



TC. Sağlık Bakanlığı

T. C.
SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
SULTAN ABDULHAMİD HAN EğİTİM VE ARAğTIRMA HASTANESİ

**TÜM ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
MİKROORGANİZMASINA KARŞI OTOLOG TROMBİN İLE AKTİVE EDİLEN
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN IN VITRO ANTİMİKROBİYAL
ETKİNLİğİNİN ARAğTIRILMASI**

Deniz Eray GÖKÇE
Uzmanlık Öğrencisi

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL
2017



TC Sağlık Bakanlığı

T. C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
SULTAN ABDULHAMİD HAN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
İSTANBUL

TÜM ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
MİKROORGANİZMASINA KARŞI OTOLOG TROMBİN İLE AKTİVE
EDİLEN TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN IN VITRO
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Deniz Eray GÖKÇE
Uzmanlık Öğrencisi

Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Sultan Abdulhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Programı İçin Öngördüğü

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Rıza Aytaç ÇETİNKAYA
Yardımcı Doçent Doktor

İSTANBUL
2017

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlığı'na

“Tüm Antibiyotiklere Dirençli *Klebsiella Pneumoniae* Mikroorganizmasına Karşı Otolog Trombin İle Aktive Edilen Trombositten Zengin Plazmanın In vitro Antimikrobiyal Etkinliğinin Araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Programı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Rıza Aytaç ÇETİNKAYA

Üye : Prof.Dr. İlyas DÖKMETAŞ

Üye : Prof.Dr. Levent GÖRENEK

Üye : Doç.Dr. Gürkan MERT

Yedek Üye : Prof.Dr. Ayten KADANALI

Yedek Üye : Doç.Dr. Asım ÜLÇAY

ONAY:

Dr.Deniz Eray GÖKÇE'nin 24 Ağustos 2017 tarihinde savunduğu bu tez yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Kadriye KART YAŞAR

Dekan a.

Dekan Yardımcısı V.

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan hocalarım, başta eğitim idari sorumlusu Prof.Dr. Levent GÖRENEK olmak üzere, Yrd.Doç.Dr. Rıza Aytaç ÇETİNKAYA, Doç.Dr. Gürkan MERT ve Doç.Dr. Asım ÜLÇAY'a Őükran ve saygılarımı arz ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalışma imkânı bulduğum ve her zaman desteklerini hissettiğim Dr. Ercan YENİLMEZ, Dr. Burak SARIKAYA ile Enfeksiyon Hastalıkları servis laboratuvarında görev yapmış olan Dilber ÖZEN, Enfeksiyon Hastalıkları Servis hemŐirelerimiz ve personeline teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince laboratuvar bilgisi ve deneyimi kazanmam hususunda her zaman yardımcı ve yönlendirici olan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa ÖZYURT'a Őükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımı sürdürürken her zaman yanımda olan sevgili eŐime; beni bugünlere getiren, yaptığım her işte bana destek olan sevgili anne ve babama teşekkür ederim.

Dr. Deniz Eray GÖKÇE

İstanbul

2017

ÖZET

Tüm Antibiyotiklere Dirençli *Klebsiella Pneumoniae* Mikroorganizmasına Karşı Otolog Trombin ile Aktive Edilen Trombositten Zengin Plazmanın In Vitro Antimikrobiyal Etkinliğinin Araştırılması

Bu çalışmada, Sultan Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen Tüm Antibiyotiklere İlaç Direncine sahip (TAD) *K. pneumoniae* izolatu üzerinde, trombositten zengin plazma (TZP)'nin in vitro etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu etkinin aynı zamanda antimikrobiyal duyarlılık testleri için uygulama standartlarında belirtilen kolay üreyen bakterilerde standart suş olan *E. coli* ATCC 25922 ile GSBL doğrulama testi yapılırken rutin olarak kullanılması önerilen *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşlarına antimikrobiyal etkilerinin kıyaslanması planlandı.

Çalışmamıza katılan 10 gönüllünün her birinden alınan 54 ml tam kandan MagellanPRP™ kitiyle 3 ml TZP ve 20 ml trombositten fakir plazma (TFP) elde edildi. Eş zamanlı olarak aynı bağışçılardan alınan kan örnekleri %10 kalsiyum glukonat ile etkileşime sokulduktan sonra çeşitli santrifüj aşamalarına tabii tutularak otolog trombin elde edildi.

Otolog trombin ile aktive edilen TZP'nin, son bakteri konsantrasyonu 1×10^3 kob/ml olan TAD'e sahip *K. pneumoniae* izolatu üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin ortaya konulması amacıyla 1., 2., 4., 8. ve 12. saatlerde %5'lik Koyun Kanlı Agar yüzeyine ekim yapıldı.

TZP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine 1., 2., 4., ve 8. saatlerdeki üreyen koloni sayıları kontrol grubuna göre kıyaslandığında antimikrobiyal etkinliğin 1. saatte başladığı 2. saatte tepe noktasına ulaştığı, 4. saatteki etkinliğin 2. saatteki etkinliğe yakın olduğu bu etkinliğin 8. saatte de devam ettiği bulundu. Antimikrobiyal etkinin 12. saatte kaybolduğu görüldü. 1., 2., 4., ve 8. saatlerdeki transforme edilmiş üreme ortalamalarının farkları istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$).

Aynı şekilde TZP'nin *E. coli* ATCC 25922 üzerine antimikrobiyal etkisinin 2. saatte tepe noktasına ulaştığı, 8. saatte bu etkinliğin azaldığı, 12. saatte ise kaybettiği görüldü. *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşunda ise TZP etkinliğinin 2. saatte tepe noktasına ulaştığı, 4. saatteki etkinliğin 2. saatteki etkinliğe yakın olduğu, 8. saatte etkinliğin azalarak devam ettiği ve 12. saatte ise kaybettiği görüldü. Her iki ATCC suşu için bu etkinlikler 8. saate kadar istatistiksel olarak da anlamlıydı.

Bu çalışmada TZP'nin her üç bakteri üzerine de etkinliğinin olduğu ayrı ayrı gösterildi. İlk saatlerde etkinliğin her üç bakteri üzerine de aynı olduğu ve sayımlarda elde edilen farkların istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulundu. Bu durum, çalışmamızda kullanılan gram negatif enterik bakteriler üzerinde TZP'nin bakteri türü ve direnç durumu gözetmeksizin antimikrobiyal etkinlik yaptığı olarak değerlendirildi.

Salt olarak antimikrobiyal direncin etkisini değerlendirmek amacıyla TAD'e sahip *K. pneumoniae* ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 karşılaştırıldı; TZP'li gruplarda 8. saatteki TAD'e sahip *K. pneumoniae* üreyen koloni sayısının daha az ve bu üreme azlığının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Bu ise bakteri direnci arttıkça trombositlere hassasiyetin artabileceğini düşündürdü.

Trombositlerin trombin ile aktivasyona uğratılması ile tüm antibiyotiklere dirençli bakteriler de dahil olmak üzere, lokal enfeksiyonların tedavisinde yardımcı bir hücrel kan bileşeni olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Fakat bunun için geniş katılımlı randomize kontrollü in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Trombositten Zengin Plazma, Tüm Antibiyotiklere Direnç (TAD), *Klebsiella pneumoniae*, Antibiyotik Direnci.

Destekleyen Kurumlar: Çalışmayı Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Yazar Adı: Dr. Deniz Eray GÖKÇE

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Rıza Aytaç ÇETİNKAYA

SUMMARY

In Vitro Antibacterial Activity of Thrombocyte Rich Plasma (PRP) Activated by Autologous Thrombin on Pandrug-Resistant (PDR) *Klebsiella pneumoniae*

In this study, it was aimed to investigate the in vitro activity of thrombocyte rich plasma (PRP) on *K. pneumoniae* isolate (PDR) with all antibiotic drug resistance isolated in Sultan Abdülhamid Han Training and Research Hospital Medical Microbiology Laboratory. This activity was also planned to be compared to *E. coli* ATCC 25922, the standard strain for easy breeding bacteria, as specified in the application standards for antimicrobial susceptibility testing, and *K. pneumoniae* ATCC 700603, which is routinely recommended for use in the ESBL validation test.

We obtained 3 ml of PRP and 20 ml of platelet poor plasma (PPP) from a 54 ml whole blood obtained from each of 10 volunteers who participated in our study with the MagellanPRP™ kit. Simultaneously, blood samples taken from the same donors were subjected to various centrifugation steps after the interaction with 10% calcium gluconate and autologous thrombin was obtained.

5% Sheep Blood Agar surface seeding was performed at 1, 2, 4, 8, and 12 hours to demonstrate the antimicrobial activity of autologous thrombin-activated PRP on PDR *K. pneumoniae* isolate with a final bacterial concentration of 1×10^3 cfu/ml.

When the number of colony forming on PRP of PDR *K. pneumoniae* at 1st, 2nd, 4th, and 8th hours is compared to that of the control group, antimicrobial activity reaches the peak at the 2nd hour starting at the 1st hour, the activity at the 4th hour is close to the activity at the 2nd hour and this activity continued at 8th hour. It was seen that the antimicrobial activity disappeared in the 12th hour. The differences in the mean transformed reproduction at the 1st, 2nd, 4th and 8th hours were statistically significant ($p < 0.05$).

Likewise, the antimicrobial activity of PRP on *E. coli* ATCC 25922 reached its peak at the 2nd hour, decreased at 8th hour and lost at 12th hour. In *K. pneumoniae* strain ATCC 700603, it was observed that the PRP activity reached its peak at the 2nd hour, that the activity at 4th hour was close to the activity at 2 hours, the activity decreased at 8th hour and then disappeared at 12th hour. For both ATCC strains, this activity was statistically significant up to the 8th hour.

In this study, the effect of PRP against all three bacterial strains was shown separately. In the first hours, the activity was found to be the same on all three bacteria, and the differences obtained in the counts were statistically insignificant. This was assessed as the antimicrobial activity of PRP on gram-negative enteric bacteria used in our study, regardless of bacterial strain and resistance status.

PDR *K. pneumoniae* and *K. pneumoniae* ATCC 700603 were compared to assess the effect of antimicrobial resistance alone; in PRP groups, PDR *K. pneumoniae* at the 8th hour was less in the number of breeding colonies and this was found to be statistically significant. This suggests that sensitivity to thrombocytes may increase as bacterial resistance increases.

We believe that by activating platelets with thrombin, they can be used as an adjunctive cellular blood component in the treatment of local infections, including all antibiotic resistant bacteria. However, there is a need for extensive and randomized controlled in vitro and in vivo studies for this.

Keywords: Thrombocyte Rich Plasma, Pandrug-Resistance (PDR), *Klebsiella pneumoniae*, Antibiotic Resistance.

Supporting Institutions: This study is supported by University of Health Sciences, Scientific Research Projects Unit

Author: Deniz Eray GOKCE, MD

Advisor: Rıza Aytaç ÇETİNKAYA, MD. Assistant Professor

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. ANTİMİKROBİYALLERE DİRENÇ	2
2.1.1. Giriş.....	2
2.1.2. Antibiyotik Direnci - Tarihçesi	2
2.1.3. Antibiyotik Direnci – Çevresel Faktörler	3
2.1.4. Antimikrobiyal İlaç Gelişimi.....	3
2.1.5. Antibiyotik Direncinin Moleküler Genetik Temelleri	4
2.1.6. Plazmidler.....	5
2.1.7. Aktarılabılır Genetik Elemanlar	5
2.1.8. DNA İntegral Elemanları.....	5
2.1.9. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	5
2.1.10. Enzimatik İnhibisyon.....	6
2.1.11. β -laktamazlar.....	6
2.1.12. Genişlemiş Spektrumlu β -laktamazlar.....	7
TEM-Türevi 7	
SHV-Türevi 7	
CTX-M-Türevi.....	7
OXA-Türevi 8	
AmpC Enzimleri.....	8
Karbapenemazlar	8
2.1.13. Gram-Pozitif Bakteriler - β -laktamaz	9
2.1.14. Anaerop Bakteriler- β -laktamaz.....	10

2.1.15.	β -Laktamazların β -Laktam'a Katkısı.....	10
2.1.16.	Aminoglikosid Direnci – Enzimler	11
2.1.17.	Kloramfenikol asetiltransferaz	12
2.1.18.	Makrolid, Linkozamid, Streptogramin - İnaktive Eden Enzimler .	12
2.1.19.	Tetrasiklin İnaktivasyonu	13
2.1.20.	Azalmış Bakteriyel Membran Geçirgenliği.....	13
2.1.21.	Dış Membran Geçirgenliği.....	13
2.1.22.	İç Membran Geçirgenliği	14
2.1.23.	Antibiyotik Akımının Teşviki.....	15
a.	Tetrasiklinler	15
b.	β -Laktamlar.....	15
c.	Florokinolonlar	15
2.1.24.	Değiştirilen Hedef Bölgeler.....	15
2.1.25.	Ribozomal Hedef Değişiklikleri.....	15
a.	Makrolidler, Linkosamidler, Streptograminler	15
b.	Tetrasiklinler	16
c.	Aminoglikozidler	16
d.	Oksazolidinonlar	16
2.1.26.	Hücre Duvar Öncülü Hedefleri Değişikliği	17
2.1.27.	Hedef Enzimlerin Değişimi	18
a.	β -Laktamlar.....	18
b.	MRSA Direnci	19
c.	Kinolonlar.....	20
d.	Sulfonamidler.....	20
e.	Trimetoprim.....	20
2.1.28.	Kazanılmış Direnç İçin Standart Tanımlar.....	21
2.1.29.	ÇİD, YİD ve TAD için önerilen Tanımlar.....	21
3.	TROMBOSİTLER.....	22
3.1.	Giriş.....	22
3.1.1.	Mikrobiyal Tehlikeleri Tanıma ve Cevap	24
3.1.2.	Trombositlerin Amplifikasyon Basamağı (Kaskad).....	25
3.1.3.	Antimikrobiyal Etkileyiciler	26

3.1.4.	Trombosit Mikrobisidal Proteinleri (PMP) ve Kinosidinler.....	26
3.1.5.	Trombositlerin Konak Antimikrobiyal Savunması	27
3.1.6.	HIV-1	27
3.1.7.	Bakteriyel patojenler.....	28
3.1.8.	Plasmodium falciparum.....	29
3.1.9.	Diğer Patojenler.....	29
3.1.10.	Diğer Antimikrobiyal Mekanizmalar	29
3.1.11.	Trombositlerin Bağışıklık Yanıt Geliştirilmesi	30
3.1.12.	Trombositlerin Antijen Sunumu;	30
3.1.13.	Trombositlerin T Hücre Koordinasyonu.....	31
4.	GEREÇ ve YÖNTEM	32
4.1.1.	Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	32
4.1.2.	Cihazlar	32
4.1.3.	Laboratuvar Malzemeleri.....	32
4.1.4.	Örnek Kabulü	33
4.1.5.	Çalışmaya Alınma Kriterleri.....	33
4.1.6.	Yöntem.....	34
4.1.7.	İzolasyon, Tür Tayini ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi 34	
4.1.8.	Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trombositten Fakir Plazma (TFP) Elde Edilmesi.....	34
4.1.9.	Otolog Trombin Elde Edilmesi.....	36
4.1.10.	Çalışma Gruplarının Hazırlanılması	37
4.1.11.	Trombositten Zengin Plazmanın (TZP) Grubu	39
4.1.12.	Trombositten Fakir Plazmanın (TFP) Grubu	41
4.1.13.	Kontrol (Phosphate buffered saline, PBS) Grubu.....	41
4.1.14.	Üreme Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	41
4.1.15.	E. coli ATCC 25922 ve K. pneumoniae ATCC 700603 Çalışma Gruplarının Oluşturulması	42
4.1.16.	İstatistiksel Analiz	44
5.	BULGULAR	44
5.1.	Bağışçılara Ait Demografik Özellikler	44

5.2.	TZP ve TFP Özellikleri	44
5.3.	Bağışçı Tam Kan Parametreleri ile TZP ve TFP gruplarının İstatistiksel Analizi	48
5.4.	TAD'e Sahip <i>K. pneumoniae</i> İzolatının Antibiyotik Duyarlılık ve Direnç Özellikleri	49
5.5.	Koloni Sayımı	51
5.6.	TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> TZP, TFP, PBS'li Ortamlarda Üremelerin Karşılaştırılması	65
5.8.	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603'nin TZP, TFP, PBS'li Ortamlarda Üremelerin Karşılaştırılması	69
5.9.	TZP'nin TAD'e Sahip <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 Üzerindeki Etkinliği İncelenmesi	70
6.	TARTIŞMA	72
	SONUÇ VE ÖNERİLER	78
7.	KAYNAKLAR	81

SİMGELER ve KISALTMALAR

A.B.D.:	Amerika Birleşik Devletleri
ADP:	Adenozin Difosfat
ATP:	Adenozin Trifosfat
C:	Kemokin
CC:	CC Kemokini
CCL5:	T Lenfosit Hücrelerinin Ekspresyonu ve Salınımı (RANTES)
CCR1:	CC Kemokin Reseptörü 1
CCR3:	CC Kemokin Reseptörü 3
CCR4:	CC Kemokin Reseptörü 4
CD162:	P-selektin glikoprotein ligand
CR3:	Kompleman Reseptörü 3
CXC:	CXC Kemokini
CX ₃ C:	CXC Kemokini
CXCL4:	Trombosit Faktör 4 (PF-4)
CXCL7:	Trombosit Bağlayıcı Protein (PBP)
CXCR4:	CXC Kemokin Reseptörü 4
C3a:	Kompleman 3 a
C5a:	Kompleman 5a
ÇİD:	Çoklu İlaç Direnci
DAE:	Diyabetik Ayak Enfeksiyonu
EUCAST:	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA:	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
dk:	Dakika
gp120:	Glikoprotein 120
GSBL:	Genişletilmiş Spektrumlu β -laktamaz
HE:	Hastane Enfeksiyonu
HIV:	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
IL-1:	İnterlökin 1
IL-6:	İnterlökin 6
kDa:	Kilodalton

kob:	Koloni Oluşturan Birim
KPC:	Karbapenamaz Üreten <i>Klebsiella pneumoniae</i>
MHB :	Mueller Hinton Broth
ml:	Mililitre
NDM:	Yeni Delhi metallo-beta-laktamaz
PF-4:	Trombosit Faktör 4 (CXCL4)
PK:	Kinosidin
PMP:	Trombosit Mikrobisidal Proteinler
PDR:	Tüm Antimikrobiklere Direnç (TAD)
P-PRP:	Pure-Trombosit Rich Plasma
P-PPP:	Pure-Trombosit Poor Plasma
TAD:	Tüm Antimikrobiklere Direnç (PDR)
TKBF:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
TLR1:	Toll Benzeri Reseptör 1 (Toll Like Receptor 1)
TLR2:	Toll Benzeri Reseptör 2 (Toll Like Receptor 2)
TLR4:	Toll Benzeri Reseptör 4 (Toll Like Receptor 4)
TLR6:	Toll Benzeri Reseptör 6 (Toll Like Receptor 6)
TLR9:	Toll Benzeri Reseptör 9 (Toll Like Receptor 9)
TNF- α :	Tümör Nekrozis Faktör-alfa
TZP:	Trombositten Zengin Plazma
TFP:	Trombositten Fakir Plazma
YBÜ:	Yoğun Bakım Üniteleri
YİD:	Yaygın İlaç Direnci
α granül:	Alfa granül
δ granül:	Dense granül
λ granül:	Lizozomal Granül
μ l:	Mikrolitre
μ m:	Mikrometre

TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.1. TAD'e Sahip <i>K. pneumoniae</i> İzolatın Farklı Trombosit Konsantresindeki Çalışma Grupları.....	38
Tablo 4.2. <i>E. coli</i> ATCC 25922 İzolatının Farklı Trombosit Konsantresindeki Çalışma Grupları.....	43
Tablo 4.3. <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 İzolatının Farklı Trombosit Konsantresindeki Çalışma Grupları.....	43
Tablo 5.1. Bağışçıların Tam Kan ve Trombositten Zengin Plazma (TZP) Özellikleri.....	46
Tablo 5.2. Bağışçıların Tam Kan ve Trombositten Fakir Plazma (TFP) Özellikleri.....	47
Tablo 5.3. Bağışçı Tam Kan, TZP, TFP Gruplarında Parametrelerin Analizi.....	48
Tablo 5.4. Koyun Kanlı Agar plaklarında ekim sonrası 18-24. saat sonunda TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> çalışma grubuna ait koloni sayıları.....	52
Tablo 5.5. Koyun Kanlı Agar plaklarında ekim sonrası 18-24. saat sonunda <i>E. coli</i> ATCC 25922 çalışma grubuna ait koloni sayıları.....	63
Tablo 5.6. Koyun Kanlı Agar plaklarında ekim sonrası 18-24. saat sonunda <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 çalışma grubuna ait koloni sayıları.....	64
Tablo 5.7. TAD'e Sahip <i>K. pneumoniae</i> Üzerine TZP, TFP Üremelerinin Ekim Zamanları Karşılaştırılması.....	66
Tablo 5.8. TAD'e Sahip <i>K. pneumoniae</i> Üzerine TZP, TFP, PBS'li Ortamda Üremelerinin Karşılaştırılması.....	67
Tablo 5.9. TZP'nin Zamana Göre Her Üç Mikroorganizma Üzerine Etkinliğinin Karşılaştırılması.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Çoklu İlaç Direnci, Yaygın İlaç Direnci, Tüm Antibiyotiklere Direnç şekli.....**21**

Şekil 3.1. İntrasellüler veya ekstrasellüler etki gösteren trombosit granülleri.....**23**

Şekil 3.2. Trombosit hücresinin bağışıklık sistemindeki rolü.....**24**



RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1. MagellanPRP™ Tam Otomatize Trombositten Zengin Plazma Santrifüjü.	35
Resim 4.2. Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trombositten Fakir Plazma (TFP)'nin santrifüj sonrası elde edilmiş görüntüsü.....	36
Resim 4.3.A-B-C. Otolog Trombin Elde Edilme Basamakları.....	37
Resim 4.4. Otolog trombin, TZP-TFP-PBS (Kontrol Grubu) ve TAD'e Sahip <i>K. pneumoniae</i> Karışımı.....	39
Resim 4.5. Otolog trombin, TZP-TFP-PBS (Kontrol Grubu) ve TAD'e Sahip <i>K. pneumoniae</i> Karışımının Etüvde Bekletilmesi ve Çalkalanması.....	40
Resim 4.6. 10 µl örnek 90 µl steril serum fizyolojik ile steril boş petri üzerinde karışımı.	40
Resim 4.7. Bir Kan Bağışçısına Ait TZP, TFP, PBS'li Ortamlarda %5 Koyun Kanlı Agar ve Müeller-Hinton Agar Plaklarında Ekim Zamanı ve Gruplandırılmaları.....	42
Resim 5.1. <i>K. pneumoniae</i> İzolatının Antibiyotik Duyarlılık-Direnç Özellikleri.....	49
Resim 5.2. VITEK2 ile Yapılan Tür Tayini ve Antibiyogram Sonucuna Göre <i>K. pneumoniae</i> İzolatının TAD'e Sahip Olduğu Tespit Edildi	50
Resim 5.3. 1. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	53
Resim 5.4. 2. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	54
Resim 5.5. 3. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	55
Resim 5.6. 4. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	56

Resim 5.7. 5. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	57
Resim 5.8. 6. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	58
Resim 5.9. 7. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	59
Resim 5.10. 8. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	60
Resim 5.11. 9. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	61
Resim 5.12. 10. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip <i>K. pneumoniae</i> üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.....	62
Resim 5.13. TZP, TFP ve PBS'li ortamlarada transforme edilmiş üreme ortalamaları kıyaslama grafiği.....	65
Resim 5.14. <i>E. coli</i> ATCC 25922'nin TZP, TFP ve PBS'li ortamlarada transforme edilmiş üreme ortalamaları kıyaslama grafiği.....	68
Resim 5.15. <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603'nin TZP, TFP ve PBS'li ortamlarada transforme edilmiş üreme ortalamaları kıyaslama grafiği.....	69

1. GİRİŞ

Tıp tarihinin en büyük buluşlarından birisi olan antibiyotikler 20. yüzyılın başından itibaren bugüne kadarki en önemli sağlık başarılarından biri olmaya devam etmektedir. Yeni kullanıma sunulacak olan sadece sınırlı sayıda antimikrobiyal molekül olmasına rağmen artan antimikrobiyal direnç ise dünya çapında insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri olarak kabul edilmektedir.

Aktive edilen trombositler buldukları ortama bir takım büyüme faktörlerini serbest bırakırlar. Bazı çalışmalar bu büyüme faktörlerinin hücre yenilenmesi, büyümesi ve farklılaşmasını yönlendirebileceğini (1, 2) hatta yara iyileşmesi ve doku yenilenmesinde etkili olduğunu (3, 4) belirtmekle birlikte, bazı enfeksiyonlarda trombositten zengin plazmanın (TZP) kullanılabileceği bildirilmektedir.

Bu çalışmada hastanemizde yatmakta olan bir hastadan izole edilen Tüm Antimikrobiyal Ajanlara Dirençli (TAD) *K. pneumoniae* izolatu üzerine, 10 kişiden elde edilen TZP'lerin in vitro etkinliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ANTİMİKROBİYALLERE DİRENÇ

2.1.1. Giriş

20. yüzyılın başından itibaren antibiyotik kullanımı bugüne kadarki en önemli sağlık başarılarından biri olmaya devam etmektedir. Antimikrobiyal direnç ise dünya çapında insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri olarak kabul edilmektedir (5, 6). Gelişmekte olan dirençli suşlar küreselleşen dünyada hızla yayılabilir. İnsanlar ve hayvanlarda antimikrobiyal ajan kullanımının artması, seçici baskıyı artırmakta dolayısı ile mikroorganizmaların direnç genlerini geliştirmeye yönelik doğal bir ortam yaratmaktadır. Antibiyotik dirençli enfeksiyonlar ABD sağlık sistemine maliyeti yıllık 20 milyar dolardan fazladır ve 8 milyondan fazla ek hastane yatış gününden sorumludur (7). Dahası, bu enfeksiyonlar genellikle daha az etkili, daha pahalı ve genellikle daha fazla toksik ilaç kullanımını gerektirir. Özellikle endişe duyulan alanlar arasında, çoklu ilaç direnci (ÇİD), yaygın ilaç direnci (YİD) ve TAD'e sahip hastane bakımı ile ilişkili enfeksiyonlar sayılabilir.

Direnç genleri insanlar ve hayvanlarda hiçbir antibiyotik maruziyeti olmayan alanlarda, kutuplarda 30.000 yıldır donmuş olan bakteri DNA'sında ve yer altı mağaralarda 4 milyon yıldır izole kalmış bakterilerde dahi bulunmuştur. Bunların bazıları 20. yüzyılda geliştirilen sentetik antibiyotiklere dahi dirençlidir (8-10).

Bu evrim sürecini güçlendirecek olan süreç antibiyotik maruziyetidir. Her yeni antibiyotik sınıfının tanıtılmasından sonra dirençli suşların küresel yayılımı ortaya çıkmış, küresel seyahat ve ticaret gibi faktörler bu yayılımı hızlandırmıştır.

2.1.2. Antibiyotik Direnci - Tarihçesi

Enterobacteriaceae ailesinde gözlenen karbapenem direnci, özellikle de mevcut tüm antibiyotiklere karşı dirençli izolatların tespiti ile birlikte ciddi şekilde endişe verici duruma gelmiştir(11, 12). Dirençli izolatlar ile oluşan bu enfeksiyonlar ağır seyirli olup bulaş kaynağı da çoğu kez hastane ortamıdır. Mortalite oranı %40 ile %50 arasında değişmektedir(13, 14). Uzun süreli hastaneye yatışı gereken ve girişimsel tıbbi cihazlarla (ventilatörler ve santral venöz kateterler) teması olan kritik hastalar özel risk altındadırlar.

Klebsiella pneumoniae izolatlarında saptanan karbapenem direncinden esas olarak karbapenemazlar (karbapenemleri inaktive eden enzimler) sorumlu tutulmaktadır. İlk

olarak 2001'de ABD'de *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz (KPC)(15) ve daha sonra 2008'de de Hindistan'da Yeni Delhi β -laktamaz (NDM)(16) tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal direnç sorunu, bakterilerin ötesine uzanır ve viral (örn., HIV, influenza), mantar (örn., *Candida*, *Aspergillus*) ve parazitik (örn. Sıtma) enfeksiyonları içerir. Bununla birlikte, hem insanlarda hem de hayvanlarda antibiyotik kullanımının artması, hasta bakımı kaynaklı enfeksiyonların topluluklara yayılması ve antibiyotik gelişiminde sanal olarak durma, bakteri antibiyotik direncini kriz seviyelerine yükseltmiş ve dünya çapında halk sağlığı, klinisyen ve politik liderlerin ilgisini çekmiştir.

2.1.3. Antibiyotik Direnci – Çevresel Faktörler

Gıda sektöründe hayvanlarda büyüme artırıcı olarak antibiyotik kullanımı önemli bir sorundur. Küresel olarak, hayvanlarda kullanılan antibiyotik miktarının, insanlarda kullanılan antibiyotik miktarını aştığı belirtilmektedir. Dolayısı ile bu antibiyotiklerin insan sağlığı üzerine etkilerinin giderek daha da fazla olduğu belirtilmektedir(17). Endüstriyel ve antibiyotik içermeyen hayvancılık operasyonları işçilerini karşılaştıran yeni bir araştırmada; hayvancılıkla ilgili metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (18) ve çoklu ilaç dirençli *S. aureus* taşıyıcılığının yalnızca endüstriyel işçiler arasında olduğu bulunmuştur(19).

2.1.4. Antimikrobiyal İlaç Gelişimi

Antibiyotiklere dirençli patojenler günümüzde sürekli artmaktayken yeni antibiyotiklerin gelişimi ise önemli ölçüde yavaşlamaktadır. 1983 ile 1987 yılları arasındaki 5 yıllık dönemde 16 yeni sistemik antibiyotik Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden insanlarda kullanım için onay alırken; 2008'den 2012'ye kadar sadece 2 tane anbiyotik FDA onayı alabilmiştir(20). Özellikle rahatsız edici olan durum ise, 40 yıldır gram-negatif bakterileri tedavi edecek yeni ilaç sınıflarının olmamasıdır. Yeni antimikrobiyal ajanların keşfedilmesi, önceki yıllara kıyasla bilimsel olarak daha zordur. Kısa dönem tedavilerden gelen olumsuz kâr marjları ve diğer önleyici tedbirlerle birçok ilaç firması piyasayı terk etmiştir. Bu etkilere karşı koyabilmek için 2012'de çıkan yeni antimikrobiyal ajanların gelişimini ve hasta erişimini artırmayı amaçlayan FDA Güvenlik ve Yenilik Yasası gibi çeşitli politik adımlar atılmaktadır(21).

2.1.5. Antibiyotik Direncinin Moleküler Genetik Temelleri

Genetik değişkenlik, mikroorganizmaların evrimi için gereklidir. Bir mikroorganizmanın dayanıklılığı değişen çevresel koşullara uyum kapasitesine bağlıdır (22). Antimikrobiyal ajanlar, bakteriyel popülasyonlara güçlü seçici baskı uygular ve onlara direnebilecek organizmaları desteklerler (22, 23).

Genetik değişkenlik çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkabilir. Nokta mutasyonları, **mikroevrimsel değişim** olarak adlandırılan bir nükleotid baz çifti içinde oluşabilir. Bu mutasyonlar enzim substrat özgülüğünü veya bir antimikrobik maddenin hedef bölgesini aktivitesini etkileyerek değiştirebilir. "Eski" β -laktamaz genleri (örneğin, Temoneira-1 [TEM-1], sülfhidril değişken-1 [SHV-1] genleri) üzerindeki önemli noktalardaki nokta mutasyonlar, yeni tanınan genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL'ler) dizilerinden sorumludur (24, 25).

Bakterilerde genomik değişkenliğin ikinci seviyesi; **makroevrimsel değişim** olarak adlandırılır ve büyük DNA parçalarının tek bir olay olarak tam ölçekli düzenlenmelerine neden olur. Bu yeniden düzenlemeler, DNA'nın geniş dizilerinin bir bakteriyel kromozomun veya plazmitin bir yerinden başka bir yere aktarılmasını veya çoğaltılmasını, eklenmesini, silinmesini, içe aktarılmasını içerebilir. Bakteriyel genomun tüm bölümlerinin bu geniş ölçekli yeniden düzenlenmesi, integronlar ve transposonlar veya ekleme dizileri olarak adlandırılan, bakteriyel genomun geri kalanından bağımsız olarak yerleştirme, yeniden düzenleme ve hareket etme kapasitesine sahip özel genetik öğeler tarafından sıklıkla üretilir (23).

Bakterilerde üçüncü genetik değişkenlik seviyesi; plasmidler, bakteriyofajlar, çıplak DNA dizileri veya diğer bakterilerden bütünleyici ve konjuge edici unsurlar (ICE) olarak bilinen uzmanlaşmış transpoze genetik elementler tarafından taşınan yabancı DNA parçalarının kazanılmasıyla oluşturulur (23). Bu olaylar, yanal veya yatay gen transferi olarak adlandırılmakta ve özellikle çevresel olarak eksojen DNA'yı alabilen doğal olarak yetkin bakteriler için sık görülen bir olay olarak bilinmektedir. Yabancı DNA'nın miras alınması, organizmanın genetik çeşitliliğine ve antimikrobiyal ajanların dayattığı seçim baskısına tepki verme kapasitesine katkıda bulunur (24). Bu mekanizmalar, bakterileri, herhangi bir antimikrobiyal ajana direnç geliştirecek görünüşte sınırsız bir kapasiteyi sağlar. Mikroorganizmaların antibiyotik maruziyeti gibi çevresel streslere uyum

kapasitesine örnek olarak plazmid aracılı karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* gösterilebilmektedir (31). Bir antibiyotik direnç geni geliştiğinde, bu gen transformasyon, transdüksiyon, konjügasyon veya transpozisyon yoluyla bakteriler arasında yayılabilir.

2.1.6. Plazmidler

Plazmidler genellikle 10 kilobaz (kb) ile 400 kb'den büyük boyutlara sahip, kovalent olarak kapalı, dairesel, çift sarmallı DNA moleküllerinden oluşan ve özerk olarak çoğalan genetik öğeler olup genetik değişim ve direnç-gen yayılımı ajanları olarak kullanılmaktadırlar(22, 24).

2.1.7. Aktarılabılır Genetik Elemanlar

Transpozonlar, bakteriyel kromozomun bir alanından diğerine veya kromozom ile plazmid veya bakteriyofaj arasında yer değiştirebilirler.

Transpozonlar çoklu antibiyotik direncinden sorumlu direnç plazmidlerinin evrimi için gereklidirler. Bazı Avrupa hastanelerinde *Enterobacteriaceae* ailesinde metalo- β laktamazlar ile karbapenem direncinin yaygınlaşmasından bu durum sorumlu tutulmuştur (26).

2.1.8. DNA İntegral Elemanları

Antibiyotik direncine aracılık eden yapısal genler sıklıkla birbirine bağlıdırlar ve bakteriyel kromozom veya plazmid boyunca birlikte bulunabilirler. Antibiyotik dirençli genlere bitişik DNA dizilerinin genetik analizi, eşsiz entegrasyon birimlerinin genellikle promoter bölgelerin yakınında bulunduğunu ortaya koymuştur (27)

İntegronlar adı verilen bu birleşme unsurları, büyük ölçüde homolog olmayan DNA dizileri arasındaki alana özgü rekombinasyon olayları için rekombinasyonel "sorumlu noktalar" olarak işlev görürler. İntegronlar yanal aktarım ve mobil gen kasetlerinden antibiyotik direnç genlerinin entegrasyonunu kolaylaştırırlar. Bu entegrasyon elementleri yapısal ve işlevsel olarak transpozonlardan farklı olsa da, bakteri popülasyonlarında yaygın olarak görülmekte ve antibiyotik dirençli genlerin yaygınlaştırılmasında önemli bir rol oynamaktadırlar (23).

2.1.9. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Bakterilerde antibiyotik direnci ile ilgili en az sekiz farklı mekanizma tanımlanmıştır.

2.1.10. Enzimatik İnhibisyon

2.1.11. β -laktamazlar

β -laktam antibiyotiklere direnç öncelikle β -laktam halkasının amid bağıını bölerek bu antibiyotikleri inaktive eden enzimler olan β -laktamaz üretimiyle oluşur. β -laktamazlar muhtemelen zamanla doğal antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları olarak bakterilerle birlikte evrilmişler ve modern tıpta antimikrobiyal terapinin yaygın olarak kullanılması sonucu ortaya çıkan baskı seçilimi, gelişimlerini hızlandırabilmektedir. β -Laktamazlar ya kromozomal genler ya da plasmidler ve transpozonlar üzerinde bulunan transfer edilebilir genler tarafından kodlanmaktadır. Buna ek olarak, β -laktamaz genleri (bla) çoğunlukla çoklu direnç belirleyicileri taşıyan integronlar üzerinde bulunur. İntegronlar, transpoze edilebilir elementler tarafından harekete geçirilirse farklı bakteri türleri arasında çoklu ilaç direncinin daha da yaygınlaştırılmasını kolaylaştırabilir (28).

Ambler tarafından önerilen ilk beta-laktamazlar amino asit yapısına göre dört moleküler sınıfa ayrılabilir. Alternatif olarak, Bush-Jacoby-Medeiros sistemi, enzimleri substrat profiline ve klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörlerine duyarlılığına göre çeşitli fonksiyonel gruplara göre sınıflandırır (29). Sınıf A, C ve D β -laktamazlar, β -laktam halkasını aktif bölgelerinde bir serin kalıntısıyla hidroliz ederken, B sınıfı enzimler, amid bağı kırmak için çinko (Zn)²⁺ kullanan metalo- β -laktamazlardır. İlk β -laktamaz, literatürde penisilin'in ilk klinik kullanımının yaklaşık olarak aynı zamanda, 1940 yılında *Escherichia coli*'de penisilini hidrolize edebilen "penisilinaz" olarak tanımlandı (30). Sonraki yıllar *S. aureus* klinik izolatlarının çoğunluğu arasında plazmid kodlu penisilin direncinin hızla yayılmasına tanık olundu (31, 32). 1960'lı yıllarda gram negatif organizmalar arasında ampisilin direncindeki artış, ilk izolatın bulunduğu bir Yunanlı hasta olan Temoniera'dan ismini alan, plazmidle kodlanmış bir β -laktamaz olan TEM-1'in ortaya çıkmasına bağlanmıştı. TEM β -laktamaz ailesi, çeşitli *Enterobacteriaceae*'nin yanı sıra *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* ve *N. gonorrhoeae* vasıtasıyla dünyaya yayılmıştır (33). Benzer şekilde hem kromozomal olarak kodlanmış hem de plasmid aracılı SHV-tipi β -laktamazlar (TEM enzimleriyle ilgili moleküler yapıya sahip), *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları arasında geniş bir şekilde yaygınlaşmıştır.

2.1.12. Genişlemiş Spektrumlu β -laktamazlar

İlaç endüstrisinin üçüncü nesil sefalosporin gelişimi başlangıçta TEM ve SHV tipi β -laktamazların etkisine karşı başarılı oldu ve kısa sürede monobaktam ve geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilen GSBL'nin ortaya çıkması ve yaygınlaşması izledi (24, 32, 33). Buna ek olarak, karbapenemaz ortaya çıkması ve yaygınlaşması ile ilgili raporların artması, şu anda sınırlı antimikrobiyal cephanenin çoklu ilaca dirençli gram negatif bakterilerle olan enfeksiyonlarla ilgili endişe yaratmıştır (34, 35).

TEM-Türevi

TEM-1 gram negatif bakterilerde en yaygın β -laktamazdır ve *Enterobacteriaceae*, *N. gonorrhoeae* ve *H. influenzae*'de penisilinleri ve dar spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilir (32). TEM'den türeyen GSBL'ler için geniş spektrumlu etkinlik, enzim aktif alanındaki konfigürasyonunu değiştiren bir ya da birkaç amino asidin değişiklikleriyle elde edilir ve böylece üçüncü nesil sefalosporinler (sefotaksim, sefpodoksim, seftazidim, seftriakson) ve monobaktam (aztreonam) hantal R1 oksimino yan zincirlerine daha kolay erişilebilir hale getirilir. İlk TEM kaynaklı GSBL, TEM-3, 1988'de rapor edilmiştir. Artık TEM'den türeyen 200'den fazla GSBL bulunmaktadır. Bu enzimler, esasen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında bulunur; ayrıca *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus spp.* ve *Salmonella spp.* gibi diğer *Enterobacteriaceae*'de bulunur (32). TEM kaynaklı GSBL'lerin çoğunluğu, klavulanik asit tarafından inhibisyona duyarlı olmaya devam eder, ancak inhibitöre dirençli TEM varyantları da tarif edilmiştir (36).

SHV-Türevi

SHV-1 β -laktamaz, TEM-1'e benzer bir biyokimyasal yapıya sahiptir (amino asitlerin % 68'i paylaşılır) ve GSBL türevleri aynı zamanda aktif bölgesindeki nokta mutasyonlarıyla (bir veya daha fazla amino asit ikamesi) üretilmektedir.

CTX-M-Türevi

Düşük patojenik potansiyele sahip çevresel gram negatif çomak, *Kleyvera spp.*'nin kromozomal ampisilin C (AmpC) enzimlerinden plazmidler tarafından elde edildiği düşünülen sefotaksim-M (CTX-M) β -laktamazlar evrimsel olarak SHV ve TEM aileleri ile ilişkili değildir (37, 38). Genel olarak, CTX-M ailesi ceftazidime karşı artmış aktiviteye yol açan nokta mutasyonlar olabilmesine rağmen, sefotaksim ve seftriaksonu, seftazidime

göre daha iyi hidrolize eder ve klavulanik asit yerine tazobaktam tarafından daha fazla inhibe edilir. CTX-M enzimleri hızla yaygınlaştı ve şu anda dünya genelinde en yaygın GSBL'ler arasındadır.

OXA-Türevi

Oksasilin (OXA) -tipi β -laktamazlar da plazmid türevlidir ve oksasilin ve türevlerini çok etkili bir şekilde hidrolize eder; klavulanik asit tarafından zayıf şekilde engellenirler(31). OXA'dan türevi GSBL'ler esasen oksimino- β -laktamlara üst düzey direnç kazanan *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır (29, 31, 39).

AmpC Enzimleri

AmpC β -laktamazlar öncelikle penisilinlere, dar spektrumlu sefalosporinlere, oksimino- β -laktamlara ve sefamisine karşı direnç gösteren ve klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörlerine duyarlı olmayan kromozomal enzimlerdir. Sefepim ve aztreonam zayıf substratlar olmasına rağmen, aktif bölgenin R2 döngüsündeki nokta mutasyonları tarafından modülasyon, sefepimi hidrolize etme yeteneği artmış varyantlardan sorumlu olmuştur. Gram negatif basillerdeki AmpC üretimi normalde bastırılmıştır. Bununla birlikte, indüklenebilir AmpC enzimlerine sahip *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Serratia*, *M. morgani*, *Providencia* ve *P. aeruginosa* türlerinde β -laktam antibiyotiklerinin varlığında geçici bir üretim artışı (10 ila 100 kat) meydana gelebilir. AmpC β -laktamaz üretimi, genin ampD bölgesinde spontan mutasyonlar ortaya çıkıp kalıcı üretim artışına yol açmazsa, antibiyotik maruziyeti kesildikten sonra tekrar düşük seviyelere döner. *Enterobacter spp.* enfeksiyonlarında üçüncü nesil sefalosporin kullanımı, baskılanmış mutantların seçilime neden olur ve bu da tedavi sırasında antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına yol açar (40).

Karbapenemazlar

Karbapenemazlar, en büyük antibiyotik direnç spektrumunu sağlar, çünkü sadece karbapenemleri değil aynı zamanda geniş spektrumlu penisilinler, oksimino-sefalosporinler ve sefamisinleri de hidroliz edebilirler. *K. pneumoniae* karbapenemaz (KPC) enzimleri halen en önemli A sınıfı serin karbapenemazlardır. *K.pneumoniae* izolatlarından ilk rapor edildiğinden beri (41), KPC'ler dünya çapında *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia* ve *P. aeruginosa* gibi çok sayıda başka gram-negatif türde bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (42). B sınıfı metalo- β -laktamazlar (MBL'ler)

β -laktam halkasının hidrolizi için bir Zn^{2+} katyonu kullanırlar; etilendiaminetetraasetik asit (EDTA) gibi iyon şelatörlerine karşı hassastırlar; klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam için dirençlidirler. Monobaktamlar hariçi tüm β -laktam antibiyotiklere direnç sağlarlar. Kromozomal olarak kodlanmış MBL'ler temel olarak *Aeromonas*, *Chryseobacterium* ve *Stenotrophomonas spp.* çevresel izolatlarında bulunur ve genellikle düşük patojenik potansiyellidirler (43). Klinik açıdan önemli MBL'lerin çoğu, imipenem (IMP), Verona integron metalo- β -laktamaz (VIM), Sao Paulo metallo- β -laktamaz (SPM), Alman imipenemaz (44) ve Seul imipenemaz (SIM), tipik olarak integronlara yerleştirilen ve *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, diğer gram-negatif nonfermente ve enterik bakteriyel patojenler yoluyla taşınan mobil gen elemanları tarafından iletilir (43).

Yeni Delhi metallo- β -laktamaz-1 (NDM-1) son yıllarda en dikkat çeken unsurlardan biridir. Başlangıçta Hindistan'da bir *K. pneumoniae* izolatında 2008'de tanımlanan NDM-1 enzimleri o zamandan beri Birleşik Devletler, Birleşik Krallık ve bir dizi başka ülkede, özellikle Hindistan veya Pakistan'a seyahatle ilgili olarak bildirilmiştir (45). Bu enzimler aztreonam hariç tüm β -laktamlara direnç kazandırır. Bununla birlikte, çoğu metalo- β -laktamaz, diğer antimikrobiyal sınıflara ek antibiyotik direnç genleri barındıran integronlara yerleştirilmiş mobil gen kasetleri üzerinde bulunur; bu çoklu ilaç direnci transpozonlar ve plazmidler vasıtasıyla diğer türlere aktarılabilir ve ciddi enfeksiyonlarda terapötik seçenekleri kısıtlar (46).

Son olarak, D sınıfı karbapenemazlar, temel olarak *A. baumannii*'de OXA-tip β -laktamazların (OXA-23, OXA-24, OXA-58 ve OXA-146) alt aileleri olarak tanımlanmıştır. Sonrasında, daha zayıf iç karbapenemaz aktivitesi, β -laktamaz üretimi ile azaltılmış membran geçirgenliği veya artmış aktif akım gibi ek bir direnç mekanizması ile birleştirilerek artırılır.

2.1.13. Gram-Pozitif Bakteriler - β -laktamaz

Gram pozitif bakteriler arasında, β -laktamaz üreten başlıca patojenler stafilokoklardır. Stafilokokal β -laktamazlar tercihan penisilinleri hidrolize eder. Çoğu indüklenebilir ve ekstraselüler olarak atılırlar. Stafilokoksik β -laktamazları belirleyen genler genellikle küçük plazmidler veya transpozonlar üzerinde taşınır. β -laktamaz ve diğer dirençleri kodlayan daha büyük plazmidler de mevcuttur ve yalnızca *S. aureus* suşları arasında değil, aynı zamanda *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* arasında konjügasyon yoluyla transfer yapabilirler (34).

2.1.14. Anaerop Bakteriler- β -laktamaz

β -Laktamazlar anaerobik bakterilerin β -laktam antibiyotiklere direncine katkıda bulunurlar. *Fusobacteriaceae* ve *Clostridiaceae* β -laktamazları esas olarak penisilinazlardır. *Bacteroides fragilis* tarafından üretilen β -laktamazlar ağırlıklı olarak sefalosporinazlar olup bazıları sefoksitin ve imipenemi hidrolize ettiği ve transfer edilebilir oldukları bulunmuştur (47). Sefalosporinazların çoğu, klavulanat, sulbaktam veya tazobaktam tarafından engellenmektedir. Bazı *Bacteroides spp.* izolatları, imidazol'e karşı direnç gösteren karbapenemazlar, EDTA ile inhibe edilen fakat klavulanatla korunmayan metaloenzimler üretirler (48).

2.1.15. β -Laktamazların β -Laktam'a Katkısı

Bir bakteri popülasyonunda belirli bir β -laktamazın aracılık ettiği antibiyotik direncinin seviyesi en az beş değişken tarafından belirlenir. Bir antibiyotığın hidrolize edilmesinde β -laktamazın etkinliği;

- a. Hidroliz hızı
- b. Antibiyotik için afinitesi
- c. Bakteri hücresi tarafından üretilen β -laktamaz miktarı
- d. Hedef proteininin (penisilin-bağlama proteininin [PBP] antibiyotiklere duyarlılığı
- e. Hücrenin periplazmasına antibiyotik nüfus etme kapasitesine bağlıdır (49).

Bakteri hücresi içinde, β -laktamazlar çeşitli yollarla antibiyotik direncine katkıda bulunurlar. En basit model, bakterilerin penisiline maruz kaldıklarında ekstrasellüler olarak salınan β -laktamaz üretmeye başladıkları penisilinaz üreten stafilokoklardır (49, 50).

Bakteri hücresi içinde, β -laktamazlar çeşitli yollarla antibiyotik direncine katkıda bulunurlar. En basit model, bakterilerin penisiline maruz kaldıklarında ekstrasellüler olarak salınan β -laktamaz üretmeye başladıkları penisilinaz üreten stafilokoklardır. İki olay aynı anda gerçekleşir: (1) penisilin bakteriyi eritir ve (2) β -laktamaz, penisilini hidrolize eder. Penisilin seviyesi, minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MIC) daha düşük bir seviyeye düşürüldükten sonra da canlı bakteri kalırsa, bakterilerin yeniden büyümesi meydana gelir (49, 50).

Başka bir model, (1) periplazmik boşluğa sıkışmış olarak kalmış bir β -laktamaz üreten ve (2) antibiyotik penetrasyonuna hiçbir engeli olmayan gram-negatif bakteriler tarafından örneklendirilmiştir. Buna bir örnek TEM-1 β -laktamaz üreten *H. influenzae*

suşlarıdır. Organizmanın ampisilin tarafından parçalanarak hapsedilmiş β -laktamaz mikro çevreye salınmasıyla, yakında bulunan bakterilere kısmi koruma sağlanır. Ampisiline maruz kalmadan önce yüksek bir inokulum mevcutsa, sınırlı bir alanda tüm periplazmik β -laktamaz enzimlerinin salınması orijinal mikroorganizma popülasyonunda kalan canlı bakterilerin bir kısmını korumak için yeterli olabilir. Bununla birlikte, bakterileri enfekte eden ilk inokulum düşük olduğunda, tek hücrelerin düşük direnç seviyesi, ampisilin β -laktamaz üreten *H. influenzae* suşlarının neden olduğu bazı enfeksiyonları tedavi etmesini mümkün kılar (50).

Bir başka model, TEM-1 β -laktamaz üreten *E. coli* suşlarının ampisiline direnci ile gösterilmiştir. Bu bakteriler β -laktam moleküllerinin girişine engel oluştururlar (dış zar) ve periplazmik alana lokalize kalan bir β -laktamaz üretirler. Bu modelde dinamikler daha karmaşıktır. Enzim, antibiyotik penetrasyonu bariyeri (dış membran) ve antibiyotik hedefleri (sitoplazmik membrandaki PBP'ler) arasında stratejik olarak bulunmaktadır. Bu pozisyonda, enzim, antibiyotik moleküllerini bariyerden geçerken, sırayla tek bir giriş noktasından geçen hedefleri bol mühimmatı olan bir keskin nişancıya benzer şekilde yok edebilir. Sonuç olarak, önceki örneğe kıyasla, tek bakteri hücrelerinde yüksek düzeyde direnç oluşur (49).

Bu model üzerinde değişiklikler, *Enterobacter* ve *Pseudomonas spp.*'de olduğu gibi, bir β -laktam (indüksiyon) maruziyetiyle β -laktamaz miktarı arttığı zaman ortaya çıkar. Yüksek β -laktamaz seviyeleri yalnızca indükleyici antibiyotiklere maruz kaldıktan sonra üretilir ve direnç geç ifade edilebilir. *Enterobakter* suşları bir tanesi güçlü bir uyarıcı (örneğin, sefamandole) olan iki β -laktam antibiyotiğe maruz kaldığında, iki antibiyotik arasındaki antagonizma ortaya çıkabilir (51).

2.1.16. Aminoglikosid Direnci – Enzimler

Aerobik bakteriler arasında, aminoglikozid direnci, en sık aminoglikozid değiştiren enzimler yoluyla enzimatik inaktivasyona bağlıdır. Bunlar plasmidler veya kromozomlardaki genler tarafından kodlanabilir. Transpozonlar üzerinde çeşitli aminoglikozid değiştiren enzimlerin bulunduğu gösterilmiştir (52).

Aminoglikozid değiştiren enzimler, üç genel tepki ile antibiyotik direnci kazandırır: N-asetilasyon, O-nükleotidilasyon ve O-fosforilasyon. Bu genel reaksiyonların her biri için belirli bir amino veya hidroksil grubuna saldıran birkaç farklı enzim vardır (52).

Enzimatik aminoglikozid direnci, sitoplazmik zar geçiş sürecinde antibiyotik modifikasyonu ile sağlanır. Belli bir aminoglikozid direnci, ilacın alınması ile ilacın inaktivasyonu kıyaslandığında iki farklı oranın bir fonksiyonudur. Direnç seviyesinin belirlenmesinde önemli bir faktör, modifiye edici enzimin antibiyotik için afinitesidir. Eğer bir enzim, spesifik aminoglikozid için yüksek afiniteye sahipse, ilaç inaktivasyonu, enzimin çok düşük konsantrasyonlarında oluşabilir (53).

2.1.17. Kloramfenikol asetiltransferaz

Gram pozitif ve gram negatif organizmalardaki kloramfenikole direnç öncelikle inaktive edici enzim kloramfenikol asetiltransferaz aracılığıdır. Bu, ilacı 3-O-asetilasyon ile inaktive eden ve plazmid kaynaklı veya kromozomal genlerle kodlanan bir hücre içi enzimdir. Bu enzimin aktif bölgesindeki homolojiye rağmen, gram pozitif ve gram negatif organizmalardan izole edilen kloramfenikol asetiltransferaz enzimleri arasında önemli farklılıklar vardır (54).

2.1.18. Makrolid, Linkozamid, Streptogramin - İnaktive Eden Enzimler

Eritromisin ve diğer makrolidlere direnç sıklıkla ribozomal hedef bölgede veya çıkış pompalarında değişiklik sonucunda olsa da, çeşitli substrat inaktive edici enzimler karakterize edilmiştir. Eritromisin esterazlar, antibiyotik lakton halkasını hidrolize eden ve inaktivasyonu sonuçlanmasıyla *E. coli*'den izole edilmiştir. Bu, yapısal olarak üretilen ve eritromisine yüksek seviyede direnç (MIC > 2000 µg / ml) sağlayan plazmid aracılı bir direnç belirleyicisidir. Bu yüksek seviyeli makrolid direnç geni genellikle karbapenemaz üreten NDM-1 taşıyan plazmidlerle bağlantılıdır (55). Bu direnç genleri gastrointestinal cerrahi prosedürlerden önce bağırsak yolunun aerobik gram-negatif florasını azaltmada oral eritromisin veya diğer makrolidlerin kullanımını sınırlar. Diğer plazmid aracılı direnç genleri, adenilat lincosamidlerin veya streptograminlerin asetilatlanması veya hidrolize edilmesi için *Streptococcus haemolyticus* ve *S. aureus*'da spesifik inaktive edici enzimler üretir.

2.1.19. Tetrasiklin İnaktivasyonu

Nadiren *Bacteroides spp.* için TetX adlı bir tetrasiklin inaktive edici enzim tanımlanmıştır. Tetrasiklin direnci, başta efflux ve ribozomal koruma olmak üzere diğer mekanizmalar aracılığıdır (56).

2.1.20. Azalmış Bakteriyel Membran Geçirgenliği

2.1.21. Dış Membran Geçirgenliği

Alexander Fleming, penisilinin gram-pozitif bakterilere karşı etkili olduğunu, ancak gram negatif basillere karşı etkili olmadığını antibiyotik gelişiminin erken döneminde kabul etti (57). Penisilin duyarlılığındaki bu fark, büyük ölçüde, gram negatif basillerde hücre içine birçok antibiyotik penetrasyonunun bir bariyer görevi gören kalın bir lipopolisakkarit tabakasının varlığı nedeniyle olmaktadır. Gram negatif bakterilerin peptidoglikan hücre duvarının dışında yer alan bu dış zar, gram-pozitif bakterilerde yoktur. Lipopolisakkarit, nafsilin veya eritromisin gibi hidrofob antibiyotiklerin girmesini engelleyen, sıkı bağlanmış hidrokarbon moleküllerinden oluşur. Polimiksin gibi lipopolisakkarid tabakasının bütünlüğünü bozan ajanlar veya bozuk lipopolisakkaritlerin üretilmesine yol açan mutasyonlar, hidrofobik antibiyotiklerin geçirgenliğinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (58).

Bu dış zar yoluyla hidrofilik antibiyotiklerin geçişi, antibiyotiklerin geçebileceği su dolu difüzyon kanalları oluşturacak şekilde düzenlenmiş proteinler olan porinler tarafından kolaylaştırılır. Bakteriler genellikle birçok porin üretir; *E. coli*'nin tek bir hücresinde yaklaşık 105 porin molekülü bulunur (59). Bakteriler çevreleyen ortamın ozmolaritesine yanıt olarak porinlerin sayısını düzenler. Hiperozmolar ortamda, *E. coli*, daha küçük olanları (OmpC) eksprese etmeye devam ederken, daha büyük porinler (OmpF) üretimini bastırabilir (60).

Bu dış zar yoluyla antibiyotiklerin difüzyon hızı, porin kanallarının sayı ve özelliklerinin yanı sıra antibiyotiklerin fiziko-kimyasal özelliklerinin bir fonksiyonudur. Genel olarak, antibiyotik molekülü ne kadar büyük olursa o kadar negatif yüklü olur ve hidrofobiklik derecesi ne kadar yüksek olursa dış zar yoluyla da o kadar az penetre olur. İmipenem gibi zwitteryonik bir yüke sahip küçük hidrofilik moleküller oldukça geçirgendir. Tersine, karbenisilin gibi daha büyük yüklü moleküller daha az geçirgendir (61).

Spesifik porinlerin kaybına neden olan mutasyonlar, klinik izolatlarda ortaya çıkabilir ve β -laktam antibiyotiklere karşı artmış direnci belirleyebilir. Tedavi sırasında ortaya çıkan

aminoglikozidlere ve karbapenemlere direnç, dış membran proteinleri üretim eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının % 25'inde tedavi sırasında gözlemlenen imipenem direncinin ortaya çıkışı, OprD proteininin (D2 porin olarak da bilinir) mutasyonel kaybına bağlıdır (62).

Nalidiksik asit ve diğer kinolonlara karşı direnç *Serratia marcescens* ve *P. aeruginosa*'da dış zar proteinlerinin değiştirilmesiyle ilişkilendirilmiştir. Azalan hücre zarı permeabilitesinden kaynaklanan plazmid aracılı kloramfenikol direnci, *E. coli*'de gösterilmiştir (54).

2.1.22. İç Membran Geçirgenliği

Aminoglikozid moleküllerinin bakteri hücrelerine girme oranı genellikle doymamış bir anyonik taşıyıcıya bağlanmalarının bir fonksiyonudur ve bunun üzerine pozitif yüklerini korur ve daha sonra hücrenin dahili negatif yükü tarafından sitoplazmik zar boyunca "çekilir". Bu işlem, enerji ve anlamlı geçiş (proton hareket kuvveti) oluşmadan önce hazır bulunması gereken hücre dahili negatif yük eşliğinin en düşük düzeyini gerektirir. İç yükün seviyesi, belirli bir zamanda gerçek aminoglikozid konsantrasyonuna bağlı olabilir. Hücre içine substrat taşınması için gerekli olan enerji üretimi veya proton hareket gücü, aminoglikozidlere dirençli mutantlarda değiştirilebilir (63).

Değiştirilmiş proton hareket kuvvetine sahip olan bu aminoglikozide dirençli izolatlar nadiren ortaya çıkar fakat uzun süreli aminoglikozid tedavisi sırasında gelişebilirler. Bu izolatların genellikle düşük büyüme hızlarından kaynaklanan bir "küçük koloni" fenotipi vardır. Seçici aminoglikozid baskı yokluğunda kararsız olabilirler ve hassas bir fenotipe dönüşebilirler. Bu izolatların klinik önemi açık değildir. Virülanlığı biraz muhafaza edebilirler ve nadiren ölümcül bakteriyemi oluşturabilirler. Oksidatif metabolizma, aminoglikozid alım eylemi ve hücre büyümesi ve gelişiminde esas olduğundan, spesifik sitokromlarda eksik olan *Pseudomonas* mutantları bulunmuştur. Arızalı elektron taşıma sistemlerine sahip dirençli mutantlar, *E. coli*, *S. aureus* ve *Salmonella spp.* için tanımlanmıştır. Anaerobik olarak yetiştirilen fakültatif organizmalar, bir proton motor kuvveti eksikliği ve ilaç alımının belirgin azalması nedeniyle aminoglikozidlere karşı dirençlidir (64).

2.1.23. Antibiyotik Akımının Teşviki

a. Tetrasiklinler

Antimikrobiyal ajanların aktif dışa atılımı, birçok klinik olarak ilgili patojenin ortak bir direnç mekanizması olarak artan bir şekilde kabul edilmektedir. *E. coli*, *Shigella spp.* ve diğer enterik organizmaların bazı suşları, ilaç dışa atılımı ile çoklu ilaç direncine yol açan bir membran nakil sistemi eksprese eder (65). Bunların birçoğu, çok bileşenli, düzenlenmiş, enerji bağımlı taşıyıcı sistemler olup, birden fazla antibiyotik sınıfının aktif atılımını teşvik eder. Antimikrobiyal ajanların tekli sınıflarının çıkışını teşvik eden spesifik çıkış pompaları da mevcuttur (66).

b. β -Laktamlar

Aktif dışa atım mekanizmaları aynı zamanda *P. aeruginosa*'da β -laktam direncinin tam olarak ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir. *P. aeruginosa*'nın iç ve dış zarındaki çoklu ilaç çıkış pompaları, β -laktam ajanlardan bakteriyi korumak için periplazmik β -laktamazlar ve zar geçirgenlik bileşenleri ile birlikte çalışır.

c. Florokinolonlar

Florokinolonların aktif dışarı atılımı enterik bakteriler ve stafilokoklarda saptanmıştır. Bu dışarı atılım, çoklu antibiyotik direnç taşıyıcısı (örn. NorA) veya spesifik bir kinolon çıkış pompası (örn., EmrAB, AcrAB veya plazmid aracılı qepA gen dışa atılım sistemi). ile ilişkili olabilir (67). Yüksek düzeylerdeki florokinolonların erişimini sınırlayan bu mekanizma, kinolon direncinin tam olarak ekspresyonu için diğer mekanizmalarla (DNA giraz nokta mutasyonları, girazın korunması, geçirgenlik engelleri ve asetillenme) birlikte çalışır.

2.1.24. Değiştirilen Hedef Bölgeler

2.1.25. Ribozomal Hedef Değişiklikleri

a. Makrolidler, Linkosamidler, Streptograminler

Tetrasiklinler, makrolidler, linkosamidler, streptograminler ve aminoglikozidler de dahil olmak üzere çok çeşitli antimikrobiyal ajanlara direnç, ribozomal bağlanma bölgelerinin değiştirilmesinden kaynaklanabilir. Antibiyotiklerin ribozom üzerindeki hedef bölge veya bölgelere bağlanamaması protein sentezini ve hücre çoğalmasını inhibe etme

kabiliyetini bozar. Makrolidler, linkosamidler ve streptogramin B (MLS) için bu, aerobik ve anaerobik gram pozitif organizmalar arasındaki çoklu ajan direncinin ana mekanizmasıdır (68). Direnç, prokaryotik ribozomun 50S alt biriminin 23S ribozomal RNA'sında (rRNA) dimetilat adenine kalıntılarının bağlanmasını bozan çeşitli metilaz enzimleri (MLSB-determinant) olan erm (eritromisin ribozom metilasyon) geninin ürünleriyle MLS'nin ribozoma bağlanması bozularak sağlanır. Bu direnç belirleyicisinin farklı sınıfları plasmidlerde veya bakteri kromozomu üzerinde bulunabilir.

b. Tetrasiklinler

Tetrasikline direnç, çeşitli mekanizmalar tarafından aracılık edilebilir, bunların en yaygın olanı dışa atım mekanizmaları ve ribozomal koruma mekanizmalarıdır. *Helicobacter pylori*'de, hedef etki alanını değiştirerek ilave tetrasiklin direnci mekanizması bulundu.

c. Aminoglikozidler

Aminoglikozidlere karşı direnç de ribozomal seviyede olmaktadır. *Enterobacteriaceae* ve fermente edici olmayan gram negatif bakterilerde, genellikle plazmitlerde taşınan enzimler tarafından 16S rRNA'nın (aminoglikozidlerin bağladığı ve protein sentezini inhibe ettiği alan) metilasyonu, en az yedi farklı gen (armA, rmtA, rmtB, rmtC, rmtD, RmtE ve npmA) tarafından gerçekleştirilir. Bu, şimdi tüm dünyaya yayılmış gibi görünen tüm parenteral aminoglikozidlere karşı direncin önemli bir mekanizması olarak kabul edilmektedir.

d. Oksazolidinonlar

Şu anda klinikte kullanılan ana oksazolidinon olan linezolid'e direnç, gram-pozitif izolatlarda (*S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis*), antibiyotik ana bağlanma yeri olan 50S ribozomal altbirimin 23S rRNA'sını kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarının bir sonucu olarak tanımlanmıştır(69). Bu, klinik izolatlar arasında linezolid direncinin en yaygın mekanizması olmaya devam etmektedir. Vankomisine dirençli enterokok (VRE) bakteremisinde uzun süren linezolid tedavisi sırasında direnç gelişimi gözlenmiştir(70).

2.1.26. Hücre Duvar Öncülü Hedefleri Değişikliği

Teikoplanin gibi vankomisin ve diğer glikopeptid antibiyotikleri, peptidoglikan öncüllerinde kök peptitin terminalinde bulunan d-alanin-d-alanin (d-ala-d-ala) 'ya bağlanır. Büyük glikopeptid moleküller öncüllerin hücre duvarına dahil edilmesini önler. Enterokokların vankomisin direnci; genotip, hedef bölge değişiklikleri türüne ve vankomisinin direnç seviyelerine ve teikoplanin duyarlılığına veya direncine dayanarak A'dan G'ye sınıflandırılmıştır.

E. faecium ve *E. faecalis*'in vankomisin ve teikoplanin'e karşı yüksek dirençli suşları, A sınıfı dirence sahiptir. Vankomisin veya teikoplanin bu suşlara direnci indükleyebilir. *E. faecalis*, *S. pyogenes*, *S. sanguis* ve *Listeria monocytogenes* de dahil olmak üzere *E. faecium*'dan diğer gram-pozitif bakterilere konjugasyon yoluyla Sınıf A glikopeptid direnci transfer edilir. Plazmid üzerindeki vanA geni, *E. coli*'de hücre duvarı sentezinde yer alan d-ala-d-ala ligazlarıyla ilişkili indüklenebilir bir proteini kodlar. Bu protein, olağan d-ala-d-ala yerine bir depsi-peptid sonu (d-alanin-d-laktat) olan peptidoglikan öncüllerini sentezler. Değiştirilmiş peptidoglikan, glikopeptid antibiyotiklere afinitiyi azaltır ve vankomisin ve teikoplanin'e direnç gösterir.

B sınıfı dirençli *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları, yüksek (MIC, 1024 µg / ml) ile düşük (MIC, 4 µg / ml) arasında değişen ve teikoplanine duyarlı olan vankomisinin direnç seviyelerine sahiptir. Vankomisin (teikoplanin değil) bu suşlarda vankomisin ve teikoplanine direnci indükleyebilir. VanB fenotipini belirleyen genler, diğer *Enterococcus* suşlarına konjugasyon yoluyla kendiliğinden aktarılabilir.

Enterococcus gallinarum, *Enterococcus casseliflavus* ve *Enterococcus flavescens*'in tüm izolatları, vankomisinin düşük seviyeli direncine sahiptir ve teikoplanine duyarlıdır (sınıf C fenotipi). Dirence, *vanC1*, *vanC2* veya *vanC3* olarak bilinen kromozomal genlerin aracılık eder. *VanC* gen kompleksi, terminal alanin'in yerini bir serin alması anlamına gelen alternatif bir dipeptid olan d-alanin-d-serin senteziyle vankomisine direnç kazandırır. VanE ve vanG olarak bilinen diğer varyant genler, çeşitli glikopeptid direnç seviyelerine aracılık eden enterokok türlerinde bulunmuştur.

1987 yılından bu yana ABD ve Japonya'dan gelen raporlar, vankomisin-orta direnç *S. epidermidis*, *S. hemolitikus* ve *S. aureus* (71) salgınlarını belgeledi. Birleşik Devletler'deki ilk vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) izolatı, 2002 yılında, hemodiyaliz alan diyabetik bir hastada ayak yarasında, aynı yaradan bir VRE suşuyla birlikte ele

geçirildi(72). DNA dizilemesi her iki izolatta da aynı *vanA* genlerini ortaya çıkarmıştır ve ileri moleküler analiz, aynı hastadan elde edilen vankomisine duyarlı MRSA suşuna *enterococcus* (VRE) suşundan *vanA* genini kodlayan Tn1546 genetik elementi aracılığıyla plazmid aracılı direnç aktarım ile vankomisine dirençli hale geldiğini (VRSA) ortaya çıkarmıştır(72, 73).

Vankomisin orta direnç *S. aureus* (71), daha az çapraz bağlı olan olağandışı kalın peptidoglikan hücre duvarlarını eksprese eder. Vankomisin-orta dirençli *S. aureus*'un bazı suşlarında bulunan hücre duvarı, vankomisine artan sayıda yanlış bağlanma sahası sağlayan amide edilmemiş glutamin öncüllerini içerir. Vankomisin molekülleri, bu aşırı bağlanma bölgelerinde emilir, böylece antibiyotik hedefine ulaşmaz ve sitoplazmik membranda peptidoglikan sentezinin engellenmeden devam etmesine izin verilir.

2.1.27. Hedef Enzimlerin Değişimi

a. β -Laktamlar

B-Laktam antibiyotikleri, sitoplazmik zar içindeki PBP'lere kovalent bağlanarak bakterileri inhibe eder. Bu hedef proteinler, bakterilerin hücre duvarını oluşturan peptidoglikanın sentezini katalize eder. PBP'lerdeki değişiklikler β -laktam antibiyotik direncine yol açabilir.

Gram pozitif bakterilerde, β -laktam antibiyotiklere direnç ya antibiyotik için PBP afinitesinde bir azalma ya da bakteri tarafından üretilen PBP miktarında bir değişiklik ile bağlantılı olabilir. Bazı klinik izolatlarda çoklu mekanizmalar var gibi gözükmektedir. Bazı penisilin dirençli *S. pneumoniae* suşları, PBP'lerde birkaç değişiklik (diğer bir deyişle bazı PBP'lerin afinitesi azalması, diğerlerinin kaybı ve daha duyarlı hücrelerde bulunmayan PBP'lerin ortaya çıkışı) göstermiştir. Bu PBP'leri kodlayan genler, duyarlı pnömokoklardan gelen bölümler ve dirençli komensal streptokoklardan gelen segmentlerden oluşan mozaiklerdir. *S. aureus* ve *E. faecium*'da ilave PBP'ler uyarılabilir (diğer bir deyişle, üretim mikroorganizmanın β -laktam antibiyotiğe maruz bırakılmasıyla uyarılır). Bu indüklenebilir PBP'lerin, β -laktam antibiyotikleri için daha düşük bir afinitesi vardır ve bu da, ilacın düşük konsantrasyonlarında inhibisyona daha az duyarlı hale getirir. Duyarlı ve dirençli suşlarda gözlenen PBP türündeki değişiklikler, viridan streptokok türü *Streptococcus mitis*'te de görülmüştür.

b. MRSA Direnci

S. aureus'ta metisiline direnç, metililine, nafsilin, oksasilin ve sefalosporinlere karşı direnç gösteren β -laktam antibiyotikler için düşük afiniteli bir protein olan PBP2a'yı kodlayan *mecA* geninin ekspresyonuyla sağlanır. Te *mecA* geni, *mec* gen kasetinin yapısal bileşenidir ve bir koagülaz negatif *Staphylococcus* türünden yatay transfer yoluyla elde edilmiş görünen daha büyük stafilokok kaset kromozom mekanizmasına (SCC*mec*) eklenir. Çeşitli genetik dizilerin ve büyüklükteki en azından farklı SCC*mec* türleri tanımlanmıştır: sağlık bakımı ilişkili MRSA suşları tip I ila III, daha büyük ve çok ilaca dirençli olma eğilimindedir; toplumdaki edinilen MRSA suşları tip IV ve V, boyutları daha küçük olma eğilimindedir ve β -laktamlar dışındaki antibiyotiklere karşı daha duyarlıdır.

Metisiline direnç geninin ekspresyonu, *mec* geninin iki düzenleyici bileşeni tarafından kontrol edilir: *mecR1-mecI* ve *mecA* transkripsiyonunu azaltarak düzenleyebilen β -laktamaz genleri *blaI*, *blaRI* ve *blaZ*. Tüm MRSA izolatlarında *mecA* geni mevcut olmakla birlikte, metisilin direncinin fenotipik ekspresyonu daha değişkendir. Örneğin, 37 ° C'den çok 32 ° C'de yetiştirilen *S. aureus* izolatlarının metisilin direncini eksprese etme olasılığı daha yüksektir. Buna ek olarak, metisilin direncinin ekspresyonu, stafilokoksik kromozomda bulunan ve peptidoglikan sentezindeki çeşitli basamakları izleyen *fem* ve *aux* gibi yardımcı genler tarafından da modifiye edilmiş gibi görünmektedir.

B-laktamaz negatif penisiline dirençli *N. gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* ve *H. influenzae* suşlarının PBP'lerinin, penisilin bağlayıcı yatkınlığının azaldığı gösterilmiştir. Onların PBP'leri, penisiline dirençli pnömokoklara benzer, ilgili türlerin dayanıklı soylarından alınan DNA parçalarını içeren melez genler tarafından kodlanmış gibi görünmektedir. Dış zar proteinlerinin kaybına yol açan mutasyonlar ayrıca *N. gonorrhoeae*'nin penisilinaz-üretmeyen suşlarının penisilin direnci edinmesiyle ilişkili olabilir; bu da değiştirilmiş geçirgenliğin dirençe katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Dönüşüm ve plazmid aktarımı ile diğer direnç genlerini elde etme kapasitesi ile birlikte, *N. gonorrhoeae*'deki birden fazla mekanizma ile β -laktam aktivitesinin progresif olarak kaybedilmesi, tüm antibiyotiklere dirençli, tedavi edilemez bir gonore oluşturabilir.

c. Kinolonlar

DNA giraz (bakteriyel topoizomeraz II olarak da adlandırılır), efektif hücre bölünmesine sahip olması için bakterilerdeki kromozomal DNA'nın süper-burulması için gereklidir. Bir başka ilgili enzim olan topoizomeraz IV de, hücre bölünmesi sırasında bakteri genomlarının iki kızı hücrelerine ayrılması için gereklidir. Bu enzimler, *gyrA* geni tarafından kodlanan iki A alt birimi ve *gyrB* geni tarafından kodlanan iki B altbirimi (veya topoizomeraz IV için *parC* ve *parE*) içerir. *GyrA* lokusundaki spontan mutasyon, enterik bakterilerde çoklu forokinolon direncinin en yaygın nedenidir, ancak B-altunit değişiklikleri de bu ilaçlara direnci etkileyebilir. Kinolon direnci, azalmış hücre duvarı geçirgenliği, dışa atım veya enzim koruma mekanizmalarının kombinasyonundan da oluşabilir(67, 74).

Plazmid aracılı kinolon direnci, çeşitli *Enterobacteriaceae*'lerde bulunur ve DNA giraz antibiyotik hedefine bağlanan ve kinolon etkisinden koruyan *qnr* ile kodlanan proteinler tarafından sağlanır. Plazmid kökenli *qnr* genleri ile ilişkili florokinolon direnci düşük seviyeli direnç olmasına rağmen, bu genler genellikle aynı mobil element üzerinde taşınan diğer antibiyotik dirençli belirleyicilere bağlıdır ve çoklu ilaç direncinin klinik fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir(67, 74).

d. Sulfonamidler

Patojen bakterilerde sulfa ilaçlarına direnci yönlendiren iki ortak gen vardır: *sul1* ve *sul2*. Bu genler, sülfonamid, dihidropteroat sintazı (DHPS) için hedef enzimin değişmiş biçimlerini ortaya çıkarmaktadır(75). Bu enzim duyarlı bakterilerde folik asit sentezi için gereklidir. Sülfonamid direnç genleri tarafından aracılık edilen değiştirilmiş DHPS enzimleri artık sülf'a'ya bağlanmaz, ancak para-aminobenzoik asit substratından dihidropteroat sentezlemeye devam eder. Çok yaygın olan *sul1* geni, sülfonamidlere karşı yaygın direnç oluşturan sınıf 1 integron ailesinin bir parçasıdır.

e. Trimetoprim

Trimetoprim, bakteriyel dihidrofolat redüktaz (DHFR) 'nin güçlü bir inhibitörüdür. Trimetoprim ile inhibisyon kaybıyla birçok değiştirilmiş DHFR enzimi, öncelikle direnç plazmidlerinde bulunan genlerden tanımlanmıştır. Bu değiştirilmiş DHFR genleri gram negatif bakterilerde yaygın olup stafilokoklarda (*dfrA* geni) bulunur(76).

2.1.28. Kazanılmış Direnç İçin Standart Tanımlar

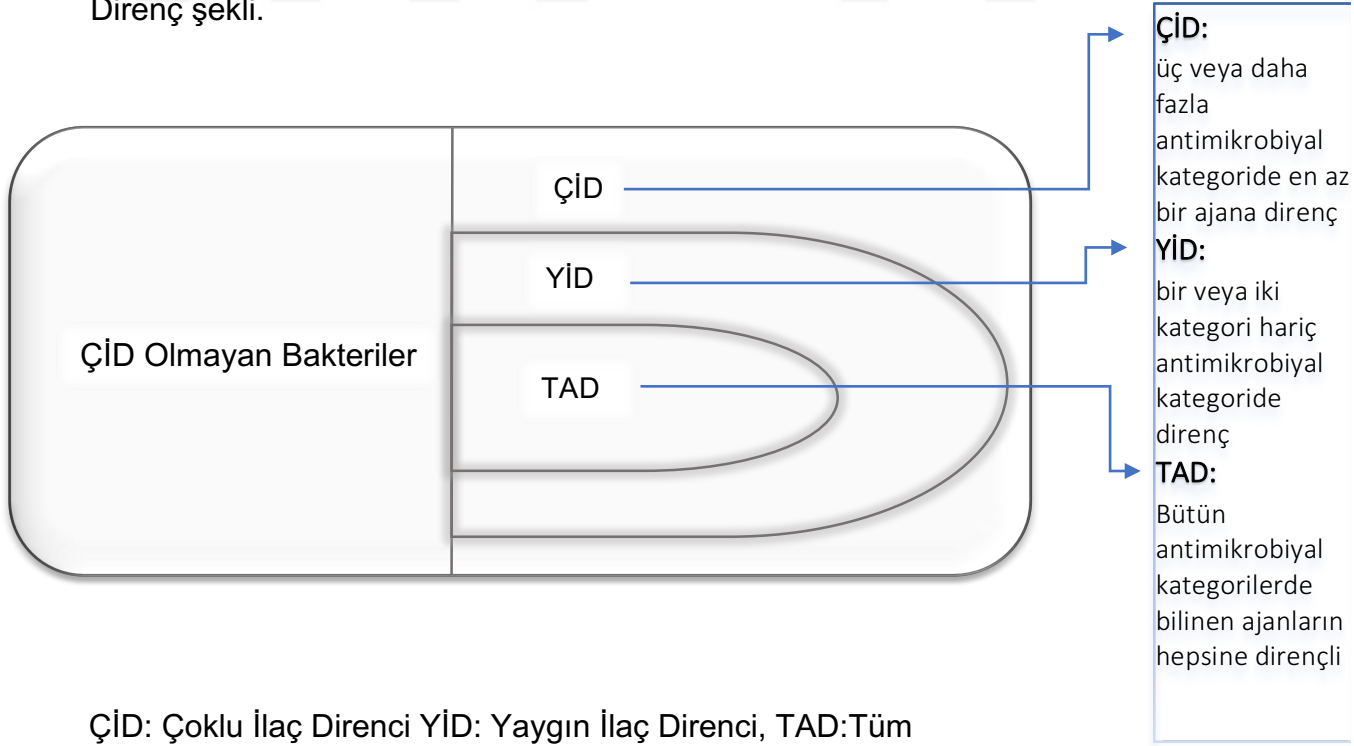
Antimikrobiyal duyarlılık testi için önerilen antimikrobiyal kategorilerin listesi, belirli kurumlardan alınan dokümanlar ve belirleyici noktalar kullanılarak oluşturulmuştur: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST). Tıbbi literatürde çoklu ilaç direnci (ÇİD), yaygın ilaç direnci (YİD), tüm antimikrobiallere direnç (TAD) için birçok farklı tanım kullanılmaktadır.

ÇİD, üç veya daha fazla antimikrobiyal kategoride en az bir ajan için direnç; YİD, antimikrobiyal kategorilerin iki veya daha azı hariç olmak üzere en az bir ajana direnç (örneğin; bakteri izolatları yalnızca bir veya iki kategoriye duyarlı kalır); ve TAD bütün antimikrobiyal kategorilerdeki ajanların hepsine direnç olarak tanımlanmaktadır(77-79).

2.1.29. ÇİD, YİD ve TAD için önerilen Tanımlar

Üç tanımın tümü için, duyarlılık; in vitro antimikrobik duyarlılık testinden elde edilen dirençli, orta veya duyarlı olmayan sonuçlara atıfta bulunur (**Şekil 2.1.**)

Şekil 2.1. Çoklu İlaç Direnci, Yaygın İlaç Direnci, Tüm Antibiyotiklere Direnç şekli. Direnç şekli.



ÇİD: Çoklu İlaç Direnci YİD: Yaygın İlaç Direnci, TAD:Tüm Antibiyotiklere Direnç

YİD, ÇİD'nin bir alt kümesidir ve TAD, YİD'nin bir alt kümesidir. TAD olan bakteri, mümkün olan en üst antimikrobiyal direnci taşır, bu suşlara karşı etkinliğe sahip herhangi bir onaylanmış antimikrobiyal ajan bulunmadığını ifade eder.

Bir bakteri izolatu YİD olarak karakterize edildiğinde, çok geniş bir direnç spektrumu da ima edilir, çünkü önerilen YİD tanımı, bu suşların antimikrobiyal ajanların sadece bir veya iki kategorisine duyarlı olduğunu gösterir. Bununla birlikte, ÇİD ve YİD'nin aksine, bakteri izolatının TAD olarak kesin olarak karakterize edilmesi için, ilgili organizma veya organizma grubu için listelenen her antimikrobiyal maddenin test edilmesi gereklidir.

3. TROMBOSİTLER

3.1. Giriş

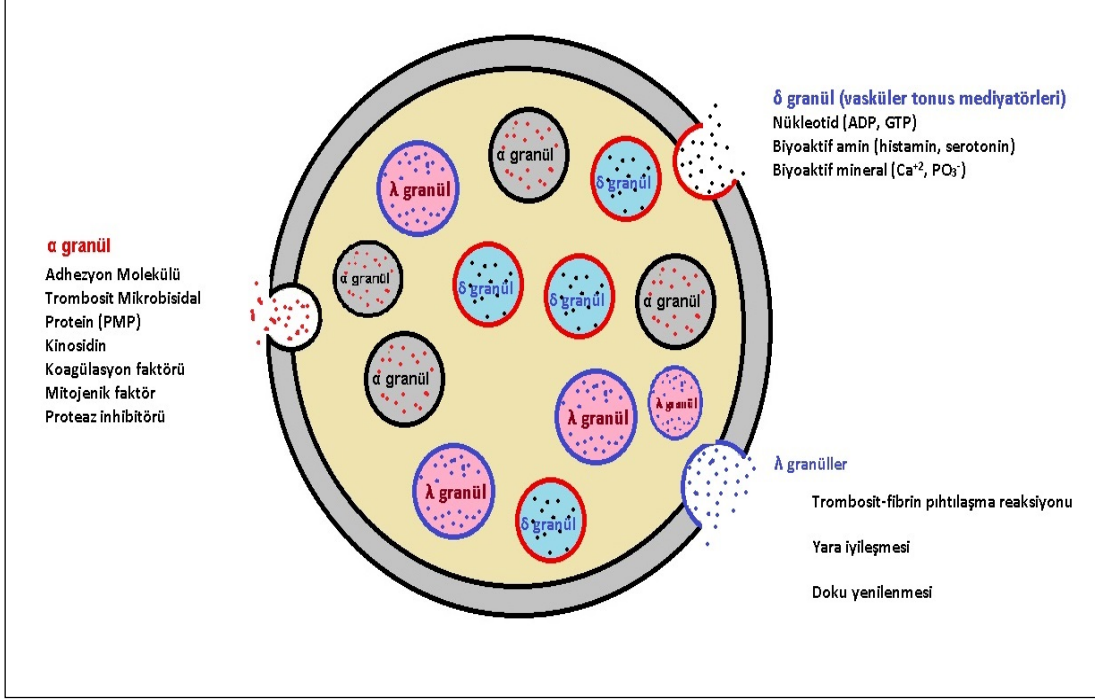
Trombositler hemostazda hayati fonksiyonlar olan hemodinamiyi, hiperkoagulasyon, endotel bütünlüğü ve damar açıklığını destekleyen hücrelerdir. Mikroorganizmaların kan akımına ulaşmasının ana yolu travmadır.

Birçok omurgalı, ilkel omurgalılarda, bir hücre tipi hemostaz ve konak defansı beraber yürütür. Memeliler evrim gereği özelleşen kan hücreleri vardır. Örneğin, trombositler, lökositler ve lenfositlerin farklı rolleri vardır. Yine de memelilerde trombositler immun sistemle ilgili bazı yapı ve fonksiyonları muhafaza etmektedirler. Trombositler megakaryositlerden gelişen küçük, çekirdeksiz, küresel hücrelerdir (80-82).

Nötrofil, bazofil ve eozinofiller temel granülositlerdir. Trombositler de granüller taşıdıkları için granülosit olarak sınıflandırılabilirler. Trombositler üç farklı granül tipi taşır (80-82) (**Şekil 3.1**).

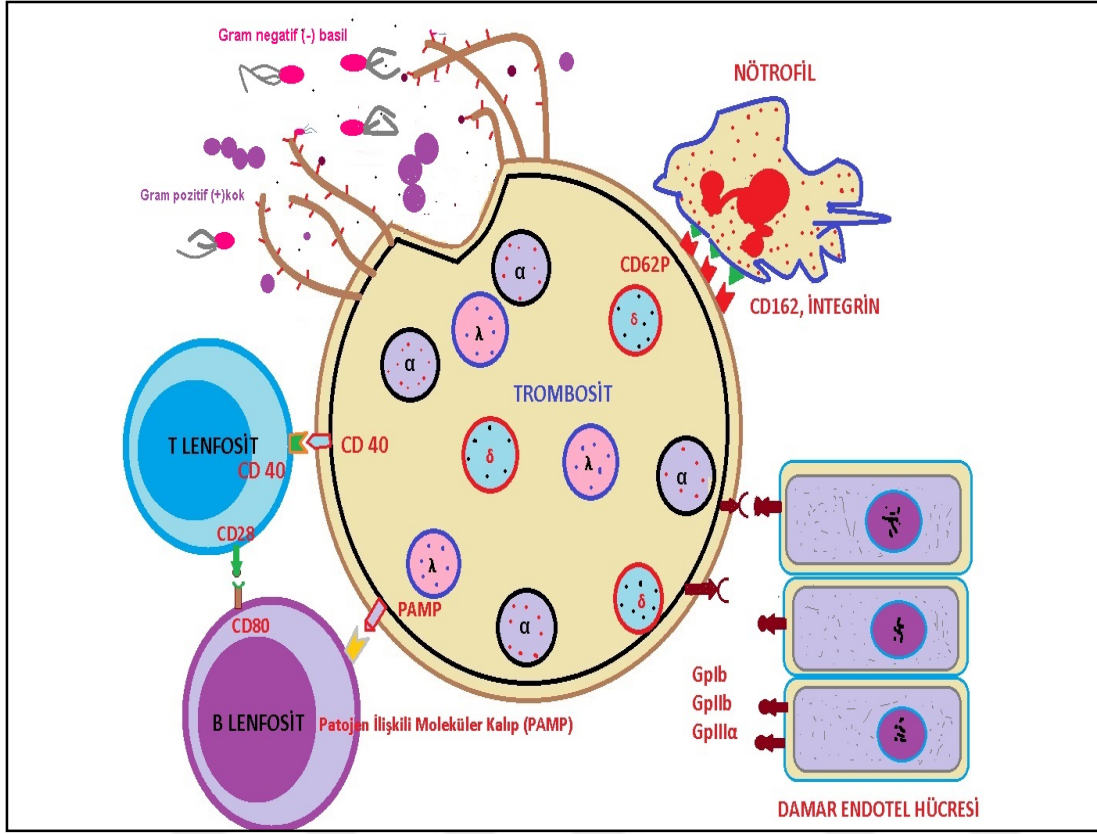
- 1- Delta (yoğun) granüller;** damar tonusuyla ilgilidir nükleotidler-biyoaktif aminler-biyoaktif iyonlardan oluşur.
- 2- Alfa granüller;** adezyon molekülleri, trombosit mikrobisidal proteinler, kinosidinler, mitojenik faktörler, koagülasyon faktörleri, proteaz inhibitörleri içerir.
- 3- Lizozomal granüller;** proteazlar, glikozidazlar, fibrin pıhtı çekilmesiyle doku iyileşmesini sağlayan granüllerdir.

Şekil 3.1. İntrasellüler veya ekstrasellüler etki gösteren trombosit granülleri (81, 82).



Ayrıca trombositler mikroorganizmaları fagosite etme yeteneğine sahiptirler (81, 82). Fakat bu fagositoz makrofajların yaptığı anlamda bir fagositoz olup olmadığı net değildir. Yine de bu süreçte trombositler küresel yapısından psödopodları olan amöbeoid hücrelere dönüşürler (**Şekil 3.2.**). Bunlar da trombositlerin hemostaz ve antimikrobiyal konak savunmasında buldukları bağlantıyı göstermektedir.

Şekil 3.2. Trombosit hücrenin bağışıklık sistemindeki rolü (80, 83).



3.1.1. Mikrobiyal Tehlikeleri Tanıma ve Cevap

Trombositler kanda en çok bulunan hücrelerdendir ve doku hasarını tanıyan sensörleri vardır (**Şekil 3.2.**). Trombositler endotelial hasar ve enfeksiyona ilk müdahale rol alan hücrelerdir. Bunun hemostastadaki öneminin yanında enfeksiyona yanıtta da rolü vardır. In vitro ve hayvan çalışmalarında bakteri spesifik proteinden zengin alanları trombositlerin hedef aldığı gösterilmiştir (81, 83). Bakteriyel peptidler, trombosit peptid reseptörlerine bağlanırlar ve bu da trombosit aktivasyonu ve degranülasyonuna neden olur. Ayrıca birçok kemokin ve kinosidin için reseptör bulundurlar. C3a ve C5a'nın yanında trombositler tarafından tanınan kemokin sınıfları (C, CC, CXC ve CXC3C) uygun kemokin reseptörlerine bağlanır (CCR, CCR3, CCR4 ve CXCR4). Sonuç olarak kemotaktik sinyallerin bu reseptörlerden tanınması trombositlerin enfeksiyon bölgesine doğru hızlı hareket etmesine neden olur. Trombositler doku hasarının sinyalleri olan kollajen veya kolajen benzeri substratlar yoluyla kemotaksise girebilir ve/veya nötrofillerle CD62P (P-selektin) ile etkileşim girerek migrasyon yaparlar. Ayrıca trombositlerinde plasma kolejenine spesifik olduğu gösterilmiştir (81, 83).

Kendi kemotaksislerine ek olarak, aktive olan trombositler, diğer immün hücrelerin kemotaksisini mikrobisidal kemokinleri (CXCL4 ve CCL5 gibi) ortama salarak düzenler. Ayrıca IgG, IgA, IgE, c-reaktif protein ve trombospondin, CD36 gibi immün efektör hücreler için reseptör eksprese eder. Böylece enfeksiyona verilen cevap hızlı hızlı ve hedefli konak yanıtını başlatır (84-86).

Trombositler ayrıca kardiyovasküler protezler ve endovasküler stentler gibi kasıtlı girişimlerle de aktive olup hasarlı dokuda birikebilirler. Bu bağlamda, TZP'NİN yara iyileşmesinde terapötik rolüne direkt antimikrobiyal etkisi de eklenebilir (81, 83).

Trombositlerin mikrobiyal tehlikeleri tanıma yolları tam olarak açıklanamamıştır. Son çalışmalar Toll-like reseptörler ve IL-1 ailesinden diğer üyeler yoluyla olduğunu göstermektedir (87, 88). Patojen moleküllerin TLR aracılıklı tanınması MYD88, IRAK, TRAF6 ve AKT tabanlı sinyal iletimi ile olduğu belirtilmektedir. Trombositler devamlı olarak düşük oranda TLR2, TLR4 ve TLR9 eksprese eder. Trombosit aktivasyonu ile daha fazla artırabilir. Yüksek thrombin seviyesi TLR9 ekspresyonunu, TLR4 yolağı ise bazı trombositlerde IL-6 ve COX-2 ile lipopolisakkaritlere (89) yanıtı tetikler. LPS tanınması, LPS reseptör kompleksi (CD14, MD2 ve MYD88) ile olmaktadır. Bu yüzden LPS ile tetiklenen CD14 ve MD2 aracılıklı trombosit-lökosit etkileşiminde TLR4 anahtar bir rol oynuyor gözükmektedir. TLR aktivasyonu, TNF α , IL-1 veya IL1b gibi akut faz reaktanlarının trombosit aracılı gelişimini indükler. Vasküler veya aterosklerotik lezyonların bakteriyel enfeksiyon içerebileceği bağlamında trombositler TLR1 ve TLR6 gelişimini artırabilir (89).

LPS'nin TLR4 ile tespitine yanıt olarak trombositler konak-defans yanıt peptidleri salar (87, 88, 90). Dahası trombositler farklı PAMP (patojen ilişkili molekül) türlerine farklı yanıt verir. İnsan trombositleri farklı bakteriyel LPS türlerine TLR4 ile ayırt ederek farklı sitokin sekresyonlarına neden olabilir. Sonuçta, farklı trombosit sitokin sekresyon izleri, diğer immün hücrelerde farklı aktivasyonlara neden olabilir.

3.1.2. Trombositlerin Amplifikasyon Basamağı (Kaskad)

Kendi amplifikasyon kaskadı trombositlerin konak-defans aktivasyonunda önemlidir. *S.aureus*'a karşı olan trombosit tanıma ve cevabı, Trier ve arkadaşları (91) tarafından bağlı olduğu unsurlar gösterilmiştir: trombosit bakteri tam oranı; trombositlerden delta (δ)-granül salınımı, ki bu ADP, ATP ve a-granül salınımını sağlar, ki bu da PMP (trombosit mikrobiyal proteinler) ve kinosidin salınımına neden olur; P2X1 ve P2Y12 adenükleotid reseptör

stimülasyonunun ADP ile olması; kenarda bekleyen trombositlerin PMP ve kinosidin seviyelerini artırmak için aktivasyonu ile olmaktadır (**Şekil 3.1.**, **Şekil 3.2.**). İlginç olarak akut veya kronik trombositopenideki artmış infeksiyon oranıyla ilgili ipuçları vermede trombosit-patojen sınır oranı ipuçları verebilir. Ayrıca *Streptococcus oralis* gibi patojenlerin trombosit aktivasyonunu takiben ADP sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca bazı patojenlerin trombosit degranülasyonu veya ADP sentezini bozduğu (subvert) gösterilmiştir. Örneğin *S. aureus* adenezine sentaz (AdsA) ADP yi AMP ye hidrolize ederek konak savunmasını aşan bir virülans faktörü gibi çalışmaktadır (81-83).

3.1.3. Antimikrobiyal Etkileyciler

Yukarıda belirtildiği gibi, trombositler mikrobiyal patojenlerin erken tanısında, tamamlayıcı konak savunmasının aktivasyonunda ve katılımında rol oynar. Ek olarak, trombositler antimikrobiyal etkili moleküller, PMP'ler ve kinosidinlerin sekresyonu ile doğrudan antimikrobiyal etkilidirler (81, 83).

3.1.4. Trombosit Mikrobisidal Proteinleri (PMP) ve Kinoidinler

Nötrofiller ve diğer granülositler gibi trombositler de doğrudan antimikrobiyal etkili protein ve peptidler içerir. En az dört çeşit mikrobisidal protein ailesi gösterilmiştir. Kinoidinler (CXCL4, CXCL7 ve CCL5), defensinler (ör. İnsan b-defensin2) timosin b4, antimikrobiyal peptid türevleri (fibrinopeptid A, fibrinopeptid B, trombositinler). Klasik defensinlerden farklı olarak trombositlerin antimikrobiyal molekülleri toplu olarak PMP'ler olarak bilinirler (80-83, 92).

Kinoidin, kemokin ve mikrobisidal etkili anlamına gelir. Trombositler birçok kinoidin içerir. Bunlar trombosit aktivasyonu ile hızla degranüle olurlar. CXCL4, CXCL7, CXCL8 monosit ve makrofajlar tarafından da üretilir. Önemli bir özellik olarak IL-8 gibi non trombosit kinoidin ile aynı oranda CXCL4 regülasyonunu artırır. Dahası CXCL4 ekspresyonu mRNA ve protein seviyesinde, trombinlerle proteinaz aktive reseptörler yoluyla olur. mRNA da 32-128 kat artış supernatant kültüründe 6 kat CXCL4 artışına sebep olur (80-83, 92).

En bol bulunan trombosit kinoidini CXCL4 dir. Bütün kinoidinlerin prototipidir. Olgun PMP'ler ve kinoidinler klasik antimikrobiyal peptidlerin belirgin özelliklerini sergiler, fakat yapısal veya fonksiyonel değişiklikler gösterir (81). Bunlar;

Birincisi; trombosit kinosidinler mikrobiyal tehdit veya doku hasarı ile kan akımına salınırlar. Klasik antimikrobiyal peptidler ise profesyonel fagositlerin içine özgüdür veya mukokutanöz olarak salınabilir fakat kan akımında toksik veya inaktiftirdirler.

İkincisi; kinosidinlerin immunoregulator fonksiyonları vardır; kemotaksis, konak tamamlayıcı savunma sistemi aktivasyonu. Karşılıklı olarak, klasik antimikrobiyal hücreler ve onların evrimsel akrabaları kalıntisal (iz kalan) kemotaktik veya hücre aktive edici özellikler taşır.

Üçüncüsü; olgun PMP'ler ve kinosidinler proteolitik yıkıma maruz kalabilir, yıkım ürünlerinin güçlü antimikrobiyal etkisi olabilir. Örneğin, trombin doku hasarı veya enfeksiyona sekonder salınır ve kinosidinleri yıkarak C-terminal ortaya çıkarır ki bu ürün otonom mikrobisidal spiral olarak çalışır. Belirli yıkım ürünleri antimikrobiyal aktivitelerini yansıtmak için trombositinleri isimlendirmiştir. Bu proteolitik ürünlerin herbiri aynı olmasa da antimikrobiyal etki taşır. Fibrinopeptid A ve fibrinopeptid B, insan trombositlerini trombin ile aktivasyonuyla fibrinogenden yıkılan PMP'lerdir.

Kinosidin türevi peptidlerin in vitro olarak *S. aureus* ve *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhimurium* gibi etkenlere nötral pH da hızlı ve güçlü mikrobisidal etkisi varken pH 5.5 da daha az etki gösterirler. RP-1 ve CXCL8 gibi birçok kinosidin in vitro ortamda *Candida*'ya karşı pH 5.5 da güçlü etkiliyken, nötral pH daha az etkilidir. Bu yüzden anatomik ve fizyolojik bağlamda bir kinosidin hangi hedefe bağlandığı seçici toksisitesiyle ilgilidir. Örneğin, antibakteriyel kinosidinler kan akımına salındıkların (pH 7) en etkinken, antifungal aktivitesi seröz akıntıya veya fagozom (pH 5.5) içinde asidik ortama salındığında daha iyidir (93).

3.1.5. Trombositlerin Konak Antimikrobiyal Savunması

Trombositler ve onların mikrobisidal proteinleri-kinosidinleri virüslere, bakterilere, mantarlara, protozoalara karşı hızlı, doğrudan ve güçlü etki gösterir (80, 82, 83). Son zamanlarda, konak antimikrobiyal savunmasında kinosidinlerin önemi ilgi çekmiştir. Aşağıdaki örneklerde insan enfeksiyonlarında kinosidinlerin önemi vurgulanmıştır:

3.1.6. HIV-1

Son çalışmalar trombosit aktivasyonu ve CXCL4 salınımının HIV-1 enfeksiyonuna karşı konak savunmasında anahtar rol oynadığı gösterilmektedir (94). Örneğin, Tsegaye ve arkadaşları, trombosit aktivasyonu sonucu CXCL4 salınımının in vitro koşullarda T

lenfositlerin HIV-1 ile enfekte olmasını engellediğini göstermiştir (94). Cocchi ve arkadaşları CD8 T-lenfositler tarafından salınan başka bir kinosidin olan CCL5'in majör bir HIV baskılayıcı olduğunu göstermişlerdir (95). HIV-1 gp120 zarf proteininin V3 bölgesi ve CCL5'in glikoz amino glikan bağlantı bölgeleri HIV-1 enfeksiyonuna karşı koruyucu etkiyle uyumlu görülmektedir. Bütün bu bulgular trombosit ürünü CXCL4'in geniş spektrumlu HIV-1 inhibitör etkisiyle uyumludur. CD4 T lenfositlerin kuşatılması ve HIV-1 fenotipik varyantları ile makrofajların enfeksiyonu virüs konak hücre bağlanma seviyesinde olmaktadır. Dahası, CXCL4 aracılı HIV-1 inhibisyonunun bu kinosidinin gp120 etkileşimi ile olduğu gösterilmiştir. Böylece, trombositlerden salınan kinosidinlerin HIV-1 konak savunmasında ve muhtemelen diğer viral patojenlere doğrudan ve dolaylı rolleri vardır. HIV-1 özelinde, kinosidinlerin koruyucu etkisi viral zarfın bozulması yoluyla mı, karşılık gelen reseptörlerin yarışmalı inhibisyonuyla mı olduğu hala aydınlatılması gereken bir konudur.

3.1.7. Bakteriyel patojenler

In vitro, ex vivo ve in vivo ortamda trombositler, PMP'ler ve kinosidinler aracılığı ile bakteriyel patojenlere karşı direk etki gösterir (83). Örneğin, trombosit kökenli kinosidinlerin *S. aureus*, streptokok türleri ve diğer bakteriyel patojenlere karşı in vitro ortamda doğrudan antimikrobiyal etkili olduğunu göstermiştir. Mercier ve arkadaşları, bir *S. aureus* nedenli ex vivo enfektif endokardit modelinde, trombositler ve onların mikrobisidal peptidlerinin koruyucu etkisini göstermişlerdir (96). Wong ve arkadaşları, bütün bu erken gözlemleri destekleyerek, trombositlerin makrofajların yüzeylerinin gözlenmesiyle bağışıklık takibinde anahtar bir rol oynadığını bildirmiştir (97). Trombositler karaciğer kupffer hücrelerini trombosit glikoprotein 1b (GP1b veya CD42c) geçici etkileşimiyle vWF ekspresyonu için gözetler. Kan kökenli *S. aureus* veya *Bacillus cereus*'ları yakalayan kupffer hücreleri vWF artışını düzenleyerek GP2b (CD41) ile bağlanacak kalıcı hedefler sağlar. Böylece, trombositler enfekte kupffer hücrelerine kuvvetli bağlanır ve trombosit antimikrobiyal yanıtlarını oluşturur. Bu fikri destekleyen, GP1b yoksunu fareler belirgin şekilde, trombosit-makrofaj etkileşimi sağlam olan farelerden, enfekte kupffer hücrelerinin trombositlerle tanı kalitesi düşüklüğü nedeniyle, kupffer hücre hasarına ve ölüme daha duyarlıdır. Bu sebeple, enfekte makrofajların trombositlerle hedef alınması yaygın enfeksiyona karşı bakteriye klirens ve korumayı sağlamada erken ve anahtar bir konak savunma basamağıdır (97).

3.1.8. Plasmodium falciparum

Viral ve bakteriyel patojenlere ek olarak, trombosit mikrobisidal proteinler ve kinosidinler protozalara karşı güçlü etkinlik gösterirler. Bu gerçek Duffy antijen reseptörünün (DARC), CXCL4 kinosidininin enfekte eritrosit içine girmesini sağlamasıyla bu kinosidinin *Plasmodium falciparum*'a karşı konak savunmasında gerekli olduğu gösterilmiştir (98). DARC'ın bir kemokin reseptörü olması; CXCL4'nin N-terminal CXC motifi, γ -çekirdeğinin ve C-terminal mikrobisidal halkasının toplamda bütün olarak insan antiplasmodial etkinliğinde temeldir. Sonuçta CXCL4 özellikle enfekte eritrosit içerisinde birikir ve sindirilen vakuolün lizisi ile sonuçlanan bir mekanizmayla hızla paraziti öldürür (99). İlginç bir şekilde, CXCL4 seviyesinin artması serebral sıtma oranında artmayla bağlantılıdır. Bu durum konak savunma fonksiyonuna ters görünebilir; çünkü HIV-1 enfeksiyonunda mortalite ve morbidite için artmış trombosit sayısı bir risk faktörü, artmış CXCL4 seviyesi mikrobiyal patogenezin bir göstergesi olmaktan çok patojenin kontrol altına alınma çabasının bir işaretidir. Gerçekten de, insanlarda *Plasmodium vivax* sıtmasıyla ilişkili trombosit fagositozu sonuçlu trombositopeni, trombositlerin parazit ile lizisinden çok monositlerle temizlenmesi neden olmaktadır (100). Bunun için, yukardaki gözlemler trombositlerin kinosidin aracılıklı antimikrobiyal rolünü güçlendirir.

3.1.9. Diğer Patojenler

Trombositler ve ürünlerinin mantarlara, protozonlar ve *Leishmania spp.* , *Schistosoma spp.* gibi diğer ajanlara karşı bağışıklık-savunma fonksiyonları bildirilmiştir (81, 83).

3.1.10. Diğer Antimikrobiyal Mekanizmalar

Konak-savunma peptidlerine ek olarak, trombositler başka antimikrobiyal faktörler üretebilirler. Hidrojen peroksit ve diğer reaktif oksijen türleri, her ne kadar nötrofillerle üretilen oranlardan daha az olmasına rağmen, platetlerin uyarılmasıyla üretilir (81, 83, 101).

Trombositlerin potansiyel fagositler olması da çeşitli araştırmalara konu olmuştur. Trombositler, klasik fagositozdan çok patojenleri kaplayarak fonksiyon gösterdiği ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (102). Bu modelde, bakterinin trombositler tarafından kontrol altına alınması açık kanal sistemi ile olduğu belirtilmektedir. Trombositler ayrıca daha büyük antimikrobiyal kompleksler için platform görevi gördüğü gösterilmiştir.

3.1.11. Trombositlerin Bağışıklık Yanıt Geliştirilmesi

PMP'ler, kinosidinler ve diğer etkenlerin doğrudan antimikrobiyal aktivitesine ek olarak, trombositler tamamlayıcı konak savunmalarını da geliştirir ve görevlendirir. Örneğin, nötrofillerle trombosit etkileşimleri artık bakteriyel enfeksiyon savunmasında anahtar rol olarak görülmektedir. Daha önce bahsedildiği gibi, mikrobiyal ligandlar trombositler tarafından TLR'ler ile tanınır (87). Karşılığında, TLR aracılı sinyal iletimi trombosit yüzeyinde CD62P ve GPIIb-GPIIIa ekspresyonunu artırır. Trombositlerin, nötrofil ve monositlere bağlanması CD62P anahtar bir ligandır (**Şekil 3.2.**). Bu şekilde trombosit-mikroorganizma etkileşimleri nötrofil fagositozunu, hücre içi patojen öldürmeyi ve trombosit-nötrofil kompleksi gelişimini artırarak, her iki konak hücre tipinin de aktivasyonunu sağlar. Kinoidinler veya diğer kemoatraktanlar tarafından yara veya enfeksiyon alanına çağrılan nötrofiller nötrofil hücre dışı kapan (NET) üretir. Bu elektronegatif DNA komplekslerinin katyonik konak savunma peptidlerini (PMPler, kinoidinler ve defensinler) artırdığı ve mikroorganizmaları kapana sıkıştırdığı düşünölmektedir (103, 104). Aynı şekilde trombositler, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı, nötrofillerin oksidatif patlamalarını potansiyelize ederler (105). PMP ve kinoidinlerin spesifik fonksiyonel bölgeleri nötrofillerin antimikrobiyal mekanizmalarını güçlendirebilir. Örneğin, CXCL4 kinoidini ve onu taklit eden peptid RP-1 *S. aureus*'un nötrofiller tarafından fagositozunu ve hücre içi öldürölmesini güçlendirir. Böylece, mikroorganizmaların trombosit degranölasyonu ile PMP ve kinoidinler ile kaplanması ve nötrofilleri çekmesi, hızlı ve sinerjik iç bağışıklık savunmasını mümkün kılar.

3.1.12. Trombositlerin Antijen Sunumu;

Nötrofillere ek olarak, trombositler dentritik hücreleri aktive eder, olgunlaşmalarını sağlayarak T ve B hücrelere patojen antijen sunumunu sağlarlar (**Şekil 3.2.**) (82, 83). Örneğin, GP1b aracılığıyla, C3 proteinleri ile kaplı olan *Listeria monocytogenes* patojenini hızla tanıyarak, patojenin splenik dendritik hücrelerinde hızla birikimine neden olur. Bu süreç *L. monocytogenes* antijenlerinin işlenmesi ve T hücrelere sunumunu hızlandırır. *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Bacillus subtilis*'de de benzer bir etki gösterilmiştir (82, 83). Dahası, sitotoksik CD8 T hücre gelişiminde trombositler *L. monocytogenes*'i dendritik hücrelere etkin bir şekilde sunduğunda artmaktadır. Trombositlerle olan etkileşim dendritik hücreler ayrıca dentritik hücreler tarafından sitokin üretiminde artışa neden olmakta, buna

interferon- γ , IL-12, IL-4 monosit kökenli dentritik hücrelerden eş uyarıcı çiftler olan CD80-CD86 dahildir (106). Bu olaylar serisi, belirli bir patojene güçlü bir şekilde etkili olabilmek için bağışıklık tepkilerini yönlendirebilir. Bu nedenle, mikroorganizmaların antijen sunan hücrelere (APC) trombosit aracılığıyla yönlendirilmesi ve APC yanıtlarının şekillendirilmesi, antimikrobiyal konakçı savunması için gerekli doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtların koordinasyonunu teşvik etmektedir. Bütün bunlar bağışıklık yanıtı olarak değerlendirilir (84). Bu, patojenlerin dolaşımdan retiküloendotel sistem yoluyla doğrudan temizlenmesiyle, T hücre ve / veya B hücre aracılı adaptif bağışıklık tepkilerini belirlenmesi, optimizasyon ve doğuştan gelen ile sonradan kazanılan antimikrobiyal efektörlerin koordinasyonunu gerçekleştirir. Ayrıca etkin savunma yanıtları için rafine ederek dentritik hücreler tarafından işleme ve antijen sunumuyla bu olaylar gerçekleşir (84).

3.1.13. Trombositlerin T Hücre Koordinasyonu

Antijen sunumuna ek olarak, trombositler T hücrelerin yönlendirilmesini en az iki yolla koordine edebilir. Örneğin, mikroorganizmalar dahil, IgG kaplı hedeflerin içe alınması insan trombositlerinde CD40L ve CCL5 kinosidinin üretimine neden olur. Sonuçta bu trombositler, bakteriyel patojenlere koruyucu T hücre aracılı bağışıklık kazandırabilir (107). Aynı şekilde, viral enfekte trombositler viral enfeksiyona karşı optimal savunma için gerekli olan CD8+ T lenfositlerinin genişleme ve olgunlaşmasını güçlendirebilir (108). Ek olarak, trombositlerin CD8+ T hücreleri ile etkileşimi, viral olarak enfekte edilmiş konakçı hücrelerin viral rezervuar olarak yok edilmesi için hedeflenmesini kolaylaştırdığı bir takım çalışmalarda tespit edilmiştir (109). Trombositler tarafından sitokinlerin ve kinosidinin salgılanması da aktifleştirilmiş T hücrelerinin yönlendirilmesini koordine edebilmektedir. Hücrel konakçı savunmadaki rolleri ile tutarlı olarak, trombositler T yardımcı 1 (TH1) hücrelerinin ve TH17 hücrelerinin yönlendirilmesini teşvik eder, ancak TH2 hücrelerinin yönlendirilmesini teşvik edemezler (110). CXCL4 ve CCL5'in antikor aracılı nötralizasyonu, bu etkiyi ortadan kaldırır. Karşılık olarak, IL-17A ADP'nin indüklediği trombosit aktivasyonunu destekleyebilir, ancak kollajen aracılı agregasyonu destekleyemez (111). IL-17A, bir hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz 2 (ERK2, MAPK 1) sinyal yolağı yoluyla trombosit tepkilerini başlatmaktadır. Üstelik, IL-17A'ya maruz kalma, trombositlerde CD62P'nin ekspresyonu uyarmaktadır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

“Tüm Antibiyotiklere Dirençli *Klebsiella Pneumoniae* Mikroorganizmasına Karşı Otolog Trombin İle Aktive Edilen Trombositten Zengin Plazmanın In Vitro Antimikrobiyal Etkinliğinin Araştırılması” konulu tez çalışması, deneysel nitelikte bir araştırmadır. Çalışmamızın etik kurul onayı, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 13.03.2017 günü yapılan 2017/26 karar numarası ile alındı. **Çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

4.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

4.1.2. Cihazlar

- Trombosit Santrifüj Cihazı Magellan Autospin Biologic Therapies (Arteriocyte Cellular Therapies, A.B.D.)
- Etüv EN 500 (Nüve, Türkiye ve Memmert, Almanya)
- McFarland densitometre (Biomerieux, Fransa)
- Vorteks cihazı Nüve NM110 (Nüve, Türkiye)
- pH metre (Hanna, A.B.D.)
- Cell Dyn Sapphire Kan Sayım Cihazı (Abbott Diagnostic, A.B.D.)
- Çalkalayıcı Thermolyne Maxi Mix III Type 65800 (ThermoFischerScientific, A.B.D.)
- Tür tayini ve antibiyogram VITEK2 (Biomerieux, Fransa)
- Tüp santrifüjü Nüve NF 200 (Nüve, Türkiye)

4.1.3. Laboratuvar Malzemeleri

- Antikoagülan Kansuk ACD-A 500 ml (Kansuk Laboratuvarı, Türkiye)
- Trombosit Santrifüj Seti 10 adet, Magellan Autospin Biologic Therapies (Arteriocyte Cellular Therapies, A.B.D.)
- *E. coli* ATCC 25922 suşu
- *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşu
- Calcium Picken Ampul %10 Kalsiyum Glukonat (Adeka İlaç, Türkiye)

- Vacuette® Serum Pıhtı Aktivasyon tüpü 9 ml (BD Vacutainer, Plymouth, İngiltere)
- K3EDTA Tüp 5 ml (BD Vacutainer Plymouth, İngiltere)
- Steril Plastik Konik Tüp, 50 ml (Fırat Plastik, Türkiye)
- Dibi Yuvarlak Steril Cam Tüp (Şişecam, Türkiye)
- Mueller Hinton Broth Besiyeri (Medikalist, Türkiye)
- PBS (Phosphate buffered saline) solüsyonu (ChemBio, Türkiye)
- %5 Koyun Kanlı Agar hazır besiyeri (Salubris, Türkiye)
- Pipet 0,5-10 µl (Witeg, Almanya)
- Pipet 20-200 µl (BrandTech, A.B.D.)
- Pipet 100-1000 µl (BrandTech, A.B.D.)
- Filtreli steril pipet ucu 1-200 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)
- Filtreli steril pipet ucu 100-1000 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)
- Steril öze Looplast (LP, İtalya)

4.1.4. Örnek Kabulü

Çalışmamızda, kan bağıışı seçim kriterlerine uygun, 10 gönüllüden 54 ml kan alındı. Elde edilen Trombositten Zengin Plazma (TZP)'nin bir hastadan izole edilen Tüm Antimikrobiyal Ajanlara Dirençli (TAD)'a sahip *K. pneumoniae* izolatu üzerinde etkinliğine ışık tutmak amacı ile çalışma, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi Bakteriyoloji ve Moleküler Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

4.1.5. Çalışmaya Alınma Kriterleri

Ulusal kan ve kan ürünleri rehberindeki kan bağıışçısı seçim kriterlerine uygun bağıışçı adaylarından kan örnekleri alındı. Çalışma süresi içerisinde bağıışçı adaylarında herhangi bir hastalığı olan veya ilaç kullananlar çalışma dışı bırakıldı.

Tüm Antimikrobiyal Ajanlara Dirençli (TAD)'a sahip *K. pneumoniae* izolatu yoğun bakım ünitesinde takip edilen bir hastadan izole edildi. Tüm çalışma boyunca tek izolat kullanıldı. TAD'e sahip *K. pneumoniae*, antimikrobiyal duyarlılık testleri için uygulama standartlarında belirtilen kolay üreyen bakterilerde standart suş olan *E. coli* ATCC 25922

ile GSBL doğrulama testi yapılırken rutin olarak kullanılması önerilen *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşlarıyla üreme sayıları kıyaslandı.

Çalışmada kullanılan TAD'e sahip *K. pneumoniae*, olan *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 izolatları için 1 McFarland bulanıklığı sağlandı.

4.1.6. Yöntem

On sağlıklı kişiden elde edilen Trombositten Zengin Plazma (TZP), Trombositten Fakir Plazma (TFP) ve kontrol grubu amacıyla da tampon solüsyonunun (Phosphate buffered saline, PBS) TAD'e sahip *K. pneumoniae*, izolatu üzerinde etkilerinin olup olmadığı, var ise bu etkiyi ne kadar süre ile devam ettirebildikleri araştırılmak istendi. Aynı zamanda antimikrobiyal duyarlılık testleri için uygulama standartlarında belirtilen kolay üreyen bakterilerden standart suş olan *E. coli* ATCC 25922 ile GSBL doğrulama testi yapılırken rutin olarak kullanılması önerilen *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşlarıyla aynı ortamlarda (TZP, TFPve PBS) etkisinin kıyaslanması planlandı.

4.1.7. İzolasyon, Tür Tayini ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmaya, Sultan Abdülhamid Han Eğitim Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi Laboratuvarı'na, Yoğun Bakım Servisi'nde takip edilen ve son 10 gündür antibiyotik tedavisi almayan bir hastadan gönderilen örneğinden izole edilen ve -80°C'de gliserollü skim milk stok besiyeri içinde stoklanmış halde bekletilen, TAD'e sahip *K. pneumoniae*, izolatu alındı. -80°C'de stoklanan TAD'e sahip *K. pneumoniae* ile *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşlarının %5 koyun kanlı agara pasajları yapıldı ve plaklar 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 18-24 saat inkübe edildi.

Tür tayini ve antibiyogram için konvansiyonel yöntemler (oksidaz, katalaz, şeker fermentasyonu, motilite, sitrat, 42°C'de üreme) ve VITEK2 (Biomerieux, Fransa) otomatize identifikasyon sistemi kullanıldı.

4.1.8. Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trombositten Fakir Plazma (TFP) Elde Edilmesi

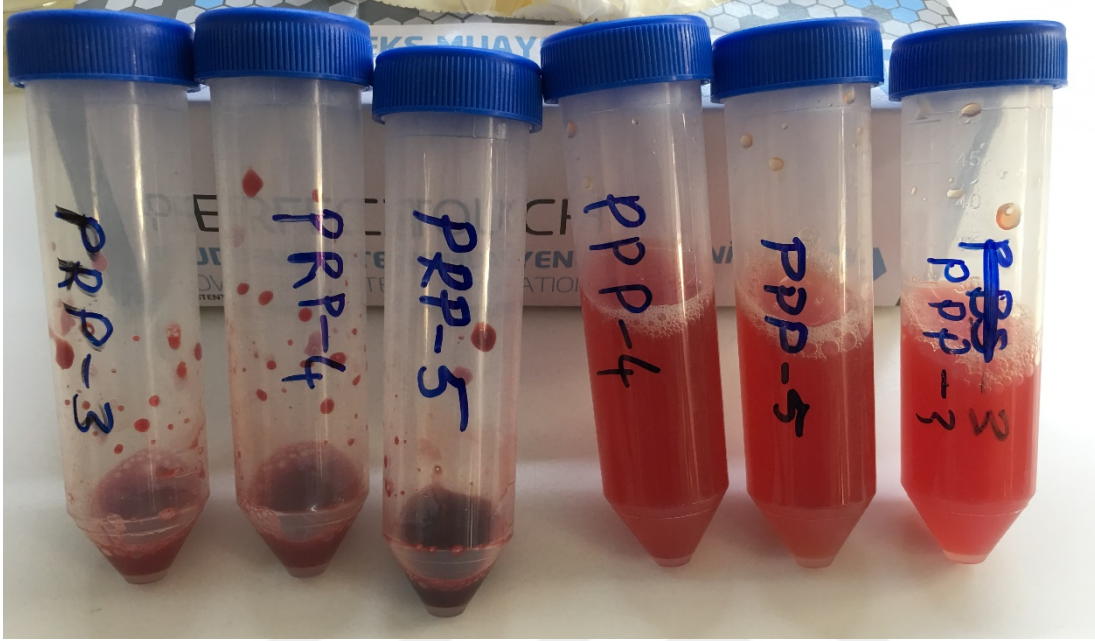
Kan bağışçılarında TZP elde edilmesi amacıyla Magellan PRP™ kiti içerisinde bulunan 60 ml enjektöre 6 ml ACD-A eklendi. Bu enjektör ile bağışçıların brakial veninden 54 ml tam kan çekildi. Toplamda 60 ml ACD-A karışımli tam kan tam otomatize kapalı sistemli

MagellanPRP™ (Arteriocyte Cellular Therapies, A.B.D.) cihazına bağlandı (**Resim 4.1.**).
MagellanPRP™ ile düşük ve yüksek devirde santrifüje edildi. Bu aşamalar sonrasında öncelikle 3 ml TZP (**Resim 4.2.**) ve 20 ml TFP (**Resim 4.2.**) elde edildi.

Resim 4.1. MagellanPRP™ Tam Otomatize Trombositten Zengin Plazma Santrifüjü.



Resim 4.2. Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trombositten Fakir Plazma (TFP)'nin santrifüj sonrası elde edilmiş görüntüsü.

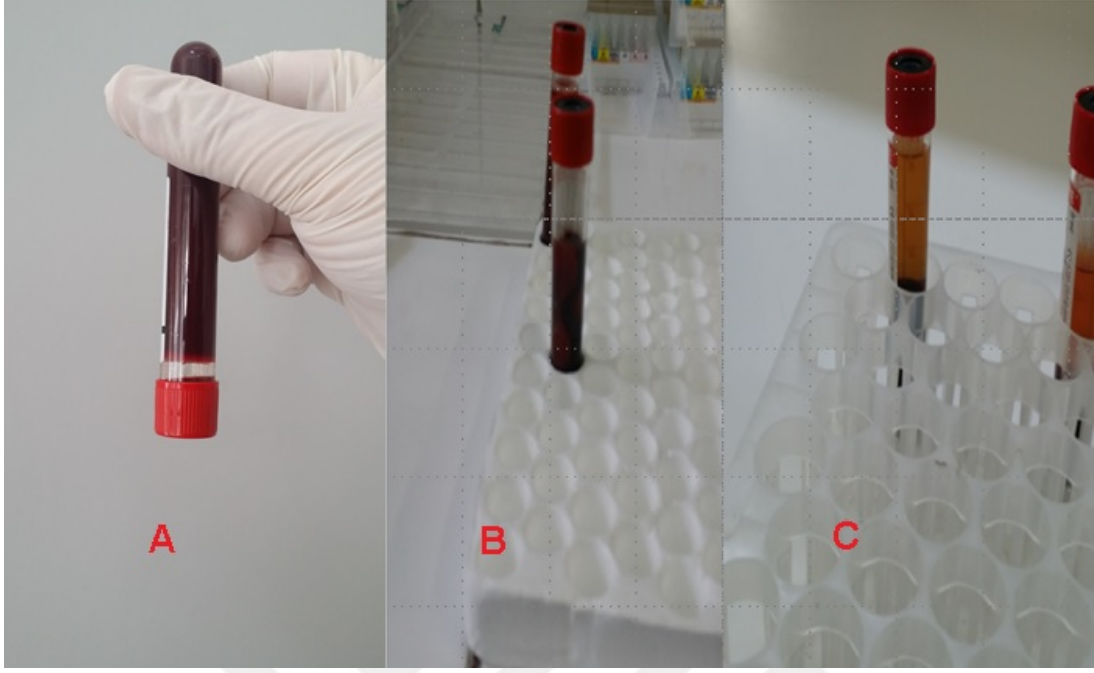


4.1.9. Otolog Trombin Elde Edilmesi

Trombin elde edilmesi amacıyla bağışçılardan yaklaşık 9 ml tam kan Vacuette® (BD Vacutainer, Plymouth, İngiltere) Serum Pıhtı Aktivasyon tüpüne alındı. Her bir tüp içine 1 ml %10 Kalsiyum Glukonat (Calcium Picken Ampul, Adeka İlaç, Türkiye) ilave edildi. Oda ısısında yaklaşık 10-15 dakikada pıhtı oluşumu gerçekleşti (**Resim 4.3.A.**). Bu pıhtı içeren tüp elde sert bir şekilde 1-2 dakika çalkalanıp pıhtı parçalandı (**Resim 4.3.B.**). Kısmen parçalanmış pıhtı vorteks cihazı (Nüve NM110, Biosan, Türkiye) ile bir dakika süre ile homojenizasyon amacıyla basit olarak santrifüj edildi.

Sonrasında 3 dakika süre ile 3000 rpm devirde tüpler santrifüj edildi (Nüve NF 200, Türkiye). Şekli elemanların tüpün dibine çökmesini müteakip üst kısımdan trombin içeren serum elde edildi (**Resim 4.3.C.**).

Resim 4.3.A-B-C. Otolog Trombin Elde Edilme Basamakları.



4.1.10. Çalışma Gruplarının Hazırlanılması

Çalışılacak olan TAD'e sahip *K. pneumoniae*, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 izolatları ayrı ayrı %5 koyun kanlı agar hazır besiyerine (Salubris, Türkiye) ekimleri yapıldı. Bir gecelik inkübasyon sonrasında üreyen TAD'e sahip *K. pneumoniae*, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 kolonileri Mueller Hinton Broth (MHB)'a ayrı ayrı inoküle edildi. Normal atmosferik koşullarda 2 saat 37°C'lik etüvde (Nüve EN 500, Türkiye) inkübasyona bırakıldı. 2 saatin sonunda MHB içeren tüpler alındı ve düşük devirde 500g x 10 dk. süreyle santrifüj (Nüve NF 200, Nüve, Türkiye) edilerek kolonilerin dibeye çökmesi sağlandı. Üst taraftaki süpernatantlar MHB döküldü ve yerine PBS eklenerek vortekslendi. Tekrar 500 g'de 10 dk. santrifüj sonrası süpernatantlar tekrar döküldü. Dipte kalan koloni pelleti vortekslenmek için kalan az miktardaki PBS ile homojenizasyonlar yapıldı.

McFarland densitometre (Biomérieux, Fransa) kullanılarak, tüplerin bulanıklık değeri PBS ile dilüe edilerek 1 McFarland olacak şekilde ayarlandı. Bir McFarland'lık TAD'e sahip *K. pneumoniae* kolonileri yaklaşık olarak 3×10^8 koloni oluşturan birim (kob) / mililitre bakteri içermekteydi.

E. coli ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 izolatları için McFarland densitometre kullanılarak 1 McFarland'lık 3×10^8 kob/mililitre bakteri içeren tüpler hazırlandı.

Her üç bakteri için dilüsyon aşaması amacıyla öncelikle 3×10^8 olan sayıyı 1×10^8 'e düşürmek için 2 ml PBS solüsyonu içeren laboratuvar tüpüne 1 ml 1 McFarland bakteri süspansiyonu eklendi. Daha sonrasında alınan 4 adet 9 ml PBS içeren tüplere sırayla bir önceki dilüsyondan birer ml çekilerek eklendi ve her aşamada tüpler tam homojenizasyon için vortekslendi. Bu aşamalardan sonra kullanılacak bakteri solüsyonu 1×10^4 'e getirildi. Solüsyon olası bakteri üremesini engellemek için buzdolabına (Nüve MD504, Türkiye) $+4^\circ\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

Çalışmamızın ana grubunu TAD'e sahip *K. pneumoniae* izolatı oluşturmaktaydı. Bu izolatın farklı trombosit konsantrisindeki üremelerinin araştırılması amacıyla 3 grup oluşturuldu (**Tablo 4.1. ve Resim 4.4.**). Bunlar sırası ile;

1. Trombositten Zengin Plazmanın (TZP) Grubu
2. Trombositten Fakir Plazmanın (TFP) Grubu
3. Kontrol (Phosphate buffered saline, PBS) Grubu

Tablo 4.1. TAD'e Sahip *K. pneumoniae* İzolatın Farklı Trombosit Konsantrisindeki Çalışma Grupları.

	TZP Grubu	TFP Grubu	PBS (Kontrol) Grubu
Buyyon	700 µl	700 µl	700 µl
<i>K. pneumoniae</i> (1×10^4)	100 µl	100 µl	100 µl
Trombin	40 µl	40 µl	40 µl
TZP	160 µl	-	-
TFP	-	160 µl	-
PBS	-	-	160 µl

TZP: Trombositten zengin plazma, **TFP:** Trombositten fakir plazma, **PBS:** Phosphate buffered saline

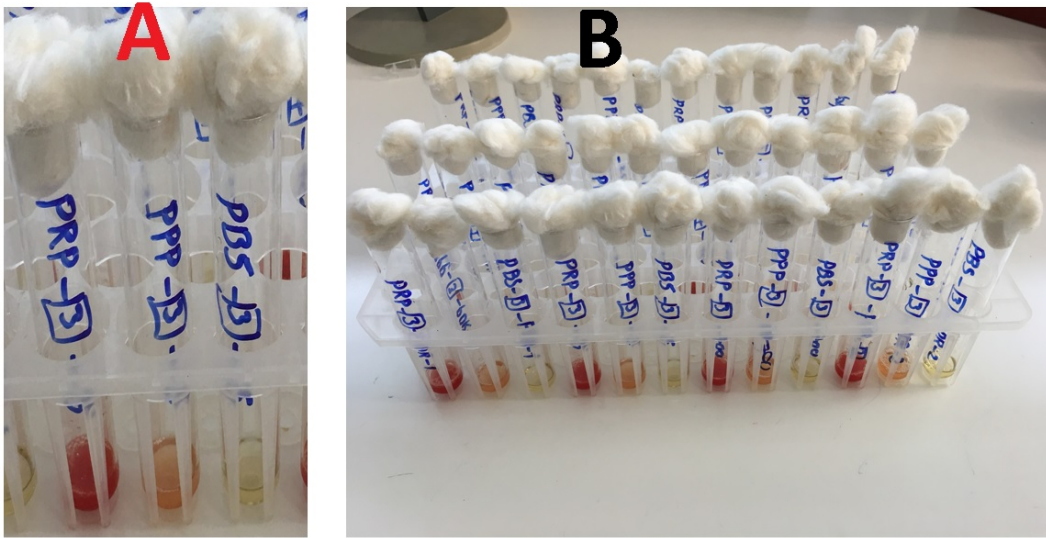
4.1.11. Trombositten Zengin Plazmanın (TZP) Grubu

Koloni sayıları ayarlanmış (1×10^4) 100 μ l TAD'e sahip *K. pneumoniae*, çalışma öncesi buzdolabından çıkarılarak ağız kapaklı cam çalışma tüplerine eklendi. Bunun üzerine 700 μ l buyyon, 160 μ l TZP son olarak 40 μ l trombin eklendi (**Tablo 4.1.**). Çalışma tüplerinde 10x daha dilüsyon gerçekleştiğinden son bakteri konsantrasyonu 1×10^4 kob/ml haline geldi (**Resim 4.5.**).

Tüpler 37°C ' de etüvde (**Resim 4.5.**) 200 rpm'de çalışan ajitator (Thermolyne Maxi Mix III Type 65800, ThermoFischerScientific, A.B.D) üzerinde inkübasyona kaldırıldı. Daha önceden belirlediğimiz saatlerde (1., 2., 4., 8., 12. saat) tüpler kontrol ekimleri için çıkarıldı. Ekim öncesi tüpler tekrar vorteksenerek homojenizasyonu sağlandı. Ekimler sırasında 10 μ l örnek filtreli steril pipet ucu (0,1-10 μ l, AHN, Almanya) kullanılarak 90 μ l steril serum fizyolojik ile steril boş petri üzerinde karıştırıldı (**Resim 4.6.**).

Bu 100 μ l 'lik (10^4) karışım %5'lik koyun kanlı agarın yüzeyine yayıldı. 18-24 saatlik 37°C de inkübasyon sonrası koloniler sayım için değerlendirildi.

Resim 4.4. Otolog trombin, TZP-TFP-PBS (Kontrol Grubu) ve TAD'e Sahip *K. pneumoniae* Karışımı.



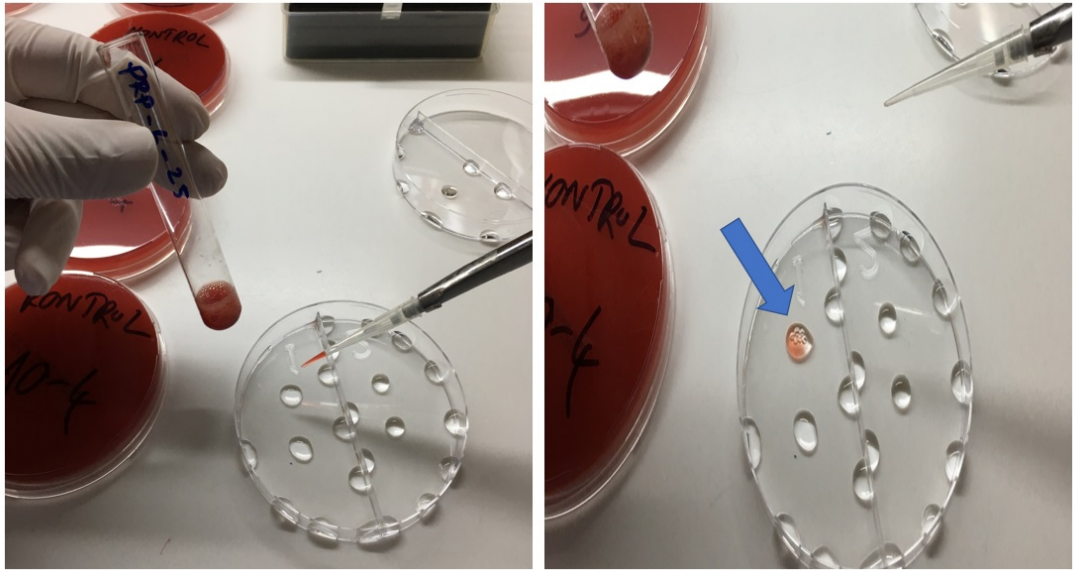
A: Üçüncü bağışçıya ait sırasıyla TZP, TFP, PBS tüpleri. Koyu kırmızı renk TZP, turuncu renk TFP, sarı renk PBS şişesi

B: Bir çalışma gününe ait çalışmaları

Resim 4.5. Otolog trombin, TZP-TFP-PBS (Kontrol Grubu) ve TAD'e Sahip *K. pneumoniae* Karışımının Etüvde Bekletilmesi ve Çalkalanması.



Resim 4.6. 10 µl örnek, 90 µl steril serum fizyolojik ile steril boş petri üzerinde karışımı.



4.1.12. Trombositten Fakir Plazmanın (TFP) Grubu

100 µl 1×10^4 TAD'e sahip *K. pneumoniae*, çalışma tüplerine eklendi. Bunun üzerine 700 µl buyyon, 160 µl TFP son olarak 40 µl trombin eklendi (**Tablo 4.1.**). Çalışma tüplerinde 10x daha dilüsyon gerçekleştiğinden son bakteri konsantrasyonu 1×10^3 kob/ml haline geldi (**Resim 4.4.**).

Tüpler 37°C ' de etüvde 200 rpm'de çalışan ajitatör üzerinde inkübasyona kaldırıldı. Daha önceden belirlediğimiz saatlerde (1., 2., 4., 8.,12. saat) tüpler kontrol ekimleri için çıkarıldı (**Resim 4.5.**). Ekim öncesi tüpler tekrar vortekslenerek homojenizasyonu sağlandı. Ekimler sırasında 10 µl örnek, 90 µl steril serum fizyolojik ile steril filtreli pipetle karıştırıldı ve 100 µl 'lik tüm hacim (**Resim 4.6.**) % 5'lik koyun kanlı agarın yüzeyine yayıldı. 18-24 saatlik 37°C de inkübasyon sonrası koloniler sayım için değerlendirildi.

4.1.13. Kontrol (Phosphate buffered saline, PBS) Grubu

100 µl 1×10^4 *A. baumannii* çalışma tüplerine eklendi. Bunun üzerine 700 µl buyyon, 160 µl PBS son olarak 40 µl trombin eklendi (**Tablo 4.1.**). Çalışma tüplerinde 10x daha dilüsyon gerçekleştiğinden son bakteri konsantrasyonu 1×10^3 kob/ml haline geldi (**Resim 4.4.**).

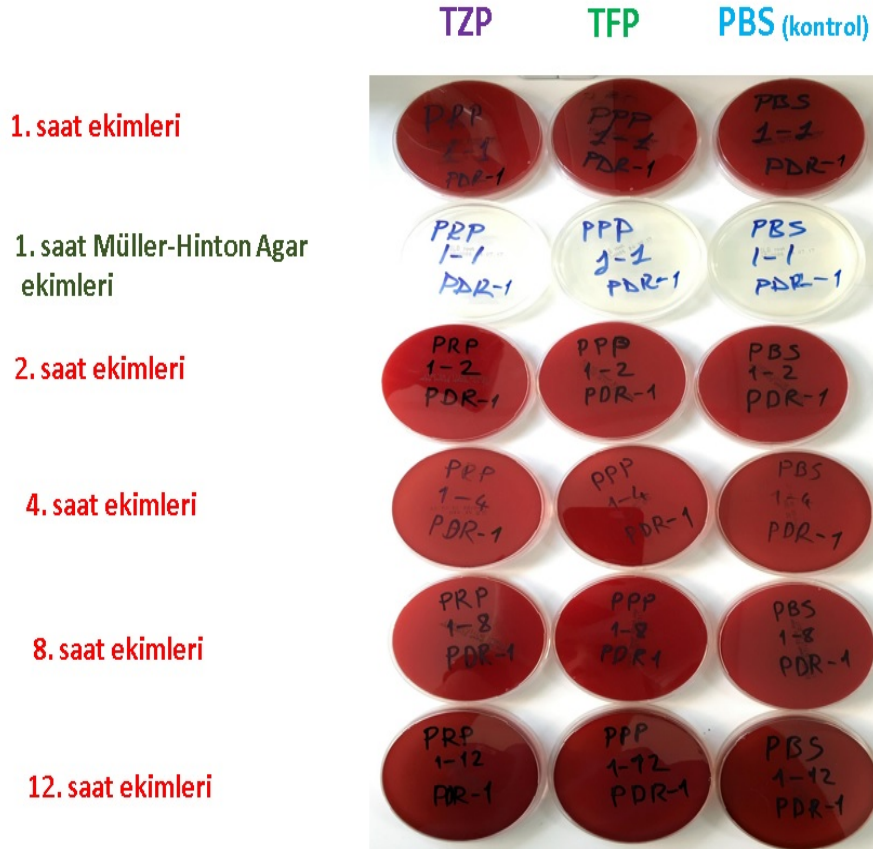
Tüpler 37°C 'de etüvde 200 rpm'de çalışan ajitatör üzerinde inkübasyona kaldırıldı. Daha önceden belirlediğimiz saatlerde (1., 2., 4.,8. 12. saat) tüpler kontrol ekimleri için çıkarıldı (**Resim 4.5.**). Ekim öncesi tüpler tekrar vortekslenerek homojenizasyonu sağlandı. Ekimler sırasında 10 µl örnek, 90 µl steril serum fizyolojik ile karıştırıldı ve 100 µl 'lik tüm % 5'lik koyun kanlı agarın yüzeyine yayıldı hacim (**Resim 4.6.**). 18-24 saatlik 37°C de inkübasyon sonrası koloniler sayım için değerlendirildi.

4.1.14. Üreme Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Etüv içinde 18-24 saatlik inkübasyon süresi bitimi koloniler koyun kanlı agarda sayıldı (**Resim 4.7.**).

Resim 4.7. Bir Kan Bağışçısına Ait TZP, TFP, PBS'li Ortamlarda %5 Koyun Kanlı Agar ve Müeller-Hinton Agar Plaklarında Ekim Zamanı ve Gruplandırılmaları.

BİR NUMARALI BAĞIŞÇIYA AİT PLAKLAR



4.1.15. E. coli ATCC 25922 ve K. pneumoniae ATCC 700603 Çalışma Gruplarının Oluşturulması

TAD'e sahip *K. pneumoniae* izolatına TZP'nin etkinliğini araştırmak için, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşları karşılaştırma amaçlı seçildi. Bu suşların seçiminde antimikrobiyal duyarlılık testleri için uygulama standartlarında tavsiye edilen standart suş olan *E. coli* ATCC 25922 ile GSBL doğrulama testi yapılırken rutin olarak kullanılması önerilen *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşlarıyla TZP' li ortamlarda üremeleri ortaya konulması amacıyla **Tablo 4.2. ve Tablo 4.3'**deki gruplar oluşturuldu.

Tablo 4.2. *E. coli* ATCC 25922 İzolatının Farklı Trombosit Konsantrisindeki Çalışma Grupları.

	TZP Grubu	TFP Grubu	PBS (Kontrol) Grubu
Buyyon	700 µl	700 µl	700 µl
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (1x10⁴)	100 µl	100 µl	100 µl
Trombin	40 µl	40 µl	40 µl
TZP	160 µl	-	-
TFP	-	160 µl	-
PBS	-	-	160 µl

Tablo 4.3. *K. pneumoniae* ATCC 700603 İzolatının Farklı Trombosit Konsantrisindeki Çalışma Grupları.

	TZP Grubu	TFP Grubu	PBS (Kontrol) Grubu
Buyyon	700 µl	700 µl	700 µl
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 (1x10⁴)	100 µl	100 µl	100 µl
Trombin	40 µl	40 µl	40 µl
TZP	160 µl	-	-
TFP	-	160 µl	-
PBS	-	-	160 µl

Her bir bakteriye ait tüplerden 1., 2., 4.,8. 12. saatlerde 10 µl örnek, 90 µl steril serum fizyolojik ile karışımlar ve koyun kanlı agarın yüzeylerine ekimler yapıldı. 18-24 saatlik 37°C de inkübasyon sonrası TAD'e sahip *K. pneumoniae* sonuçları ile karşılaştırmak için sayıldı.

4.1.16. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada , çalışmanın sonuç değişkeni olan üreme sayılarına süreklilik ve karekök ile normallik düzeltilmesi uygulanarak tekrarlanan ölçümlü ANOVA yöntemiyle iç içe bağımlı 3 faktörlü deneme desenine göre SPSS 21 kullanılarak (AEK Araştırma Ltd. Şti , Mersin Teknopark) biyoistatistik uzmanları tarafından veri analizleri yapılmış, tekrarlanan ölçümlü ANOVA sonrası zamana, mikroorganizmalara ve trombosit konsantrasyonlarına göre bağımlı grup karşılaştırmaları için repeated ve simple contrast kullanılmıştır. 1. tip hata en çok % 5 olacak şekilde red edilen H_0 hipotezleri * ile işaretlenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler hem transformasyon öncesi hem sonrası ayrı ayrı verilmiştir. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

5.1. Bağışçılara Ait Demografik Özellikler

Çalışmaya dahil edilen bağışçıların yaş ortalaması $36,5 \pm 6,5$ olup, 2 bağışça kadındı. Bağışçıların tam kan analizinde ortalama Beyaz Küre (WBC) sayısı; $7,2 \times 10^3$ µl, ortalama Trombosit (Trombosit) sayısı $236,8 \times 10^3$ µl olarak gözlemlendi.

5.2. TZP ve TFP Özellikleri

Tam kan ve TZP'ye ait beyaz küre, nötrofil, lenfosit ve trombosit sayıları **Tablo 5.1.**'de verilmiştir. TZP'de beklendiği üzere trombosit sayısı artmışken, beraberinde beyaz küre sayısında arttı.

Trombositten Zengin Plazma (TZP)'deki ortalama Beyaz Küre (WBC) sayısı; $76,18 \times 10^3$ µl, Trombosit (Trombosit) sayısı 2218×10^3 µl olarak saptandı. Bağışçıların TZP özellikleri **Tablo 5.1.**'de özetlenmiştir. TZP'deki trombosit ve WBC verimliliğinde sırasıyla yaklaşık 9,3 ve 10,5 artış saptandı.

Tam kan ve TFP'ye ait beyaz küre, nötrofil, lenfosit ve trombosit sayıları **Tablo 5.2.**'de verilmiştir. TFP'de beklendiği üzere trombosit sayısı azalırken, beraberinde beyaz küre sayısında azaldı.

Trombositten Fakir Plazma (TFP)'deki Beyaz Küre (WBC) sayısı; $2,76 \times 10^3 \mu\text{l}$, Trombosit (Trombosit) sayısı $174,7 \times 10^3 \mu\text{l}$ olarak saptandı. Bağışçuların TFP özellikleri **Tablo 5.2.**'de özetlenmiştir. TFP'deki WBC'de önemli derecede düşüş, trombosit sayısında yaklaşık %50 oranında azalma tespit edildi.



Tablo 5.1. Bağışçılarının Tam Kan ve Trombositten Zengin Plazma (TZP) Özellikleri

	BAĞIŞÇI BEYAZ KÜRE (WBC) SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	BAĞIŞÇI NÖTROFİL SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	BAĞIŞÇI LENFOSİT SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	BAĞIŞÇI TROMBOSİT SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	TZP BEYAZ KÜRE (WBC) SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	TZP NÖTROFİL SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	TZP LENFOSİT SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	TZP TROMBOSİT SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$
1	9,94	7	2,23	218	75,4	41,6	24,5	2638
2	8,02	5,31	2,18	265	160	101	45,6	4060
3	5,93	3,02	2,37	288	62,8	20,9	34	3442
4	9,52	5,63	2,86	241	84,2	43,5	30,8	1223
5	5,42	3,21	1,74	224	59,1	35,2	18,4	797
6	6,4	3,42	2,43	193	72,1	31,5	32,5	1230
7	6,24	3,4	2,08	229	21,9	4,38	14,4	1841
8	5,87	2,61	2,68	154	55,4	14	38,8	804
9	7,32	4,27	2,49	292	71,2	26,8	37,1	3076
10	7,38	4,34	2,47	264	99,7	47,4	43,5	3078
ORTALAMA	7,2 ± 1,5	4,2 ± 1,3	2,3 ± 0,3	236 ± 42,9	76,18 ± 35,7	36,6 ± 26,3	31,9 ± 10,2	2218 ± 1186

Tablo 5.2. Bağışçıların Tam Kan ve Trombositten Fakir Plazma (TFP) Özellikleri

	BAĞIŞÇI BEYAZ KÜRE (WBC) SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	BAĞIŞÇI NÖTROFİL SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	BAĞIŞÇI LENFOSİT SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	BAĞIŞÇI TROMBOSİT SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	TFP BEYAZ KÜRE (WBC) SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	TFP NÖTROFİL SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	TFP LENFOSİT SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$	TFP TROMBOSİT SAYISI $\times 10^3 \mu\text{l}$
1	9,94	7	2,23	218	2,18	0,6	1,14	181
2	8,02	5,31	2,18	265	4,31	1,04	2,66	271
3	5,93	3,02	2,37	288	2,52	0,255	1,87	142
4	9,52	5,63	2,86	241	1,5	0,245	1,05	59,7
5	5,42	3,21	1,74	224	1,98	0,634	1,15	150
6	6,4	3,42	2,43	193	4,34	1,1	2,78	186
7	6,24	3,4	2,08	229	2,33	0,23	1,69	205
8	5,87	2,61	2,68	154	2,26	0,488	1,71	81,9
9	7,32	4,27	2,49	292	3,25	0,69	2,2	242
10	7,38	4,34	2,47	264	3,02	1,03	1,74	229
ORTALAMA	7,2 ± 1,5	4,2 ± 1,3	2,3 ± 0,3	236 ± 42,9	2,7 ± 0,95	0,6 ± 0,33	1,7 ± 0,6	174 ± 67,7

5.3. Bağışçı Tam Kan Parametreleri ile TZP ve TFP gruplarının İstatistiksel Analizi

Bağışçı tam kanlarında ölçülen beyaz küre, nötrofil, lenfosit ve trombosit sayıları; **TFP grubunda** ölçülen değerlerden daha yüksek, **TZP grubundan** ise daha düşük olarak tespit edildi. Bağışçıların tam kan parametrelerinin TZP ve TFP' deki değerleri arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (**Tablo 5.3**).

TZP ve TFP' deki ölçülen değerler beyaz küre, nötrofil, lenfosit ve trombosit sayıları karşılaştırıldığında TZP' deki değerlerin tümünün daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu iki grup arasındaki farkta istatistiksel olarak anlamlıydı (**Tablo 5.3**).

Tablo 5.3. Bağışçı Tam Kan, TZP, TFP gruplarında parametrelerin analizi.

HÜCRE TİPİ	BAĞIŞÇI TAM KAN	TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (TZP)	TROMBOSİTTEN FAKİR PLAZMA (TFP)
Beyaz Küre (WBC) Sayısı $\times 10^3 \mu\text{l}$	$7,2 \pm 1,5^{a,b}$	$76,18 \pm 35,7^{b,c}$	$2,76 \pm 0,95^{a,c}$
Nötrofil Sayısı $\times 10^3 \mu\text{l}$	$4,2 \pm 1,3^{a,b}$	$36,2 \pm 26,3^{b,c}$	$0,63 \pm 0,33^{a,c}$
Lenfosit Sayısı $\times 10^3 \mu\text{l}$	$2,5 \pm 0,3^{a,b}$	$31,9 \pm 10,2^{b,c}$	$1,7 \pm 0,6^{a,c}$
Trombosit Sayısı $\times 10^3 \mu\text{l}$	$236,8 \pm 42,9^{a,b}$	$2218 \pm 1186^{b,c}$	$174,7 \pm 67,7^{a,c}$

Mann-Whitney U testi, *p*: anlamlılık düzeyi, SS: standart sapma

^aTam Kan - TFP < 0.05;

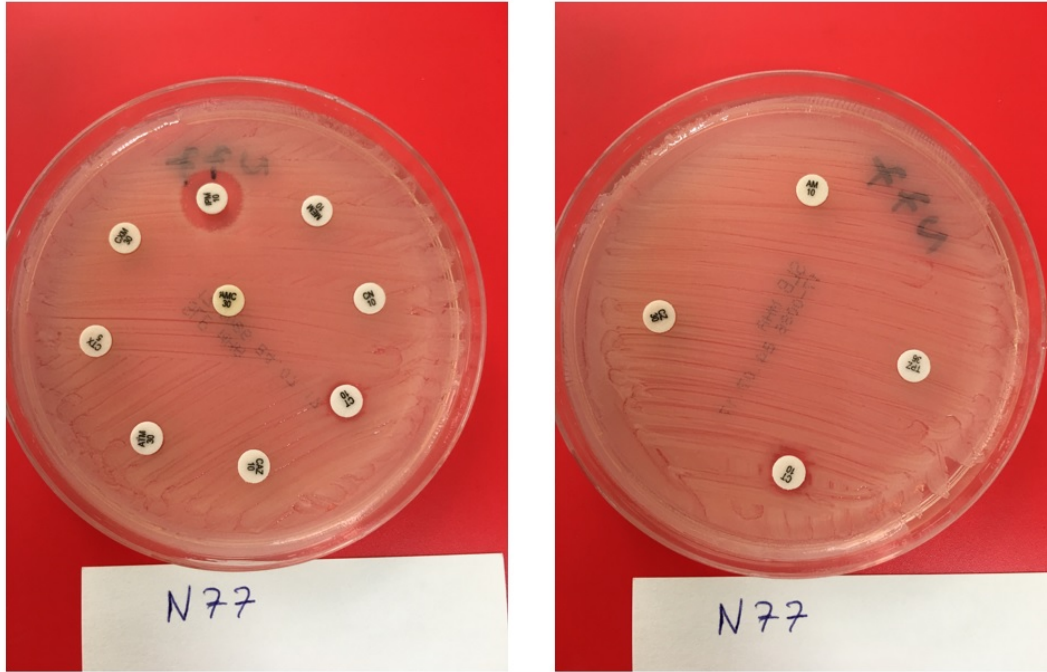
^bTam Kan - TZP < 0.05,

^cTFP-TZP < 0.05

5.4. TAD'e Sahip *K. pneumoniae* İzolatının Antibiyotik Duyarlılık ve Direnç Özellikleri

Çalışmaya alınan izolatın disk diffüzyonda antibiyotik duyarlılık oranları **Resim 5.1.**'de, yine tür tayini ve antibiyogram sonucu VITEK2 ile **Resim 5.2.**'de gösterilmektedir. Antibiyogramın değerlendirilmesi bakteriler için versiyon 6,0 EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre yapıldı. İzolatın kolistin ve tigesiklin dahil test edilen tüm antibiyotiklere karşı dirençli olduğu olduğu gözlemlendi. İzolat TAD tanımına uymaktaydı.

Resim 5.1. *K. pneumoniae* İzolatının Disk Diffüzyonda Antibiyotik Duyarlılık-Direnç Özellikleri.



N77: *K. pneumoniae* izolatına laboratuvarında vermiş olduğumuz numara.

SAM: Ampisilin/sulbaktam; **PIP:** Piperasilin; **CAZ:** Seftazidim; **SCF:** Sefaperazon/sulbaktam; **FEP:** Sefepim; **IMP:** İmipenem; **MEM:** Meropenem; **AK:** Amikasin; **CN:** Gentamisin; **NET:** Netilmisin; **TOB:** Tobramisin; **CIP:** Siprofloksasin; **LEV:** Levofloksasin; **TE:** Tetrasiklin; **TIG:** Tigesiklin; **CS:** Kolistin; **SXT:** Trimetoprim/sülfametoksazol; **TPZ:** Piperasilin/tazobaktam.

Resim 5.2. VITEK2 ile Yapılan Tür Tayini ve Antibiyogram Sonucuna Göre *K. pneumoniae* İzolatının TAD'e Sahip Olduğu Tespit Edildi.

Hasta Adı: Q İzolat Grubu: 77N-T-1			Hasta ID: 77N-T Tezgah: DIGER			
Kart Türü: GN Test Cihazı: 00000A4E0E3A (5757) Kart Türü: AST-N326 Test Cihazı: 00000A4E0E3A (5757)						
Biyonumara: 6607734673565010						
Duyarlılık Bilgileri	Kart:	AST-N326	Lot No:	7660226403	Son Kullanım Tarihi:	10.Tem.2018 13:00 CDT
	Tamamlandı:	11.Tem.2016 01:22 CDT	Durum:	Son	Analiz Zamanı:	9,50 saat
Antimikrobiyal	MIK	Yorum	Antimikrobiyal	MIK	Yorum	
Piperasilin	>= 128	R	Netilmisin	>= 32	R	
Piperasilin/Tazobaktam	>= 128	R	Tobramisin	>= 16	R	
Seftazidim	>= 64	R	Siprofloksasin	>= 4	R	
Sefepim	>= 32	R	Levofloksasin	>= 8	R	
Aztreonam	>= 64	R	Tetrasiklin	(-)	(-)	
İmipenem	>= 16	R	Tigesiklin	>= 8	R	
Meropenem	>= 16	R	Kolistin	>= 16	R	
Amikasin	>= 64	R	Trimetoprim/Sülfametaksazol	>= 320	R	
Gentamisin	>= 16	R				
+= Genişletilen antibiyotik *= AES tarafından değiştirildi **= Kullanıcı tarafından değiştirildi (-)= Duyarlılık testi tavsiye edilmez; tür tedavi için zayıf bir hedeftir.						
AES Bulguları:		Son Değiştirilme Tarihi:		01.Ağu.2016 14:23 CDT		EUCAST+ Parametre Seti: Fenotipik 2016
Uyum Düzeyi:	Tutarlı					
İnceleme için işaretlenmiş fenotipler:	BETALAKTAMLAR	İMPERMEABİLİTE KARBA (+ESBL VEYA +HL AmpC),KARBAPENEMAZ (+ VEYA - ESBL)				
	AMINOGLIKOZİTLE R	DİRENÇLİ GEN TOB NET AMİ (AAC(6')+?)				

N77: *K. pneumoniae* izolatına laboratuvarda vermiş olduğumuz numara.

SAM: Ampisilin/sulbaktam; **PIP:** Piperasilin; **CAZ:** Seftazidim; **SCF:** Sefaperazon/sulbaktam; **FEP:** Sefepim; **IMP:** İmipenem; **MEM:** Meropenem; **AK:** Amikasin; **CN:** Gentamisin; **NET:** Netilmisin; **TOB:** Tobramisin; **CIP:** Siprofloksasin; **LEV:** Levofloksasin; **TE:** Tetrasiklin; **TIG:** Tigesiklin; **CS:** Kolistin; **SXT:** Trimetoprim/sülfametoksazol; **TPZ:** Piperasilin/tazobaktam.

5.5. Koloni Sayımı

Koloni sayımları 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında büyüteç (Baloo, 8711G, Türkiye) yardımıyla yapıldı. Sayılan kolonilerin karışıklığa yol açmaması için üzerleri steril tek kullanımlık özenin sivri tarafı ile çizildi. Kolonilerin sayılabileceği üst değer 1000 olarak belirlendi. Koloni sayısı 1000 ve üzerindeki olan tüm değerler 1000 olarak kabul edildi.

TAD'e sahip *K. pneumoniae* TZP grubunun saatlere göre koloni ortalamaları sırasıyla 1.saat için 1,8; 2. saat için 2; 4. saat için 5,7; ve 8. Saat için 448 ve son olarak 12. saat için 1000 olarak bulundu (**Tablo 5.4.**).

TAD'e sahip *K. pneumoniae* TFP grubunun saatlere göre koloni ortalamaları sırasıyla 1.saat için 2,3; 2. saat için 3,1; 4. saat için 5,7; ve 8. Saat için 692,6 ve son olarak 12. saat için 1000 olarak bulundu (**Tablo 5.4.**).

TAD'e sahip *K. pneumoniae* PBS grubunun saatlere göre koloni ortalamaları sırasıyla 1.saat için 6,3; 2. saat için 9,6; 4. saat için 47,3; ve 8. Saat için 1000 ve son olarak 12. saat için 1000 olarak bulundu (**Tablo 5.4.**).

Herbir bağışçıya ait tüm grupların saatlik üreme sonuçları **Resim 5.3.** (1.Bağışçı), **Resim 5.4.** (2.Bağışçı), **Resim 5.5.** (3.Bağışçı), **Resim 5.6.** (4.Bağışçı), **Resim 5.7.** (5.Bağışçı), **Resim 5.8.** (6.Bağışçı), **Resim 5.9.** (7.Bağışçı), **Resim 5.10.** (8.Bağışçı), **Resim 5.11.** (9.Bağışçı), **Resim 5.12.** (10.Bağışçı)'da gösterilmiştir.

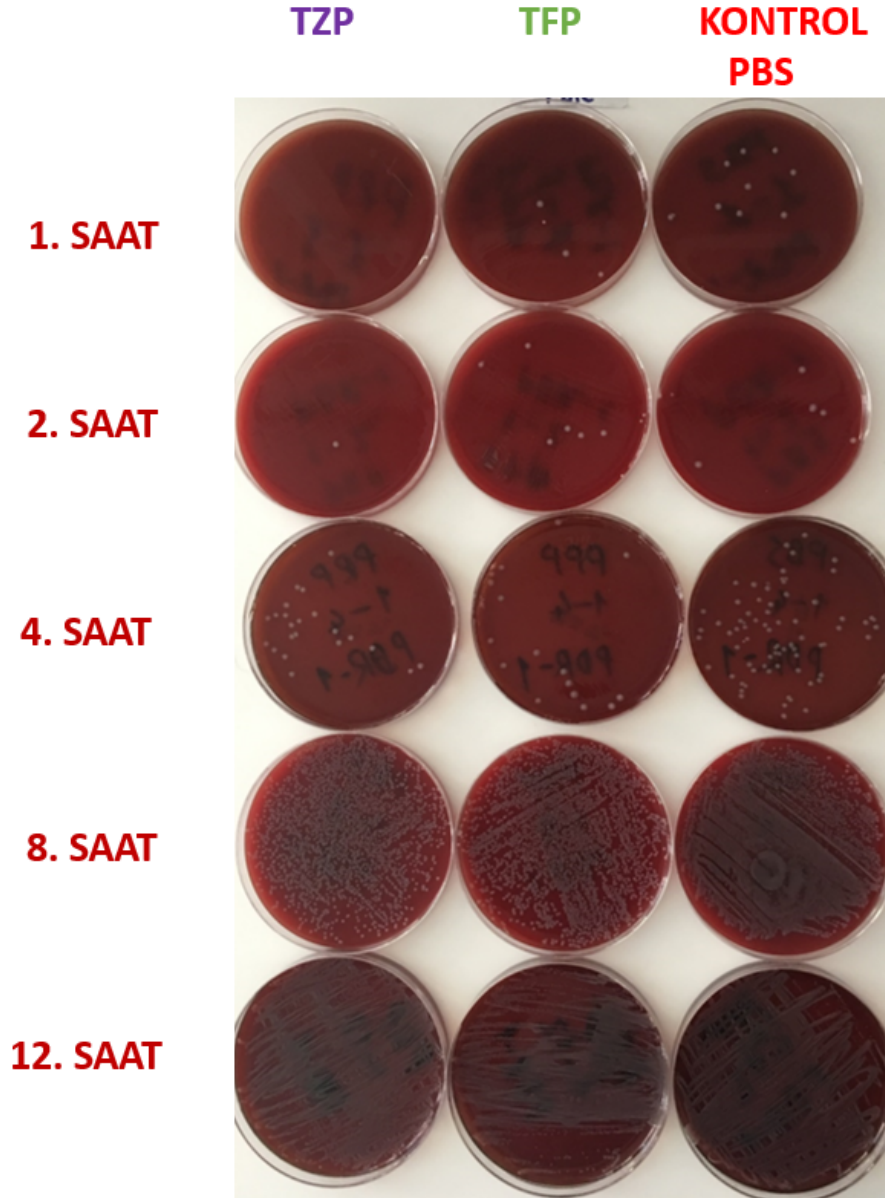
Tablo 5.4. Koyun Kanlı Agar plaklarında ekim sonrası 18-24. saat sonunda TAD'e sahip *K. pneumoniae* çalışma grubuna ait koloni sayıları.

	1. Saat Üreme Sonuçları			2. Saatteki Üreme Sonuçları			4.Saatteki Üreme Sonuçları			8. Saatteki Üreme Sonuçları			12.Saatteki Üreme Sonuçları		
	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS
1.Bağışçı	1	3	10	1	8	8	22	17	76	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2.Bağışçı	1	4	7	2	7	8	19	10	121	1000	1000	1000	1000	1000	1000
3.Bağışçı	1	3	5	0	0	8	5	1	39	445	630	1000	1000	1000	1000
4.Bağışçı	0	1	10	2	5	8	3	7	50	410	580	1000	1000	1000	1000
5.Bağışçı	3	5	9	1	6	7	1	16	21	380	620	1000	1000	1000	1000
6.Bağışçı	1	0	2	0	1	8	1	0	25	0	47	1000	1000	1000	1000
7.Bağışçı	6	0	3	2	0	6	0	0	7	37	49	1000	1000	1000	1000
8.Bağışçı	0	0	6	9	0	12	0	0	58	66	1000	1000	1000	1000	1000
9.Bağışçı	3	3	4	1	2	12	5	1	22	1000	1000	1000	1000	1000	1000
10.Bağışçı	2	4	7	2	2	19	1	5	54	142	1000	1000	1000	1000	1000
ORT:	1,8	2,3	6,3	2	3,1	9,6	5,7	5,7	47,3	448	692,6	1000	1000	1000	1000

TZP: Trombositten zengin plazma, **TFP:** Trombositten fakir plazma, **PBS:** Phosphate buffered saline

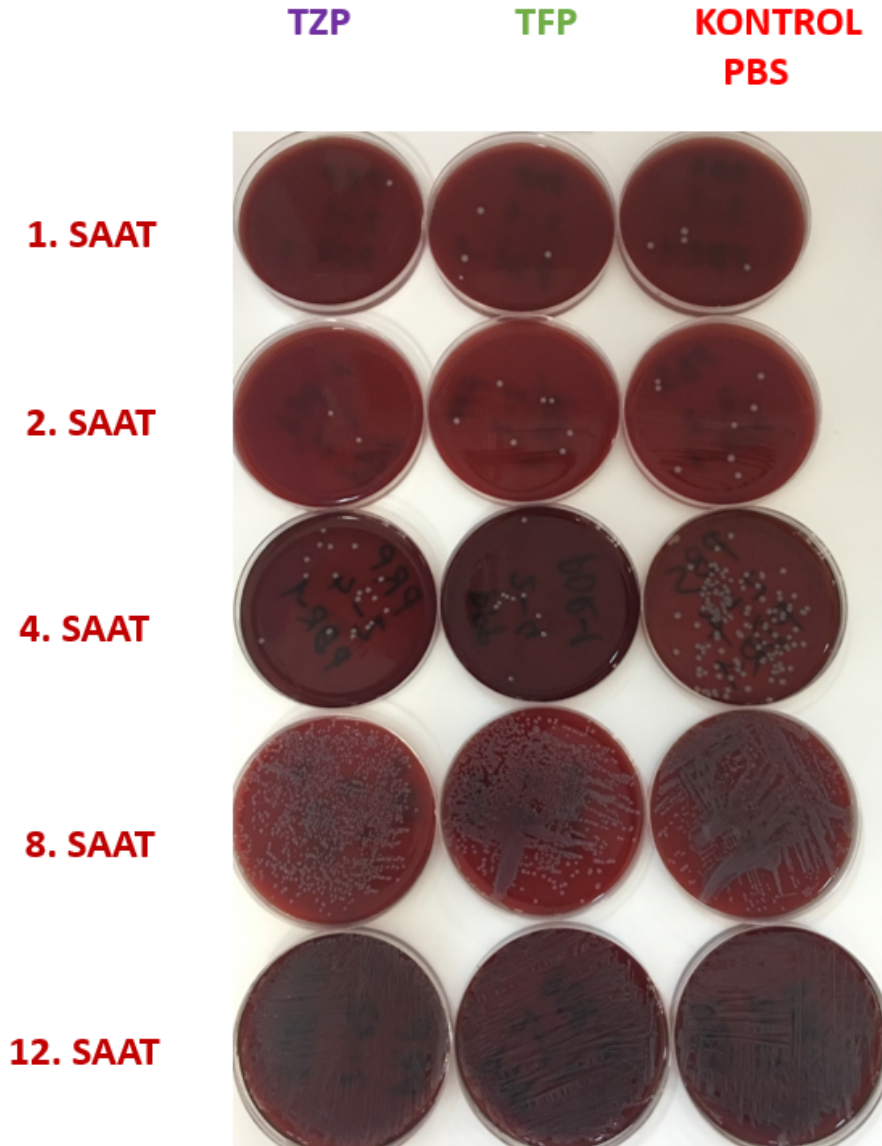
Resim 5.3. 1. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.

1. Bağışçı

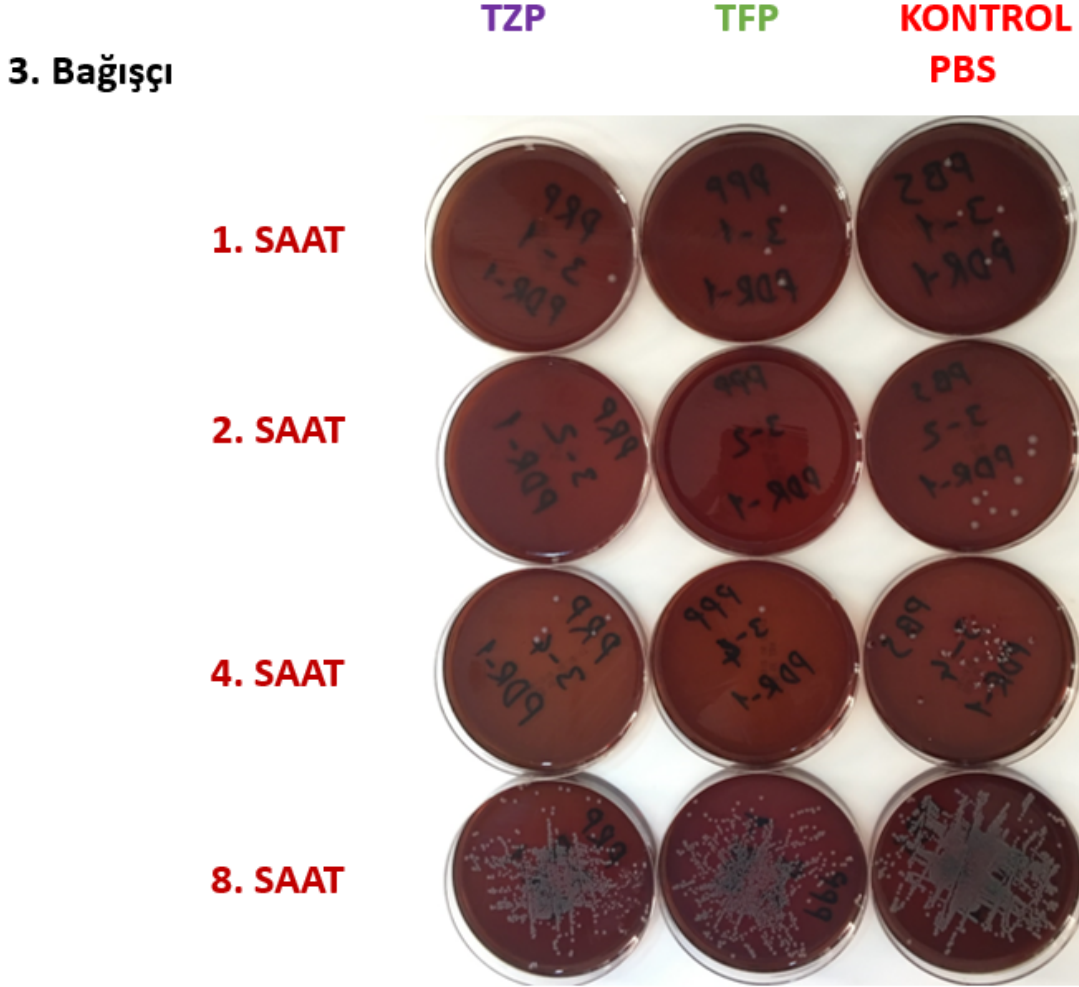


Resim 5.4. 2. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.

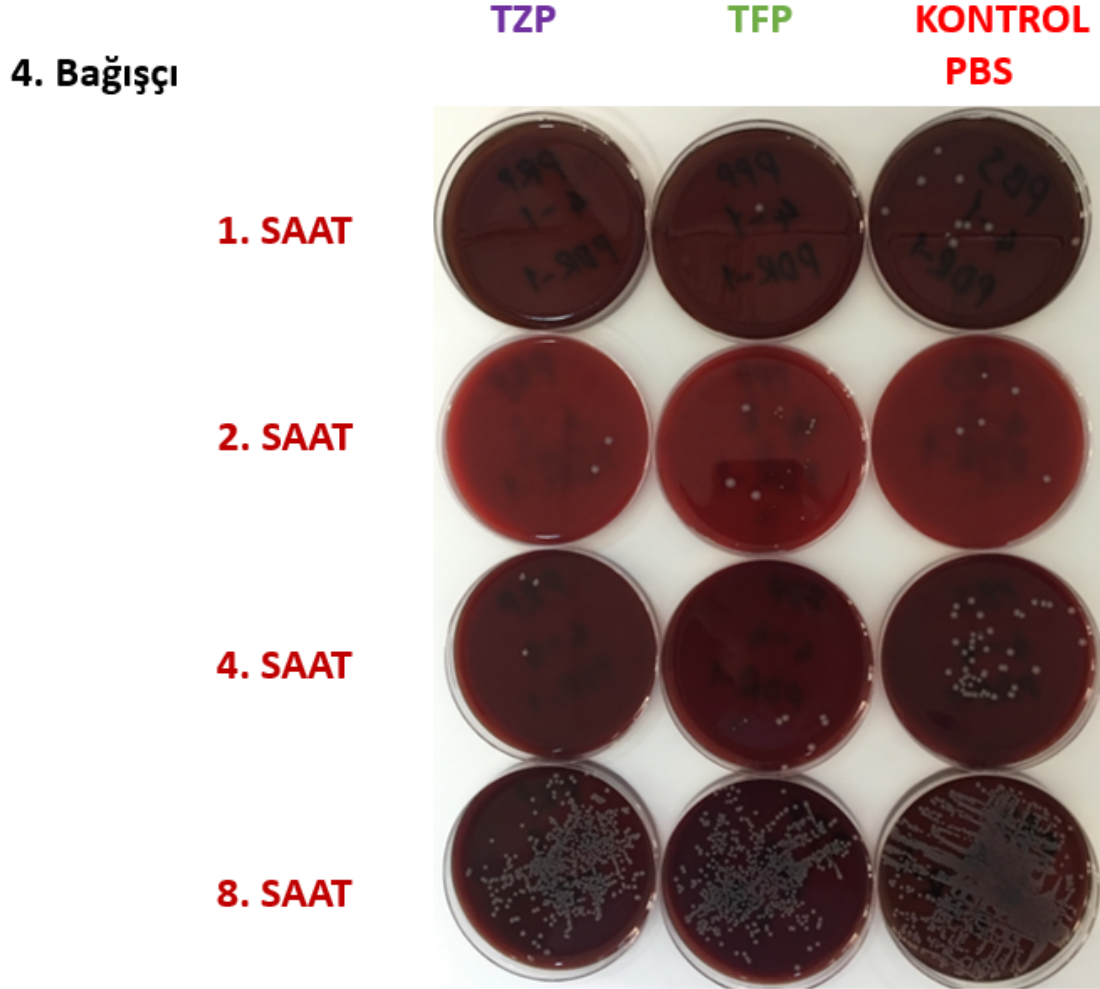
2. Bağışçı



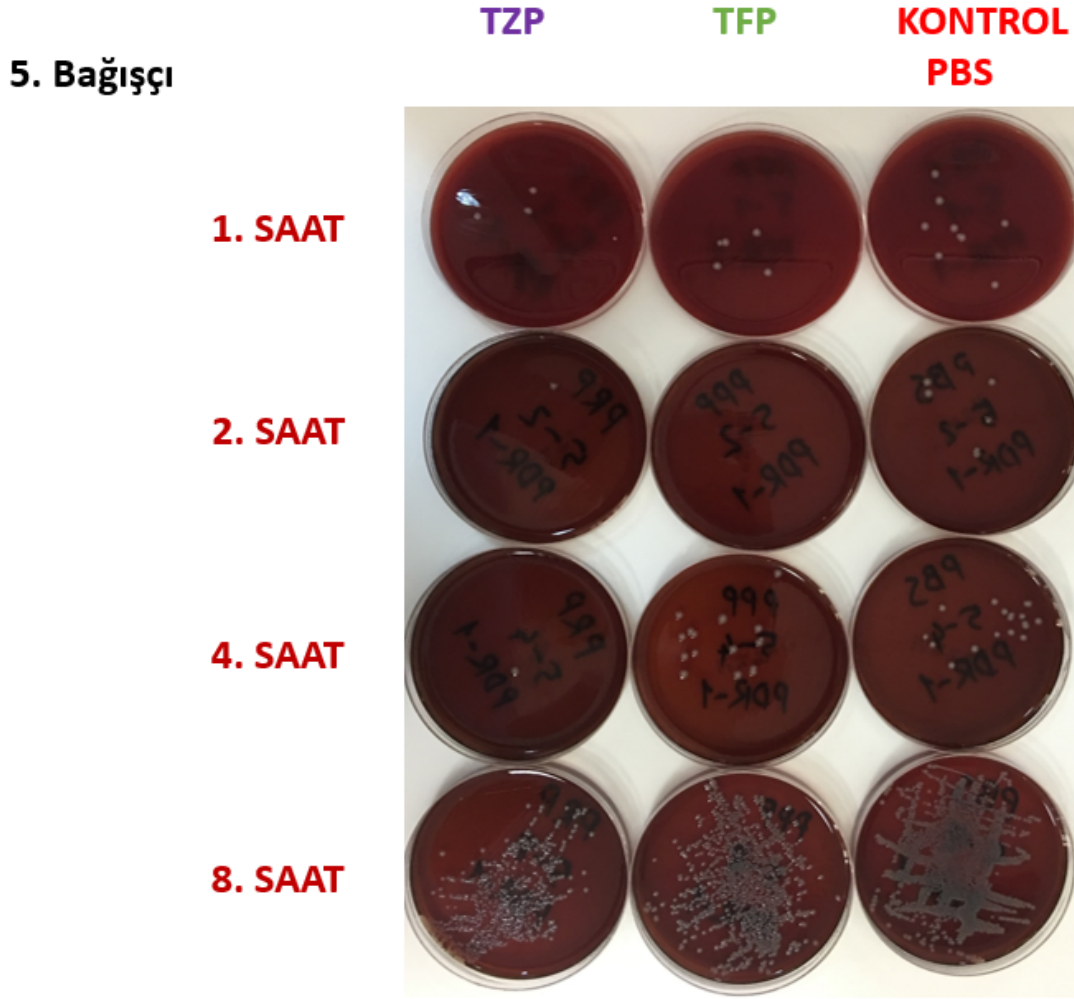
Resim 5.5. 3. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.



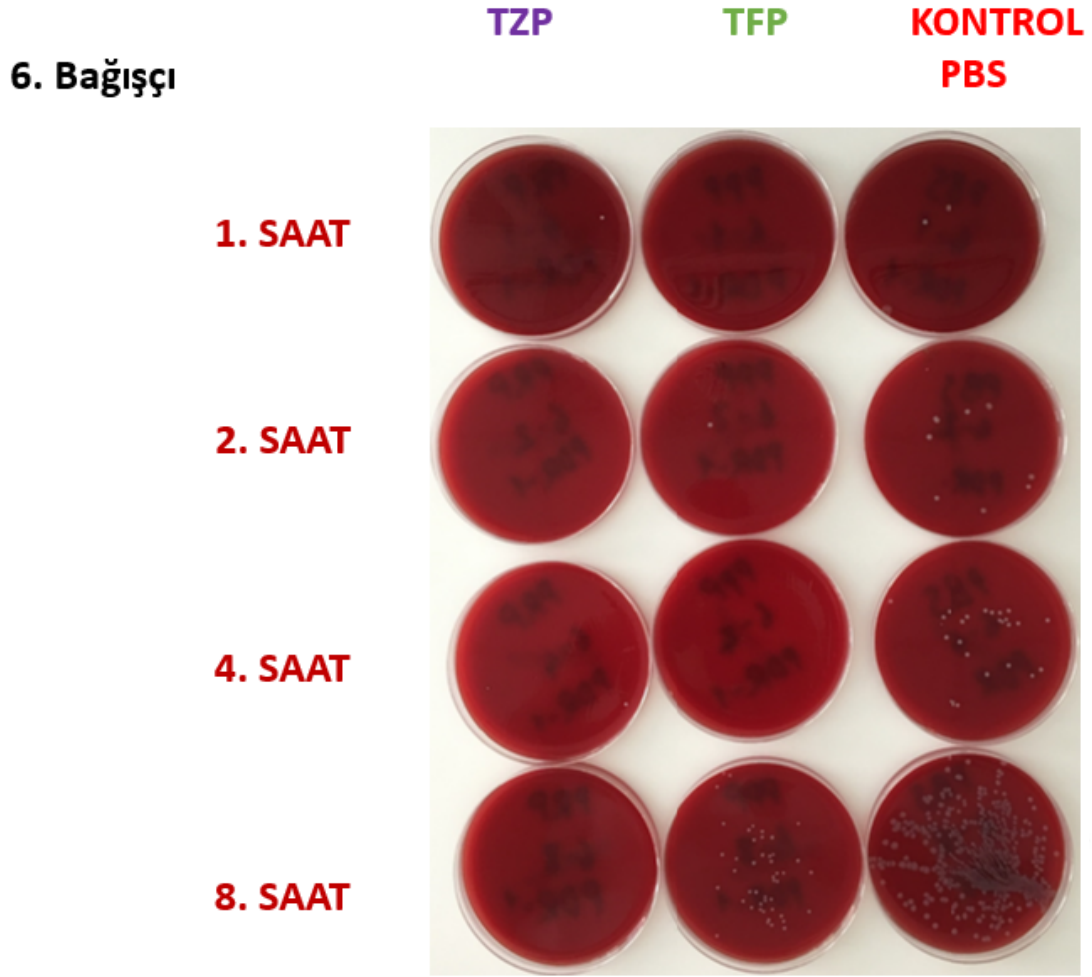
Resim 5.6. 4. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.



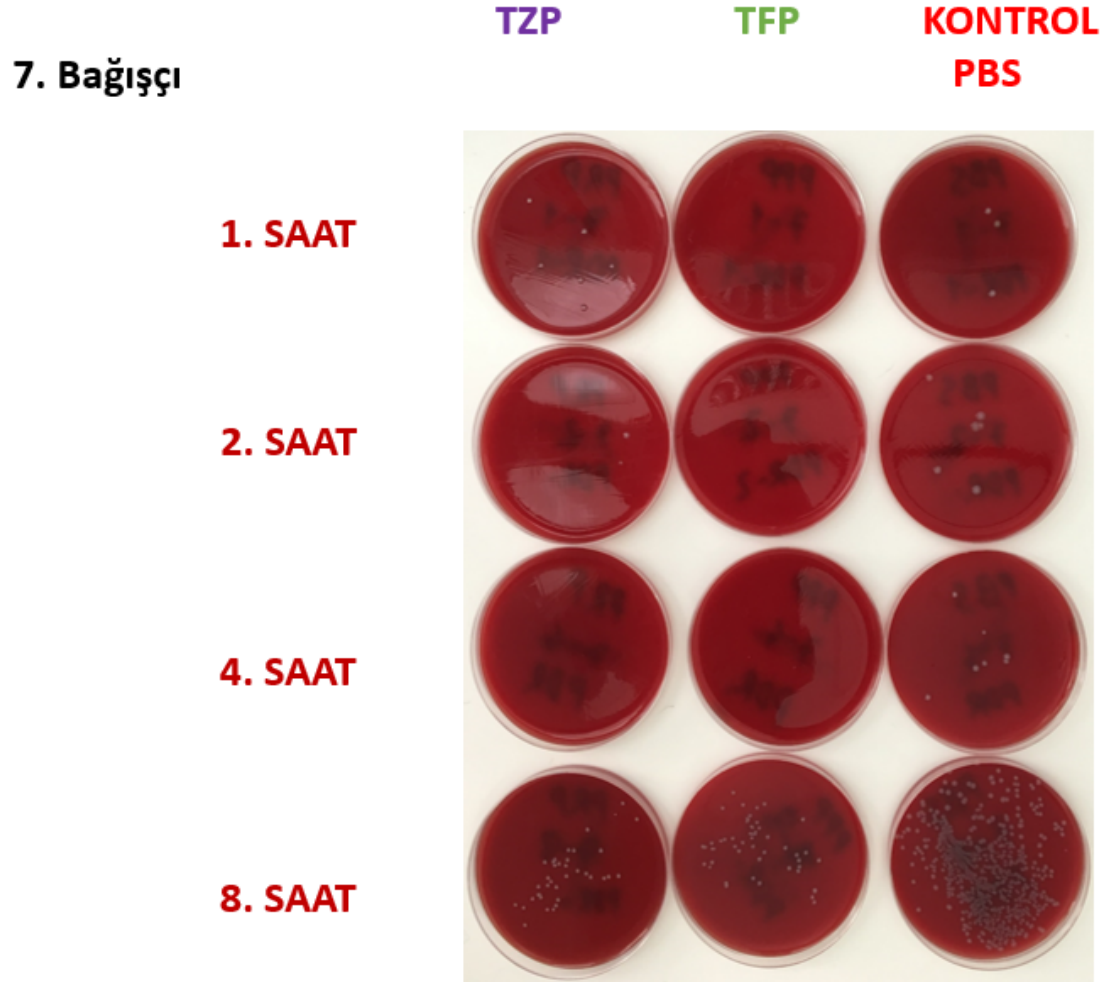
Resim 5.7. 5. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.



Resim 5.8. 6. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.

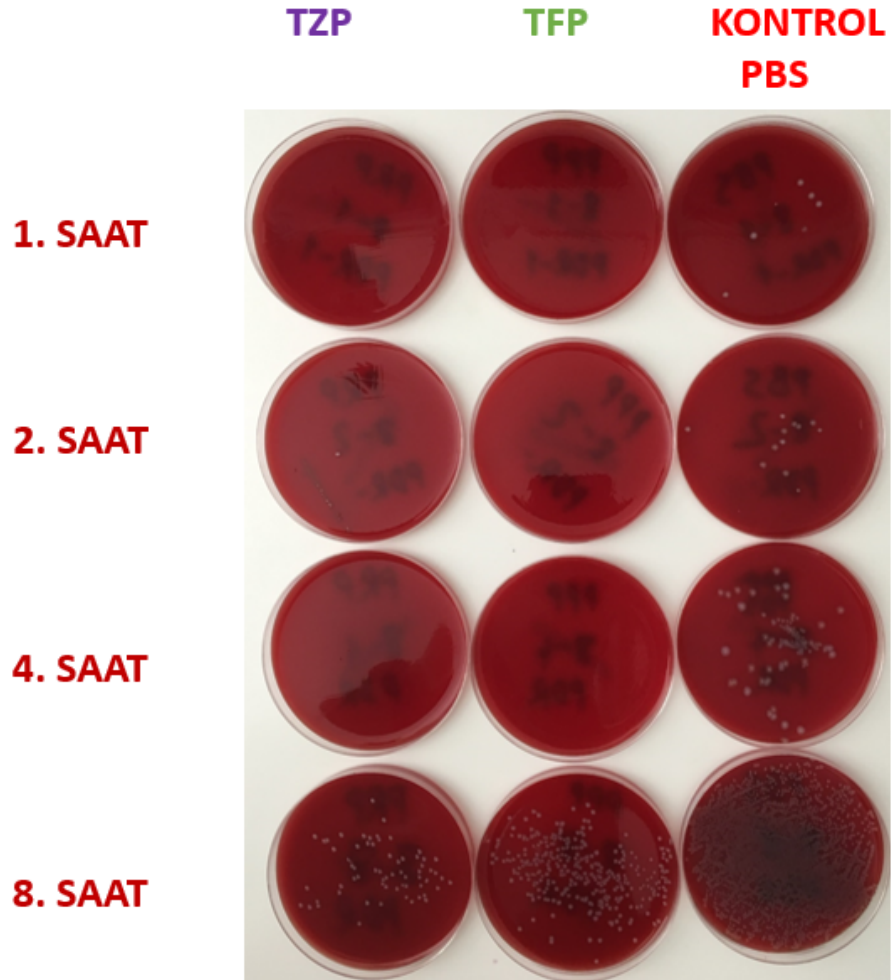


Resim 5.9. 7. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.



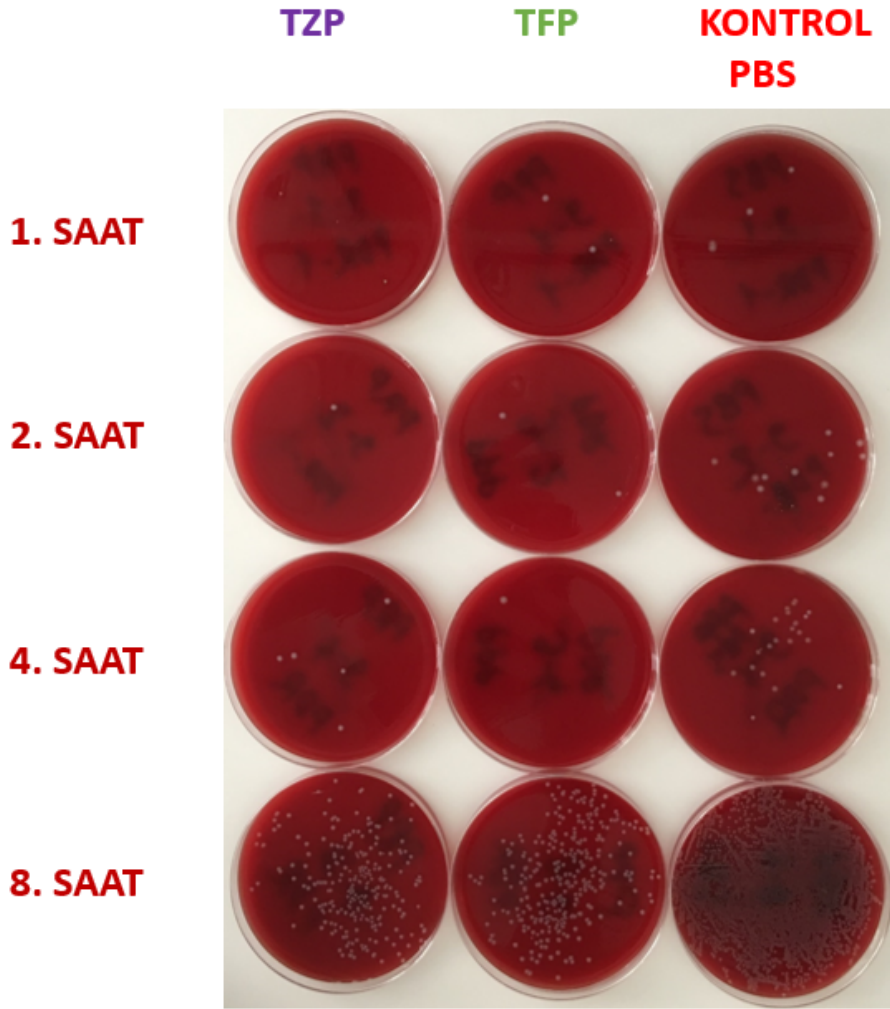
Resim 5.10. 8. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.

8. Bağışçı

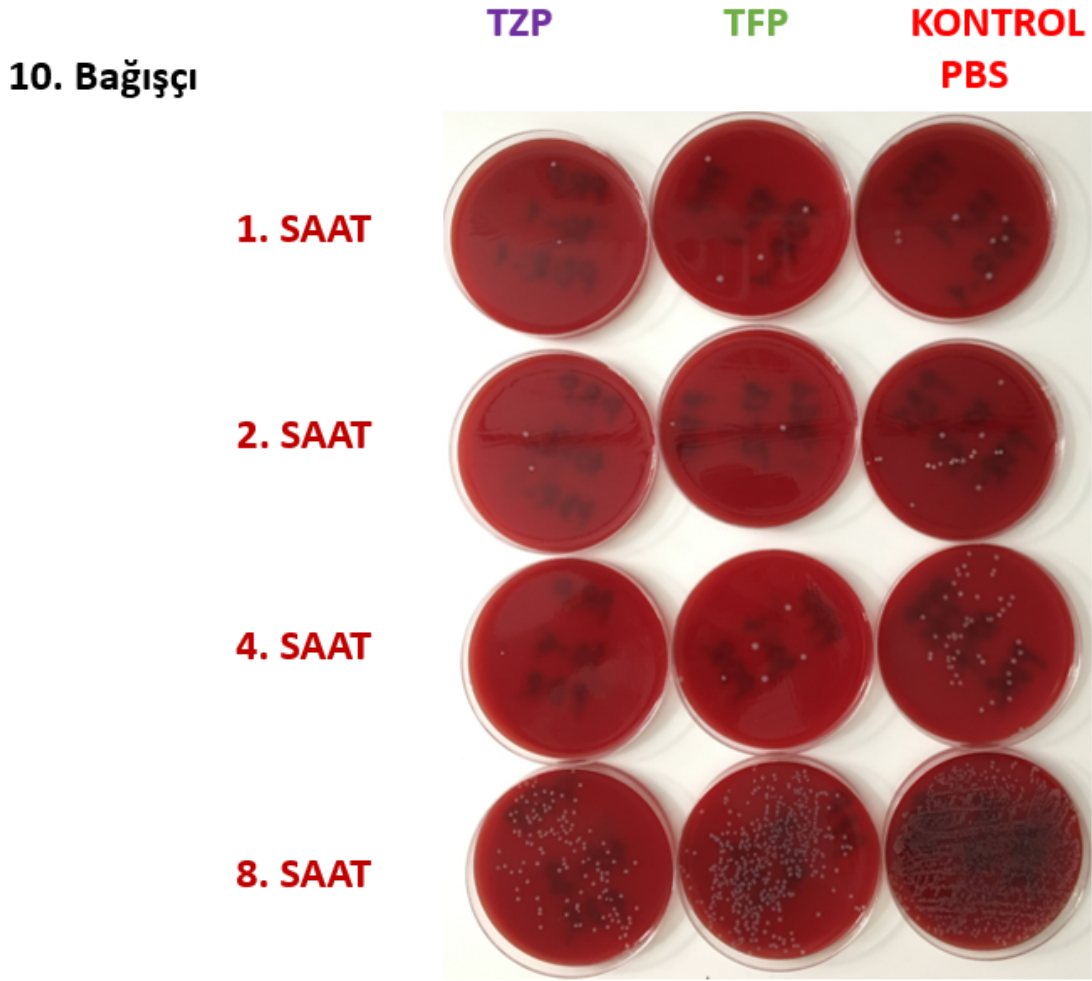


Resim 5.11. 9. Bağışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.

9. Bağışçı



Resim 5.12. 10. Bağıışçıdan elde edilen TZP, TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine saatlere göre etkinliğini gösteren koloni sayım plakları.



Tablo 5.5. Koyun Kanlı Agar plaklarında ekim sonrası 18-24. saat sonunda *E. coli* ATCC 25922 çalışma grubuna ait koloni sayıları.

	1. Saatteki Üreme Sonuçları			2. Saatteki Üreme Sonuçları			4.Saatteki Üreme Sonuçları			8. Saatteki Üreme Sonuçları			12.Saatteki Üreme Sonuçları		
	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS
1.Bağışçı	1	6	7	1	17	19	216	167	218	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2.Bağışçı	2	2	9	1	5	10	18	106	148	1000	1000	1000	1000	1000	1000
3.Bağışçı	1	1	10	5	1	2	0	17	35	390	862	1000	1000	1000	1000
4.Bağışçı	1	2	9	1	0	6	7	1	32	1000	1000	1000	1000	1000	1000
5.Bağışçı	1	1	9	1	1	4	5	11	13	1000	1000	1000	1000	1000	1000
6.Bağışçı	0	0	11	0	0	5	0	0	4	0	0	1000	1000	1000	1000
7.Bağışçı	3	2	3	0	0	7	6	6	23	1000	1000	1000	1000	1000	1000
8.Bağışçı	0	4	6	0	5	9	1	4	29	1000	1000	1000	1000	1000	1000
9.Bağışçı	0	0	9	0	1	8	1	13	60	1000	1000	1000	1000	1000	1000
10.Bağışçı	0	21	12	0	1	9	2	3	46	98	1000	1000	1000	1000	1000
ORT:	0,9	3,9	8,5	0,9	3,1	7,9	25,6	32,8	60,8	748,8	886,2	1000	1000	1000	1000

TZP: Trombositten zengin plazma, **TFP:** Trombositten fakir plazma, **PBS:** Phosphate buffered saline

Tablo 5.6. Koyun Kanlı Agar plaklarında ekim sonrası 18-24. saat sonunda *K. pneumoniae* ATCC 700603 çalışma grubuna ait koloni sayıları.

	1. Saat Üreme Sonuçları			2. Saatteki Üreme Sonuçları			4.Saatteki Üreme Sonuçları			8. Saatteki Üreme Sonuçları			12.Saatteki Üreme Sonuçları		
	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS	TZP	TFP	Kontrol PBS
1.Bağışçı	0	8	11	3	20	43	3	182	419	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2.Bağışçı	0	1	8	2	0	22	2	96	128	1000	1000	1000	1000	1000	1000
3.Bağışçı	1	3	7	0	0	7	0	0	112	1000	1000	1000	1000	1000	1000
4.Bağışçı	0	0	6	1	0	7	9	2	106	1000	1000	1000	1000	1000	1000
5.Bağışçı	0	6	9	1	3	8	0	5	58	510	440	1000	1000	1000	1000
6.Bağışçı	1	0	11	1	8	16	0	8	37	0	1000	1000	1000	1000	1000
7.Bağışçı	0	3	16	2	0	12	0	78	37	1000	1000	1000	1000	1000	1000
8.Bağışçı	1	5	7	0	2	15	14	58	54	1000	1000	1000	1000	1000	1000
9.Bağışçı	0	0	25	0	0	18	19	1	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
10.Bağışçı	6	32	12	0	13	28	0	2	158	1000	1000	1000	1000	1000	1000
ORT:	0,9	5,8	11,2	1	4,6	17,6	4,7	43,2	210,9	851	944	1000	1000	1000	1000

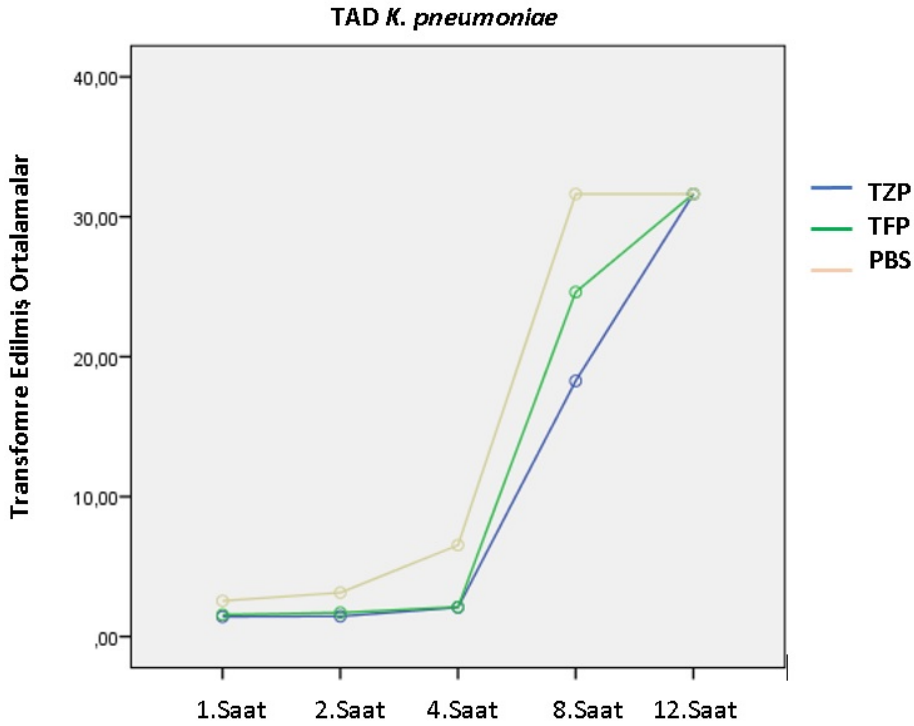
TZP: Trombositten zengin plazma, **TFP:** Trombositten fakir plazma, **PBS:** Phosphate buffered saline

5.6. TAD'e sahip *K. pneumoniae* TZP, TFP, PBS'li Ortamlarda Üremelerin Karşılaştırılması

Trombositten Zengin Plazma (TZP), Trombositten Fakir Plazma (TFP) ve PBS'li ortamlarda 1×10^3 kob/ml TAD'e sahip *K. pneumoniae* içeren tüpler ajitatörde 37°C' de etüvde bekletildikten sonra çalışmanın 1., 2., 4., 8., ve 12. saatlerinde koyun kanlı agar plaklarına ekim yapıp, 18-24 saat inkübasyon sonrası değerlendirildiğinde;

TZP ve TFP ortamlarında üremeler kıyaslandığında (**Resim 5.13.**) transforme edilmiş ortalama olarak 4. saatte tepe noktasına ulaştığı, 8. saatte bu etkinliğin azaldığı, 12. saatte trombositlerin antimikrobiyal etkinliğini kaybettiği görüldü (**Tablo 5.7.**).

Resim 5.13. TAD'e sahip *K. pneumoniae* TZP, TFP ve PBS'li ortamlarada transforme edilmiş üreme ortalamaları kıyaslama grafiği



Tablo 5.7: TAD'e Sahip *K. pneumoniae* Üzerine TZP, TFP Üremelerinin Ekim Zamanları Karşılaştırılması.

n:10		p değeri
	1. Saat – 2. Saat	0,92
	2. Saat – 4. Saat	0,28
	1. Saat – 4. Saat	0,24
TZP	2. Saat – 8. Saat	0,001*
	4. Saat – 8. Saat	0,001*
	1. Saat – 12. Saat	<0,001*
	2. Saat – 12. Saat	<0,001*
	4. Saat – 12. Saat	<0,001*
	8. Saat – 12. Saat	0,005*
	1. Saat – 8. Saat	0,001*
TFP	1. Saat – 2. Saat	0,52
	2. Saat – 4. Saat	0,08
	1. Saat – 4. Saat	0,12
	2. Saat – 8. Saat	0,001*
	4. Saat – 8. Saat	<0,001*
	1. Saat – 12. Saat	<0,001*
	2. Saat – 12. Saat	<0,001*
	4. Saat – 12. Saat	<0,001*
	8. Saat – 12. Saat	0,05*
	1. Saat – 8. Saat	<0,001*

p: anlamlılık düzeyi *Tekrarlı ve Basit Kontrast Testler , - : Yetersiz Veri

TZP ve TFP gruplarının TAD'e Sahip *K. pneumoniae* üremelerinin ekim zamanları kıyaslandığında; TZP grubunun antimikrobiyal etkinlik 1., 2. ve 4. saatte daha yüksek olduğu (**Tablo 5.7.**), bakteri üremesi üzerine baskının daha etkili olduğu görüldü.

Tablo 5.8. Her Üç Mikroorganizma Üzerine TZP, TFP, PBS'li Ortamda Üremelerinin Karşılaştırılması

n:10			p değeri
1. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i>	TZP – TFP	0,61
		TZP – PBS	0,004*
		TFP – PBS	<0,001*
2. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i>	TZP – TFP	0,51
		TZP – PBS	<0,001*
		TFP – PBS	0,003*
4. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i>	TZP – TFP	0,94
		TZP – PBS	<0,001*
		TFP – PBS	<0,001*
8. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i>	TZP – TFP	0,04*
		TZP – PBS	0,005*
		TFP – PBS	0,05*
12. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i>	TZP – TFP	-
		TZP – PBS	-
		TFP – PBS	-
1. Saat Ekim	<i>E. coli</i> ATCC 25922	TZP – TFP	0,13
		TZP – PBS	<0,001*
		TFP – PBS	0,01
2. Saat Ekim	<i>E. coli</i> ATCC 25922	TZP – TFP	0,19
		TZP – PBS	0,001*
		TFP – PBS	<0,001*
4. Saat Ekim	<i>E. coli</i> ATCC 25922	TZP – TFP	0,18
		TZP – PBS	0,001*
		TFP – PBS	<0,001*
8. Saat Ekim	<i>E. coli</i> ATCC 25922	TZP – TFP	0,20
		TZP – PBS	0,11
		TFP – PBS	0,31
12. Saat Ekim	<i>E. coli</i> ATCC 25922	TZP – TFP	-
		TZP – PBS	-
		TFP – PBS	-
1. Saat Ekim	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	TZP – TFP	0,02*
		TZP – PBS	<0,001*
		TFP – PBS	0,04*
2. Saat Ekim	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	TZP – TFP	0,26
		TZP – PBS	<0,001*
		TFP – PBS	<0,001*
4. Saat Ekim	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	TZP – TFP	0,06
		TZP – PBS	0,001*
		TFP – PBS	0,03*
8. Saat Ekim	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	TZP – TFP	0,37
		TZP – PBS	0,23
		TFP – PBS	0,34
12. Saat Ekim	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	TZP – TFP	-
		TZP – PBS	-
		TFP – PBS	-

p: anlamlılık düzeyi *Tekrarlı ve Basit Kontrast Testler , - : Yetersiz Veri

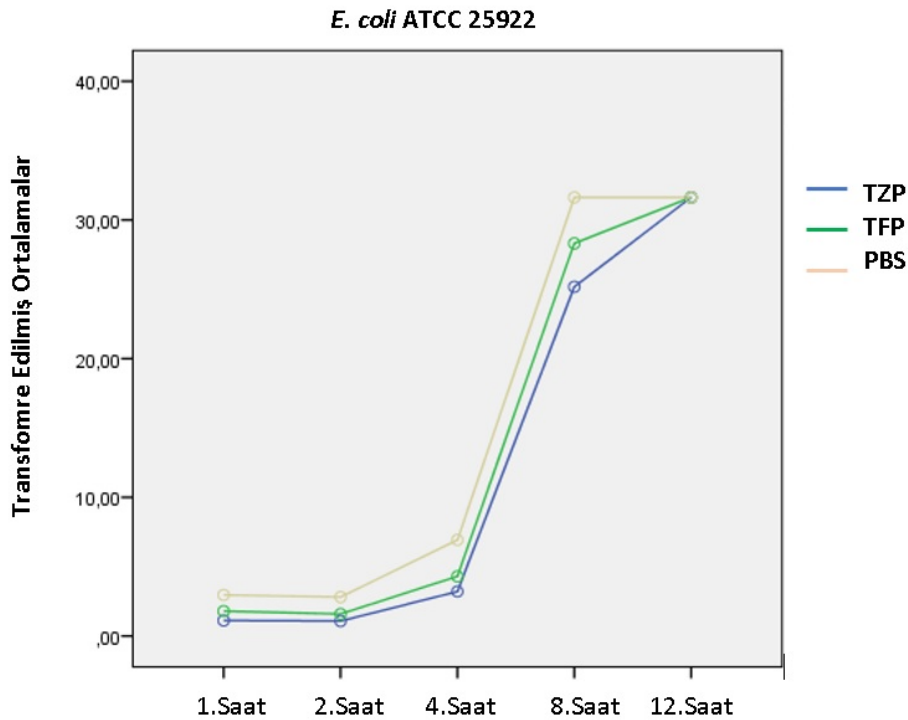
TZP ve TFP kendi içlerinde kıyaslandığında ise 1.,2.,4. saatlerde yapılan ekimlerde fark olmakla birlikte bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (**Tablo 5.8.**). Fakat 8. saat ekimlerinde ise fark olmakla birlikte istatistiksel olarak da anlamlıydı. Bu farklılığın TZP içerisindeki Trombosit ve lökosit sayısının daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

5.7. *E. coli* ATCC 25922'nin TZP, TFP, PBS'li Ortamlarda Üremelerin Karşılaştırılması

E. coli içeren tüpler ajitatörde 37°C' de etüvde bekletildikten sonra çalışmanın 1., 2., 4.,8., ve 12. saatlerinde koyun kanlı agar plaklarına ekim yapıp, 18-24 saat inkübasyon sonrası değerlendirildiğinde;

TZP ve TFP ortamlarında üremeler kıyaslandığında (**Resim 5.14.**) transforme edilmiş ortalama olarak 2. saatte tepe noktasına ulaştığı, 8. saatte bu etkinliğin azaldığı, 12. saatte trombositlerin antimikrobiyal etkinliğini kaybettiği görüldü. Bu etkinlikler 8. saate kadar istatistiksel olarak da anlamlıydı (**Tablo 5.8.**)

Resim 5.14. *E. coli* ATCC 25922'nin TZP, TFP ve PBS'li ortamlarada transforme edilmiş üreme ortalamaları kıyaslama grafiği

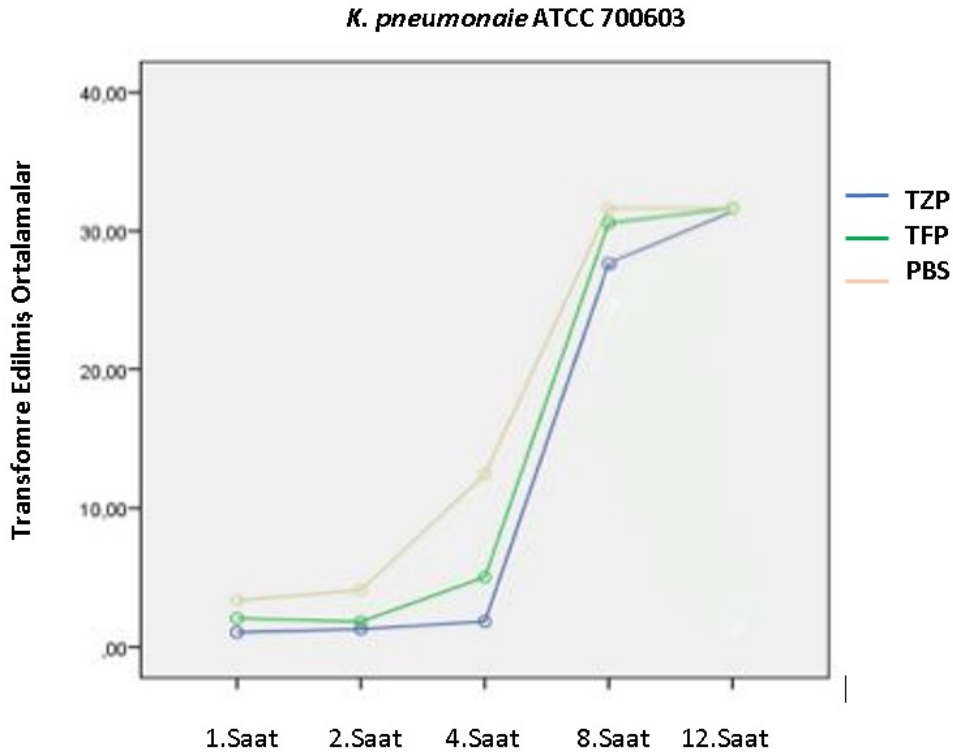


5.8. *K. pneumoniae* ATCC 700603'nin TZP, TFP, PBS'li Ortamlarda Üremelerin Karşılaştırılması

K. pneumoniae daha önce belirlenen saatlerde yapılan ekimleri değerlendirildiğinde;

TZP ve TFP ortamlarında üremeler kıyaslandığında (**Resim 5.15.**) transforme edilmiş ortalama olarak 2. saatte tepe noktasına ulaştığı, 4. saatte tepe noktasına yakın devam ettiği, 8. saatte bu etkinliğin azaldığı, 12. saatte trombositlerin antimikrobiyal etkinliğini kaybettiği görüldü. Bu etkinlikler 8. saate kadar istatistiksel olarak da anlamlıydı (**Tablo 5.8.**)

Resim 5.15. *K. pneumoniae* ATCC 700603'nin TZP, TFP ve PBS'li ortamlarada transforme edilmiş üreme ortalamaları kıyaslama grafiği.



5.9. TZP'nin TAD'e Sahip *K. pneumoniae*, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 Üzerindeki Etkinliği İncelenmesi

TZP'nin her üç bakteri üzerine etkinliği ayrı ayrı gösterilmiş olmasına rağmen bu etkinliklerin bakteri türü ve direnç durumuna göre karşılaştırıldığında;

TZP'nin sadece 8. saatteki TAD'e Sahip *K. pneumoniae* ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 arasında istatistiksel anlamlı bir fark görüldü (**Tablo 5.9.**). Sekizinci saatteki koloni sayısının daha az ve bu üreme azlığının istatistiksel anlamlı olması bakteri direnci arttıkça bakterinin trombositlere daha hassas olabileceğini düşündürmektedir.

Fakat TZP'nin 1., 2. ve 4. saatlerinde etkinliklerinin her üç bakteri üzerine aynı olduğu ve bunlarında istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulundu. Bu anlamsızlık çalışmamızda kullanılan gram negatif enterik bakteriler üzerinde TZP'nin bakteri türü ve direnç durumu gözetmeksizin antimikromisidal etkinlik yaptığı olarak değerlendirildi.

Tablo 5.9. TZP'nin Zamana Göre Her Üç Mikroorganizma Üzerine Etkinliğinin Karşılaştırılması.

n:10		P değeri
1. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,12
	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,20
	<i>E. coli</i> ATCC 25922 – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,80
2. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,27
	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,46
	<i>E. coli</i> ATCC 25922 – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,28
4. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,31
	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,41
	<i>E. coli</i> ATCC 25922 – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,99
8. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,09
	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,02*
	<i>E. coli</i> ATCC 25922 – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,38
12. Saat Ekim	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>E. coli</i> ATCC 25922	-
	TAD <i>K. pneumoniae</i> – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	-
	<i>E. coli</i> ATCC 25922 – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	-

p: anlamlılık düzeyi *Tekrarlı ve Basit Kontrast Testler , - : Yetersiz Veri

6. TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç dünya çapında insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri olarak kabul edilmektedir (5). İnsanlar ve hayvanlarda antimikrobiyal ajan kullanımının artması, seçici baskıyı artırmakta dolayısı ile mikroorganizmaların direnç genlerini geliştirmeye yönelik doğal bir ortam yaratmaktadır.

Antibiyotiklere dirençli patojenler günümüzde sürekli artmasına rağmen, yeni antibiyotiklerin gelişimi önemli ölçüde yavaşlamaktadır. Son 10 yıl içinde sık kullanılan antibiyotiklere dirençli klinik suşlar tüm dünyada yaygınlaşmıştır. Yeni kullanıma sunulacak olan sınırlı sayıda antimikrobiyal molekül olması yeni ve alternatif tedavi seçeneklerini gerekli kılmaktadır (20).

TAD'e sahip bakteriyel enfeksiyonlar günümüzde en sık yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalarda meydana gelebilmektedir. Bunlara karşı tedavi yaklaşımında ise genellikle 1. Polimiksinler 2. Karbapenamaz kombinasyonları 3. İntravenöz Fosfomisin (112) 4. Ceftazidim-Avibaktam (113, 114) kombinasyonları önerilmektedir. Fakat bu antibiyotik kombinasyonlarına rağmen tedavide başarısızlıklar ile karşılaşılabilir. Steed ve ark. (118), Wieman ve ark. (119) ise DAE de bir iyileşme sağlandığı, bu iyileşmesinde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir.

Dirençli mikroorganizma enfeksiyonları açısından mortalite ve morbidite oranları yüksek olan bir diğer önemli hastalık ise diyabetik ayak enfeksiyonudur (DAE). Bu konuda ise farklı görüşler bulunmaktadır. TZP ile ilgili yapılmış çalışmalarda d'Hemecourt P ve ark. (115), Smiell ve ark. (116), Robson ve ark. (117) istatistiksel olarak anlamlı olmayan sonuçlar elde etmişlerdir. Steed ve ark. (118), Wieman ve ark. (119) ise DAE de bir iyileşme sağlandığı, bu iyileşmesinde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir.

TZP etkinliği ile ilgili yapılan in vitro ve in vivo çalışmalardaki farklılığın temel nedeninin trombosit sayılarından kaynaklandığı gösterilmiştir. Bu durumun trombositlerden ortama salınan kemokin, kinosidin ve antiinflamatuvar sitokin miktarlarındaki değişikliklerden kaynaklandığı belirtilmektedir. Dolayısıyla yapılan çalışmalardaki başarıyı etkileyen en önemli faktörün trombosit sayısı ile ilgili olduğu gösterilmiştir (120).

Amable ve ark. (120) yaptıkları bir çalışmada, santrifüj aşamasında yer çekim gücünün (g), süre ve santrifüj ısısının TZP'deki trombosit sayısını etkilediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada en etkili TZP değerleri, tam kan testi sonuçlarından elde edilen trombosit sayısının kaç kat artırılabilirliğine dair birçok çalışmanın değerleri (g, santrifüj süresi, santrifüj ısısı ve çift devirli santrifüj vb.) kullanılmasıyla bulunmaya çalışılmıştır. Amable ve ark. 17 farklı metod kullanmalarına rağmen TZP'deki trombosit

sayısını en düşük 0,6 kat, en yüksek 5,2 kat arttırabilmişlerdir. Magellan™ tam otomatize sistem kullanılarak yaptığımız bu araştırmada, bağışçıların periferik kanlarındaki ortalama trombosit sayısı $236,8 \times 10^3 /\mu\text{l}$ olup TZP'deki trombosit sayısı ise $2218 \times 10^3 /\mu\text{l}$ (minimum 3,5, maksimum 15,3, ortalama 9,4 kat artış) olarak tespit edildi. Bu değerler literatür taramamızda en yüksek trombosit sayısına ulaşan TZP değerlerinden birisidir.

Jago ve Jacox (121), Weksler (122), Kahn ve ark. (123), Czuprynski ve Balish (124) ve Miragliotta ve ark. (125) trombositlerin *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella* gibi birçok organizmaya karşı bakteriyostatik ve/veya bakterisidal etkinliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Fakat literatür taramamızda kolaylıkla çapraz bulaşa yol açıp, fırsatçı enfeksiyonlara sebep olabilen, tedavisi oldukça güç olan TAD'e sahip *K. pneumoniae* gibi bir patojene karşı TZP etkinliğinin araştırılmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda TZP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üremesi üzerine 1., 2., 4., 8. ve 12. saat üremeleri koloni sayımları ile incelendi (**Tablo 5.4.**). Bizim çalışmamızda TZP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine in vitro bakteriyostatik bir etkinlik gösterdiği ve bu etkinin 2. saatte tepe noktasına ulaştığı, 4. saatte bu değere yakın etkisinin olduğu, 8. saatte etkisinin azalmakla birlikte devam ettiği, bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. 12. saatte ise bu etkinin kaybolduğu tespit edildi. Aynı zamanda çalışmamızın TAD'e sahip *K. pneumoniae* üremesi üzerine TFP'nin bakteriyostatik etkinliği araştırıldığında; TFP etkinliğinin maksimum 8 saat kadar sürdüğü, sonrasında zamanla bu etkinliğinin azaldığı gösterildi (**Resim 5.13.**).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri için uygulama standartlarında belirtilen kolay üreyen bakterilerden standart suş olan *E. coli* ATCC 25922 üremesi üzerine 1., 2., 4., 8. ve 12. saat üremeleri koloni sayımları ile incelendiğinde (**Resim 5.14.**) etkinin 2. saatte tepe noktasına ulaştığı, 8. saatte etkisinin azaldığı, 12. saatte ise kaybolduğu tespit edildi. GSBL doğrulama testi yapılırken rutin olarak kullanılması önerilen *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşunda da benzer sonuçlar elde edildi (**Resim 5.15.**).

Yang ve ark. (126) oral florada bulunan *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* bakterileri üzerine TZP, TFP, plazma ve Trombositten Zengin Fibrin (TZF) ile antimikrobiyal etkinliği araştırmışlardır. Bu çalışma sonunda *F. nucleatum*'a karşı daha düşük ve daha kısa süreli olmakla birlikte; TZP, TFP, plazma ve TZF'nin bu üç bakterinin üremesini 24 saate kadar inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda TAD'e sahip *K. pneumoniae* üremesi üzerine en etkili ve en uzun süre etkinliğin TZP'li grupta olduğu gösterilmiştir. Fakat bu etki süresinin bizim çalışmamızda tepe noktasına TZP'li grupta 2. saatte, TFP'li grupta ilk saatlerde ulaştığı, 12. Saatte her iki grupta etkinliğin kaybolduğu gözlemlendi (**Resim**

5.13., Tablo 5.7.). Bunun sebebinin çalışmamızda kullanılan TAD'e sahip *K. pneumoniae* mikroorganizmasının farklılığından kaynaklanabileceği, fakat bu ayrımı yapmanın zor olduğu değerlendirildi. Aynı şekilde *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşlarında da TZP'nin TFP'ye saatlere göre değişmekle birlikte üstün olduğu gösterildi (**Tablo 5.8.**).

Yine bizim çalışmamızda yer alan üç mikroorganizmaya karşı TFP' li grup sonuçları Yang ve ark. çalışmasındaki TFP grubundaki sonuçlara benzer olduğu gözlemlendi.

E. Mariani ve ark. (127) trombositlerin doku iyileşmesindeki rolüne ilave olarak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Streptococcus faecalis* gibi hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenleri üzerine trombositlerin etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmanın en önemli özelliği saf trombositlerin beş farklı mikroorganizma üzerindeki bakteriyostatik/bakterisidal etkinliğine ilave olarak mikrobisidal proteinleri de araştırılmıştır. Saf trombositten zengin plazma (Saf TZP, S-TZP) ve yine saf trombositten fakir plazmalı çalışma grupları (Saf TFP, S-TFP) %10'luk Kalsiyum Klorid ile aktive edilindikten sonra bu beş mikroorganizmayı farklı bakteri konsantrasyonlarında (10^4 kob/ml, 10^5 kob/ml, 10^6 kob/ml) plaklara ekimlerini gerçekleştirmişlerdir. Sonrasında 18-24 saatlik inkübasyona alınan plakların; 1., 2., 4. ve 18. saatlerde koloni sayımlarına geçilmiştir. E. Mariani ve ark. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ile yaptıkları çalışmada S-TZP ve S-TFP gruplarının, kontrol grubuna göre bakteri üremesini önemli derecede daha fazla inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda S-TZP'nin 10^4 ve 10^5 kob/ml gibi düşük konsantrasyonlu 1 ve 2. saat ekimlerinde S-TFP'den daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bu konsantrasyonlarda üremeyi 4 saate kadar baskılayabildiklerini belirtmektedirler. Oysa 10^6 kob/ml konsantrasyondaki yapılan çalışmada bu etkinin sadece 2. saatte olduğu görülmüştür. Çalışmamız sonuçları E. Mariani ve ark. yaptığı çalışma ile kıyaslanınca; TAD'e sahip *K. pneumoniae* izolatında bakteriyostatik etki süresinin bizim çalışmamızda daha uzun sürdüğü görüldü (8 saat). Bu sürenin uzamasının nedeni olarak E. Mariani ve ark. yaptığı çalışmada trombosit sayısının (ort. $290 \times 10^3 \mu\text{L}$) bizim çalışmamızdaki ortalama trombosit sayısından çok daha az ($2218 \times 10^3 /\mu\text{l}$) olmasına ve lökosit içermemesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Aynı zamanda bizim çalışmamızdaki bakteri konsantrasyonu daha düşüktü (10^3 kob/ml).

E. Mariani ve ark. yaptığı çalışmadaki *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 suşu üzerine olan trombositlerin etkinliği karşılaştırıldığında ise gerek TZP gerekse TFP gruplarında bakteriyostatik etki süresinin (4 saat) bizim çalışmamızdan daha kısa

sürdüğü görüldü (8 saat). Bu sürenin uzamasının nedeni olarak trombosit sayısının bizim çalışmamızda çok daha fazla olmasına, bakteri konsantrasyonunun daha az ve PRP içeriğinde lökositlerin bulunmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Mariani ve arkadaşları dördüncü saatten sonraki ekimleri 18. saatte planlamaları nedeniyle tam bir kıyaslama yapılamadı. Bununla birlikte TZP, TFP kıyaslanmasında E. Mariani ve ark. yaptığı çalışmada TZP üstünlüğü 1. saat ekiminden itibaren gösterilmekle birlikte bizde de benzer sonuçlar elde edildi (**Tablo 5.8.**).

TZP'nin *E. coli* ATCC 25922'ye karşı etkinliği ile ilgili literatür taramasında; E. Mariani ve ark. (127) aynı izolatu kullandığı görüldü. Bu çalışmada 10^6 kob/ml gibi yüksek bakteri konsantrasyonlarında TZP'nin ilk bir saatte üremeyi baskılabildiği sonrasında etkinliğini kaybettiği belirtilmekteydi. 10^5 kob/ml ve 10^4 kob/ml gibi daha düşük bakteri konsantrasyonlu gruplarında ise inhibisyonun iki saate kadar çıktığı belirtilmekteydi. Bu sonuçlar bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında ise inhibisyon süresinin bizim çalışmada daha uzun sürdüğü yönündeydi (8 saat) (**Resim 5.14.**). Bu sürenin uzamasının nedeni olarak yine trombosit sayısının farklılığı, bakteri konsantrasyonunun daha az ve TZP içeriğinde lökositlerin bulunmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Trombositlerin antimikrobiyal etki mekanizmalarında az da olsa bilinmeyen noktalar bulunmaktadır. Bilinen birçok trombosit kaynaklı antimikrobiyal faktörün yanında plazma ve diğer hücre sel elemanların bu faktörlerden nasıl etkilendiği halen tam açıklanamamıştır. Bielecki ve ark. (128) disk difüzyonlu ortamda *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* üzerine lökositli TZP'nin inhibitör etkisini araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* üzerinde lökositli TZP'nin hiçbir etkisinin olmadığını, *E. coli*, *S. aureus* üzerine ise etkisinin olduğunu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise *K. pneumoniae* (TAD'e sahip ve ATCC 700603 dahil) ve *E. coli*'ye karşı üremeyi engelleyen etkinlik gösterilmiştir. Sonuçlarımız ile Bielecki ve ark. yaptığı çalışma karşılaştırıldığında standart ATCC suşu kullanılmaları ve farklı bir yöntem olan disk difüzyonlu bir metod seçmeleri nedeniyle karşılaştırmanın zor olduğu değerlendirildi.

Çalışmamızda trombositlerin aktivasyonu için kullandığımız kalsiyum glukonat uygulamasının ilk saatlerinde trombositlerden salgılanan mikrobisidal moleküllerin yoğunluğunu artırdığı ve bakteriyel inhibisyonu etkilediği bilinmektedir. Buna ek olarak Moojen ve ark. (129) yaptığı çalışmada TZP'ye trombin eklenmesinin lökositleri etkilemediği, bu yüzden 1-4. saatlerdeki antimikrobiyal aktivitenin çoğunlukla trombosit kaynaklı olduğu göstermiştir. Chen L. ve ark. (130) diyabetik ayak ülserlerinde TZP'yi trombin ile aktive ederek yaptıkları çalışmada beklenen ilk dört saatlik inhibitör etkinin

yanında 24 saate uzayan antibakteriyel etkiyi gösterebilmişlerdir. Ayrıca deneysel koşullarda yaptıkları lökositli grup ile lökositlerin etkinliğinin bloke edildiği grup sonuçları arasında fark olmaması nedeni ile lökositlerin antibakteriyel etkinliğinin olmadığı gösterilmiştir.

Anitua ve ark. (131) TZP içerisindeki lökosit miktarında ilave artışın antimikrobiyal etkinliği artırmadığını göstermişlerdir. Fakat TZP'nin antimikrobiyal etkinliği üzerine yapılan başka çalışmalarda ise lökositlerden ziyade trombositlerin antimikrobiyal etkinlikten sorumlu olduğu, trombositlerin başlattığı bu etkiyi lökositlerin artırmış olabileceği Yang ve ark. (126) ile Drago ve ark. (132) tarafından iddia edilmektedir. Yang ve ark. yaptığı çalışmada azda olsa TZP içerisinde lökositin yer alması, TZP'nin uzamış antimikrobiyal etkisinin lökositler tarafından gerçekleştirilmiş olabileceği iddia edilmiştir. Drago ve ark. (133) yaptığı çalışmada ise TZP'deki lökosit miktarındaki artışın doğrudan antimikrobiyal potansiyeli güçlendirdiği savunulmaktadır. Bizim çalışmamızda TZP'nin bakteri türü ve ekim saatine göre değişmekle birlikte TFP'ye göre bakteriyostatik etkinliği daha fazlaydı. TZP ve TFP'de ölçülen beyaz küre, nötrofil, lenfosit ve trombosit sayıları karşılaştırıldığında TZP' deki değerlerin tümünün daha yüksek olduğu tespit edildi (**Tablo 5.3.**).

Bakterilerin üremelerinin değerlendirilmesinde ekimlere kadar geçen inkübasyon süresi oldukça önemli olan bir diğer konudur. Ekimlerin sık sık (saat başı gibi) yapılması her ne kadar ideali olsa da imkân kabiliyet açısından yapılabilir değildir. Çalışmamızda her üç bakteri için ekimlerin yapıldığı süreler 1., 2., 4., 8. ve 12. saatler olarak belirlenmiştir. 12. saatte TZP ve TFP'li gruplardaki tüm bakteri üremeleri kontrol grubuyla (PBS) eşdeğer hale geldiği görüldü. Bu da 12. saate kadar TZP ve TFP içeriğindeki trombositlerin ortama saldıgı kemokin ve kinosidinler dahil antimikrobiyal etkinliklerinin azaldığını göstermekteydi. Çalışmamızın eksik yönü açısından değerlendirildiğinde 6. saat ve 10. saat ekimleri de yapılmış olsaydı bakteri üremeleri, etkinlik açısından daha ideal olabilirdi. E. Mariani ve ark. (127) yaptığı çalışmada 1., 2., 4. ve 18. saatlerde üreme kontrolleri amacıyla ekimler yapılmıştır. 18. saatte yapılan ekimlerin TZP ve TFP'li gruplardaki antimikrobiyal etkinliğin kaybına bağlı olarak çok fazla bakteri ürediği ve bizim çalışmamızda olduğu gibi kontrol grubu ile eşitlendiği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada da ara saatlerdeki ekimler olmaması nedeniyle etkinliğin sonlanımı tespit edilememiştir. Bizim çalışmamızın daha sık ekimleri içeren ileri çalışmanın yapılması TZP ve TZP'nin ayrı ayrı etkinlik sonlanımını göstermede yardımcı olabileceği değerlendirilmektedir.

TZP'nin çalışmamızda kullandığımız TAD'e sahip *K. pneumoniae*, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 üzerine antimikrobiyal etkisi vardır. Bu etki

yaklaşık olarak sekiz saattir. TZP'nin antimikrobiyal etkisi bakteri direnç profilinden bağımsızdır. Hatta bu bağlamda TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerine olan etki, *K. pneumoniae* ATCC 700603' den sekizinci saatte daha fazladır ve bu fark istatistiksel olarak da anlamlıdır (**Tablo 5.9.**). Sekizinci saat verilerine bakıldığında bir bakterideki direnç durumu arttıkça trombositlere hassasiyeti artabilir fakat bunun için daha geniş çaplı araştırmalara gereksinim duyulduğu aşikardır.

Son 20 yılda trombosit konsantrasyonlarının doku iyileşmesindeki potansiyeli üzerine pek çok çalışma olmasına rağmen antimikrobiyal etkinlikleri üzerine çok az çalışma bulunmaktadır. Drago L. ve ark. (133) trombositlerin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yaptığı bir çalışmada trombositlerin tek başına antimikrobiyal etkiye sahip olmadığını göstermişlerdir. Antimikrobiyal etki için aynı ortamda plazma ve aktive trombosit kaynaklı faktörlere ihtiyaç olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda disk difüzyon ile antimikrobiyal zon çaplarını ölçmemize rağmen materyal-metod ve sonuçlar kısmında bu konuya değinmedik. Boş disklere emdirdiğimiz TZP'nin (10 µl) herhangi bir inhibisyon ve zon çaplarında genişleme yapmadığını gözlemledik. Drago L. (133), Bielecki ve ark. (128) yaptığı inhibisyon zon çapı çalışmalarında ise diske emdirilen TZP'ye trombin eklediklerini belirtmektedirler. Bizim çalışmamızda inhibisyon zon çapının olmaması trombinin TZP'li diske ilave edilmemesine bağlandı.

Son 10 yıl içinde sık kullanılan antibiyotiklere dirençli klinik suşlar tüm dünyada yaygınlaşmıştır. Yeni kullanıma sunulacak olan sadece sınırlı sayıda antimikrobiyal molekül olması yeni ve alternatif tedavi seçeneklerini gerekli kılmaktadır. Enfekte yara tedavilerinde TZP genelde antibiyotiklere destek tedavisi olarak iyi bir seçenek gibi düşünülmeyle birlikte son zamanlarda Sun S. ve ark. (134) bildirdiği gibi vaka bazında da olsa etkin antibiyotik seçeneklerinin olmadığı durumlarda sadece TZP ve diğer destek tedavileri ile tam sağaltım sağlanan vakalar bildirilmektedir. Sun S. ve ark. sundukları bir diyabetik ayak enfeksiyonlu hastada amputasyon sonrası test edilen tüm antibiyotiklere dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu geliştiği belirtilmektedir. Uzun süreli sistemik ve lokal antibiyotik tedavisi birlikte kullanılmasına rağmen yara iyileşmesinde gelişme kaydedememişlerdir. Tüm antibiyotik tedavileri stoplanan hastada birkaç seans debridman sonrası, 3 kez TZP jel uygulanılmıştır. Takiben beş seans TZP jel ve üç seans negatif basınçlı yara terapisi eş zamanlı uygulanan hastanın kültür takiplerinde üremenin olduğu ve yaranın 118 günde kapandığı belirtilmektedir.

Sonuç olarak TZP TAD'e sahip mikroorganizmalarda dahil olmak üzere çeşitli bakteriler üzerine antimikrobiyal etki göstermektedir. Bu konudaki çalışmaların çoğunluğu laboratuvar çalışmaları olup etkinliğin değerlendirilmesi amacı ile yapılacak geniş katılımlı, randomize kontrollü klinik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamıza alınan TAD'e sahip *K. pneumoniae* izolatu versiyon 6,0 EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiş; izolatuın kolistin ve tigesiklin dahil test edilen tüm antibiyotiklere karşı dirençli olduğu olduğu gözlendi. İzolat TAD tanımına uymaktaydı.
2. Trombositten Zengin Plazma (TZP) grubunda ortalama Beyaz Küre (WBC) sayısı; $76,18 \times 10^3 \mu\text{l}$, Trombosit sayısı $2218 \times 10^3 \mu\text{l}$ olarak saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız Magellan™ tam otomatize sisteminin bağışçılarının periferik kanlarındaki ortalama trombosit sayısını güvenilir bir şekilde 9,4 kat arttırdığı görülmüştür. TZP'nin rejeneratif tıp veya antimikrobiyal etkinliği için tam otomatize kapalı sistemlerin kullanılması ile en yüksek trombosit ve lökosit değerleri elde edilebilir. Bu değerler antimikrobiyal başarıyı etkileyen en önemli etkindir.
3. TZP'nin çeşitli mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalarda birtakım farklılıkları gözlenmektedir. Bunun en önemli nedeninin elde edilen TZP'deki trombosit sayısından kaynakladığı, dolayısı ile sayıya ve aktivasyona bağlı olarak ortaya çıkan kemokin, kinosidinlerin miktarlarındaki değişikliklerden bu farklılığın ortaya çıktığı düşünölmüştür.
4. TAD'e sahip *K. pneumoniae* izolatu üzerine 10^3 kob/ml bakteri konsantrasyonunda antimikrobiyal etkinliği göstermek amacıyla yapılan koloni sayım ortalamlarında, 1. saat için 1,8; 2. saat için 2; 4. saat için 5,7; ve 8. saat için 448 ve son olarak 12. saat için 1000 olarak bulunmuştur. Bu üremeler TZP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerinde 2 saat boyunca en yüksek düzeyde antimikrobiyal etki gösterdiği, bu seviyede etkinliğin 4. saatte de devam ettiği, 8. saate doğru bu etkinin azaldığı, 12. saatte ise etkinin kaybolduğunu göstermektedir. TZP'nin PBS'e göre TAD'e sahip *K. pneumoniae* üremesi üzerine etkinliği karşılaştırıldığında 1., 2., 4. ve 8. saatte üreyen koloni sayısının TZP'li grupta istatistiksel anlamlı olacak şekilde daha az olduğunu göstermiştir.
5. TZP'nin antimikrobiyal etki süresi 12 saatten kısa gibi gözökmekle birlikte, klinik uygulamada kullanılacak olur ise ilk aşamada elde edilen TZP düşük hacimli steril torbalarda saklanılıp kullanılacağı zaman yeniden aktive edilebilir. Bu yöntem ile ek doz uygulamaları için hastalarda ilave girişimin önüne geçilebileceği düşünölmektedir.
6. TZP'nin 1., 2. ve 4. saatlerde üreyen kolonilerinin PBS (kontrol) ile kıyaslandığında 4. saatte tepe noktasına yakın seviyelere ulaştığı, istatistiksel

olarak farklılık 8. saat ekimlerinde de devam etmektedir. 12. saatte trombositlerin antimikrobiyal etkinliğinin fark edilemeyecek kadar azaldığı tespit edilmiştir

7. TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerinde antimikrobiyal etkisinin transforme edilmiş ortalamalar açısından 2. saatte tepe noktasına ulaştığı, 4. saatte trombositlerin antimikrobiyal etkinliğinin 2. saatteki etkinliğe yakın olduğu, 8. saatte trombositlerin bu etkinliğinin azaldığı, 12. saatte ise kaybolduğu görüldü.
8. TZP ve TFP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* üzerinde antimikrobiyal etkinlikleri kıyaslandığında gerek bakteri üremesi üzerine baskı gücünün, gerekse gücünü devam ettirme süresinin TZP'de daha güçlü olduğu, 1., 2. ve 4. saatte üreyen koloni sayısının TZP'li grupta daha az olduğu ve bu farkın 8. saatte istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum trombosit başta olmak üzere lökosit ve lenfosit sayısının artmasının antimikrobiyal etkinliği arttırdığını göstermiştir. Aynı şekilde TZP hakkında yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesinin en önemli nedeni, bu trombosit sayısı farklılığı ve lökosit hücrelerinin ortamda bulunup bulunmadığına göre değişiklik göstermesidir.
9. TZP'nin TAD'e sahip *K. pneumoniae* etkinliği dışında, antimikrobiyal duyarlılık testleri için uygulama standartlarında belirtilen kolay üreyen bakterilerde standart suş olan *E. coli* ATCC 25922 ile GSBL doğrulama testi yapılırken rutin olarak kullanılması önerilen *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşlarına karşı da antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu etkinlik sırası ile;
***E. coli* ATCC 25922 açısından** 1., 2., ve 4. saatlerde PBS (kontrol)'e göre etkinliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. 8. saatte etkin olmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. 12. saatte ise etkinin kaybolduğu tespit edilmiştir.
***K. pneumoniae* ATCC 700603 açısından** 1., 2., ve 4. saatlerde PBS (kontrol)'e göre etkinliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. 8. saatte etkin olmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. 12. saatte ise etkinin kaybolduğu tespit edilmiştir.
10. TZP'nin her üç bakteri üzerine etkinliği ayrı ayrı gösterilmiş olmasına rağmen bu etkinliklerin bakteri türü ve direnç durumuna göre karşılaştırıldığında;
TZP'nin 8. saatteki TAD'e Sahip *K. pneumoniae* ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 karşılaştırıldığında; TAD'e Sahip *K. pneumoniae* üreyen koloni sayısının daha az ve bu üreme azlığının istatistiksel anlamlı olduğu bulundu. Bu ise bakteri direnci arttıkça trombositlere daha hassas olabileceğini

düşündürmektedir. Fakat TZP'nin 1., 2. ve 4. saatlerinde etkinliklerinin her üç bakteri üzerine aynı olduğu ve bunlarında istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulundu. Bu anlamsızlık çalışmamızda kullanılan gram negatif enterik bakteriler üzerinde TZP'nin bakteri türü ve direnç durumu gözetmeksizin antimikromisidal etkinlik yaptığı olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak; trombositlerin aktivasyona uğratılması ile tüm antibiyotiklere dirençli bakteriler de dahil olmak üzere, lokal enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklere yardımcı bir hücre sel kan bileşeni olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Fakat bunun için geniş katılımlı randomize kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



7. KAYNAKLAR

1. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(1):37-41.
2. Anitua E, Sanchez M, Zaldueño MM, de la Fuente M, Prado R, Orive G, et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif.* 2009;42(2):162-70.
3. Torres J, Tamimi F, Martínez PP, Alkhraisat MH, Linares R, Hernández G, et al. Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009;36(8):677-87.
4. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(4):529-35.
5. Infectious Diseases Society of A, Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ, Boucher HW, Bradley JS, et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin Infect Dis.* 2011;52 Suppl 5:S397-428.
6. Sugden R, Kelly R, Davies S. Combatting antimicrobial resistance globally. *Nat Microbiol.* 2016;1(10):16187.
7. Roberts RR, Hota B, Ahmad I, Scott RD, 2nd, Foster SD, Abbasi F, et al. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. *Clin Infect Dis.* 2009;49(8):1175-84.
8. Molton JS, Tambyah PA, Ang BS, Ling ML, Fisher DA. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clin Infect Dis.* 2013;56(9):1310-8.
9. Rolain JM, Canton R, Cornaglia G. Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(7):615-6.
10. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One.* 2012;7(4):e34953.
11. Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat. *JAMA.* 2008;300(24):2911-3.
12. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-8.
13. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(12):1099-106.
14. Chitnis AS, Caruthers PS, Rao AK, Lamb J, Lurvey R, Beau De Rochars V, et al. Outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae at a long-term acute care hospital: sustained reductions in transmission through active surveillance and targeted interventions. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012;33(10):984-92.
15. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151-61.
16. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(9):597-602.
17. Lai EP, Iqbal Z, Avis TJ. Combating Antimicrobial Resistance in Foodborne Microorganisms. *J Food Prot.* 2016;79(2):321-36.
18. Kallen AJ, Mu Y, Bulens S, Reingold A, Petit S, Gershman K, et al. Health care-associated invasive MRSA infections, 2005-2008. *JAMA.* 2010;304(6):641-8.

19. Rinsky JL, Nadimpalli M, Wing S, Hall D, Baron D, Price LB, et al. Livestock-associated methicillin and multidrug resistant *Staphylococcus aureus* is present among industrial, not antibiotic-free livestock operation workers in North Carolina. *PLoS One*. 2013;8(7):e67641.
20. Bartlett JG. A call to arms: the imperative for antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis*. 2011;53 Suppl 1:S4-7.
21. Food, Drug Administration HHS. Establishing a list of qualifying pathogens under the Food and Drug Administration Safety and Innovation Act. Final rule. *Fed Regist*. 2014;79(108):32464-81.
22. Rice WR, Chippindale AK. Sexual recombination and the power of natural selection. *Science*. 2001;294(5542):555-9.
23. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35(5):912-35.
24. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*. 1997;24 Suppl 1:S19-45.
25. Gold HS, Moellering RC, Jr. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med*. 1996;335(19):1445-53.
26. el Solh N, Allignet J, Bismuth R, Buret B, Fouace JM. Conjugative transfer of staphylococcal antibiotic resistance markers in the absence of detectable plasmid DNA. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986;30(1):161-9.
27. Recchia GD, Hall RM. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol*. 1997;5(10):389-94.
28. Weldhagen GF. Integrons and beta-lactamases--a novel perspective on resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;23(6):556-62.
29. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211-33.
30. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*. 1988;10(4):677-8.
31. Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *Br J Pharmacol*. 2008;153 Suppl 1:S406-13.
32. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):933-51, table of contents.
33. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. 2006;9(3):142-56.
34. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011;11(5):381-93.
35. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 2011;53(1):60-7.
36. Leflon-Guibout V, Speldooren V, Heym B, Nicolas-Chanoine M. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of bla(TEM) genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(10):2709-14.
37. Poirel L, Kampfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(12):4038-40.
38. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(9):3045-9.

39. Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(21):7378-82.
40. Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, et al. Enterobacter bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med*. 1991;115(8):585-90.
41. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med*. 2005;165(12):1430-5.
42. Landman D, Bratu S, Kochar S, Panwar M, Trehan M, Doymaz M, et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(1):78-82.
43. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):306-25.
44. Hirao Y, Yanagimachi R. Detrimental effect of visible light on meiosis of mammalian eggs in vitro. *J Exp Zool*. 1978;206(3):365-9.
45. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol*. 2011;19(12):588-95.
46. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2006;43 Suppl 2:S49-56.
47. Hedberg M, Edlund C, Lindqvist L, Rylander M, Nord CE. Purification and characterization of an imipenem hydrolysing metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *J Antimicrob Chemother*. 1992;29(2):105-13.
48. Jacobs MR, Spangler SK, Appelbaum PC. beta-Lactamase production and susceptibility of US and European anaerobic gram-negative bacilli to beta-lactams and other agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11(11):1081-93.
49. Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol*. 2001;183(1):235-49.
50. Moxon ER, Medeiros AA, O'Brien TF. Beta-lactamase effect on ampicillin treatment of *Haemophilus influenzae* B bacteremia and meningitis in infant rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;12(4):461-4.
51. Sanders CC, Sanders WE, Jr., Goering RV. In vitro antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;21(6):968-75.
52. Shimizu K, Kumada T, Hsieh WC, Chung HY, Chong Y, Hare RS, et al. Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;28(2):282-8.
53. John JF, Jr., Twitty JA. Plasmids as epidemiologic markers in nosocomial gram-negative bacilli: experience at a university and review of the literature. *Rev Infect Dis*. 1986;8(5):693-704.
54. Gaffney DF, Cundliffe E, Foster TJ. Chloramphenicol resistance that does not involve chloramphenicol acetyltransferase encoded by plasmids from gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol*. 1981;125(1):113-21.
55. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046-54.
56. Speer BS, Bedzyk L, Salyers AA. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J Bacteriol*. 1991;173(1):176-83.

57. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):780-90.
58. Vaara M. The outer membrane permeability-increasing action of linear analogues of polymyxin B nonapeptide. *Drugs Exp Clin Res.* 1991;17(9):437-43.
59. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 1985;49(1):1-32.
60. Hasegawa Y, Yamada H, Mizushima S. Interactions of outer membrane proteins O-8 and O-9 with peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12. *J Biochem.* 1976;80(6):1401-9.
61. Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;27(1):84-92.
62. Goldstein FW, Gutmann L, Williamson R, Collatz E, Acar JF. In vivo and in vitro emergence of simultaneous resistance to both beta-lactam and aminoglycoside antibiotics in a strain of *Serratia marcescens*. *Ann Microbiol (Paris).* 1983;134A(3):329-37.
63. Bryan LE, Kwan S. Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23(6):835-45.
64. Funada H, Hattori KI, Kosakai N. Catalase-negative *Escherichia coli* isolated from blood. *J Clin Microbiol.* 1978;7(5):474-8.
65. Williams JB. Drug efflux as a mechanism of resistance. *Br J Biomed Sci.* 1996;53(4):290-3.
66. McMurry L, Petrucci RE, Jr., Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(7):3974-7.
67. Canton R, Morosini MI. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):977-91.
68. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 2002;34(4):482-92.
69. Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis.* 2004;39(7):1010-5.
70. Raad, II, Hanna HA, Hachem RY, Dvorak T, Arbuckle RB, Chaiban G, et al. Clinical-use-associated decrease in susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* to linezolid: a comparison with quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3583-5.
71. Hoellman DB, Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Activities and time-kill studies of selected penicillins, beta-lactamase inhibitor combinations, and glycopeptides against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(4):857-61.
72. Clark NC, Weigel LM, Patel JB, Tenover FC. Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):470-2.
73. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis.* 2006;42 Suppl 1:S25-34.
74. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5638-42.
75. Enne VI, King A, Livermore DM, Hall LM. Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of *sul2* or a short insertion in chromosomal *folP*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1934-9.
76. Huovinen P. Trimethoprim resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(10):1451-6.

77. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 12):1619-29.
78. Cohen AL, Calfee D, Fridkin SK, Huang SS, Jernigan JA, Lautenbach E, et al. Recommendations for metrics for multidrug-resistant organisms in healthcare settings: SHEA/HICPAC Position paper. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29(10):901-13.
79. Kallen AJ, Hidron AI, Patel J, Srinivasan A. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2008. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31(5):528-31.
80. Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis*. 1997;25(5):951-68; quiz 69-70.
81. Yeaman MR. Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defense. *Future Microbiol*. 2010;5(3):471-506.
82. Yeaman MR. Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(4):525-44.
83. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(6):426-37.
84. Yeaman MR, Yount NY. Unifying themes in host defence effector polypeptides. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(9):727-40.
85. Yeaman MR, Yount NY, Waring AJ, Gank KD, Kupferwasser D, Wiese R, et al. Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(3):609-19.
86. Yount NY, Yeaman MR. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(19):7363-8.
87. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, et al. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol*. 2008;141(1):84-91.
88. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res*. 2004;113(6):379-85.
89. Phelps PK, Miller JS, Stanley DW. Prostaglandins, not lipoxygenase products, mediate insect microaggregation reactions to bacterial challenge in isolated hemocyte preparations. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003;136(2):409-16.
90. Blair P, Rex S, Vitseva O, Beaulieu L, Tanriverdi K, Chakrabarti S, et al. Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ Res*. 2009;104(3):346-54.
91. Trier DA, Gank KD, Kupferwasser D, Yount NY, French WJ, Michelson AD, et al. Platelet antistaphylococcal responses occur through P2X1 and P2Y12 receptor-induced activation and kinocidin release. *Infect Immun*. 2008;76(12):5706-13.
92. Yeaman MR, Bayer AS. Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resist Updat*. 1999;2(2):116-26.
93. Yount NY, Waring AJ, Gank KD, Welch WH, Kupferwasser D, Yeaman MR. Structural correlates of antimicrobial efficacy in IL-8 and related human kinocidins. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(3):598-608.
94. Tsegaye TS, Gnirss K, Rahe-Meyer N, Kiene M, Kramer-Kuhl A, Behrens G, et al. Platelet activation suppresses HIV-1 infection of T cells. *Retrovirology*. 2013;10.
95. Cocchi F, Devico AL, Garzinodemo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of Rantes, Mip-1-Alpha, and Mip-1-Beta as the Major Hiv-Suppressive Factors Produced by Cd8(+) T-Cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-5.

96. Mercier RC, Dietz RM, Mazzola JL, Bayer AS, Yeaman MR. Beneficial influence of platelets on antibiotic efficacy in an in vitro model of *Staphylococcus aureus*-induced endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(7):2551-7.
97. Wong CHY, Jenne CN, Petri B, Chrobok NL, Kubes P. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol*. 2013;14(8):785-+.
98. McMorran BJ, Wieczorski L, Drysdale KE, Chan JA, Huang HM, Smith C, et al. Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. *Science*. 2012;338(6112):1348-51.
99. Love MS, Millholland MG, Mishra S, Kulkarni S, Freeman KB, Pan W, et al. Platelet factor 4 activity against *P. falciparum* and its translation to nonpeptidic mimics as antimalarials. *Cell Host Microbe*. 2012;12(6):815-23.
100. Coelho HC, Lopes SC, Pimentel JP, Nogueira PA, Costa FT, Siqueira AM, et al. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria is related to platelets phagocytosis. *PLoS One*. 2013;8(5):e63410.
101. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun*. 2002;70(12):6524-33.
102. White JG. Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets*. 2005;16(2):121-31.
103. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012;12(3):324-33.
104. Jenne CN, Wong CHY, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, et al. Neutrophils Recruited to Sites of Infection Protect from Virus Challenge by Releasing Neutrophil Extracellular Traps. *Cell Host & Microbe*. 2013;13(2):169-80.
105. Miedzobrodzki J, Panz T, Plonka PM, Zajac K, Dracz J, Pytel K, et al. Platelets augment respiratory burst in neutrophils activated by selected species of gram-positive or gram-negative bacteria. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(3):383-8.
106. Nguyen XD, Muller-Berghaus J, Kalsch T, Schadendorf D, Borggreffe M, Kluter H. Differentiation of monocyte-derived dendritic cells under the influence of platelets. *Cytotherapy*. 2008;10(7):720-9.
107. Sowa JM, Crist SA, Ratliff TL, Elzey BD. Platelet influence on T- and B-cell responses. *Arch Immunol Ther Ex*. 2009;57(4):235-41.
108. Iannacone M, Sitia G, Isogawa M, Whitmire JK, Marchese P, Chisari FV, et al. Platelets prevent IFN-alpha/beta-induced lethal hemorrhage promoting CTL-dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus. *P Natl Acad Sci USA*. 2008;105(2):629-34.
109. Iannacone M, Sitia G, Isogawa M, Marchese P, Castro MG, Lowenstein PL, et al. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Blood*. 2005;106(11):193a-a.
110. Gerdes N, Zhu LJ, Ersoy M, Hermansson A, Hjemdahl P, Hu H, et al. Platelets regulate CD4(+) T-cell differentiation via multiple chemokines in humans. *Thromb Haemostasis*. 2011;106(2):353-62.
111. Maione F, Cicala C, Liverani E, Mascolo N, Perretti M, D'Acquisto F. IL-17A increases ADP-induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;408(4):658-62.
112. Magdalena Z, Andrzejczuk S, Chudzik-Rząd B, Juda M, Malm A. Fosfomycin as an alternative therapeutic option for treatment of infections caused by multi-resistant Gram-negative bacteria. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2015;8(2):51-4.
113. Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Lagacé-Wiens PRS, et al. Ceftazidime-Avibactam: a Novel Cephalosporin/ β -lactamase Inhibitor Combination. *Drugs*. 2013;73(2):159-77.

114. Vazquez JA, González Patzán LD, Stricklin D, Duttaroy DD, Kreidly Z, Lipka J, et al. Efficacy and safety of ceftazidime–avibactam versus imipenem–cilastatin in the treatment of complicated urinary tract infections, including acute pyelonephritis, in hospitalized adults: results of a prospective, investigator-blinded, randomized study. *Current Medical Research and Opinion*. 2012;28(12):1921-31.
115. Hemecour P. Sodium carboxymethylcellulose aqueous-based gel vs. becaplermin gel in patients with nonhealing lower extremity diabetic ulcers. *Wounds*. 1998;10:69-75.
116. Smiell JM, Wieman TJ, Steed DL, Perry BH, Sampson AR, Schwab BH. Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies. *Wound Repair Regen*. 1999;7(5):335-46.
117. Robson M. Integrating the results of phase IV (postmarketing) clinical trial with four previous trials reinforces the position that Regranex (becaplermin) gel 0.01% is an effective adjunct to the treatment of diabetic foot ulcers. *J Appl Res*. 2005(5):35-45.
118. Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer Study Group. *J Vasc Surg*. 1995;21(1):71-8; discussion 9-81.
119. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care*. 1998;21(5):822-7.
120. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Correa do Amaral RJ, Granjeiro JM, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):67.
121. Jago R, Jacox RF. Cellular source and character of a heatstable bactericidal property associated with rabbit and rat platelets. *J Exp Med*. 1961;113:701-11.
122. Weksler BB, Nachman RL. Rabbit platelet bactericidal protein. *J Exp Med*. 1971;134(5):1114-30.
123. Kahn RA, Flinton LJ. The relationship between platelets and bacteria. *Blood*. 1974;44(5):715-21.
124. Czuprynski CJ, Balish E. Interaction of rat platelets with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 1981;33(1):103-8.
125. Miragliotta G, Lafata M, Jirillo E. Anti-bacterial activity mediated by human platelets. *Agents Actions*. 1988;25(3-4):401-6.
126. Yang LC, Hu SW, Yan M, Yang JJ, Tsou SH, Lin YY. Antimicrobial activity of platelet-rich plasma and other plasma preparations against periodontal pathogens. *J Periodontol*. 2015;86(2):310-8.
127. Mariani E, Filardo G, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, et al. Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytotherapy*. 2014;16(9):1294-304.
128. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br*. 2007;89(3):417-20.
129. Moojen DJ, Everts PA, Schure RM, Overdeest EP, van Zundert A, Knape JT, et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res*. 2008;26(3):404-10.
130. Chen L, Wang C, Liu H, Liu G, Ran X. Antibacterial effect of autologous platelet-rich gel derived from subjects with diabetic dermal ulcers in vitro. *J Diabetes Res*. 2013;2013:269527.
131. Anitua E, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF(R)-Endoret(R)) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37(6):652-7.

132. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Taschieri S, Del Fabbro M. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC Microbiol.* 2013;13:47.
133. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Romano CL, Taschieri S, Del Fabbro M. Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: an in vitro study. *PLoS One.* 2014;9(9):e107813.
134. Sun S, Wang C, Chen D, Cen S, Lv X, Wen X, et al. Combating Superbug Without Antibiotic on a Postamputation Wound in a Patient with Diabetic Foot. *Int J Low Extrem Wounds.* 2016;15(1):74-7.

