, R., 2018. Alterations in the diversity and composition of mice gut

microbiota by lytic or temperate gut phage treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, pp.10219-10230.

Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E. and Guery, B., 2018. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 7.

Breitbart, M. and Rohwer, F., 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?. *Trends in microbiology*, 13(6), pp.278-284.

Ceyssens, P.J. and Lavigne, R., 2010. Bacteriophages of *Pseudomonas*. *Future microbiology*, 5(7), pp.1041-1055.

Chegini, Z., Khoshbayan, A., Taati Moghadam, M., Farahani, I., Jazireian, P. and Shariati, A., 2020. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 19, pp.1-17.

Chin, M., Aaron, S.D. and Bell, S.C., 2017. The treatment of the pulmonary and extrapulmonary manifestations of cystic fibrosis. *La Presse Médicale*, 46(6), pp.e139-e164.

Clokier, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V. and Heaphy, S., 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), pp.31-45.

Cutting, G.R., 2015. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews Genetics*, 16(1), pp.45-56.

Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V.A., Foster, S., Gilmore, B.F., Hancock, R.E., Harper, D. and Henderson, I.R., 2016. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), pp.239-251.

Davey, M.E. and O'toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), pp.847-867.

- Davies, J.C., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatric respiratory reviews*, 3(2), pp.128-134.
- De Boeck, K., Vermeulen, F. and Dupont, L., 2017. The diagnosis of cystic fibrosis. *La Presse Médicale*, 46(6), pp.e97-e108.
- Dhar, S., Kumari, H., Balasubramanian, D. and Mathee, K., 2018. Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*—their role in the development of resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 67(1), pp.1-21.
- Döring, G., Flume, P., Heijerman, H., Elborn, J.S. and Consensus Study Group, 2012. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *Journal of Cystic Fibrosis*, 11(6), pp.461-479.
- Düzgüneş, N., Sessevmez, M. and Yildirim, M., 2021. Bacteriophage therapy of bacterial infections: the rediscovered frontier. *Pharmaceuticals*, 14(1), p.34.
- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S. and Amitai, G., 2017. Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature*, 541(7638), pp.488-493.
- Fong, S.A., Drilling, A., Morales, S., Cornet, M.E., Woodworth, B.A., Fokkens, W.J., Psaltis, A.J., Vreugde, S. and Wormald, P.J., 2017. Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, p.418.
- Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., Zhao, H., Gao, Y., Song, J., Lu, R. and Sun, C., 2012. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PloS one*, 7(3), p.e31698.
- Guerini, M., Condrò, G., Friuli, V., Maggi, L. and Perugini, P., 2022. n-acetylcysteine (NAC) and its role in clinical practice management of cystic fibrosis (CF): a review. *Pharmaceuticals*, 15(2), p.217.

Guerini, M., Grisoli, P., Pane, C. and Perugini, P., 2021. Microstructured lipid carriers (MLC) based on N-acetylcysteine and chitosan preventing *Pseudomonas Aeruginosa* biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), p.891.

Hankin, E., 1896. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera. *Ann Inst Pasteur*, 10, p.511.

Herelle, F.D., 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compte Rendu Académie Sci*, 165, pp.373-375.

Hitchcock, N.M., Devequi Gomes Nunes, D., Shiach, J., Valeria Saraiva Hodel, K., Dantas Viana Barbosa, J., Alencar Pereira Rodrigues, L., Coler, B.S., Botelho Pereira Soares, M. and Badaró, R., 2023. Current clinical landscape and global potential of bacteriophage therapy. *Viruses*, 15(4), p.1020.

Hraiech, S., Brégeon, F. and Rolain, J.M., 2015. Bacteriophage-based therapy in cystic fibrosis-associated *Pseudomonas aeruginosa* infections: rationale and current status. *Drug design, development and therapy*, pp.3653-3663.

Jo, A., Ding, T. and Ahn, J., 2016. Synergistic antimicrobial activity of bacteriophages and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Food science and biotechnology*, 25, pp.935-940.

Jones, J.D., Trippett, C., Suleman, M., Clokie, M.R. and Clark, J.R., 2023. The future of clinical phage therapy in the United Kingdom. *Viruses*, 15(3), p.721.

Karaynir, A., Salih, H., Bozdoğan, B., Güçlü, Ö. and Keskin, D., 2022. Isolation and characterization of *Brochothrix* phage ADU4. *Virus Research*, 321, p.198902.

Kim, M.S. and Bae, J.W., 2018. Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *The ISME Journal*, 12(4), pp.1127-1141.

Kim, S.K. and Lee, J.H., 2016. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of microbiology*, 54, pp.71-85.

Knezevic, P., Curcin, S., Aleksic, V., Petrusic, M. and Vlaski, L., 2013. Phage-antibiotic synergism: a possible approach to combatting *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in microbiology*, 164(1), pp.55-60.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. and Hultgren, S.J., 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), p.a010306.

Kumar, A., Malik, H., Dubal, Z.B., Jaiswal, R.K., Kumar, S., Kumar, B. and Agarwal, R.K., 2022. Isolation and characterization of *Salmonella* phages and phage cocktail mediated biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chicken meat. *LWT*, 155, p.112957.

Kung, V.L., Ozer, E.A. and Hauser, A.R., 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(4), pp.621-641.

Kvachadze, L., Balarjishvili, N., Meskhi, T., Tevdoradze, E., Skhirtladze, N., Pataridze, T., Adamia, R., Topuria, T., Kutter, E., Rohde, C. and Kutateladze, M., 2011. Evaluation of lytic activity of staphylococcal bacteriophage Sb-1 against freshly isolated clinical pathogens. *Microbial biotechnology*, 4(5), pp.643-650.

Law, N., Logan, C., Yung, G., Furr, C.L.L., Lehman, S.M., Morales, S., Rosas, F., Gaidamaka, A., Bilinsky, I., Grint, P. and Schooley, R.T., 2019. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Infection*, 47, pp.665-668.

Lima, E.M.F., de Almeida, F.A., Sircili, M.P., Bueris, V. and Pinto, U.M., 2023. N-acetylcysteine (NAC) attenuates quorum sensing regulated phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Heliyon*, 9(3).

Malhotra, S., Hayes Jr, D. and Wozniak, D.J., 2019. Cystic fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the host-microbe interface. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), pp.10-1128.

Martínez-Gallardo, M.J., Villicaña, C., Yocupicio-Monroy, M., Alcaraz-Estrada, S.L. and León-Félix, J., 2023. Current knowledge in the use of bacteriophages to combat infections

caused by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Folia Microbiologica*, 68(1), pp.1-16.

Marza, J.S., Soothill, J.S., Boydell, P. and Collyns, T.A., 2006. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns*, 32(5), pp.644-646.

Merabishvili, M., Vandenheuvel, D., Kropinski, A.M., Mast, J., De Vos, D., Verbeken, G., Noben, J.P., Lavigne, R., Vaneechoutte, M. and Pirnay, J.P., 2014. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, 9(8), p.e104853.

Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Szufnarowski, K., Pawełczyk, Z., Rogóż, P., Kłak, M., Wojtasik, E. and Górski, A., 2012. Clinical aspects of phage therapy. *Advances in virus research*, 83, pp.73-121.

Mokhtari, V., Afsharian, P., Shahhoseini, M., Kalantar, S.M. and Moini, A., 2017. A review on various uses of N-acetyl cysteine. *Cell Journal (Yakhteh)*, 19(1), p.11.

Moradali, M.F., Ghods, S. and Rehm, B.H., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, p.39.

Morello, E., Sausserieau, E., Maura, D., Huerre, M., Touqui, L. and Debarbieux, L., 2011. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PloS one*, 6(2), p.e16963.

Nobrega, F.L., Vlot, M., De Jonge, P.A., Dreesens, L.L., Beaumont, H.J., Lavigne, R., Dutilh, B.E. and Brouns, S.J., 2018. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), pp.760-773.

Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T. and Jehl, F., 2020. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Frontiers in microbiology*, 10, p.2894.

Onger, M.E., Gocer, H., Emir, D. and Kaplan, S., 2016. N-acetylcysteine eradicates *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in bone cement. *Scanning*, 38(6), pp.766-770.

Pedre, B., Barayeu, U., Ezeriņa, D. and Dick, T.P., 2021. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H₂S and sulfane sulfur species. *Pharmacology & therapeutics*, 228, p.107916.

Pinto, R.M., Monteiro, C., Costa Lima, S.A., Casal, S., Van Dijck, P., Martins, M.C.L., Nunes, C. and Reis, S., 2021. N-acetyl-l-cysteine-loaded nanosystems as a promising therapeutic approach toward the eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(36), pp.42329-42343.

Prijbelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A. and Korobeynikov, A., 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current protocols in bioinformatics*, 70(1), p.e102.

Rice, L.B., 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*, 197(8), pp.1079-1081.

Römling, U. and Balsalobre, C., 2012. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of internal medicine*, 272(6), pp.541-561.

Salih, H., Karaynir, A., Yalcin, M., Oryasin, E., Holyavkin, C., Basbulbul, G. and Bozdogan, B., 2022. Metagenomic analysis of wastewater phageome from a University Hospital in Turkey. *Archives of Microbiology*, 204(6), p.353.

Santamaría-Corral, G., Senhaji-Kacha, A., Broncano-Lavado, A., Esteban, J. and García-Quintanilla, M., 2023. Bacteriophage–Antibiotic Combination Therapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, 12(7), p.1089.

Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K. and Bisht, R., 2019. Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. *Indian journal of microbiology*, 59, pp.3-12.

Schooley, R.T., Biswas, B., Gill, J.J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J.J., Reed, S.L., Rohwer, F., Benler, S. and Segall, A.M., 2017. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a

disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(10), pp.10-1128.

Sempere, J., Llamosí, M., Román, F., Lago, D., González-Camacho, F., Pérez-García, C., Yuste, J. and Domenech, M., 2022. Clearance of mixed biofilms of *Streptococcus pneumoniae* and methicillin-susceptible/resistant *Staphylococcus aureus* by antioxidants N-acetyl-l-cysteine and cysteamine. *Scientific reports*, 12(1), p.6668.

Shang, Y., Sun, Q., Chen, H., Wu, Q., Chen, M., Yang, S., Du, M., Zha, F., Ye, Q. and Zhang, J., 2021. Isolation and characterization of a novel *Salmonella* phage vB_SalP_TR2. *Frontiers in microbiology*, 12, p.664810.

Simmonds, P. and Aiewsakun, P., 2018. Virus classification—where do you draw the line?. *Archives of virology*, 163, pp.2037-2046.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Ćirković, I. and Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), pp.891-899.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M. and Garber, R.L., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), pp.959-964.

Strathdee, S.A., Hatfull, G.F., Mutalik, V.K. and Schooley, R.T., 2023. Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*, 186(1), pp.17-31.

Thi, M.T.T., Wibowo, D. and Rehm, B.H., 2020. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International journal of molecular sciences*, 21(22), p.8671.

Trend, S., Fonceca, A.M., Ditcham, W.G., Kicic, A. and Cf, A., 2017. The potential of phage therapy in cystic fibrosis: Essential human-bacterial-phage interactions and delivery considerations for use in *Pseudomonas aeruginosa*-infected airways. *Journal of Cystic Fibrosis*, 16(6), pp.663-670.

Vallières, E. and Elborn, J.S., 2014. Cystic fibrosis gene mutations: evaluation and assessment of disease severity. *Advances in Genomics and Genetics*, pp.161-172.

Wright, A., Hawkins, C.H., Änggård, E.E. and Harper, D.R., 2009. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical otolaryngology*, 34(4), pp.349-357.

Wu, W., Jin, Y., Bai, F. and Jin, S., 2015. *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular medical microbiology* (pp. 753-767). Academic Press.

Yang, H., Liang, L., Lin, S. and Jia, S., 2010. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC microbiology*, 10, pp.1-10.

Yazdi, M., Bouzari, M. and Ghaemi, E.A., 2018. Isolation and characterization of a lytic bacteriophage (vB_PmiS-TH) and its application in combination with ampicillin against planktonic and biofilm forms of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infection. *Microbial Physiology*, 28(1), pp.37-46.

Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., Hu, F., Jiang, X. and Jiao, W., 2019. A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environment international*, 129, pp.488-496.

Yin, R., Cheng, J., Wang, J., Li, P. and Lin, J., 2022. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: challenges and strategies. *Front Microbiol* 2022; 13: 955286.

Zhao, T. and Liu, Y., 2010. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC microbiology*, 10, pp.1-8.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Majda	Uyruğu	Karadağ
Soyadı	Licina	Tel no	-
Doğum tarihi	-	e-posta	-

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	-	2018
Lisans	Başkent Üniversitesi	2022
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2024
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler: