

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**MAGGOT (*Lucilia sericata* Larvası) TÜM VÜCUT SIVISI
METABOLİTLERİNİN BELİRLENMESİ ve ANTİBAKTERİYEL
AKTİVİTE POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ali Korhan SİĞ
Tbp.Kd.Ütğm.

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA
2016

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**MAGGOT (*Lucilia sericata* Larvası) TÜM VÜCUT SIVISI
METABOLİTLERİNİN BELİRLENMESİ ve ANTİBAKTERİYEL
AKTİVİTE POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ali Korhan SİĞ
Tbp. Kd. Ütğm.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı İçin Öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Remzi Engin ARAZ
Prof.Tbp.Alb.

ANKARA
2016

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığına:

“Maggot (*Lucilia sericata* larvası) tüm vücut sıvısı metabolitlerinin belirlenmesi ve antibakteriyel aktivite potansiyelinin araştırılması” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Tbp.Alb. Remzi Engin ARAZ
GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tıbbi Parazitoloji BD Bşk.

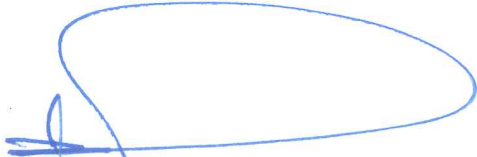
Üye : Prof.Dr. Sibel ERGÜVEN 
Hacettepe Üni. Tıp Fakóltesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD.Öğt.Üye.

Üye : Prof.Tbp.Alb. Remzi Engin ARAZ
GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tıbbi Parazitoloji BD Bşk. 

Üye : Doç.Tbp.Alb. Orhan BAYLAN 
GATA H.paşa Eğt.Hst. Tıbbi Mikrobiyoloji Srv.Öğt.Üye.

ONAY:

Tbp.Kd.Ütğm. Ali Korhan SIĞ’ın 27 Haziran 2016 tarihinde savunduğu bu tez, Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.


Hayati BİLGİÇ
Prof. Tbp. Tümamiral
GATA Komutanı Bilimsel Yardımcısı,
Askeri Tıp Fakóltesi Dekanı ve
Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

“Maggot (*Lucilia sericata* larvası) ekskresyon/sekresyon metabolitlerinin belirlenmesi ve antibakteriyel aktivite potansiyelinin araştırılması” konulu uzmanlık tezi, GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD Başkanlığının 10 Ocak 2014 tarih ve T. MİK. AD: 50687469-3730-9-14/1541 sayılı emri ile verilmiş, GATF Dek.lığı ve Eğt.Hst.Bştpb.lığının 28 Haziran 2016 tarihli, T.MİK.AD.: 50687469-8030-317-16/1541 sayılı ve “Tez Konusu Değişikliği” konulu yazısı ile “Maggot (*Lucilia sericata* larvası) tüm vücut sıvısı metabolitlerinin belirlenmesi ve antibakteriyel aktivite potansiyelinin araştırılması” şeklinde yeniden düzenlenip ve çalışılmıştır.

Uzmanlık eğitimim süresince, öğrenimimde ve tezimle ilgili çalışmalarımda bilgi ve tecrübesini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Prof.Dr.Tbp.Alb. Remzi Engin ARAZ başta olmak üzere, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Tbp.Alb. Mehmet BAYSALLAR’a, Prof.Tbp.Alb. Mehmet TANYÜKSEL’e, Prof.Dr.Tbp.Alb. Ali ALBAY’a, Prof.Dr. Mehmet YAPAR’a, Prof.Tbp.Alb. Mehmet Ali SARAÇLI’ya, Prof.Dr. Ayşegül Çetin GÖZEN’e, Doç.Tbp.Alb. Özgür KORU’ya ve Yrd.Doç.Tbp.Alb. Mustafa GÜNEY’e ve diğer tüm öğretim üyelerine şükranlarımı sunarım. Ayrıca tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen parazitoloji laboratuvarımızda görevli personelimiz Svl.Me.Vet.Hek. Zeynep GÜÇLÜ KILBAŞ’a, Svl.Me.Lab. Suzan ESİN’e ve Svl.Me.Lab. Fatma KARAKAYA’ya, bilgi ve tecrübesini benimle her daim paylaşan ve eğitimimde katkısı büyük olan Uzm.Tbp.Bnb. Kemal TEKİN, Uzm.Dz.Tbp.Yzb. Serhat DUYAN ile tez döneminde her türlü yardımı benden esirgemeyen Sağ.Yzb. Valbona MATAJ’a, J.Tbp.Ütğm. Eyüp DOĞAN’a, Svl.Me.Dr.Bio. Aylin ÜSKÜDAR GÜÇLÜ’ye ve Svl.Me.Bio. Sema ÖREN’e ve isimlerini sayamadığım tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelebilmemdeki en büyük destekçim canım anneme ve babama, sevgili kardeşime, dostlarım J.Tbp.Ütğm. Hüseyin ŞAN ve Hv.Tbp.Ütğm. Ahmet TAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tbp.Kd.Ütğm. Ali Korhan SIĞ
Haziran 2016
Ankara



ÖZET

MAGGOT (*Lucilia sericata* LARVASI) TÜM VÜCUT SIVISI METABOLİTLERİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Çalışmamızda, kronik yara bakımında rutin olarak kullanılan maggot (*Lucilia sericata* larvası) tüm vücut sıvısının metabolitlerini tespit etmeyi ve bunların potansiyel antibakteriyel etkilerini araştırmayı amaçladık.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı bünyesindeki iklim odasında çoğaltılan maggotların, tüm vücut sıvıları elde edilerek, öncelikle antibakteriyel etki potansiyeli açısından Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve akım sitometrisi yöntemi ile araştırıldı. Antibakteriyel potansiyelin araştırılması sonrasında iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2-D PAGE) ile protein analizi yapıldı.

Sonuç olarak, maggot (*Lucilia sericata* larvası) tüm vücut sıvısının, kronik yaralardan sıkça izole edilen *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Eenterococcus faecalis* bakterilerine karşı antibakteriyel etkisi net olarak gösterilmiştir. Protein analizinde, çok sayıda değişik molekül ağırlıklarında ve izoelektrik noktalarında protein saptanmıştır. Bu etkinin, vücut sıvılarının içeriğindeki bu proteinler aracılığı ile ilgili olabileceği, ancak kütle spektrometrisi ve protein veri tabanı ile karşılaştırma yapılması gerekliliği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler : *Lucilia sericata*, Maggot Debritman Tedavisi, Kronik Yara Bakımı, Larval Debritman, Biyocerrahi

Destekleyen Kurumlar : Çalışmayı destekleyen kuruluş yoktur.

Yazar Adı : Tbp.Kd.Ütğm. Ali Korhan SİĞ

Danışman : Prof.Tbp.Alb. Remzi Engin ARAZ

SUMMARY

DETECTION OF WHOLE BODY EXTRACT METABOLITES OF *Lucilia sericata* LARVAE AND EVALUATION OF THEIR POTENTIAL ANTIBACTERIAL EFFECTS

The aim of this study is to detect components and to investigate potential antibacterial effects of whole body extract metabolites of maggots (*Lucilia sericata* larvae) which are commonly used in chronic wound care.

Due to potential antibacterial effects, Kirby-Bauer disc diffusion and flow cytometry methods were used to do evaluation on whole body extracts of previously-cloned maggots in specialized climate room of Department of Medical Microbiology. After this antibacterial effect evaluation, two-dimensional polyacrilamid gel electrophoresis (2-D PAGE) analysis was done for protein investigation.

Consequently, antibacterial effects of maggot whole body extracts on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Eenterococcus faecalis* strains are obviously detected. In protein analysis, many protein spots with widely variable molecular mass and isoelectric points were observed. As a result, this antibacterial effects may be caused by these proteins, but it is necessary that these proteins must be further evaluated via mass spectrometry and protein databases.

Keywords : *Lucilia sericata*, Maggot Debridement Therapy, Chronic Wound Care, Larval Debridement, Biosurgery

Funding : None

Author : Ali Korhan SIĞ, MD

Consultant : Prof. Remzi Engin ARAZ, MD, PhD

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Tamamlayıcı Tıp Uygulamalarına Yaklaşım	2
1.2 Kronik Yara ve Maggot Debritman Tedavisine Bakış	4
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Maggot (<i>Lucilia sericata</i> Larvası) Genel Özellikleri	8
2.2. Maggot Debritman Tedavisi (MDT)	9
2.2.1 Yara İyileşmesi ve Kronik Yara	9
2.2.2 Yara Örtüleri	16
2.2.3 Maggot Debritman Tedavisine (MDT) Giriş	17
2.2.4 Maggot Debritman Tedavisi (MDT) Etki Mekanizması	23
2.2.5 Maggot Debritman Tedavisinin Endikasyon ve Kontrendikasyonları	27
2.3. Antimikrobiyal Etki Analizi	28
2.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi	28
2.3.2 Akım Sitometrisi	29
2.4. Protein Analizi	30
2.4.1 İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi (2-D PAGE)	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1 Gereçler	33
3.1.1 Besiyerleri	33
3.1.2 Cihaz ve Ekipmanlar	33
3.1.3 Sarf Malzemeleri	34

3.1.4 Kimyasallar ve Antibiyotikler	35
3.2 Yöntem	35
3.2.1 Çalışma Grubu	36
3.2.2 <i>Lucilia sericata</i> Çoğaltılması ve İklim Odası	36
3.2.3 Maggot Sıvısı Eldesi	37
3.2.4 Bakteri Suşlarının Canlandırılması ve Saflık Kontrolü	38
3.2.5 Antibakteriyel Etki Tespiti	38
3.2.5.1 Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi	38
3.2.5.2 Akım Sitometrisi	39
3.2.6 Protein Analizi	41
3.2.6.1 Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	41
3.2.6.2 Protein Analizi	43
3.2.7 Sonuçların Değerlendirilmesi	47
3.2.7.1 Antibakteriyel Etki Tespiti	47
3.2.7.2 Protein Analizi	47
3.2.8 Kalite-Kontrol	48
4. BULGULAR	49
4.1 Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi	49
4.2 Akım Sitometrisi	49
4.3 Protein Analizi (2-D PAGE)	54
5. TARTIŞMA	57
5.1 Antibakteriyel Analizler	57
5.2 Protein Analizi	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

2-D PAGE	: İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BLAST	: Temel Yerel Sıra Arama Motoru
CHAPS	: Dimetil[3 propil]. azaniyumyl}propan-1-sülfonat
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DTT	: Ditiyotreyitol
eDNA	: Hücre Dışı DNA
ES	: Ekskresyon/Sekresyon
Etest	: Epsilomer Test
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FSC	: İleri Saçılım
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
IEF	: İzoelektrik Fokuslama
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IPG	: Sabit pH Meyili
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
MAC	: Zar Saldırı Kompleksi
MALDI	: Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonlaşma
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MDT	: Maggot Debritman Tedavisi
MHA	: Mueller Hinton Agar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MS	: Kütle Spektrometrisi
NCCAM	: ABD Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi

NCCIH	: ABD Ulusal Tamamlayıcı ve Bütünleyici Tıp Merkezi
NIH	: ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü
PDGF	: Platelet Türetilmiş Büyüme Faktörü
pI	: İzoelektrik Nokta
PI	: Propidiyum İyodit
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su Çözeltisi
PMF	: Peptid Kütle-Parmakizi
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SSC	: Yan Saçılım
TAST	: Transpozon Aracılı Sinyal Bindirme
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TO	: Tiyazol Turuncusu
TOF	: Uçuş Süresi
TSB	: Triptik Soy Buyyon
TVS	: Tüm Vücut Sıvısı
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa
1. <i>Lucilia sericata</i> 'nın Yaşam Döngüsü	9
2. Doğru Yara Örtüsü Seçimi	17
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Akım Sitometrisi Sonuçları	49
4. <i>Enterococcus faecalis</i> 'in Akım Sitometrisi Sonuçları	50
5. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Akım Sitometrisi Sonuçları	51
6. <i>Escherichia coli</i> 'nin Akım Sitometrisi Sonuçları	52
7. Maggot TVS Proteinlerinin SDS-PAGE (1-D PAGE) ile Analizi	54
8. Maggot TVS Proteinlerinin 2-D PAGE ile Analizi	55
9. Proteomiks İşlem Sırası	62

TABLULAR DİZİNİ

Tablolar	Sayfa
1. Serbest ve Paketli Maggot Uygulamalarının Karşılaştırılması	21
2. Akım Sitometrisi ve Disk Difüzyon Testi Sonuçları	53
3. Dilüsyonlara Göre Akım Sitometrisi Sonuçlarının Toplu Değerlendirmesi	53
4. 1 ve 2-D PAGE ile Tespit Edilen Proteinlerin Özellikleri	56
5. Maggot Proteinlerine Yönelik Başlıca Çalışmaların Sonuçları	64

1. GİRİŞ

Tıp, insan sağlığının sürdürülmesi ya da bozulan sağlığın düzeltilmesi için uğraşan, hastalara tanı koymaya, hastaları sağaltmaya ve hastaları yaralanmalardan korumaya yönelik çalışmalarda bulunan, birçok alt bilimden oluşan bilimsel disiplinlerin şemsiye adıdır. Birçok kültürde tıbbın ilk hali, bitkilerin (herbalizm) ve hayvansal unsurların şifa amaçlı kullanılmasına dayanmıştır. Kültürlerde farklı uygulamaların ve bu farklılıkların dinler ile iç içe geçmiş olması, yöresel olarak “tıp” adı altında çok farklı uygulamaların doğmasına sebep olmuştur. Geçmiş dönemde yıllar boyunca genellikle çeşitli inanışların din adamları ya da büyücü, bitkici, yaşlı gibi kişilerin elinde kalan tıp, özellikle 18’inci yüzyılın sonlarında hem doğu hem batı kültürlerinde ard arda gelen keşiflerle büyük değişim göstermiş, 1900’lerin başında da Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD) gibi ülkelerde kliniksel tıp gelişmiştir (1).

20’nci yüzyılda “kanıta-dayalı” tıp olarak anılan akımla birlikte, bilimsel yöntemler ve küresel bilgi birikiminin kullanılmasıyla; meta-analizler ve rastgele kontrollü deneyler hız kazanmış; ancak etik sıkıntılar ve yapılan deneylerde insan ve hayvan hakları gibi kavramlarla yaşanan çelişkiler, büyük tartışmalara neden olmuştur. Genetik ve moleküler biyolojide yaşanan gelişmeler, tıpta yeni çığırar açarken, yeni tartışma başlıklarını da ortaya atmıştır (1,2).

Geçmişten günümüze din adamları, büyücüler ve daha birçok “özelleşmiş” kişiler tarafından uygulanan “tıbbi” prosedürler; kanıta dayalı tıbbın ortaya çıkmasıyla tartışılır hale gelmiş, hatta şarlatanlık (tıp hekimliği, diş hekimliği, veteriner hekimlik veya eczacılık üzerine herhangi bir eğitim ve lisansı olmadığı halde bu meslekleri icra eden sahtekarlar için kullanılan bir hukuk terimi) (3) olarak sınıflandırılmışlardır. Modern tıbbın getirdiği ve kanıta dayalı olarak sunulan tanı ve tedavi yöntemlerinin %100 sonuç vermemesi (ki bilimsel olarak da mümkün değildir) ve her tedavinin her hastada aynı etkiyi göstermemesi, insanları kimi zaman bu tür eylemleri tercih etmeye itmektedir. Bu yöntemlerin yıllardan beri denenmiş olması ve etkinliklerinin “öznel” olarak da olsa

gözlemlenmiş olması, ayrı bir avantaj şeklinde önümüze serilmektedir. Ancak bu yöntemlerin suiistimale açıklığı da ortadadır. Halk arasında “merdiven altı” olarak tabir edilen bu uygulamaların yapılmalı mı tartışmasını bir kenara bırakırsak; profesyonel olmayan eller tarafından uygulanmasının da ayrıca sorun teşkil edebileceği ve tıbbın ilk kuralı olan “asla zarar verme”nin ayaklar altına alınabileceği açıktır.

1.1. Tamamlayıcı Tıp Uygulamalarına Yaklaşım

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre; Avrupa, Kuzey Amerika ve diğer sanayileşmiş toplumlarda nüfusun %50’si en az bir defa tamamlayıcı veya alternatif tedavileri denemiştir. Bu rakam, Kanada’da %70’lere, Almanya’da %90’lara ulaşmaktadır (4). Tüm bunların yanında bu uygulamaların, çok ciddi bir ekonomik sektör olduğu da unutulmamalıdır. Sadece ABD’de “doğal ürünlere” insanların harcadığı tahmini rakam, 2008 yılında 14,8 milyar doları bulmaktadır (5). ABD’deki Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi (NCCAM) verilerine göre her on kişiden dördü bir tamamlayıcı tıp uygulamasını yapmış veya yapmaktadır. Bazı uygulamaların kullanımında (nefes egzersizleri, masaj terapisi, meditasyon, yoga, naturapati), 2002 ile 2007 yılları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (6). Ayrıca, DSÖ’nün 2012 yılındaki verilerine göre, bu tür tedavileri tercih eden insanların %30’unun üniversite eğitimi olan insanlar olduğunu ortaya konulmuştur. Kültürel farklılıklar da bu tür eğilimleri doğrudan etkilemektedir. Örneğin Güney Kore ve Singapur gibi bölgelerde nüfusun %76 – 86’sı aktif olarak geleneksel tedavi yöntemlerini tercih etmektedir. Düzgün bir tıbbi bakıma ulaşımın olmayışı da (Afrika gibi), geleneksel tedavilere yönelimin bir diğer sebebidir (5). Ceylan ve arkadaşlarının ülkemizde diyabet hastaları üzerine yaptıkları çalışmada (7), hastaların yüzde 40’ının en az bir defa tamamlayıcı tıp uygulaması denediği ve şehirde doğup büyüyen, göreceli olarak daha eğitilmiş ve daha genç hastaların tamamlayıcı tıp uygulamasına daha eğilimli olduklarını ortaya koymuşlardır. Horneber ve arkadaşlarının kanser hastalarında, 18 ülkeden bildirilen tamamlayıcı tıp uygulamaları ile ilgili yayınları inceledikleri derlemelerinde (8); 1970’lerden itibaren tamamlayıcı tıp uygulamalarının tercih

edilmesinde ciddi bir artış olduğu (1970’lerde %25 iken 2000’lerde %49), özellikle ABD’de en yüksek oranlara ulaşıldığı, ancak tamamlayıcı tıp uygulamalarında ciddi bir heterojenite olduğu, standardizasyonun olmadığı bildirilmiştir.

Öte yandan, bu uygulamaların halklar nezdinde – gerçekten veya tesadüfen – etkili olduğu gözlerden kaçmadığından, modern tıp, “bunlar bir tedavi yöntemi olabilir mi?” sorusunu sürekli olarak kendine sormaktan kendini alamamıştır. Bitkiler, böcekler, özler, zehirler, hayvanlar, hipnoz, ses ve müzik gibi ve daha birçok yöntem, bilim dünyasınca da araştırma konusu olmuş ve **bilimsel araştırmalar sonucunda etkileri ve yan etkileri ispatlananlar**, gerek batı gerekse de doğuda modern tıbbın içerisine girmiştir. Aslında son derece eski olan bu uygulamaları uzun zaman reddeden modern tıp, bunların bir kısmının, rastgele kontrollü çalışmalarla etkinliklerini ortaya koymuştur; maggot debritleme tedavisi, apiterapi, hirudoterapi bunlardan bazılarıdır. Bu sonuçlardan sonra bazı kavramları ayırmak zorunluluğu doğmuştur (9-11);

Alternatif tıp; Tedavi yaptığı ileri sürülen; ancak bu etkileri, bilimsel yöntemlerle kanıtlanamayan geleneksel veya güncel tıbbi uygulamalara verilen isimdir. Ancak buradan “tıbbın alternatifi” gibi bir anlam çıkmakta o nedenle modern tıbbi uygulamalar yanında yapılan destekleyici tedavilere tamamlayıcı tıp denmektedir. Öyle ki; ABD’de Sağlık Bakanlığı (U.S. Department of Health and Human Services) bünyesindeki Ulusal Sağlık Enstitüsü’ne (NIH: National Institutes of Health) bağlı NCCAM; Aralık 2014’te ismini Ulusal Tamamlayıcı ve Bütünleyici Tıp Merkezi (NCCIH: National Center for Complementary and Integrative Health) olarak değiştirmiştir. Aslen, alternatif tıp ile tamamlayıcı tıbbi birbirinden keskin sınırlar ile ayırmak kimi zaman mümkün değildir. Örneğin masaj, ağrı yönetiminde tamamlayıcı olarak kullanılmakta, ancak kimi otoriteler tarafından ise alternatif tedavi olarak da kabul edilmektedir.

Tamamlayıcı tıp; Kanıta dayalı tıp biliminin hastalık sebeplerini önlemede somut verileri olmadığı veya kanıtlanmış bir tedavi yöntemi olmadığı halde hasta isteğiyle çağdaş tıp tedavilerinin yanında onlara destekleyici olarak hastanın rahatlaması, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, psikolojisinin düzelmesi gibi

amaçlarla uygulanabilen yöntemlerdir. Aslında bu tanım tam olarak doğru değildir. Burada yabancı kaynaklarda iki türlü tanımdan bahsedilmektedir: “Complementary” ve “Integrative”. Gerçekte anlaşılan “Complementary Medicine” (Tamamlayıcı Tıp) bilimsel olarak faydalı olduğuna dair kanıtları ortaya konamamış, ancak hastaları rahatlattığına inanılan ya da gözlemlenen yöntemlerdir. “Integrative Medicine” (Bütünleyici Tıp) ise özellikle modern tıp tarafından daha kabul edilen, bilimsel olarak faydası olduğuna dair kanıta dayalı verileri olan, ancak tek başlarına tedavi yöntemleri olmayan ve modern tıbbi tedaviyi destekleyici niteliği olan yöntemlerdir (Örneğin, maggot debridman tedavisi - MDT). Maalesef, tüm bu tanımlar konusunda bir birliktelik yoktur ve bu konular halen tartışma konusudur.

Geleneksel tıp; Eski hekimlerin kendi zamanlarındaki tıp anlayışı ve birikimleri ile işe yarayabileceğini umduğu veya öğrendiği bitkiler, macunlar, sular, sargı, yakma ve diğer yöntemlerle hastasını tedavi etme uygulamalarına verilen isimdir.

Modern tıp; Kanıta dayalı, karşılaştırmalı ve modern bilimsel yöntemlerle hastalar için faydalı olduğu görülen ve bu yararı ölçümlenebilen tıp yöntemlerini kapsar. İnsanlığın bilgisi arttıkça ve yeni tanı araçları (mikroskop, radyografi, manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi, elektron mikroskopisi, biyopsi, kan/dışkı/idrar tahlilleri vb) bulundukça hastalıklar ve bu hastalıkların tedavisinde kullanılan yöntemler daha kapsamlı olarak geliştirilmiştir.

1.2. Kronik Yara ve Maggot Debridman Tedavisine Bakış

Kronik, iyileşmeyen yaralar; pratikte üç ay içerisinde iyileşme olmayan yaralar olarak tanımlanmaktadır. Bütün kronik yaralar, altta yatan etiyolojik bir nedene dayanmaktadır. Buna göre kronik yaralar, genel olarak, venöz bacak ülserleri, iskemik yaralar, diyabetik ayak yaraları ve bası yaraları olarak sınıflandırılmaktadırlar (12).

Sosyoekonomik olarak bakacak olursak; batı toplumunun neredeyse %1'i bir kronik yara taşımaktadır. Kronik yara bakımı, batı ülkelerinin sağlık

harcamalarının %2-4'ünü oluşturmaktadır (12). Sadece ABD'de yılda 1,25 milyon yanık ve 6,5 milyon venöz staza, diyabete veya basıya bağlı kronik cilt ülseri gelişmektedir. Yine ABD'de kronik yaralar nedeniyle yıllık 6-15 milyon Amerikan Doları harcanmaktadır (13). Sadece Birleşik Krallık'ta 2005-2006 yıllarında toplam sağlık bütçesinin %2-3'ü kronik yara bakımına harcanmıştır (14). Hastaların son derece heterojen olması ve bakımlarının farklı sağlık teşekküllerince yapılıyor olması nedeniyle asıl maliyeti tespit etmek ise mümkün değildir. Ek olarak, bir yıldan uzun süre boyunca tedavi edilemeyen/edilmeyen kronik yaraların %50'si ciddi mortalite ve morbidite ile sonuçlanmaktadır (15).

Bacak ülserlerinin yetişkin erkek toplumundaki insidansı %0,3'dür ve gittikçe artmaktadır. Bunların %70'den fazlasının etiyolojisinde venöz bir patoloji yatmaktadır. Bacak ülserleri, her ne kadar ciddi bir tedavi başarıları oranı olsa da, tekrarlama olasılığı son derece yüksek yaralardır. Diyabetik ayak ülseri; günümüzde gittikçe artan oranda ciddi bir sorun olan diabetes mellitus hastalığının komplikasyonu olarak gelişmektedir. Diyabet hastalarının %15'i, diyabetik ayak ülserini yaşamakta ve bunların da %70'inde ülser, tekrarlayıcı olmaktadır. Burada belirtmek gerekir ki diyabete bağlı amputasyonların nedenleri arasında %85'inin başlangıcında ülser oluşumu vardır. Bu hastaların bağışıklık sistemi ile ilgili sorunları ve diyabetik ayak ülseri enfeksiyonları, durumu daha da ciddileştirmektedir. Uzun süreli yatan hastalarda görülen bası yaraları da diğer bir kronik yara formudur. Sadece Birleşik Krallık'ta sağlık harcamalarının %4'ü bası yaralarının tedavisine harcanmıştır (14). Bası yarasına maruz kalan hastaların yoğun bakım üniteleri, bakım evleri gibi uzun süreli bakım gerektirebilecek, dirençli mikroorganizmalarca oluşturulabilecek enfeksiyonlara açık bölgelerde yatmaları ve bu hastaların diğer etiyolojik sebepler nedeniyle muhtemel bağışıklık sistemi sorunları taşımaları nedeniyle bası yaralarının uygun yöntemlerle tedavisi çok önem kazanmaktadır. Tüm bunların dışında, ateşli silah yaralanmaları, diğer sistemik hastalıklara ikincil olarak gelişen yaralar ve travmalar gibi kronik yara oluşturabilecek birçok sebep bulunmaktadır.

Kronik yaralar, enfeksiyon yapabilecek patojenlere açıktır. Burada, kolonizasyon (kontaminasyon) ve enfeksiyon kavramlarını birbirinden ayırt etmek gerekir. Enfeksiyon kavramı için yara yüzeyinin cm^2 'si başına düşen patojeni tespit etmek hususu, mikrobiyolojik olarak örnek alma tekniğine göre değişebilmektedir. Şu ana kadarki yapılan çalışmalarda kronik yaralarda en çok görülen patojenler; *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *Enterococcus faecalis*, *Proteus* türleri, anaerobik bakteriler ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır (12). Ancak patojen mikroorganizma; hastanın durumu, etiyolojik neden gibi sebeplere dayanarak değişkenlik göstermektedir (14). Yara üzerindeki enfeksiyon etkeni patojen, zaman içerisinde de değişebilmektedir (16). Kronik yaralarda mikroorganizmaların oluşturduğu tek sorun enfeksiyon değil, ayrıca biyofilm oluşumudur. Biyofilm oluşumu ile birlikte bakterilerin antimikrobiyal direnci artmakta, kronik inflamasyon daha da alevlendirilmekte ve enfeksiyonu çözmek daha zor ve uzun süreli bir uğraş gerektiren bir hal almaktadır (12).

Maggot debritleme tedavisi, diğer adlarıyla biyocerrahi, larval debritleme veya larval terapi; aslında geçmişte sıklıkla denenmiş ve tıp tarihinde ciddi bir tecrübe birikimi olan bir tekniktir. MDT'nin uygulanması için çoğunlukla *Lucilia sericata* larvaları kullanılmaktadır ve etki mekanizması konusunda birçok çalışma yapılmış olsa da halen de tam anlamıyla tüm etki mekanizması çözülememiştir. Önceden sterilize edilmiş maggotlar, yara üzerine "serbest (free-range; confinement dressing; cage dressing)" veya "paketli (containment dressing; biobag)" şekilde uygulanır ve gerek mekanik olarak "yiyerek" gerekse de ekskresyon/sekresyon (ES) metabolitleri aracılığı ile nekrotik dokuyu yok etmekte, enfeksiyon etkeni mikroorganizmaları öldürmekte, biyofilm oluşumunu engellemekte, var olan biyofilmi yıkmakta ve doku tamirini hızlandırıcı etki göstermektedirler. Hem doğrudan hem de dolaylı olarak gerçekleştirilen bu etkilerin, tek başlarına birbirinden ayrı olarak incelenmesi mümkün değildir. MDT; bası yaraları, venöz staz ülserleri, nöropatik ayak ülserleri (diyabetik ayak gibi), iyileşmeyen travmatik veya cerrahi sonrası yaralar, yanıklar, arteriyel ülserler, Burger hastalığı, sellülit, lenfostaz, osteomyelit, mastoidit ve nekrotik tümörlerde denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (17). Öte yandan, kronik yara

tedavisinde göreceli olarak düşük maliyetli bir teknik olması da özellikle ciddi bir üstünlüktür. Maliyet hesabında, maggot uygulaması ile uygun tedavi edilen yarada komplikasyonların engellenmesi ve bunun getireceği ek maliyet kazancı da dikkate alınmalıdır. Ayrıca MDT'nin hastane yatışını gerektirmemesi ve MDT ile zaten muhtemel sistemik sorunları olan (diyabet gibi) hastalara oral veya parenteral olarak bir tedavi gerektirmeden (antibiyotik tedavileri gibi) kronik yaranın tedavi edilebilir ve enfeksiyondan temizlenebilir olması da hem hasta hem de klinisyen açısından ciddi avantajlar sağlamaktadır (18).

Maggot debridman tedavisi, ülkemizde 27 Ekim 2014 tarihli 29158 sayılı Resmi Gazete'de T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan "Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği" ile resmi uygulamaya sokulmuş; diyabetik ayak ülserleri, venöz staz ülserleri, bası yaraları, osteomyelit, nekrotizan fasiit, postoperatif yaralar, nöropatik ayak ülserleri, travmatik iyileşmeyen yaralar ve arteriyel/iskemik ülserler, MDT'nin uygulama endikasyonları içinde yer almıştır. Uygulamaya yetkili personel olarak, sertifikalı bir tabip kılınmış ve kontrendikasyonlar da yönetmelikte ayrıntılı olarak belirtilmiştir (19).

2. GENEL BİLGİLER

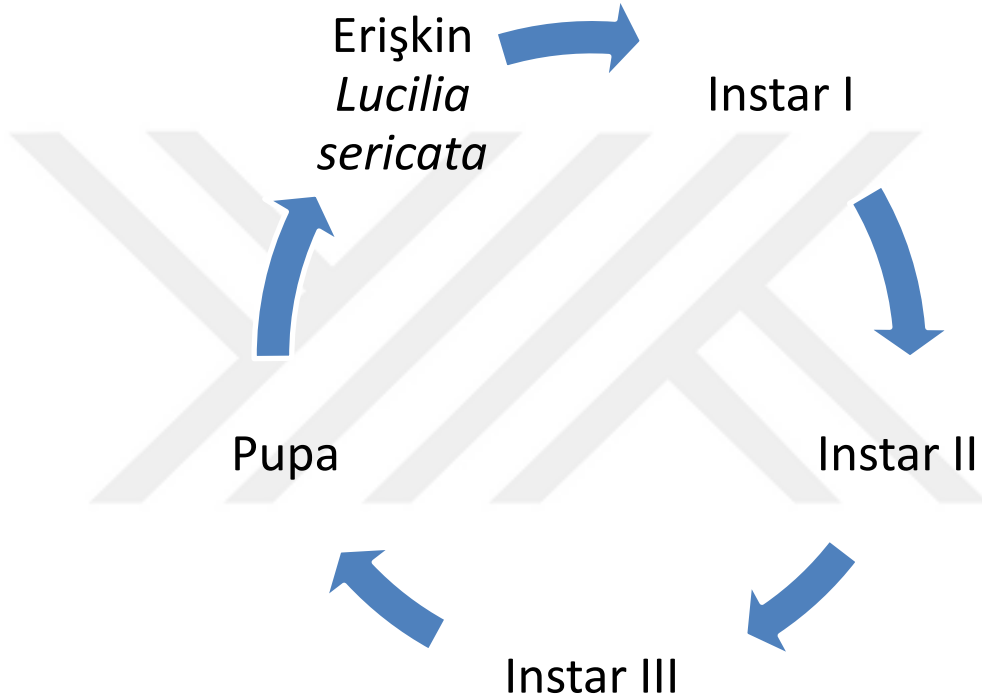
2.1. Maggot (*Lucilia sericata* Larvası) Genel Özellikleri

Maggot debritleman tedavisi için seçilen maggotlar, özellikle canlı dokuya zarar vermeden ölü dokuyu yok etmeleri özelliklerine göre seçilmektedir. MDT'nin uygulaması için çoğunlukla *Lucilia sericata* (green bottle fly; yeşil şişe sineği) larvaları kullanılmaktadır. *L.sericata* larvalarının daha çok tercih edilmesinin sebebi, bu türün MDT'ye yönelik birçok çalışmaya konu olması ve klinik tecrübesinin diğer türlere göre göreceli olarak daha çok olmasıdır. Birçok başka larva türü daha önce MDT için denenmiş, ancak en yüksek başarı, bu tür ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir (17,18).

Lucilia sericata, Diptera (Çiftkanatlılar) takımından, Calliphoridae (Blow fly; Göksinekler) ailesinden *Lucilia* cinsine ait bir türdür. *Lucilia* cinsine ait şu ana kadar 160'dan fazla tür belirlenmiştir (20) ve bu cinse bağlı türlerin özellikle adli entomoloji içerisinde önemli bir konumu vardır (21).

Lucilia sericata, tüm dünyada yaygındır, ancak tropikal iklimi tercih etmektedir. Solunum yapırlar ve leşlerin kokusunu çok uzak mesafelerden alabilen bu türün dişisi, hayvan dışkıları ve cesetleri üzerine hayatı boyunca yaklaşık 200 yumurta bırakır. Yumurtalardan 8-24 saat içerisinde larvalar çıkar ve üç aşamalı instar evrelerinden sonra pupa fazına geçerek metamorfoz ile erişkin yeşil şişe sineğine dönüşür (1-3 hafta). Maggotların 12 segmenti vardır ve sefalofaringeal iskeleti son derece karmaşıktır. Maggotlar solunum yapmaktadır. Maggotların sadece karanlık ve aydınlığa hassas olan primitif almaçları bulunmaktadır ve maggotlar erişkinlerinin aksine ışıktan rahatsız olurlar (negatif fototaksi). Proteolitik enzimlerini iki labial bez tarafından üretir ve salgılarlar. Güçlü farengeal pompaları sayesinde çürümüş gıdayı ve bakterileri içlerine çekerler ve beş kez konsantre eden bir filtreden geçirirler. Sadece beş dakika içerisinde vücut ağırlığının yarısına yakın ölçüde gıdayı sindirebilirler ve pupal

safhada kullanmak üzere depolayabilirler. Bu şekilde, bir maggot, birkaç gün içerisinde vücut büyüklüğünü 100 kata kadar arttırabilir. İlginç olarak, metamorfoz aşamasında pupanın enfekte olup ölmemesi için, maggotların, “otodezenfeksiyon” kabiliyeti bulunmaktadır (Şekil 1) (17,18).



Şekil 1: *Lucilia sericata*'nın Yaşam Döngüsü (17, 18 numaralı kaynaklara göre düzenlenmiştir)

2.2. Maggot Debritman Tedavisi

2.2.1. Yara İyileşmesi ve Kronik Yara

Yara iyileşmesi, çok sayıda immünolojik ve fizyolojik mekanizmanın dahil olduğu çok karmaşık bir süreçtir. İnsan vücudunda oluşan yaralar, çoğunlukla kendiliğinden iyileşmekte ve kapanmaktadır. Ancak bazı durumlarda iyileşme süreci sekteye uğrar ve skar dokusu oluşumu gecikir ya da engellenir. Yara

iyileşmesinin temel olarak 3 basamağı bulunmaktadır; 1. İnflamasyon, 2. Proliferasyon ve 3. Yeniden şekillenme (remodeling).

İnflamasyon, vaskülarize dokuların enfeksiyonlara ve hasara karşı oluşturduğu bir savunma mekanizmasıdır. İnflamasyon, akut ve kronik olmak üzere iki gruba ayrılır (22-24);

Akut İnflamasyon: Enfeksiyonlara ya da doku hasarına karşı ilk verilen yanıt akut inflamasyondur. Tipik olarak dakikalar-saatler içinde gelişir ve göreceli olarak kısa sürelidir (birkaç saat-birkaç gün). Temel prensibi, olay bölgesinde vazodilatasyon ve ödem, lökositlerin migrasyonu (baskın olarak nötrofiller) ve şiddetli proinflamatuvar sitokin [Tümör nekrozis faktörü-alfa (TNF α), interlekin (IL)-1, IL-6, IL-17, kemokinler] salınımı ile birçok biyokimyasal yolağın aktive olmasıdır (histamin, serotonin, araşidonik asit ürünleri – prostaglandinler ve lökotrienler, proinflamatuvar sitokinler, kompleman aktivasyonu, kinin-kallikrein sisteminin aktivasyonu ve trombüs oluşumu ile koagülasyon kaskadı aktivasyonu, vb.). Akut inflamasyon sonunda üç durumdan biri gerçekleşir; inflamasyonun tamamen çözülmesi, skar-fibrosis oluşumu, kronik inflamasyon.

Kronik İnflamasyon: Doku hasarı ortadan kaldırıldığında veya enfeksiyöz ajanlar bölgeden temizlendiğinde akut inflamasyon durulmakta ve yara iyileşmesi süreci başlamaktadır. Ancak bazı durumlarda inflamatuvar süreç devamlılık kazanmakta (haftalar, aylar) ve doku hasarı ile sonuçlanan, akut inflamasyonun aksine daha çok lenfosit ve makrofajların baskın olduğu ve interferon-gama (IFN γ), IL-12 gibi farklı proinflamatuvar olmayan sitokinlerin salındığı kronik inflamasyon gelişmektedir. Kronik inflamasyona neden olan mekanizmalar, halen tam olarak çözülememiş olsa da, persistan enfeksiyonlar, aşırı duyarlılık reaksiyonları, toksik veya yabancı cisimlere uzun süreli maruziyet ve otoimmunitenin kronik inflamasyona neden oldukları düşünülmektedir. Kronik inflamasyon sırasında, mononükleer hücre infiltrasyonu, doku yıkımı ve aynı anda tamiri gerçekleşmektedir. Kronik inflamasyonda, normal savunma

sistemimizin çok önemli bir üyesi olan makrofajların, nedeni tespit edilemeyen bir şekilde “düzgün olmayan” aktivasyonuna, buna T ve B lenfositlerin, birbirlerini, kısır döngü içerisinde çift yönlü olarak sitokin aracılı uyarmalarının eşlik etmesi söz konusudur.

Yara iyileşmesi, insan vücudundaki en karmaşık biyolojik mekanizmalardan biridir. Bir doku hasarı sonrasında, çok sayıda biyolojik yolak (bağışıklık sistemi, koagülasyon kaskadı ve inflamatuvar yolaklar) aynı anda işlemeye başlar. Bu yolaklarda çok sayıda ve değişik tiplerde hücreler görev almaktadır (25).

Bir dokuda hasar geliştiğinde koagülasyon kaskadı hızlı bir şekilde aktive olur ve pıhtı oluşturarak tıkaç görevi görür. Koagülasyon kaskadının tek görevi, pıhtı oluşturmak değildir; aynı zamanda sıkı sıkıya ilişkili olduğu inflamatuvar süreçlerin de başlatılmasında görev görür. Şiddetli sitokin salınımı, inflamatuvar mediyatörlerin salınımı ve inflamatuvar hücre (nötrofil) göçü ile akut inflamasyon süreci başlar. Kompleman sistemi aktive olur ve plateletlerden degranülasyon gerçekleşir. İlk 24 saat içinde bölgeye yoğun bir nötrofil göçü gerçekleşir ve 24-48 saat içinde yıkılmış epitelyal dokunun tamamlanması için kök hücrelerde mitotik aktivite başlar. Üçüncü günün sonunda nötrofiller yerini makrofajlara bırakır ve beşinci günde granülasyon dokusu ve neovaskülarizasyon [en önemli tetikleyicileri; vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)-A ve fibroblast büyüme faktörü (FGF)-2] mekanizmaları en üst seviyededir. Burada eklemek gerekir ki fibroblast migrasyonu; çok sayıda kemokin, TNF, platelet türetilmiş büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β ve FGF tarafından yönlendirilir. Makrofajlar, bu sitokin ve kemokinlerin asıl kaynağıdır; ancak diğer inflamatuvar hücreler ve plateletler de bu sürece katkıda bulunmaktadır. Fibroblastlar, miyofibroblastlara dönüşerek yara kontraksiyonu ve doku geriliminde rol alırlar.

Hasarlı dokunun tamiri temelde iki reaksiyonu içermektedir; hasarlanmamış hücrelerin rejenerasyon ve proliferasyonu ile doku kök hücrelerinin matürasyonu,

skar oluşturmak üzere konnektif doku depozisyonu (22). İnsan dokularında rejenarasyon sınırlıdır ve hasarlı doku tipine göre rejenerasyon yeteneği değişkendir. Burada kritik nokta, rejenere edilecek dokunun hasarlanmamış rezidüel kısmının olup olmadığıdır. Eğer tüm doku tabakaları hasarlanmış ise rejenerasyon tam anlamıyla başarılamayacak ve skarlaşma gerçekleşecektir. Skar oluşumunun temelinde anjiogenez, granüstasyon dokusunun oluşumu ve konnektif dokunun “yeniden şekillenme” aşamaları bulunmaktadır. Büyük doku hasarları, apseler, ülserasyonlar, iskemik nekrozlar skarlaşırlar (22,25). Yeniden şekillenme aşamasını müteakiben, bölgedeki tamirde görev alan hücreler apoptoza uğrarlar ve bölgede ciddi bir “protein öplüğü” oluşur. Bu öplüğün temizlenmesinde, fibroblastlar ve makrofajlarca salınan matriks metalloproteinaz enzimlerinin ciddi bir etkinliği vardır (25).

Yapılan alışmalar, gerek rejenerasyon aşamasında gerekse de skar oluşumunda makrofajların kritik rolü olduğunu ortaya koymuştur. Ölü dokunun uzaklaştırılması, büyüme faktörlerinin salgılanması, sitokin salınımı, fibroblast proliferasyonu ve konnektif doku depozisyonunun her aşamasında makrofajlar etkin rol alırlar (22).

Hasarlı dokunun iyileşmesi, birçok olaydan etkilenebilmektedir. Enfeksiyonlar, sistemik hastalıklar (diyabet vb), hastanın beslenme durumu, ilaç kullanımı (glikokortikoidler vb), mekanik faktörler (yaraya yapılan lokal basınç gibi), perfüzyon durumu, yabancı cisimler ve hasarın vücuttaki yerleşim yeri bu faktörler arasında yer almaktadır (22).

Fizyolojik inflamasyonun kronik inflamasyona dönüşmesi, yetersiz yara iyileşmesi ile sonuçlanır. Sitokinler, büyüme faktörleri, kemokinler ve çözünebilir proteinler, inflamasyon bölgesindeki hücreleri yönlendiren temel faktörlerdir. Hücrelerin aktivitesi, çok iyi kontrol edilen bir orkestra şeklinindedir. Neyse ki, bu maddelerin yara yerindeki yarı ömürleri kısadır. Bu kontrol mekanizması, kronik inflamasyona geçişi engellemektedir (26). Ancak, bu maddelerin anormal varlığı

ya da yokluğu, inflamasyonun devamlılığı ile sonuçlanabilir. Düzgün iyileşme sağlanan bir yarada, inflamatuvar döneme göre göreceli olarak düşük sayıda nötrofil ve makrofaj ile artmış fibroblast sayısı/aktivitesi ve matriks metalloproteinaz (MMP) aracılı kollajen yıkımı ile kollajen yapımı arasında denge söz konusudur (26). Proteazlar ve antiproteazlar arasındaki denge, inflamasyonun geleceği konusunda kritik role sahiptir (23). MMP aktivitesini düzenleyen proinflamatuvar sitokinlerin kaynağı, makrofaj ve nötrofillerdir. MMP aktivitesi, kronik yaralarda ciddi artış gösterir (22,26). Kronik yaralarda, normalde yara iyileşmesinin “yeniden şekillenme” safhasında rol alan MMP’ler, çok yoğun üretilir ve fibronektin ile kollajen yıkımına neden olarak ters bir etki yaratır. Kronik yaralarda görülen yoğun eksüda ile mücadelenin, yara üzerindeki MMP aktivitesini kontrol altına aldığı gösterilmiştir (13).

Yapılan çalışmalarda; TGF- β , granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), VEGF ve PDGF mediyatörlerinin hem fizyolojik hem de patolojik yara iyileşmesinde rolü olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar bu mediyatörler yara iyileşmesi için gerekli olsa da, TGF- β hariç hiçbirinin doğrudan etkileri henüz net olarak gösterilememiştir (26). TGF- β üretimi yara yerindeki proteolitik aktiviteler ile doğrudan ilişkilidir ve TGF- β inflamasyonu fibrosise doğru yönlendirir (23).

Kompleman sistemi de gerek akut inflamasyonda gerekse kronik yara oluşumunda ayrı görevler almaktadır. Akut inflamasyon sırasında yara iyileşmesi için gerekli bir mekanizma olsa da, persistan kompleman aktivasyonu, kronik yara oluşumuyla doğrudan ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda, C1 ve C3 uygulanan akut yaralarda yara iyileşmesini hızlandırdıkları, ancak zar saldırı kompleksi [membran attack complex (MAC)] varlığının ülser ve kronik yaralarda ciddi bir sorun olduğu ortaya konmuştur (15).

Sonuç olarak, kronik yaralarda; zayıf vaskülarizasyon, yoğun inflamatuvar infiltrasyon (özellikle nötrofiller), persistan inflamasyon, epidermal

hiperproliferasyon, azalmış fibroblast migrasyonu, fibroblastlarda nedeni bilinmeyen bir mekanizmayla TGF- β 'ya karşı azalmış duyarlılık, yükselmiş MMP aktivitesi ve yıkılamayan yoğun fibrin kılıf (oksijenizasyona engel) görülmektedir. Öte yandan, inflamatuvar infiltrasyonla bölgeye gelen bağışıklık hücrelerinin antimikrobiyal (bakterisidal ve fagositik) etkilerinin akut inflamasyona göre göreceli olarak düşük olduğu gözlenmiştir. Kronik yaralarda görülen yoğun nekrotik doku oluşumunun fagositik aktivitenin düşmesi ile temizlenemediği düşünülmektedir. Tüm bunların yanında, bağışıklık savunma mekanizması zayıflamış yara bölgesinin enfeksiyonu kaçınılmaz hale gelmekte, açık yara yeri, gerek cilt florası gerekse de ekzojen patojenler açısından neredeyse bir "besiyeri" hali almaktadır (14,27). Bütün kronik yaralar, bakteri bulundurur; hatta bazı çalışmalar, yarada düşük düzeylerde bakteri bulunmasının, bakterilerin proteolitik aktivitesi sayesinde debritlemeye yardımcı bir durum olduğunu ve nötrofillerden proteaz salınımını da tetiklediğini belirtmektedirler. Yaradaki mikroorganizma yükü (bioburden) ve mikroorganizmalara karşı gelişen immünolojik yanıtın durumu, enfeksiyon varlığı için ana belirleyicidirler. Kontamine yaralar çok düşük düzey mikroorganizma taşırlarken, kolonize yaralar çoğalan kümeleşmiş mikroorganizmalar taşır ancak bunlara karşı immünolojik yanıt yoktur. Mikroorganizma yükü daha çok arttığında inflamasyon bulguları da başlar. Son aşama enfeksiyondur ki; şiddetli inflamatuvar yanıt görülür ve bu evrede yaranın mm³ alanı başına 100.000 cfu/ml mikroorganizma yükü vardır (13). Yara yeri enfeksiyonuna neden olan etkenler, etiyolojiye göre ve yara yerinin yerleşimine göre değişmektedir. Diyabetik ve venöz bacak ülserlerinde enfeksiyona neden olan ajanlar benzer olsa da bası yaralarında değişkenlik göstermektedir (14,27).

Uzamış inflamasyon durumunda biyofilm oluşumu muhtemeldir; ancak biyofilm oluşumu da uzamış inflamasyona neden olabilir. İnsan bakteriyel enfeksiyonlarının %80'e yakınının biyofilm ilişkili olduğu ve bu enfeksiyonların sıklıkla *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerince gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Biyofilm enfeksiyonlarının tanısı zordur ve geleneksel kültür

yöntemleri ile etken patojenin izolasyonu da sorunludur (28). Biyofilm oluşumu, sitokin yukarı-regülasyonuna ve azalmış büyüme faktörü salınımına sebep olur. Biyofilm oluşumu sırasında bakterilerde, çok sayıda fizyolojik ve genetik değişim (mutasyon) gerçekleşmektedir. Çalışmalar bu sürecin dinamik olduğunu ve bakterilerin biyofilm oluştururken diğer taraftan aynı anda biyofilmden bireysel forma (planktonik faz) geçiş yaptıklarını göstermiştir. Biyofilm oluşumu sonucunda; bakteriler, antibakteriyel ajanlara, bağışıklık sistemine ve diğer antimikrobiyal maddelere (gümüş gibi) ciddi direnç gösterebilmektedirler. Biyofilmin, planktonik formdaki bir bakteriye göre 1000 kat daha fazla antibiyotik konsantrasyonuna direnç gösterdiği bildirilmiştir. Üstelik, enfeksiyon bölgesindeki biyofilmler, kimi zaman tek bir bakteriyel patojene dayanmamakta, polimikrobiyal olabilmekte ve bu durum antibiyotik direncini arttırabilmektedir. Sonuç olarak, yara alanından bakteri eradikasyonunu ciddi anlamda zorlaştırmaktadır. Kronik yaralarda özellikle *S.aureus* ve *P.aeruginosa* kaynaklı biyofilm oluşumu izlenmektedir. Biyofilm formasyonu içerisindeki bakterilerin, planktonik fazdaki bakterilere göre mutasyona daha eğilimli oldukları gösterilmiştir. Biyofilm formasyonu, bakteriler, hücre dışı matriks, polisakkridler ve hücre dışı DNA'dan [extracellular DNA (eDNA)] oluşmaktadır. Biyofilm formasyonundaki matriks, bakterilerin yavaş üremesi ve eDNA'nın (mutasyonlar ile) antimikrobiyal ve dezenfektan direncinde ve bağışıklık sistemine karşı direnmede etkili olan asıl mekanizmalar olduğu düşünülmektedir (12,27,28).

Kronik yarası olan hastalarda, hastaların kronik yaralarının vaskülarizasyonunun bozuk olması (antibiyotiğin yaraya penetrasyonunun bozuk olması), hastaların ikincil sistemik hastalıklarının bulunması (diyabet gibi) ve biyofilm bariyeri de antibiyotik kullanımı konusunda sıkıntı yaratacak hususlardır (12,14). Genel olarak bakacak olursak, bir kronik yarada; süregelen bir inflamasyon, zayıf neoanjiogenez, normal yara granülasyonu oluşturulamaması, yoğun ödem ve eksuda oluşumu (hücre migrasyonuna ve inflamatuvar hücrelerin bakterisidal etkisine engel olmaktadır), enfeksiyon ve biyofilm oluşumu temel sorunlardır (13,14). Kronik yara tedavisindeki temel amaçlar; bu belirttiğimiz

sorunları ortadan kaldırmak, inflamatuvar ve immünolojik süreci enfeksiyonun temizlenmesine ve yaranın normal iyileşmesine yönlendirmek olmalıdır.

2.2.2. Yara  rt leri

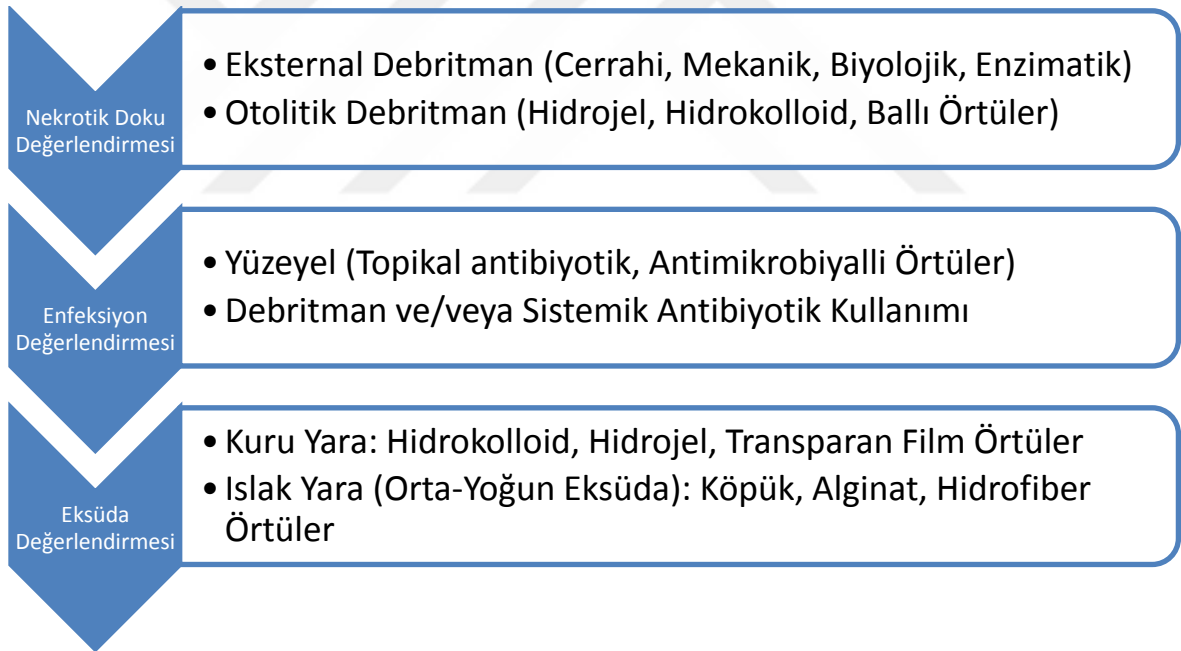
Kronik yaraların tedavisindeki amaçlardan daha önce bahsedilmiştir. Yara  rt leri kronik yaraların bakımında sıklıkla kullanılan tekniklerdir. Yara örtülerinin, farklı yönlerden etkinlikleri birbirlerine göre daha üstün olan, film, hidrojel, köpükler, hidrokolloidler, alginatlar, hidrofiberler, antimikrobiyal örtüler, biyolojik  rt ler (MDT gibi), apiterap tik (bal)  r nler, doku mühendisliği ürünleri gibi çok çeşitli türleri bulunmaktadır (13,16,29). Bu kadar çok çeşitlilik, yara iyileşmesinin henüz tam olarak anlaşılmamasından ve yara tiplerinin değişikliğinden ileri gelmektedir.

Genel olarak, bir yara örtüsü epiteliyal rejenerasyon ile kollajen sentezini arttırmalı, enfeksiyon ajanlarını, eksuda ve diğer yara yeri iyileşmesini engelleyici yapıları uzaklaştırmalı ve yarayı dış travmalardan korumalıdır (14,16,29). Bu kurallar ışığında ideal bir yara örtüsü (13,16);

- a. Uygulaması kolay,
- b. Estetik olarak hastayı tatmin edici,
- c. Hastaya acı vermeyen,
- d. Maliyeti düşük,
- e. Allerjik olmayan, toksik madde içermeyen,
- f. Yara alanındaki nem ile sıcaklığı koruyan,
- g. Yara alanını asgari travmatize edici olan,
- h. Dış ortamla gaz alışverişine izin veren,
- i. Nekrotik doku debridmanı sağlayan,

- j. Eksudayı emen,
- k. Dış kaynaklı kontaminasyonu engelleyen bir yapıda olmalıdır.

Yara örtüleri temelde üç ana kategoriye ayrılır. Bir grup yara örtüsü, sadece yaralı doku üzerine etkilidir ve otolitik debridmanı tetikler. Yara üzerindeki hastaya ait proteolitik enzimleri ve fagositik hücreleri uyararak, oto-debridman sağlar. Diğer bir grup yara örtüsü ise yara üzerinde nem oluşturmaya yönelik örtülerdir. Üçüncü bir grup ise antimikrobiyal etkilidir ve mikroorganizmaların eradikasyonuna yöneliktir. Bunların dışında bu etkileri birleştiren yara örtüleri de bulunmaktadır (13).



Şekil 2: Doğru Yara Örtüsü Seçimi (16 numaralı kaynaktan düzenlenmiştir)

2.2.3. Maggot Debridman Tedavisine Giriş

Maggot debridman tedavisi, diğer adlarıyla Biyocerrahi veya Larval Terapi; aslında geçmişte sıklıkla denenmiş ve tıp tarihinde ciddi bir tecrübe birikimi olan

bir tekniktir. Orta Amerikalı Maya yerlilerinin güneşte beklettikleri kan ve ette oluşan larvaları alıp yaralara koyarak sargılama yaptıkları; Avustralya, Güney Wales'teki Ngemba aborjin kabilelerinin MDT'yi yıllarca kullandıkları araştırmalarda tespit edilmiştir (30,31). Bununla birlikte resmi kayıtlarda, maggotların yara bakımında faydalı etkilerinin ilk olarak 16'ncı yüzyılda Ambroise Pare tarafından fark edildiği belirtilmektedir. Napolyon'un ordusundaki bir hekim olan Baron Larrey ve Amerikan İç Savaşında bulunan bir hekim olan Joseph Jones tarafından ise askerlerin yaralarında sağlam dokuya zarar vermeyen, ancak yaraları temizleyen larvaların olduğu not düşülmüştür. Baltimore'daki Johns Hopkins Hastanesi Ortopedi Servisi Şefi William S. Baer, Birinci Dünya Savaşı'ndaki gözlemlerini toparlayarak, bu konudaki ilk uygulamayı 1929 yılında yürütmüş, 100'den fazla osteomyelitli ve yumuşak doku enfeksiyonlu çocuğa maggot terapiyi uygulayarak tarihe geçmiştir. Maggotların, uygulanmasından önce dezenfekte edilmesi gerektiğini de gözlemlerinden yola çıkarak bildirmiştir (32,33). Lederle Laboratuvarları (Pearl River, New York, ABD), ticari olarak ilk maggot üreticisi olmuş ve 1940'lara kadar hizmete devam etmiştir (34), ancak 1940'lı yıllarda, MDT'ye olan ilgi kaybolmuş ve MDT terk edilmiştir. 1990'lı yılların başlarında ise özellikle Ronald A. Sherman'ın yayınlarının önderliğinde MDT tekrar gündeme gelmiştir (35-39). Bu yıllardan sonra çok sayıda araştırmacı MDT'yi denemiş, kısmen de olsa mekanizmalarını ve başarılı sonuçlarını ortaya koyarak, önerilerini dizelemişlerdir (40-44). Ülkemizde, ilk defa, Gülhane Askeri Tıp Akademisinde (Ankara/Türkiye) Tanyüksel ve arkadaşları tarafından klinik uygulamaya sokulan MDT konusunda (45), daha sonraki yıllarda yine ülkemizden birçok araştırmacı da yönteme ilgi duymuş ve hatta çalışmalar yaparak gözlemlerini yayımlamışlardır (46-49).

Maggot debridman tedavisi, uzun zaman önceden beri bilinip uygulansa da tıp otoritelerinin bakışı açısından tartışma konusu olmuştur. MDT üzerine yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiş ve etki mekanizmaları, tam olarak olmasa bile ortaya konabilmiştir. Çalışmaların sonuçları çok olumludur ve şu an birçok ülkede rutin kronik yara bakımında yeri vardır (17,18). Birçok hastane ya da yara bakım ünitesi, MDT uygulamaları için uluslararası literatürleri referans göstererek kendi

uygulama metodolojisini, endikasyon ve kontraendikasyonlarını geliştirmiştir (50,51). MDT, řu an için en çok diyabetik ayak yaraları, bası yaraları ve vasküler staz yaralarında diğerk tedavilerle (hiperbarik oksijen tedavisi gibi) kombine edilerek kullanılmaktadır (17,51). Ancak kronik yaralarla ilgili yeni çalışmalar ve larva ES'lerinin etki mekanizmalarının daha çok aydınlatılması sonucunda kullanım alanlarının genişleyebileceği dűřünűlmektedir.

Maggot debritleman tedavisi uygulaması için daha önce birçok larva tűrű çalıřılmıř olmasına rađmen sıklıkla *L.sericata* larvaları tercih edilmektedir (17,18). *L.sericata* tropikal iklim canlısı olduđundan, gerekli ıřık ve nem olanaklarının sađlandığı iklim odalarında, yetiřkin yeřil řiře sineklerinin ciđer vb hayvan etleri űzerine yumurtlaması sađlanır ve bu řekilde instar 1 ařamasındaki larvalar elde edilir. Maggotlar, uygulanma öncesinde sterilize edilmelidir. Bunun için, birçok arařtırmacı farklı yayınlarında, farklı sıvılarla muamele etmeyi seçmiřlerdir (41,52-56). Non-steril maggot uygulaması olursa bakteriyemi, sepsis riski söz konusudur (57). MDT uygulanan hastaların, yatalak-yatan, diabetes mellitus vb rahatsızlıkları olabileceđi de dűřűnűldűđűnde bu konunun, zen gerektiren bir durum olduđu ortadadır. Uygulamaya konulacak maggotlar, %5 koyun kanlı agar, brain-heart infűzyon agar vb besiyerlerine ekilerek sterilite kontrolleri yapılmalıdır (17,18). Larvaların bu iřlemler yapılırken a bırakılıp bırakılmayacađı, özellikle hangi instar evresinde yaraya uygulanacađı ile sineklerin iklim odasında karanlık veya ıřıđa olan maruziyet sűreleri konusunda bir grűř birliđi yoktur. Ancak genel olarak MDT için instar 3 larvalar tercih edilmektedir (50,51).

Maggot debritleman tedavisi, "serbest (free-range; confinement dressing; cage dressing)" veya "paketli (containment dressing; biobag)" şekilde uygulanabilmektedir (Tablo 1). Bu iki uygulamanın birbirlerine göre űstűnlűkleri de, dezavantajları da vardır. Derin nekrotik dokusu olan hastalarda, serbest uygulama tavsiye edilmektedir. Ancak serbest uygulama ile hastaların uygulamaya yönelik acı/ağrı/rahatsızlık hissi şikayetlerinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, hastanın yarasına birçok maggotu serbest olarak bırakmak, hastaları

rahatsız edebilmekte, uygulamayı reddetmelerine sebep olabilmektedir. Öte yandan, paketli uygulama yapıldığında debritleman derinliği ve bağlantılı olarak uygulama süresi olumsuz etkilenmektedir (17,43,58). Serbest uygulamada yarada kanama olduğu bildirilmişse de, paketli uygulamada kanama bildirilmemiştir. Maggotların yara üzerinde dolaşması/sürünmesi, çalışmacılar tarafından kabul edilmiş tek açıklama olarak gözüktüğü de bu konuda yeterli bilimsel çalışma yoktur. Maggotların ES'lerinin enzimatik reaksiyonları ve artmış fibrinolizinin de bu konuda etkili olması muhtemeldir (59,60). Tüm bu açıklamalardan sonra şu soru akla gelmektedir; “Uygulama sonrasında, larvalar yaradan nasıl temizlenecektir?” Elbette ki, paketli uygulamada böyle bir sorun yoktur. Maggotlar (kaçışlar dışında) paket dışına çıkmadıklarından, yaraya nüfuz etmeleri de mümkün değildir. Ancak serbest uygulama için bu soru sorulabilir. İlginçtir ki, *L.sericata* larvaları, yara üzerinde beslendikten sonra pupa fazına geçmek için yaradan kaçmaya çalışmaktadırlar. Bu nedenle, toplanmalarına gerek kalmadan, yara dışına kendileri göç ettiklerinden MDT için ideal olmaktadır (sözlü görüşme – ARAZ, R.E.)¹. Burada larvaların solunum amaçlı oksijen gerekliliklerine de dikkat çekmek gerekir (18).

İşin uygulayıcıları açısından bakarsak iki yöntem arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiş, iki yöntem de kolay olarak sınıflandırılmıştır. Uygulayıcı birim açısından bakıldığında, paketli sistemin maliyetinin daha yüksek olduğunu belirtmekte yarar vardır. Ancak zaten bu tür yaralarda uygulanan diğer debritleman yöntemlerine kıyasla çok daha ucuz olan MDT'nin, paketli olarak uygulandığında daha da fazla hasta tarafından kabul edilebilirliğinin de artabileceğini göz önüne alırsak, paketli şekilde uygulanmasının çok ciddi bir mali yük getirmeyeceği düşünülebilir (17,43,58).

¹ Prof.Tbp.Alb. Remzi Engin ARAZ, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tıbbi Parazitoloji BD Bşk.

Tablo 1: Serbest ve Paketli Maggot Uygulamalarının Karşılaştırılması (17 numaralı kaynağa göre düzenlenmiştir)

Özellik	Serbest	Paketli
Etkinlik	Maggotların derin bölgelere ulaşımı mümkün	Göz, ağız çevresi gibi hassas bölgelere uygun
Debritman Gücü	+++	++
Acı Hissi	Daha Acılı	Daha Az Acılı
Maggot Kaçması	Deneyimsiz uygulamacılar maggotlarda daha çok kaçış bildirmişlerdir	Deneyimli uygulamacılar kaçışlarda iki yöntemde fark görmemiştir
Estetik Uyum	Uyum Daha Az	Daha Çok Uyum
Uygulama Süresi	24 - 72 Saat	72 - 96 Saat
Maliyet	Düşük	Daha Yüksek

Maggot debritleman tedavisi, bası yaraları, venöz staz ülserleri, nöropatik ayak ülserleri (diyabetik ayak gibi), iyileşmeyen travmatik veya cerrahi sonrası yaralar, yanıklar, arteriyel ülserler, Burger hastalığı, sellülit, lenfostaz, osteomyelit, mastoidit ve nekrotik tümörlerde denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Uygulamadaki en büyük sorun, hastanın uyumudur. Hastalar tarafından en çok bildirilen sorun, hissettikleri rahatsızlık ya da ağrıdır. Tedavinin sonlandırılması ile hastaların hissettikleri bu durum da sona ermektedir (17). Acı faktörü, hastanın yaraya neden olan alttaki etkenine göre de değişkenlik göstermektedir. Örneğin, uygulama sırasında, diyabetik yarası olan hastalar çok daha uyumlu olabilirken (ayrıca nöropati de olduğunu göz önüne almak gerekir), venöz staz ülserlerine sahip hastalar ise daha çok ağrı/acı hissetmektedirler (sözlü görüşme – TANYÜKSEL, M.)². Yara üzerindeki açık sinir uçlarının maggotlarca irritasyonu da acı için ayrı bir açıklama olabilir (61). Bunun yanında hastalar, acılı ve ağrılı yaralarına dış görünüşü hoş olmayan canlıları koymak istemeyebilmektedirler ve bu durum, hastanın başlangıçta tedaviye olan inancını kaybetmesine neden olabilmektedir. Steenvorde ve arkadaşları (62), birçok

² Prof.Tbp.Alb. Mehmet TANYÜKSEL, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Yüksek Bilim Konseyi Üyesi

hastanın uyum sorunları yaşadığını, ancak bunun MDT'nin etkinliği üzerinde bir azalma meydana getirmediğini bildirmişler; kendi gözlemlerine dayanarak da “kabullenme”nin yan etkilerin azalmasında en iyi yöntem olduğunu yorumlamışlardır.

Maggot debritleman tedavisi, daha önce de belirttiğimiz gibi, altta yatan etkeni farklı olan birçok kronik yarada çok kez denenmiş ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Altta yatan etken, başarı oranını etkilese de, kronik yara oluşumuna neden olan hastalıkların sistemik olması (diabetes mellitus gibi) ve hastaların bağışıklık sisteminin zayıflamış olması (hastanede yatan, opere ve diabetes mellitus hastası gibi) gibi durumlar ile eşlik eden başka hastalıkların da bulunması (kronik böbrek yetmezliği, koroner hastalıklar gibi), sistemik ilaçların kullanımını hem ciddi anlamda kısıtlamakta hem de yan etki profilini arttırmaktadır. Ayrıca, venöz staz veya diyabetik ayak yaraları gibi kronik yaralarda, kan dolaşımı bozukluğu olduğundan (kan dolaşımı düzgün olmadığı sürece yara iyileşmesinin ve bağışıklık sisteminin, yara enfeksiyonu ile savaşının düzgün olmayacağını burada hatırlatmak gerekir), sistemik uygulanacak tedavilerin etkinliği de tartışmalıdır. MDT, hem yara bakımı konusunda istenen tüm özellikleri içermekte, hem enfeksiyonla savaşmakta, hem yara debritlemanı sağlamakta hem de yara iyileşmesini ve neoanjiogenezi uyarmaktadır (17,18,63). Maliyet açısından da (sistemik kullanılan pahalı antibiyotikler göz önüne alındığında) büyük avantaj sağlamaktadır. MDT'nin, yukarıda bahsettiklerimizden de anlaşıldığı üzere; hem randomize kontrollü çalışmalarla etkinliği gösterilmiş hem de insanlar üzerindeki çalışmalarla kullanımdaki yararlılığı (ve zarar vermeziği) ispatlanmıştır (64). Burada unutulmaması gereken husus, MDT'nin, tek başına yara tedavisi yöntemi olduğu değil, kronik yara tedavisinde çok disiplinli yaklaşımın bir parçası olduğudur.

Ülkemizde MDT, Gülhane Askeri Tıp Akademisi (Ankara), Atatürk Üniversitesi (Erzurum), Yıldırım Beyazıt Üniversitesi (Ankara), Üsküdar Üniversitesi (İstanbul), Medipol Üniversitesi (İstanbul), Dumlupınar Üniversitesi (Kütahya), Bezm-i Alem Üniversitesi (İstanbul) ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (İstanbul)

bünyelerinde yapılmakta veya MDT'yi uygulamaya koymak üzere çalışmaları devam etmektedir.

2.2.4. Maggot Debritman Tedavisi Etki Mekanizması

Maggot debritman tedavisi etki mekanizması konusunda birçok çalışma vardır ve halen de tam anlamıyla tüm etki mekanizması çözülememiştir (17). Şu ana kadar elde edilen verileri dört ana başlık altında toplayabiliriz;

a. Debritman: Tedavide kullanılacak larvadan ilk istenen, nekrotik dokuyla beslenmesi, canlı dokuya herhangi bir müdahalede bulunmamasıdır (65). *L.sericata* larvaları tam da istenen bu özelliği karşılamaktadır. Bu işlem, hem fiziksel hem de kimyasal olarak yapılmaktadır. Her maggotun, 24 saat içinde 25 mg nekrotik dokuyu yok edebildiği gözlenmiştir (43). Larvalar, mekanik debritmanlarını, özellikle ağız bölgelerinde bulunan iki çengel aracılığıyla yarayı sıyrarak ve kazıyarak yapmaktadırlar (66,67). Lokal olarak uygulanan yara örtülerinin aksine, serbest uygulama sırasında maggotlar yaranın en derin noktalarına kadar gitmekte ve “yiyeceğini” aramaktadır. Bu nedenle maggotlar yaranın tümü için etkin bir debritman sağlayabilmektedir (17,18,43).

b. Antimikrobiyal Etki: Maggotlar antibakteriyel etkilerini hem bakterileri “yiyerek” hem de ES'lerinin bakterisidal etkisi yoluyla göstermektedirler. Mumcuoğlu'nun 2001 yılında ortaya koyduğu çalışma (43), bakterilerin, larvalar tarafından mekanik olarak yendiğini ortaya çıkarmıştır. Öte yandan, larvaların gastrointestinal sisteminde kommensal olarak yaşayan *Proteus mirabilis* bakterisince üretilen fenilasetik asit ve fenilasetaldehitin antibakteriyel etkisi daha önceki çalışmalarda da gözlenmiştir (68,69). ES'ler üzerine çalışmalar halen devam etmekle birlikte; bu sıvılardan ve larva hemolenf sıvısından, Bexfield ve ark. (52,53), Barnes ve ark. (41), Huberman ve ark.larının (54,55) çalışmalarında, değişik molekül ağırlıkları olan farklı antibakteriyel protein molekülleri izole edilmiştir. Aynı çalışmada Huberman ve arkadaşları (55) ve başka bir çalışmada da Kerridge ve arkadaşları (70), bakteriye maruz kalan larvaların, düşük molekül ağırlıklı antibakteriyel proteinleri hemen (ve steril larvalara göre miktar olarak çok

daha fazla) salgıladığını, daha büyük molekül ağırlıklı olanları ise daha sonraki sürelerde üreterek salgıladığını bildirmişlerdir.

Kruglikova ve Chernysh (56), *L.sericata* larvalarının ekzoeksresyonlarının antibakteriyel etkinliklerini *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* gibi gram pozitif ve negatif birkaç bakteri üzerinde test etmişlerdir. Araştırmacılar, yine Chernysh ve arkadaşları (71) tarafından daha önce gram negatif bakteriler ve mantarlar üzerinde öldürücü etkisi belirtilmiş difterisin (8882 ve 9025 Da) proteinlerinin yanında; *E. coli* üremesini engelleyen 1014, 1128, 1269, 5772, 8631, 8882 ve 9025 Da molekül ağırlıklarındaki peptid molekülleri ile molekül ağırlıkları 174-904 Da arasında değişen düşük molekül ağırlıklı peptidler izole etmişlerdir. Anti-gram-pozitif etkinin ise 6466 ve 6633 Da ağırlığındaki proteinler ile molekül ağırlıkları 129–700 Da arasında olan düşük molekül ağırlıklı peptidler aracılığı ile oluştuğu belirtilmiştir.

Ceřovský ve arkadaşları (72), “lucifensin” adını verdikleri defensin benzeri antibakteriyel molekülü bildirmişler; Valachova ve arkadaşları da (73) bu proteinin, maggot içerisindeki ekspresyonunu göstermişlerdir. Lucifensinin keşfini müteakiben kısa süre sonra, *Lucilia cuprina* larvalarından, lucifensinin homoloğu, “Lucifensin II” molekülü izole edilmiştir (74). Lucifensin molekülü, özellikle biyofilm oluşumunun eşlik ettiği kronik yaralar için, gelecekte “tek bir antibiyotik olarak veya antibiyotiklerle kombine olarak kullanılabilir mi?” sorusunu da beraberinde getirmiştir (75). Bunu gösterebilmek için prelinik, farmakodinamik ve farmakokinetik çok sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Andersen ve arkadaşları “transposon assisted signal trapping (TAST)” tekniği kullanarak, *L.sericata* larva ES’lerinin antibakteriyel proteinleri ve dizilerini (kısmi veya tam olarak) ayırt etmeye çalışmışlardır. Buldukları proteinlerin amino asit benzerliklerini Temel Yerel Sıra Arama Motoru [The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)] – Protein sistemiyle karşılaştıran araştırmacılar, lektin, defensin, attacin ve kitin bağlayıcı protein gibi proteinlere %28 ile %91 arasında amino asit benzerliği tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, lucifensinin antibakteriyel etkinliği birçok bakteride denenmiş, gram pozitiflerde çok ciddi antimikrobiyal

etkinlik gözlenirken, gram negatiflerde bunu söylemek mümkün olmamıştır. Aynı araştırmacılar, lucifensinde antifungal etkinlik de gözlenemediğini bildirmişlerdir (40).

İkibinondört yılı başında yayımlanan bir başka çalışma (75), larvaların, fenil metalloproteaz, sinyal peptid proteaz, üç farklı serin proteaz ve kimotripsin salgılarını ve amplikonlarını göstermiş; BLAST kullanarak, diğer larval proteazlarla olan amino asit benzerliklerini bildirmiştir. Aynı araştırmacılar; aynı yıl yayımlanan bir başka çalışmalarında (76), larval midgut lizozimlerini değerlendirmişler; molekül ağırlıklarını, primer ve amplikonlarını ve çeşitli bakterilerdeki antibakteriyel etkinliklerini göstermişlerdir.

Tüm bunlara ek olarak, maggotlarda kommensal olarak yaşayan *P.mirabilis* bakterisince üretilen moleküllerin ortama verilmesiyle, yara ortamının alkalileştirildiği, bu şekilde de bakteriyostatik etki oluşturulduğu da belirtilmiştir (77). Daha sonraki çalışmacılar (78), *L.sericata* ve *L.cuprina* larva ES'lerinin, nekrotik doku ile karşılaştıklarında ortamı alkalileştirici birçok başka enzim de içerdiklerini bildirmişlerdir. Larval sekresyonların geniş bir pH aralığında (pH 5-10) çalışma kabiliyeti olduğu; bu alkalileştirme işleminin sadece bakteriyostatik etki yaratmak için olmadığı, ayrıca serin proteaz, tripsin benzeri ve kimotripsin benzeri enzimler ile metalloproteinaz gibi larval enzimlerin optimal çalışma koşullarını oluşturmak için de olduğu yorumlanmıştır.

Pöppel ve arkadaşları (79), 2014 yılında, *L.sericata* ES'lerinden, lucifensinin homoloğu olan ancak lucifensinin aksine antibakteriyel değil, antifungal etkinliği gösterilen "lucimycin"i izole etmişlerdir. Çalışmacılar, sınırlı sayıda mantar üzerinde deneme yapmalarına rağmen, bazı fungal (*Cladosporium herbarium*, *Alternaria alternata*, *Lichtheimia corymbifera*, *Mucor circinelloides*, *Candida albicans*, *Trichosporon asahii*) ajanlarda antifungal etkiyi (spor germinasyonunun ve miçelyal üremenin önlenmesi) gözlemlemişler; ancak bazı mantarlarda (*Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Arthoderma benhamiae*) antifungal etki tespit edememişlerdir.

Maggot debridman tedavisi ile ilgili eklenebilecek bir konu da, 2012 yılında Polat ve arkadaşlarınca yapılan (80), anti-leyşmanya etkisinin gözlemlenmesidir. Fareler üzerinde *L.tropica* ile kutanöz leşmanya lezyonları oluşturan araştırmacılar; *L.sericata* ES'lerini lezyonlara enjekte etmiş ve sonuçları gözlemişlerdir. ES'lerin taze ve saf olması koşuluyla kutanöz lezyon oluşmasının engellendiğini ya da oluşan lezyonun iyileştiğini bulmuşlar; ancak kültüre edilmiş promastigotlarda bu etkinin gözlenemediğini, bunun da ES'lerin hızlıca okside olmasına bağlanabileceğini yorumlamışlardır.

c. Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri: MDT'nin yara iyileşmesini hızlandırıcı etkisi üzerine birçok gözlem ve araştırma bulunmaktadır. Burada dikkat çekilmesi gereken durum; daha önceki başlıklar altında bahsedilen, nekrotik dokunun debride edilmesi ve enfeksiyonun giderilmesi ile yaranın zaten iyileşme sürecine gireceğidir. MDT tekil olarak, ilk iki maddede bahsedilen etkiler aracılığı ile değil; doğrudan olarak yara iyileşmesini hızlandırmakta mıdır? Öncelikle belirtmek gerekir ki; birçok çalışmada (81-84), MDT yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Van der Plas ve arkadaşları 2007'de yayımladıkları çalışmada (80); *L.sericata* ES'lerinin, nötrofillerin antimikrobiyal fonksiyonlarını etkilemeden, proinflatuvar yanıtlarında inhibitör etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Doz bağımlı olarak, elastaz salınımının ve hidrojen peroksit üretiminin inhibe edildiğini gözlemişler; kronik yaralarda, reaktif oksijen radikali oluşumunun engellenmesi ve nötrofillerin iyileştirici yollara katkısının sağlanması açısından bunun ciddi bir öneme sahip olabileceğini yorumlamışlardır. Aynı çalışmada, yine doz bağımlı olarak, nötrofil kemotaksisinin de inhibe edildiğini ve CD11b, CD18 gibi aktif nötrofiller üzerinde olan adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun da azaldığını (ve dolayısıyla nötrofil adhezyonunun ve transendotelyal migrasyonun düzenlendiğini) bildirmişlerdir. Öte yandan, nötrofillerin, yara iyileşmesinde faydalı etkileri (fagositoz gibi) de olduğunu, ancak ES'lerin fagositozu inhibe etmediğini, nötrofil apoptozunu uyarmadığını da bildirmişlerdir (85). Aynı araştırmacıların bir diğer çalışması (86), monosit proinflatuvar yanıtının ES'lerle baskılandığını ve sitokin salınımlarının etkilendiğini ortaya koymuştur. Horobin ve arkadaşları ise (87), ES'lerin proteolitik aktivitesinin, fibronektini küçük

biyoaktif parçacıklara dönüştürdüğünü ve ekstrasellüler matriks iletişimini arttırabileceğini belirtmişlerdir.

ç. Biyofilm Yıkıcı Etkisi: Biyofilm oluşan hastalıklar geniştir; katater ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları, üriner katater ilişkili persistan üriner enfeksiyonlar, ventilatör ilişkili pnömoniler, prostetik cihaz enfeksiyonları en sık görülen enfeksiyonlardır. Biyofilm oluşumu, sadece antibiyotik direncine sebep olmasıyla değil, tedavilerinin pahalı olması, protez çıkarılmasına sebep olması gibi sıkıntılar sebebiyle de ciddi bir sorundur (28). Cazander ve arkadaşları, bir yıl arayla yayımladıkları iki çalışmalarında (42,88); ES'lerin sadece antibakteriyel etkili değil, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. oxytoca*, *E. faecalis*, *E. cloacae* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin, polietilen, titanyum ve cerrahi paslanmaz çelik yüzeylerde oluşturdukları biyofilmi yıkıcı/geriletici etkileri olduğunu da bildirmişlerdir. Van der Plas ve arkadaşları ise (89), ES'lerin, *S. aureus* biyofilmlerini 3 saat içerisinde, hiçbir bir antibiyotik baskısı altında olmadan yok ettiğini göstermişler; ES olmayan antibiyotik grubunda ise (vankomisin ve daptomisin) antibiyotiklerin biyofilme karşı azalmış aktivite gösterdiklerini gözlemişlerdir. Ayrıca, linezolid ve klindamisinin biyofilme karşı etkinliği olduğunu, ancak ilk 24 saat içinde tabakanın yıkılamadığını not düşmüşlerdir. Biyofilmi yıkılmış bakterinin ise antibiyotiklere karşı azalmış duyarlılığının yok olduğunu, bakterinin antibiyotikle daha kolay eradike edilebildiğini gözlemişlerdir.

2.2.5. Maggot Debritman Tedavisinin Endikasyon ve Kontrendikasyonları

Maggot debritman tedavisini resmi uygulamaya sokan yönetmelikte; diyabetik ayak ülserleri, venöz staz ülserleri, bası yaraları, osteomyelit, nekrotizan fasiit, postoperatif yaralar, nöropatik ayak ülserleri, travmatik iyileşmeyen yaralar ve arteriyel/iskemik ülserleri uygulama endikasyonları içinde yer almaktadır. Uygulamaya yetkili personel olarak, sertifikalı bir tabip kılınmıştır. Yönetmelikte; MDT kontraendikasyonları koagülopatiler, larvalara karşı allerjiler ve hemorajik apseler olarak belirlenmiştir (19). Ayrıca, solunum sistemi, baş bölgesi, hayati organlara bağlı fistüller, açık batın yaraları, iç organlar, endokrin

bezler ile hayatı tehdit eden, çok hızlı ilerleyen nekroz veya yaralarda da MDT'nin uygulanamayacağı bildirilmiştir (17,19).

2.3. Antimikrobiyal Etki Analizi

2.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyon, rutin klinik laboratuvarlarda en yaygın kullanılan antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinden biridir. Zor üreyen ancak sık rastlanan bakteriler de dahil birçok patojenin antimikrobiyal duyarlılık durumları disk difüzyon ile test edilebilmektedir. Gerek ABD Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)], gerekse de Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi [The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] ölçütlerine göre her test edilecek mikroorganizma için, eğer güvenilebilir ise, disk difüzyon tekniğinde kabul edilecek inhibisyon alanı çapları belirlenmiş ve standardize edilmiştir. Disk difüzyon ile birlikte Epsilomer test (E-test) yöntemleri için de minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri standardize edilerek bildirilmiştir (90,91). Bu yöntemlerin dışında agar dilüsyon, agar proporsiyon, mikrodilüsyon ve makrodilüsyon gibi antimikrobiyal duyarlılık test teknikleri de bulunmaktadır (92). Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin standartları, antimikrobiyal ilaçların potensleri, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri kullanılarak değerlendirilmiş çok sayıda çalışmanın sonucunda yapılan karmaşık matematiksel hesaplamalara dayanır (93).

Bakteriler için Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği; Mueller-Hinton agara, 0,5 McFarland bulanıklık standardında ayarlanmış bakteri süspansiyonlarının, plak üzerine homojen olarak sürülmesi ve antibiyotik disklerinin aralarında standart boşluklar kalacak şekilde plak üzerine yerleştirilmesini müteakiben, 24 saatlik inkübasyon sonrasında antibiyotik diskleri çevresinde inhibisyon alanının çapının ölçülmesine ve CLSI ya da EUCAST ölçütlerine göre yorumlanmasına dayanan bir tekniktir. Maggot ES'lerinin antimikrobiyal etkinliği daha önce gösterilmiştir

(17,18). Ancak bu konuyu değerlendirmek için standardizasyon yoktur ve ES'lerin disk difüzyon tekniği ile göstermesi muhtemel inhibisyon alanını değerlendirmek için standart ölçütler bulunmamaktadır. Öte yandan, disk difüzyon tekniği, antimikrobiyal etkinliğin gözlenebilmesi için kolay uygulanabilir bir tekniktir. Kerridge ve arkadaşları (70), Mueller-Hinton agarı 4 mm'lik kuyucuklar açarak, ES'leri kuyuların içine yerleştirmiş ve oluşan inhibisyon alanını gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde, Doğandemir (94), TVS'lerinin antimikrobiyal potansiyelini difüzyon yöntemi ile denemiş ve başarılı sonuçlar elde etmiştir. Sonuç olarak, Kirby-Bauer disk difüzyon testi, antimikrobiyal etkinliğin gösterilmesi açısından uygun olacağı değerlendirilmektedir.

2.3.2. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi; hücre kümelerinin, tek hücre bazında hızlı bir şekilde optik analizinin yapılmasına dayanan bir yöntemdir (95). Akım sitometrisi, ilk defa 1940'lı yılların sonunda II. Dünya Savaşı döneminde aerosoller içerisindeki bakterileri tespit etmek amacıyla kullanılmış, 1970'lerin ortasından itibaren mikrobiyoloji alanında akım sitometrisinin kullanımı başlamıştır (96). Akım sitometrisi aracılığı ile özellikle bakteriyolojide, hücrelerin üremeleri, yaşam durumları, replikasyon aşamaları, hücre bölünmesi, metabolizma ve hücre yüzeyinde meydana gelen değişimler hakkında bilgi edinilebilmektedir. Hücre boyutu bilgilerinin yanı sıra hücre içindeki nükleik asit yapısı, protein içeriği ve lipid içeriği gibi özellikleri için ayrı floresan maddeler kullanarak teorik olarak aynı anda hücrenin 18-20 özelliği incelenebilir. Bu analiz, sıvı içinde süspansiyon edilmiş hücrelerin üzerine yapılan lazer atışı sonrasında hücrelerden olan saçılımlar ile hücrelerin kendi otofloresan özelliklerinden ve işlem öncesi hücrelere uygulanmış olan floresan maddelerin lazer emilimi ile reemisyondan faydalanılarak hücre hakkında bilgi edinmesine dayanır. Sistem, tek hücre bazında inceleme yapar, bir çok parametre sunar ve hücre toplulukları konusunda çıkarım yapılabilmesini sağlar. Ayrıca topluluk içindeki hücreler, alt gruplara ayrıştırılabilir (97)

Herhangi bir floresan boyamaya ihtiyaç duyulmadan hücrenin intrinsek karakterine bağlı olarak, lazer atışıyla ileri saçılım ile yan saçılım gerçekleşir ve hücrelerin boyut ile granülarite bilgileri alınabilir. Diğer ek bilgiler için flurokrom maddelerine ihtiyaç duyulmaktadır (95).

Mikrobiyoloji alanında hızlı tanı ve duyarlılık testleri, başlıca kullanım alanlarını oluşturmaktadır. Floresan madde ile işaretli patojenler için özgül antikorların kullanılması ile doğrudan örnekten, kültüre gerek kalmadan patojenleri tanımlamak mümkün olmakta ve hatta çok sayıda farklı özgül antikorların mikroboncuklara yapıştırılması ile aynı anda çok sayıda tanımlama yapılabilmesine olanak tanınabilmektedir. Biyofilm oluşumu gibi geleneksel yöntemler ile bakteri tespit edilmesi zor durumlarda bile canlı bakteri olabildiği ve bu bakterilerin akım sitometrisi ile tespit edilebildiği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Patogenezle ilgili olarak *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da biyofilm ile ilişkili olan bir proteinin varlığı akım sitometrisi ile tanımlanmıştır (98,99). Kolera toksini, stafilokokal enterotoksin B gibi bazı toksinlerin tespiti de antikor kaplı mikroboncuklarla mümkün olmuştur (100).

Antimikrobiyal duyarlılık testinin standardizasyonu zor, zahmetli veya uzun süreli olan patojenlerde akım sitometrisi ile yapılacak duyarlılık çalışmaları daha kısa sürede sonuç alınmasına imkan sağlamaktadır (97). Akım sitometrisi ile antimikrobiyal ajanların bakteriyostatik ve bakterisidal etkileri gösterilebilir ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK), antibiyotik sonrası etki, subinhibitör konsantrasyonun etkisi ya da duyarlılık testi içinde heterojen varyantların tespit edilmesi mümkün olabilmektedir (96). Öte yandan antimikrobiyal duyarlılık analizi uzun süren mikobakteri ve mantar gibi bazı patojenlerde, akım sitometrisi ile birkaç saat içinde sonuç alınması mümkün olabilmektedir (95).

2.4. Protein Analizi

2.4.1. İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (2-D PAGE)

Analitik bir incelemede, intakt proteinlerin ayrıştırılması tekniklerinden en etkin olanlarından biri, İzoelektrik Fokuslama (İEF) ve “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis” (SDS-PAGE) kombinasyonudur (Two Dimensional Electrophoresis, 2-D PAGE) (101). 2-D PAGE, 2000’den fazla proteinin paralel analizle tek bir jelde ayırt edilebilmesine müsaade eder ve proteomiks işlemlerinin temelini oluşturur (102).

Elektrofrezde proteinler, elektriksel yükü olan ortamda yürütülerek ayırım yapılmaktadır. Burada proteinler için iki kavram vardır; elektroforetik mobilite ve isoelektrik nokta. Elektroforetik mobilite; protein molekülünün yüküne, şekline ve büyüklüğüne dayanırken, izoelektrik nokta ise molekülün net yüküne dayanmaktadır. Mobilite, iyonların çözelti içerisindeki hareketlilik özelliği olarak tanımlanır. Mikro-akışkan sistemlerde çözelti içerisindeki parçacıkların ayrıştırılmasında mobilite değerinin büyüklüğü önemlidir. Elektroforetik mobilite, elektriksel alan kuvveti içerisinde protein moleküllerinin migrasyonu oranı olarak belirtilebilir. Elektroforetik mobilite; ortam pH seviyesinden, ortamdaki karşı yüklü iyon miktarından ve denature edici diğer kimyasallardan etkilenir. Öte yandan, proteinler, amfoterik moleküllerdir ve ortam pH değerlerine göre net yükleri değişebilmektedir. Net yükün 0 olduğu pH değeri, isoelektrik nokta (pI) olarak tanımlanır. Ortam pH’sı proteinin mobilitesini ciddi anlamda etkilemekte ve migrasyonunu değiştirebilmektedir. 2-D PAGE, bu iki kavramın kullanıldığı iki tekniğin birleştirilmesi ile oluşturulmaktadır (102).

İzoelektrik fokuslama, proteinler gibi amfoterik moleküllerin ayrıştırılmasında kullanılan elektroforetik bir yöntemdir. Protein komplekslerinin ve agregatlarının önüne geçmek için numune öncelikle zwitteriyonik deterjana maruz bırakılır ve protein olmayan iyonlar uzaklaştırılır. Daha sonra artık sadece proteinlerden oluşan numune, immobilize pH gradienti (IPG) eşliğinde, İEF jeline yüklenir ve elektriksel alanda ayrışmaya maruz bırakılırlar. pH gradientine göre,

protein molekülleri, izoelektrik noktasından daha düşük pH değerlerinde (daha asidik) pozitif yük alırken, daha yüksek (daha alkali) pH değerlerinde negatif yük almaktadır. Proteinler aldıkları bu yüke göre anot ya da katoda doğru göç etmektedir. Proteinler, göçünü tamamlayıp izoelektrik noktalarına ulaştığında son derece yoğunlaştırılmış haldedir ve çok düşük yük farklılıkları bile ayırt edilebilmiştir. Buradan itibaren, SDS-PAGE aşamasına geçilir (101,103).

Proteinler için jel elektroforezi, genel olarak, proteinlerin moleküler ağırlığı, elektriksel yükü, subunit yapıları ve protein yapılarının saflığı konusunda bilgi verir. Göreceli olarak kolay ve tekrar edilebilirliği yüksektir (101,102). Jel elektroforezinin temel unsuru, jelin kendisidir. Her ne kadar farklı türlerde jel materyalleri olsa da (poliakrilamid, agaroz vb.), proteinler için poliakrilamid tercih edilmektedir. Jel, proteinlerin migrasyonuna karar verir (partikül büyüklüklerine göre jel konsantrasyonu değiştirilebilir). Poliakrilamid jeller, hidrofildir ve elektriksel olarak nötrdür. Protein bağlarına bağlanmazlar ve 250 nm dalga boyunda ışığı geçirgendirler (102). Proteinler için en sık tercih edilen jel elektroforezi yöntemi, SDS-PAGE tekniğidir. Yöntem, kolaylıkla, bir örnekteki polipeptid sayısını, molekül karmaşıklığını ve örnek saflığını ortaya koyar. SDS-PAGE, temelde proteinlerin moleküler ağırlığına dayanır ve çoğunlukla kromatografi gibi diğer protein saflaştırma teknikleriyle birlikte kullanılır. SDS-PAGE için proteinlerin polipeptid zincirleri seviyesine kadar denature edilmesi gerektiğinden SDS-PAGE, proteinlerin fonksiyonları konusunda bilgi vermez (101-103).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

“Maggot (*Lucilia sericata* larvası) ekskresyon/sekresyon metabolitlerinin belirlenmesi ve antibakteriyel aktivite potansiyelinin araştırılması” konulu uzmanlık tezi, GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD Başkanlığının 10 Ocak 2014 tarih ve T. MİK. AD: 50687469-3730-9-14/1541 sayılı emri ile verilmiş, GATF Dek.lığı ve Eğt.Hst.Bştbp.liğinin 28 Haziran 2016 tarihli, T.MİK.AD.: 50687469-8030-317-16/1541 sayılı ve “Tez Konusu Değişikliği” konulu yazısı ile “Maggot (*Lucilia sericata* larvası) tüm vücut sıvısı metabolitlerinin belirlenmesi ve antibakteriyel aktivite potansiyelinin araştırılması” şeklinde yeniden düzenlenip ve çalışılmıştır. Bu çalışmanın etik kurul onayı Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Etik Kurulu’nun 06 Mart 2015 tarihli toplantısında ve 50687469-1491-243-15/1648.4-508 sayılı kararı ile alındı. Maggotların üretimi, “sanal” yara ortamında provoke edilmesi ve bakteri ile karşılaştırılması, toplanması, sıvılarının çıkartılması ve ön hazırlık aşamaları, GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tıbbi Parazitoloji BD’de yapıldı. Akım sitometrisi analizleri, GATA Ar-Ge Merkezi’ne bağlı “FMF Arthritis Vasculitis and Orphan Disease Research Center (FAVOR)” ünitesinde gerçekteştirildi. 2-D PAGE analizi ise Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji-Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi’nde yapıldı.

3.1 Gereçler

3.1.1 Besiyerleri

- %5 koyun kanlı agar hazır besiyeri (Salubris, Türkiye)
- Sabouraud dekstrozu agar (Toz) (Oxoid Ltd., İngiltere)
- Mueller-Hinton agar hazır besiyeri (Salubris, Türkiye)
- Mueller-Hinton agar (Toz) (Biomérieux, Fransa)
- Triptik soy buyyon (Toz) (Oxoid Ltd., İngiltere)

3.1.2 Cihaz ve Ekipmanlar

- Hassas terazi (Precisa XB 220A, Almanya)

- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standart, Almanya)
- Tek kanallı otomatik pipetler (Brand, Almanya)
- Cam laboratuvar malzemeleri (balon, mezür, vb.)
- Şarjlı pipet pompası (Accu-jet, Brand, Almanya)
- Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)
- Mars sınıf II biyogüvenlik kabini (ScanLaf, Danimarka)
- Etüv (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu (-80°C) (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu (-20 °C) (Arçelik, Türkiye)
- Otoklav (Sanyo, Japonya)
- Mini-Protean dikey elektroforez cihazı (BioRad, ABD)
- BD Accuri C6 akım sitometrisi cihazı (BD, ABD)
- FCM arayüzü (BD, ABD)
- Protean IEF-Cell (BioRad, ABD)
- Criterion SDS-PAGE elektroforesis cell (BioRad, ABD)

3.1.3 Sarf Malzemeleri

- Steril distile su (GATA Eczacılık Bilimleri Merkezinden temin edilmiştir)
- Steril deiyonize su (GATA Eczacılık Bilimleri Merkezinden temin edilmiştir)
- Steril %0,9'luk NaCl çözeltisi (GATA Eczacılık Bilimleri Merkezinden temin edilmiştir)
- Santrifüj tüpü 50 ml (LP Italiana, İtalya)
- Mikrosantrifüj tüpü 1,5 ml (Axygen, ABD)
- 0,22 µm çaplı filtre (Minisart Sartorius, Almanya)
- Çeşitli sarf malzemeleri (eldiven, lam, tek kullanımlık steril öze)
- Tekrar kullanılabilir malzemeler (hava geçirgen tülbent, kafes ve pupa kabı, cam şişe, vb)
- Bölmesiz steril petri kabı (Fıratmed, Türkiye)
- Steril şırınga 5 ml (Hayat Tıbbi Aletler, Türkiye)
- Pipet uçları 1, 10, 100, 1000 µl (Axygen, ABD)

- Steril pamuk uçlu silgeç, 150 X 2,2 mm (True-Line, Türkiye)

3.1.4 Kimyasallar ve Antibiyotikler

- Vankomisin diski 30 µg (Ürün Kodu: ASD09400) (Bioanalyse, Türkiye)
- Meropenem diski 10 µg (Ürün Kodu: 1806393) (Oxoid Ltd., İngiltere)
- Linezolid diski 10 µg (Ürün Kodu: ASD05010) (Bioanalyse, Türkiye)
- Kolistin diski 10 µg (Ürün Kodu: ASD03300) (Bioanalyse, Türkiye)
- Sodyum dodesil sülfat (Amresco, ABD)
- Akrilamid (Amresco, ABD)
- N,N'-metilen-bis-akrilamid (Amresco, ABD)
- Amonyum persülfat (Amresco, ABD)
- TEMED (Sigma-Aldrich, ABD)
- Trizma base (Sigma Aldrich, ABD)
- HCl (Merck, Almanya)
- Gliserol (Amresco, ABD)
- Glisin (Amresco, ABD)
- Etanol (%96) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Bütanol (Merck, Almanya)
- Bromfenol mavisi (Sigma-Aldrich, ABD)
- 2-b-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, ABD)
- Tris-Glisin-SDS 10X SDS-PAGE Buffer (BioRad, ABD)
- Metanol (%100) (Merck, Almanya)
- Asetik asit (Merck, Almanya)
- ProteoSilver™ silver stain Kit (Ürün Kodu: PROT SIL1) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Thiazole orange (TO) (Sigma Aldrich, ABD)
- Propidium iodide (PI) (Sigma Aldrich, ABD)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck, Almanya)
- 40% BioLyte 3/10 Ampholyte (BioRad, ABD)
- BioRad 2-D starter kit (BioRad, ABD)

- 11 cm IPG strip (BioRad, ABD)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma Aldrich, ABD)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma Aldrich, ABD)
- Tween 20 (Merck, Almanyà)



3.2 Yöntem

3.2.1 Çalışma Grubu

Çalışmada, *Lucilia sericata* larvalarından instar 2 ve instar 3 evresinde olanlar kullanıldı. Maggot sıvılarının etkinliğini göstermek üzere, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922, *E.faecalis* ATCC 29212, *S.aureus* ATCC 25923 suşları kullanıldı. Bu suşların tercihinde, makale taraması sonucunda, kronik yaralar üzerinde en sık izole edilen patojen mikroorganizmalar olduğunun görülmesi etkili oldu.

3.2.2 *Lucilia sericata* Çoğaltılması ve İklim Odası

Lucilia sericata çoğaltılmasında ve larva eldesinde Tanyüksel ve arkadaşlarının (45) yöntemi kullanıldı. Çoğaltma işlemi, sıcaklığı 25°C'nin üzerinde tutan ve nemi %50'nin üzerine sabitleyen sistemin kurulu olduğu, dışarıdan özel havalandırmalı, ışıklandırması 16 saat karanlık ve 8 saat aydınlık durumuna ayarlı "iklim odası" içerisinde yapıldı. İklim odasında, kafes içerisinde, ticari toz şeker ve çeşme suyu ile beslenip canlı tutulan erişkin *L.sericata* sineklerinin üreyebilmesi için, daha önceden -20°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilen dana karaciğeri, diğer canlıların temasından korunarak çözdürüldü ve sinek kafeslerinin içerisine bırakıldı. Sineklerin karaciğer üzerinde üreyebilmeleri için 4-8 saat beklendi ve sonrasında karaciğerler toplandı. Üzerinde üreme olan karaciğerlerin üzerine temiz karaciğerler konularak, "pupa" yapmak üzere, daha önceden içerisine odun talaşı konulmuş kaplara karaciğerler yerleştirildi. Pupa kapları, larvaların kaçışını engellemek için, aynı kafeslerde yapıldığı gibi, ince delikli, hava ve nem geçirgen tülbentler ile kapatıldı. Ertesi gün pupa kaplarında büyüyen larvaları beslemek için, pupa kaplarına taze karaciğer bırakıldı. Takip eden günlerde pupa kapları hergün kontrol edildi ve iklim odasının iklim şartlarını koruması sağlandı. Birkaç gün içerisinde pupa kaplarındaki maggotların "pupa" fazına geçtiği ve siyah, kabuklu ve hareketsiz hal aldıkları gözlemlendi. Yine şartların devamlılığı sağlanarak, birkaç gün içerisinde maggotların erişkin döneme (sinek) geçtikleri gözlemlendi. Erişkin dönemdeki pupa kapları, içerisinde su ve şeker bulunan görece daha büyük kafeslere alındı ve açıldı. Kafese alınmanın ertesi günü, sinekleri beslemek amacıyla, taze karaciğerler kafeslere bırakıldı. Sinekler bu aşamada

henüz üremediklerinden bu dönemde konulan karaciğerler kafesten geri toplanmadı. İlk beslemeden iki gün sonra, başta da bahsettiğimiz, çoğaltmanın ilk aşamasındaki taze karaciğer ile yeni larva alımı sağlandı. Yeni larva alımı ile iki sonuç elde edildi; yeni kafes oluşturmak için pupaya larvalı karaciğerler konuldu (yeni pupa kapları oluşturuldu) ve alınan larvalar taze karaciğer ile beslenerek Instar 2 ve 3 maggotlar elde edildi.

Yukarıda bahsedilen yöntem uygulanarak, hem çalışmada kullanılacak uygun evredeki maggotlar elde edilmiş hem de yaşam döngüsünün devamlılığı sağlanarak üretime devam edilebilmiştir.

3.2.3 Maggot Sıvısı Eldesi

Maggot ES'lerini elde etmek için Barnes ve arkadaşları (41) ile Doğandemir (94)'in teknikleri denenmiştir. Gerek akım sitometrisi ile dilüsyonel antimikrobiyal analiz ve gerekse de protein analizi için yeteri kadar ES elde edilemediğinden tüm vücut sıvısı (TVS) incelemesinin daha uygun olacağı değerlendirildi.

İklim odasında karaciğer ile beslenip Instar 2 ve 3 evresine ulaştırılan larvalar, karaciğerler üzerinden dikkatle toplanarak 50 ml'lik steril santrifüj tüplerinin içerisine yerleştirildi. Başka bir kaba yerleştirilen karaciğerler üzerine 0,5 McFarland bulanıklık standardında hazırlanmış *S.aureus* ATCC 25923 ve *E.coli* ATCC 25922 döküldü. Böylece "sanal" bir enfekte yara ortamı yaratıldı. Tüplerdeki maggotlar, bu kapların içerisine döküldü ve kaplar, maggotların bakteriler ile karaciğerden en iyi koşullarda beslenmeleri için buhar ve sıcaklık koşulları sabit (37°C) etüv içerisinde 24-48 saat bekletildi. Süre sonunda maggotlar tekrar toplandı, süzgeçli tülbentin içerisine konuldu. Maggotlar, öncelikle %0,9 NaCl çözeltisi ile yıkandı ve tülbentten çıkartılmadan önceden steril edilmiş kurşun havan içerisinde dövülerek ezildi. Çıkan sıvı steril pastör pipetleri ile steril 50 ml'lik santrifüj tüplerinin içerisine konuldu ve tüplere daha önce sterilize edilmiş 4 mm'lik cam boncuklar konuldu. Santrifüj tüpleri en az iki dakika vortekslendi ve 13,000 rpm hızında 10 dk santrifüj edildi. Santifüj sonunda, dipteki pellet ile üst kısımda oluşan katı tabaka arasındaki koyu renkli, ancak berrak sıvı faz elde edilerek sonraki işlemler bu sıvı ile yapıldı. Sıvılar alınmasını müteakip aynı gün içerisinde mutlak surette çalışıldı.

3.2.4 Bakteri Suşlarının Canlandırılması ve Saflık Kontrolü

Çalışmada, -80°C'lik derin dondurucuda, uygun koşullarda, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde saklanan *P.aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922, *E.faecalis* ATCC 29212 ve *S.aureus* ATCC 25923 suşları; steril pamuk uçlu silgeçler yardımıyla %5 koyun kanlı agara ekildi ve agarlar, 24 saat %5 CO₂ atmosferli etüvde inkübasyona tabi tutuldu. 24 saat sonraki kontrolde üreyen mikroorganizmaların saflığı kontrol edildi ve saf olmayan üremeler pasajlanarak saf hale getirildi.

3.2.5 Antimikrobiyal Etki Tespiti

3.2.5.1 Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği, EUCAST (90) ve CLSI (91) ölçütleri ile Doğandemir'in çalışması (94) incelenerek düzenlendi. Hem CLSI hem EUCAST için, bakteriyolojik çalışmalarda kullanılan besiyeri, Mueller-Hinton agardır. Sterilizasyon kontrolü yapılmış, fabrikasyon ile dökülmüş Mueller-Hinton agar plaklarından rastgele seçilen dört tanesine; *P.aeruginosa*, *E.coli*, *E.faecalis*, *S.aureus* suşları ekilerek pozitif kontrole ve dört tanesi ise boş olarak etüvde 48 saat bekletilerek kontaminasyon kontrolüne tabi tutuldu.

Her bir plak camayazar kalem ile ikiye bölündü ve böylece agarın bir tarafına TVS, diğer tarafına antibiyotik diski konulabilmesi olanağı sağlandı. Antibiyotik içermeyen steril diskler ve steril pamuk uçlu silgeçler kullanılarak, çalışılacak plakların TVS konulacak tarafının üzerinde 6-8 mm'lik delikler açıldı.

Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği için, agar plaklarına sürüm aşamasında kullanılmak üzere, bakteriler için triptik soy buyyon (TSB), mantar için ise %0,9 luk NaCl çözeltisi kullanıldı. TSB tozu, üretici firmanın talimatları doğrultusunda suda çözünerek kaynatıldı ve daha önceden hazırlanmış ağzı kapaklı 10 ml'lik cam şişeler içerisinde beşer ml olacak şekilde dağıtıldı. Şişeler, ağızlarının tam kapalı olduğu tekrar kontrol edilerek, 121°C'de 15 dakika otoklav ile sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. GATA Eczacılık Bilimleri Merkezinden elde edilmiş %0,9'luk NaCl çözeltisi ise, daha önceden

otoklavda 121°C'de 15 dakikada steril hale getirilmiş cam tüplere, steril enjektör ile beşer ml'lik eşit hacimlerde konuldu.

Pseudomonas aeruginosa, *E.coli*, *E.faecalis*, *S.aureus* bakterileri TSB içerisinde 0,5 McFarland olacak şekilde hazırlandı. Mueller-Hinton agar plaklarına, steril pamuk uçlu silgeç ile üç yönde 60 derecelik açıyla sürüm yapılarak, bakterinin agar üzerinde her yere eşit dağılması sağlandı. 50 µl TVS, agarlar üzerinde açılan deliklere konuldu. Gram negatif bakteriler için 10 µg meropenem ile 10 µg kolistin diski, *S.aures* için ise 30 µg vankomisin ile 10 µg linezolid diski plakların diğer yarımalarına yerleştirildi. Etüv sıcaklığının TVS üzerindeki muhtemel etkisini bertaraf etmek için; aynı işlemler yapılarak ikinci bir plak grubu oluşturuldu ve bir grup 37°C'de atmosfer havasında, diğer grup ise 30°C'de atmosfer havasında inkübe edildi.

Plaklar 24 saat sonra kontrol edildi ve TVS ile antimikrobiyallerin çevresinde oluşan inhibisyon alanları ölçüldü.

3.2.5.2. Akım Sitometrisi

Maggotlardan elde edilen TVS'lerin antibakteriyel etkinliğinin akım sitometrisi ile tespiti amacıyla ilk önce testte kullanılacak boyalar için stok solüsyonlar hazırlandı. Boya olarak canlı veya ölü ayırt etmeksizin tüm bakterilerin DNA'larına bağlanabilen thiazole orange (TO) ile sadece hücre zar bütünlüğü bozulmuş ölü veya ölmek üzere olan bakterilerin DNA'larına bağlanabilen propidium iodide (PI) boyları seçildi. 250 mg TO, 50 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde, 10 mg PI, 10 ml distile suda çözülerek stok solüsyonlar elde edildi. Stok solüsyonlardan seri dilüsyonlar yapılarak 420 nM derişimde TO, 48 µM derişimde PI çalışma solüsyonları hazırlandı (104).

Çalışmada, -80°C'de saklanan bakteri izolatları %5'lik koyun kanlı agar besiyerine pasajlanarak normal atmosfer şartlarında 37°C'de 18–24 saat inkübe edildi. Taze ve identik bakteri kolonilerinden 1–2 tanesi alınıp 4 mm'lik TSB bulunan cam şişelerin içerisine inoküle edildi. Bakteri inoküle edilmiş şişeler, 37°C'lik etüvde 0,5 McFarland bulanıklık oluşturacak yoğunluğa (5×10^8 cfu/ml) gelene kadar bir iki saat süre ile inkübe edildi. Bakterinin logaritmik üreme fazını aşmaması için inkübasyon süresi en fazla iki saat olacak şekilde ayarlandı (105). Bulanıklık standardının 0,5

McFarland değerini aşması durumunda vorteks işlemleri yapılmadan dilüe edilerek tekrar McFarland ölçümü yapıldı.

Tüm vücut sıvıları, hızlıca işleme alındı. Her test edilecek bakteri için, içlerinde ikişer ml TSB bulunan altı tüp hazırlandı. TVS'lerden alınan 2 ml, ilk tüpe eklendi ve 1/2 dilüsyonu elde edildi. Devam eden dilüsyonlarla, 1/4 dilüsyonundan 1/64 dilüsyonuna kadar olacak şekilde beş dilüsyon elde edildi. Her dilüsyon için her şişeye ayrı ayrı 20 µl 0,5 McFarland standardındaki bakteri solusyonlarından eklendi. Böylece bakteriler 1/100 oranında dilüe edildi ve her şişede 10^6 cfu/ml bakteri olması sağlandı. Hazırlanan süspansiyonlar, atmosfer havasındaki 37 °C'lik etüve kaldırıldı ve tümü iki saat inkübasyonda tutuldu. İnkübasyon sonunda, gram negatif bakterilerin dilüsyonları için (10 dilüsyon) 170'er µl karışım solüsyonu (164 µl fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi (PBS) + 2 µl Tween 20 ve 4 µl EDTA), gram pozitif bakteriler için ise (10 dilüsyon) 170'er µl PBS bulunan mikrosantifüj tüplerinin içerisine yirmişer µl TVS'ye maruz kalmış bakteri süspansiyonu ile 2 µl TO ve 8 µl PI eklenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika bekletildi. Aynı işlem pozitif ve negatif kontrollere de uygulandı. Bu şekilde son hacim 200 µl'ye tamamlandı ve bakteriler de 1/10 oranında dilüe edilmiş oldu (106,107).

Süre sonunda boyanma işlemi tamamlanan örnekler, BD Accuri C6 akım sitometrisi cihazı ile analiz edildi. Akım kanalından geçen örnekler, 488 nm dalga boyundaki tek yönlü lazer ışınına maruz bırakıldı. Bu lazerin önünden geçen partiküllerin büyüklük ve boyutları ile ilgili veriler ileri saçılımla (forward scatter - FSC), granül yapısına ait veriler yan saçılımla (side scatter - SSC) 488 nm dalga boyuna özgü dedektörler tarafından algılandı. Lazer uyarımı sonucu TO'dan saçılan floresans 530/30 nm "band pass" filtreden süzülerek FL1 dedektörü tarafından algılanırken, PI'dan saçılan floresans >670 nm "long pass" filtreden süzülerek FL3 dedektörü tarafından algılandı. Steril distile su, pozitif kontrol ve negatif kontrol kullanılarak yapılan ölçümler sonucunda FSC, SSC, FL1 ve FL3 dedektörlerinden elde edilen veriler FCM arayüzü tarafından analize uygun hale getirildi. Yapılan analiz sonucunda TO'dan saçılan ve FL1 dedektörü tarafından algılanan floresans miktarının içerisinde, PI'dan saçılan ve FL3

dedektörü tarafından algılanan floresans miktarının yüzdeleri hesaplanarak her bakteri türü için kapı (gate) protokolü oluşturuldu ve 20 seri dilüsyon, bu protokollere göre değerlendirildi. Her örnek tüpü için 10.000 şekilli eleman sayıldı. Böylece her dilüsyona ait bakteri ölüm yüzdeleri hesaplanarak maggotlardan elde edilen TVS'lerinin hangi derişiminin hangi tür bakterinin oransal olarak yüzde kaçını öldürdüğü saptandı.

3.2.6 Protein Analizi

3.2.6.1 Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

(<http://www.cytographica.com/lab/acryl2.html> ile hesaplandı)

Elektroforez için hazırlanan solüsyonlar;

- Solüsyon 1: %30 Akrilamid/Bis-Akrilamid Çözeltisi (300 ml)

87,5 g akrilamid

2,4 g N,N'-metilen-bis-akrilamid

Toplam hacim 300 ml'ye tamamlandı ve 0,45 µm'lik filtreden geçirildi.

Karışım, karanlıkta 4°C'de saklanabilir.

- Solüsyon 2: 1,5 M Tris-HCl, pH:8,8 (150 ml)

27,23 g trizma base, 80 ml distile suda çözündü. pH'yi 8,8'e ayarlamak için 1M HCl kullanılır. Ayarlama sonrası distile su ile toplam hacim 150 ml'ye tamamlandı. Karışım karanlıkta 4 °C'de saklanabilir.

- Solüsyon 3: 0,5 M Tris-HCl, pH:6,8 (100 ml)

6 g Trizma Base 60 ml distile suda çözündü. pH'yi 6,8'e ayarlamak için 1M HCl kullanıldı ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Karışım karanlıkta 4°C'de saklanabilir.

- Solüsyon 4: %10 SDS Çözeltisi (100 ml)

10 g SDS 100 ml distile su içerisinde çözöldü

- Solüsyon 5: 5X Elektroforez Tamponu (600 ml)

300 ml konsantre 10 X Tris-Glisin-SDS tampondan, 300 ml distile su ile karıştırılarak %50 oranında seyreltili.

- Solüsyon 6: %0,05 Bromfenol Mavisi Çözeltisi (10ml)

5 mg toz halindeki bromfenol mavisi, 10 ml distile su içerisinde çözündü.

- Solüsyon 7: %10 Amonyum Persülfat Çözeltisi (10 ml)

1 g amonyum persülfat 10 ml distile su içerisinde çözöldü

- Solüsyon 8: 4X Örnek Yökleme Tamponu (8 ml)

4 ml distile su

200 µl Solüsyon 6

1,6 ml Solüsyon 4

1 ml Solüsyon 3

800 µl gliserol

400 µl 2-b-merkaptoetanol

- Solüsyon 9: %12'lik Ayırıcı Jel (Seperating Gel) Hazırlanması (8 ml)

2,6 ml deiyonize su

2 ml Solüsyon 2

80 µl Solüsyon 4

3,2 ml Solüsyon 1

80 µl Solüsyon 7

8 µl TEMED

Not: TEMED işleminden hemen önce eklenmiştir. Solüsyonun önceki kısmı karanlıkta 4 °C'de saklanabilir.

- BioRad 2-D Starter Kit içeriğindeki kitler, üretici firma talimatlarına göre hazırlandı.

Boyama işlemleri için hazırlanan solüsyonlar;

- Boya Solüsyonu 1 (BS1); Fiksasyon Solüsyonu: 50 ml etanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml deiyonize su karıştırılarak hazırlandı.
- BS2; %30 Etanol Solüsyonu: 30 ml etanol ve 70 ml deiyonize su karıştırılarak hazırlandı.
- BS3; “Sensitizer” Solüsyonu: 1 ml ProteoSilver Sensitizer ile 99 ml deiyonize su karıştırılarak hazırlandı.
- BS4; Gümüş (Silver) Solüsyonu: 1 ml ProteoSilver Solüsyonu ile 99 ml deiyonize su karıştırılarak hazırlandı.
- BS5; “Developer” Solüsyonu: 5 ml ProteoSilver Developer 1 ile 100 µl ProteoSilver Developer 2, 95 ml deiyonize su ile karıştırılarak hazırlandı.

3.2.6.2 Protein Analizi (2-D PAGE)

İşlem öncesinde elektroforez jeli hazırlandı. Dikey elektroforez cihazının cam plakaları, öncelikle %70’lik etanol, sonrasında deiyonize su ile yıkandı. Oda sıcaklığında kurumaları sağlandıktan ve cam plakalar arasına ayırıştırıcılar (spacer) konulduktan sonra, plakalar cihazdaki yerlerine, kısa cam çalışan kişiye bakacak şekilde yerleştirildi. Plaka tutucusu kilitlendi ve sızdırmazlık kontrolleri yapıldı.

Ön işlemlerden sonra, daha önce hazırlanmış, ancak TEMED eklenmemiş Solüsyon 9’a (%12’lik Ayırıcı Jel) 8 µl TEMED eklenerek hafifçe karıştırıldı. Solüsyon 9’un son hali, cam plakalar arasına üstten 2 cm’lik boşluk kalacak şekilde 1 ml’lik otomatik pipet yardımıyla boşaltıldı. Jelin üstten pürüzsüzlüğünü sağlamak amacıyla kalan 2 cm’lik bölüm bütanol ile dolduruldu. En az 20 dakika oda sıcaklığında

beklendikten sonra, emici bir filtre kağıdı ile üstteki bütanol uzaklaştırıldı ve üst kısım deiyonize su ile yıkandı.

a. Protein Hazırlığı:

Tüm vücut sıvılarının santrifüjü sonrasında, sıvı içerisindeki oranları sırasıyla %5 ve %2 olacak şekilde 2-b merkaptetanol ve amfolit (pH 3-7) eklendi (108) ve tekrar vortekslendi. 13,000 rpm hızında 10 dakika tekrar santrifüj sonrası kalan süpernatant, eşdeğer miktarda %1 SDS solüsyonu ile muamele edildi ve artık inceleme için hazır durumuna getirildi. Çözünmeyen son materyalleri ortadan kaldırmak amacıyla 20,000 rpm hızında 15 dakika 15°C'de santrifüj tekrarlanarak süpernatant alındı (SDS, iki boyutlu elektroforez sonuçlarını etkilememektedir).

b. IPG Striplerinin Rehidrasyonu ve Fokuslaması:

[Rehidrasyon Buffer (RB): 8 M Üre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, %0,2 Amfolitler ve Bromfenol Mavisi içeren buffer çözeltisi]

Çalışmada, 11 cm lik IPG stripleri için; 200 µg numune, bir rehidrasyon tepsisinin (tray) bir gözünün içerisine bir baştan bir başa olacak şekilde boşaltıldı. Aynı şekilde, eşdeğer miktarda RB de rehidrasyon tepsisinin gözlerine yüklendi. IPG stripleri, plastik koruyucu materyallerinden sıyrılarak serbest hale getirildi ve bir forceps yardımıyla plastik koruyucudan ayrılan yüz (jel yüzü) ile temas etmeyerek ve sribin negatif tarafından tutuldu. IPG stripleri, rehidrasyon tepsisinin gözlerine aynı yük aynı tarafa (gözün pozitif işaretli tarafına IPG sribinin de pozitif kutbuna denk) gelecek ve jel yüzü tabana bakacak şekilde yerleştirildi. Bu işlem sırasında hava kabarcıkları oluşmamasına özen gösterildi. Rehidrasyon tepsisinin gözleri, Protean IEF-Cell cihazına yine kutuplar denk gelecek şekilde yerleştirildi ve sribin üzerini tamamen örtecek şekilde mineral yağı kullanıldı. Stripler, üretici firmanın talimatları doğrultusunda pasif rehidrasyon için, 12 saat boyunca rehidrasyon işleminde bırakıldı.

Çalışmada, 12 saatlik rehidrasyon sonunda, stripler, yine negatif kutuplarından alınarak, ters yüz edilip, jel yüzü yukarı bakacak (serbest olacak) şekilde kuru filtre kağıdının üzerine yerleştirildi. Strip üzerinde kalan mineral yağı alabilmek için bir başka filtre kağıdı ile nazikçe jel yüzü temizlendi. IPG stripleri, yine jel yüzleri tabana bakacak şekilde fokuslama tepsisine yerleştirildi. Stripler üzerine 2-3 ml mineral yağı konularak striplerin üstleri kapatıldı ve tepsi yine Protean IEF-Cell cihazına yerleştirildi. Üretici firma önerileri doğrultusunda 11 cm'lik IPG stripleri için üç aşamalı programlama yapıldı ve IEF başlatıldı. IEF sonrası striplerden mineral yağının süzülebilmesi için, stripler dikey olarak forceps yardımı ile tutularak 5-10 saniye bekletildi.

c. Dengeleme ve İki Boyutlu Elektroforezin Yürütülmesi

[Equilibration Buffer-1 (EB-1): 6 M Üre, %2 SDS, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), % 20 Gliserol, % 2 DTT + işlem öncesi 13.35 ml % 30 Gliserol eklenmiştir.]

[Equilibration Buffer-2 (EB-2): 6 M Üre, %2 SDS, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), % 20 Gliserol + işlem öncesi 13.35 ml % 30 Gliserol ve 0,5 g iyodoasetamit eklenmiştir.]

Çalışmada IEF sonrası, stripler bu kez jel yüzleri yukarı bakacak şekilde gözlere yerleştirildi. 4 ml EB-1, her strip gözüne konuldu ve tepsi, karıştırıcı (shaker) üzerinde 15 dakika bekletildi. Müteakiben, EB-1 döküldü ve 4 ml EB-2 konularak tepsi yine 15 dakika karıştırıcı üzerinde bekletildi ve EB-2 de döküldü. Bu aşamada, IPG stripleri jelde yürütme işlemleri için artık hazırdır.

Stripler negatif kutuplarından tutularak alındı ve daha önce SDS-PAGE için de kullanılmış olan elektroforez tamponu içerisine daldırılarak hafifçe yıkandı. Böylece EB-1 ve 2 tamamen strip yüzeylerinden uzaklaştırıldı. Stripler, SDS-PAGE jeli üzerine, stribin jel yüzü dışarı bakacak şekilde hafifçe bastırılarak yerleştirildi. Stribin, SDS-PAGE üzerindeki konumunun ortalanmasına dikkat edildi. Protein standardı kit içerisinden çıkartılarak, jel

üzerindeki kuyucuk büyüklüğünde kesildi ve referans olarak kullanılacak ilk kuyucuğa yerleştirildi. IPG stribinin ve protein standardının SDS-PAGE jeli üzerine yapıştırılabilmesi için; mikrodalga fırında kaynayana kadar ısıtılıp, dokunulabilecek seviyede soğutulan PROTEAN Plus Overlay Agarose (sıvı) ile, IPG stribi ve kuyucuklar üzerine bir geçiş yapılarak, stripler jele biraz daha bastırılarak ittirildi. Bu şekilde kalan hava kabarcıkları da bertaraf edildi.

İşlem sonrası, jel kasedi hazneden çıkartıldı ve üzerindeki tampon çözeltiler boşaltıldı. Bir forceps yardımı ile jel ile kaset birbirinden ayrıldı. Yine forceps yardımıyla IPG stribi uzaklaştırıldı. Jel, “Criterion SDS-PAGE Elektrophoresis Cell” kasedi üzerine yerleştirildi ve kaset, Criterion SDS-PAGE Elektrophoresis Cell haznesi içerisine konuldu. Hazne, elektroforez tamponu ile dolduruldu. Elektrot girişleri takıldı ve 60-70 dakika 200 V ile elektroforez işlemi başlatıldı.

d. Boyama İşlemleri:

- Elektroforez sonrasında, sistemin elektrik bağlantısı kesilerek, tank içerisindeki jelli bölme çıkartıldı. Jel dikkatlice camlardan ayrıldı ve durgun deiyonize suda yıkandı.
- Bu aşamadan sonra boyama öncesinde proteinleri sabitlemek için jel, en az 40 dakika 100 ml BS1 içerisinde bekletildi.
- Takibinde, BS1 solüsyonu döküldü ve jel bu kez 10 dakika 100 ml BS2 içerisinde bekletildi.
- Süre sonunda BS2 solüsyonu da döküldü ve jel 200 ml deiyonize su içerisinde tutularak yıkandı.
- Su dökülerek jel, 100 ml BS3 solüsyonu içerisinde 10 dakika bekletildi.
- BS3 solüsyonu döküldü ve iki kez onar dakika olacak şekilde 200'er ml deiyonize su ile yıkama yapıldı.
- Jel, 100 ml BS4 ile 10 dakika bekletildi.
- BS4 ardından, 200 ml deiyonize su ile 1-1,5 dakika (en fazla 1,5 dakika) süre ile yıkama yapıldı.

- Jel, 100 ml BS5 ile en fazla 10 dakika olacak şekilde muamele edildi.
- Son aşamada, BS5 dökülmeden, solüsyon içerisine 5 ml ProteoSilver Stop Solüsyonu eklenerek 5 dakika bekletildi.
- Son karışım dökülerek jel, 15 dakika boyunca 200 ml deiyonize suda bekletilerek yıkandı.

3.2.7 Sonuçların Değerlendirilmesi

3.2.7.1 Antibakteriyel Etki Tespiti

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile TVS'lerin konulduğu kuyucukların çevresinde inhibisyon alanının oluşması, test edilen mikroorganizmaya karşı etkinlik olduğunun göstergesidir. Ancak bu sonuç, standardizasyon sorunları nedeniyle doğrulamaya muhtaçtır. Öte yandan, bir etkinlik olduğunu, ancak bunun doz bağımlı olabileceğine işaret etmektedir.

Doğandemir'in çalışmasında (94) disk difüzyon testi sonuçları mikrodilüsyon yöntemiyle doğrulanmış olduğundan; çalışmamızda, "Akım Sitometrisi" ikincil yöntem olarak test edildi. Akım sitometrisi ile canlı mikroorganizmalar ile antimikrobiyale maruz kalmış mikroorganizmalar, özgül olarak ayırt edilebildiğinden iki yöntemin birbirini desteklemesi beklenmektedir. TVS'lerin antibakteriyel etkinliği, akım sitometrisi ile daha önce gösterilmemiştir. Akım sitometrisindeki otofloresans (boyanmayan, gözükmeyen hücreler) nedeniyle, Doğandemir'in mikrodilüsyon sonuçları temel alınarak, TVS'lerin konsantrasyonları sırayla düşürüldü ve etkinlik gözlenmeye çalışıldı. Yan saçılım [SSC (Side Scatter)], Ön saçılım [FSC (Forward Scatter)] değerleri ile FL-1 (TO boyası – tüm hücrelere bağlanır) ve FL-3 (PI boyası – ölü hücrelere bağlanır) arasındaki ilişki gözlenerek, TVS'lerin farklı konsantrasyonlarında öldürme oranları gözlemlendi (105-107). Literatür incelemeleri sonucunda; öldürme oranı %20'nin altında ise "antimikrobiyal etkinlik yok (Dirençli - R)" olarak kabul edildi, %20-30 aralığında bakteri antimikrobiyale orta duyarlı (Orta Duyarlı - I), %30'un üzerinde ise duyarlı (S) olarak yorumlandı (109).

3.2.7.2 Protein Analizi

Protein analizlerinin en temelinde yer alan 2-D PAGE ile antimikrobiyal etki gösteren/göstermesi muhtemel TVS proteinlerinin moleküler ağırlık ve pH gradientine göre ayrılması amaçlandı. Jel üzerinde boyalı olarak görülen proteinler, moleküler ağırlık göstergesi (molecular weight size marker) aracılığı ile moleküler ağırlığına ve pH gradientine göre ayırt edildi.

3.2.7.3 Kalite Kontrol

Çalışmalarda kullanılacak izolatların, derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra kontaminasyon kontrolü amacıyla %5 koyun kanlı agara ekimi yapıldı ve 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat süreyle inkübe edildi. Ayrıca, çalışılan tüm katı besiyerleri (hazır veya dökülmüş), pozitif kontrol amaçlı olarak bir *E.coli* ATCC 25922 suşu, bir *S.aureus* ATCC 25923 suşu ve negatif kontrol amaçlı olarak herhangi bir ekim yapılmadan 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat süreyle inkübe edildi.

Kullanılan antibiyotik diskleri, bir *E.coli* ATCC 25922 suşu ve bir *S.aureus* ATCC 25923 suşu ile EUCAST ölçütlerine göre Mueller-Hinton agar ile antibiyogram işlemine tabii tutularak kontrol edildi.

Akım sitometrisinde, bir pozitif ve bir negatif kontrol kullanılarak cihazın çalışması doğrulandı.

2-D PAGE işleminde, işlem sırasında, moleküler ağırlık göstergesi kullanılarak pozitif kontrolü, deiyonize su kullanılarak negatif kontrol sağlandı.

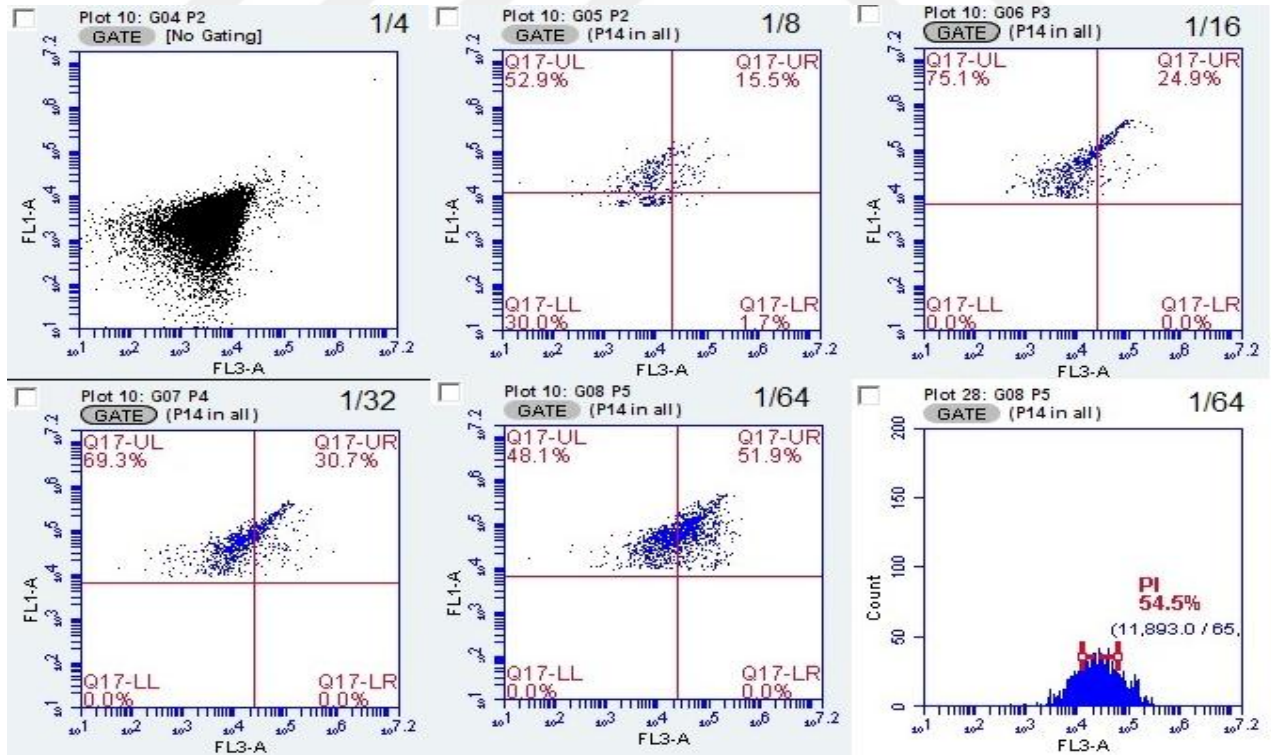
4. BULGULAR

4.1 Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi

Yapılan disk difüzyon test sonucunda, *P.aeruginosa* bakterisine ait ölçülebilir herhangi bir inhibisyon alanı gözlenmemiştir. *E. feacalis*, *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerinde ise sırasıyla 14 mm, 16 mm ve 22 mm çapında inhibisyon alanı olduğu gözlenmiştir (Tablo 2).

4.2 Akım Sitometrisi

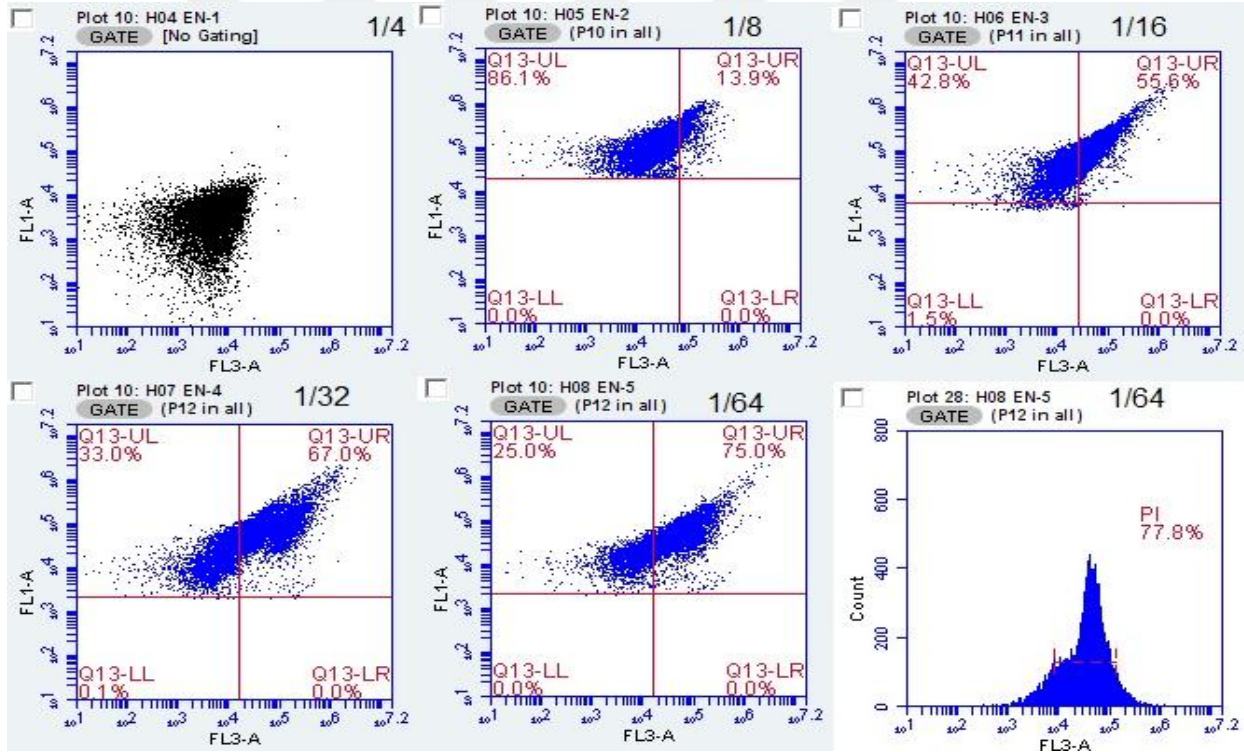
Akım sitometrisi analizine ait değerler, Tablo 2 ve 3'de verilmiştir. Akım sitometrisi sonucunda, *P.aeruginosa* suşu için, 1/2 ve 1/4 dilüsyonunda otofloresans nedeniyle canlı veya ölü bakteriler gözlenememiştir. 1/8 dilüsyonunda etkinlik görülmezken (R) (%15,5), 1/16 dilüsyonunda orta duyarlı (I) (%24,9), 1/32 ve 1/64 dilüsyonlarında ise duyarlı (S) (sırasıyla %30,7 ve %51,9) sonuçlar alınmıştır (Şekil 3).



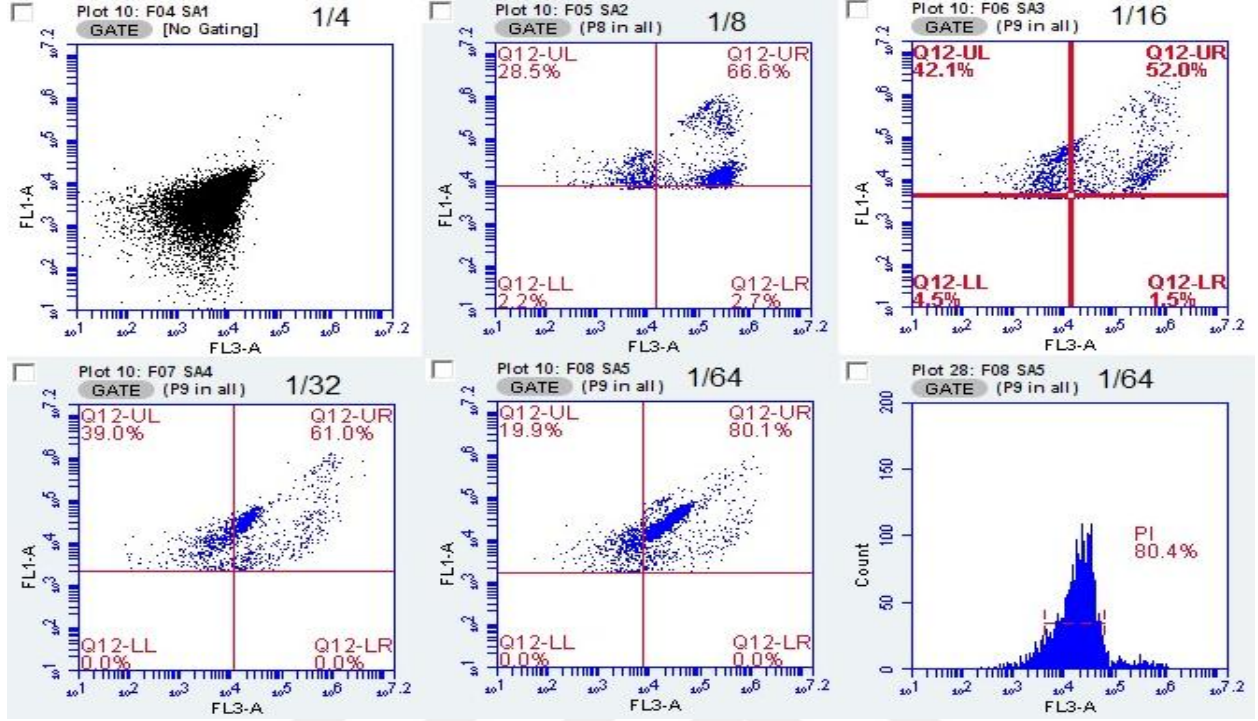
Şekil 3: *Pseudomonas aeruginosa*'nın Akım Sitometrisi Sonuçları (Dilüsyonlar, resimlerin sağ üstündedir)

E. faecalis için, TVS'lerin 1/2 ve 1/4 dilüsyonunda otofloresans nedeniyle canlı veya ölü bakteriler gözlenememiştir. 1/8 dilüsyonunda etkinlik tespit edilmemiştir (R) (%13,6). 1/16 dilüsyonunda %55,6 (S), 1/32 dilüsyonunda %67 (S) ve 1/64 dilüsyonunda %75 (S) öldürme oranı gözlenmiştir (Şekil 4).

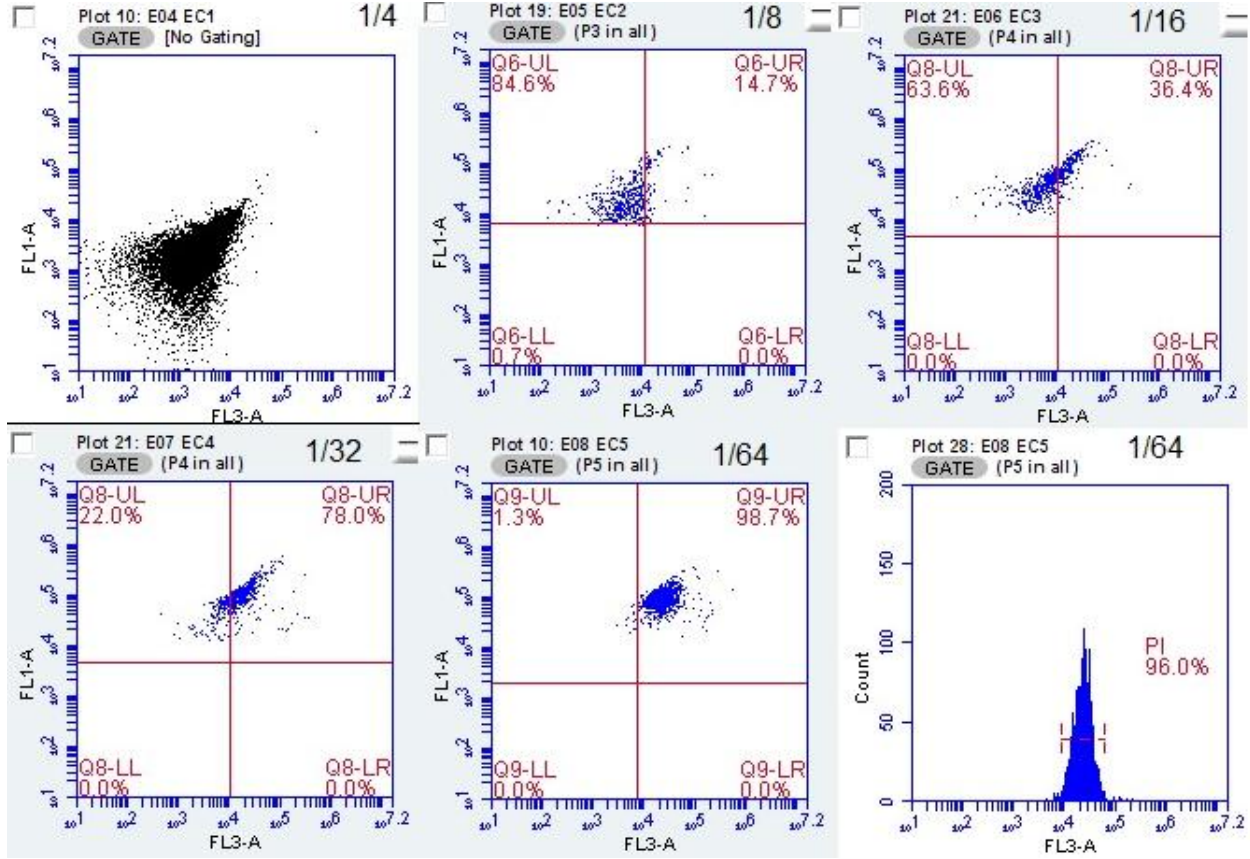
S.aureus için, TVS'lerin 1/2 ve 1/4 dilüsyonunda otofloresans nedeniyle canlı veya ölü bakteriler gözlenememiştir. Ancak, 1/8 dilüsyonunda %.66,6 (S), 1/16 dilüsyonunda %52 (S), 1/32 dilüsyonunda %61 (S) ve 1/64 dilüsyonunda %80 (S) öldürme oranı gözlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 4: *Enterococcus faecalis*'in Akım Sitometrisi Sonuçları (Dilüsyonlar, resimlerin sağ üstündedir)



Şekil 5: *Staphylococcus aureus*'un Akım Sitometrisi Sonuçları (Dilüsyonlar, resimlerin sağ üstündedir)



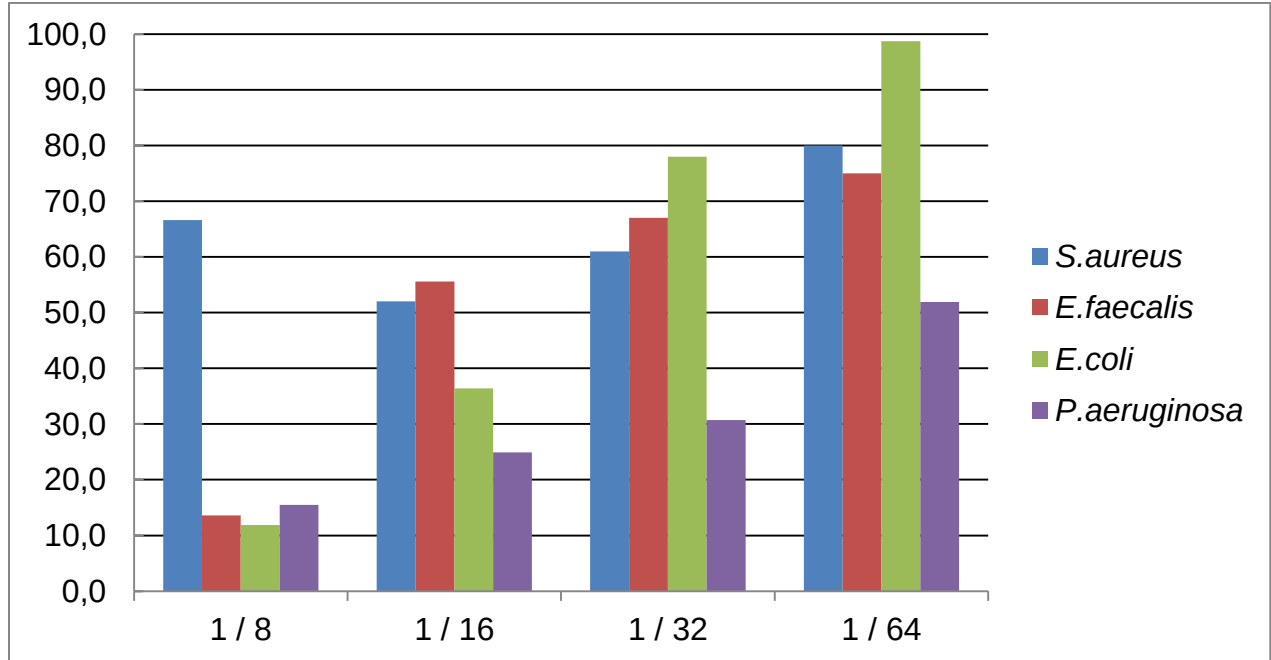
Şekil 6: *Escherichia coli*'nin Akım Sitometrisi Sonuçları (Dilüsyonlar, resimlerin sağ üstündedir)

E. coli için, TVS'lerin 1/2 ve 1/4 dilüsyonunda otofloresans nedeniyle canlı veya ölü bakteriler gözlenememiştir. Ancak, 1/8 dilüsyonunda %11,9 (R), 1/16 dilüsyonunda %36,4 (S), 1/32 dilüsyonunda %78 (S) ve 1/64 dilüsyonunda %98,7 (S) öldürme oranı gözlenmiştir (Şekil 6).

Tablo 2: Akım Sitometrisi ve Disk Difüzyon Testi Sonuçları

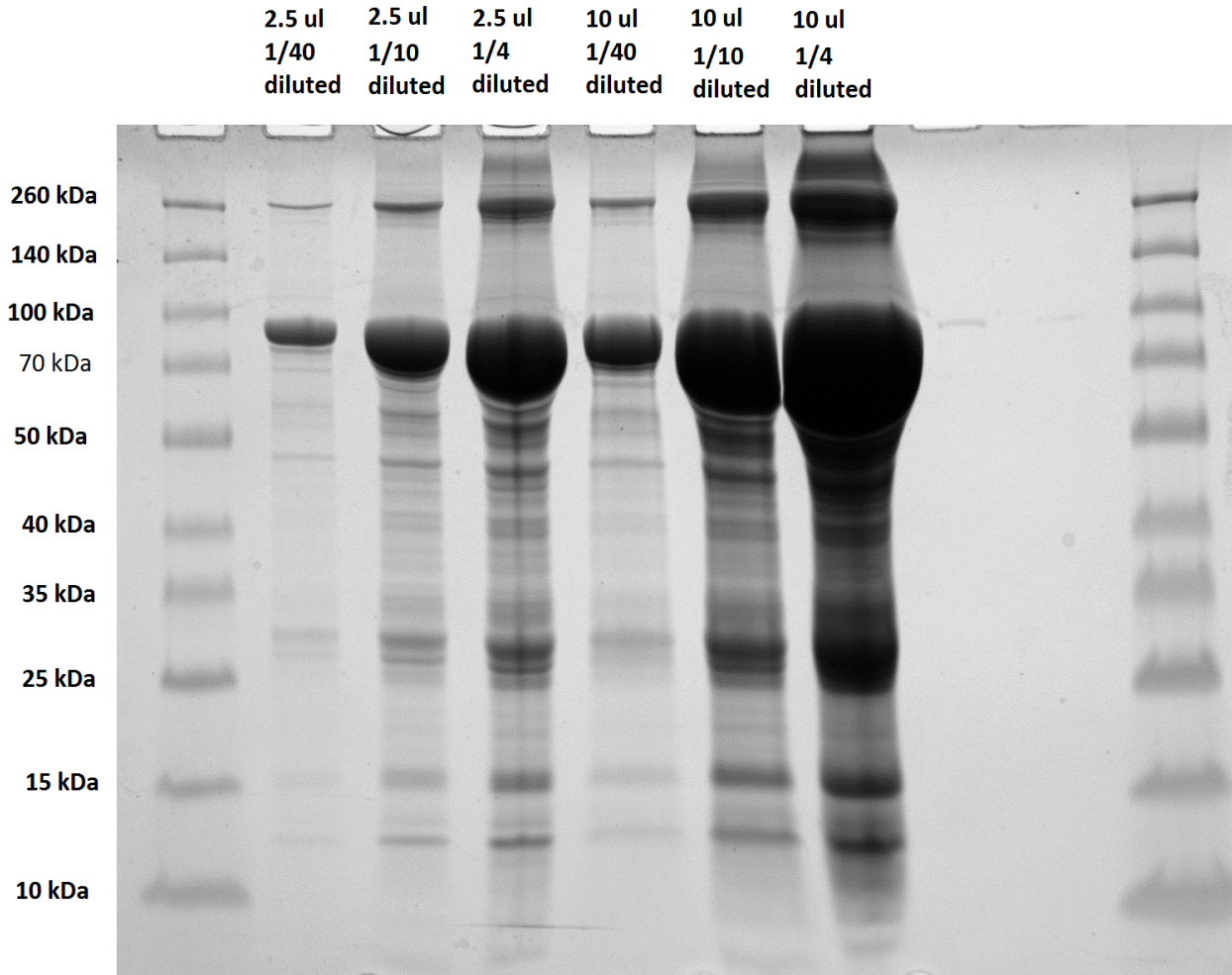
Dilüsyonlar	% / Yorum							
	<i>S.aureus</i>		<i>E.faecalis</i>		<i>E.coli</i>		<i>P.aeruginosa</i>	
1 / 2	X	X	X	X	X	X	X	X
1 / 4	X	X	X	X	X	X	X	X
1 / 8	66,6	S	13,6	R	11,9	R	15,5	R
1 / 16	52	S	55,6	S	36,4	S	24,9	I
1 / 32	61	S	67	S	78	S	30,7	S
1 / 64	80	S	75	S	98,7	S	51,9	S
İnhibisyon Alanı Çapı	16 mm		14 mm		22 mm		Alan Yok	

X: Otofloresans nedeniyle sonuç alınamamıştır. R: Dirençli, I: Orta Duyarlı, S: Duyarlı

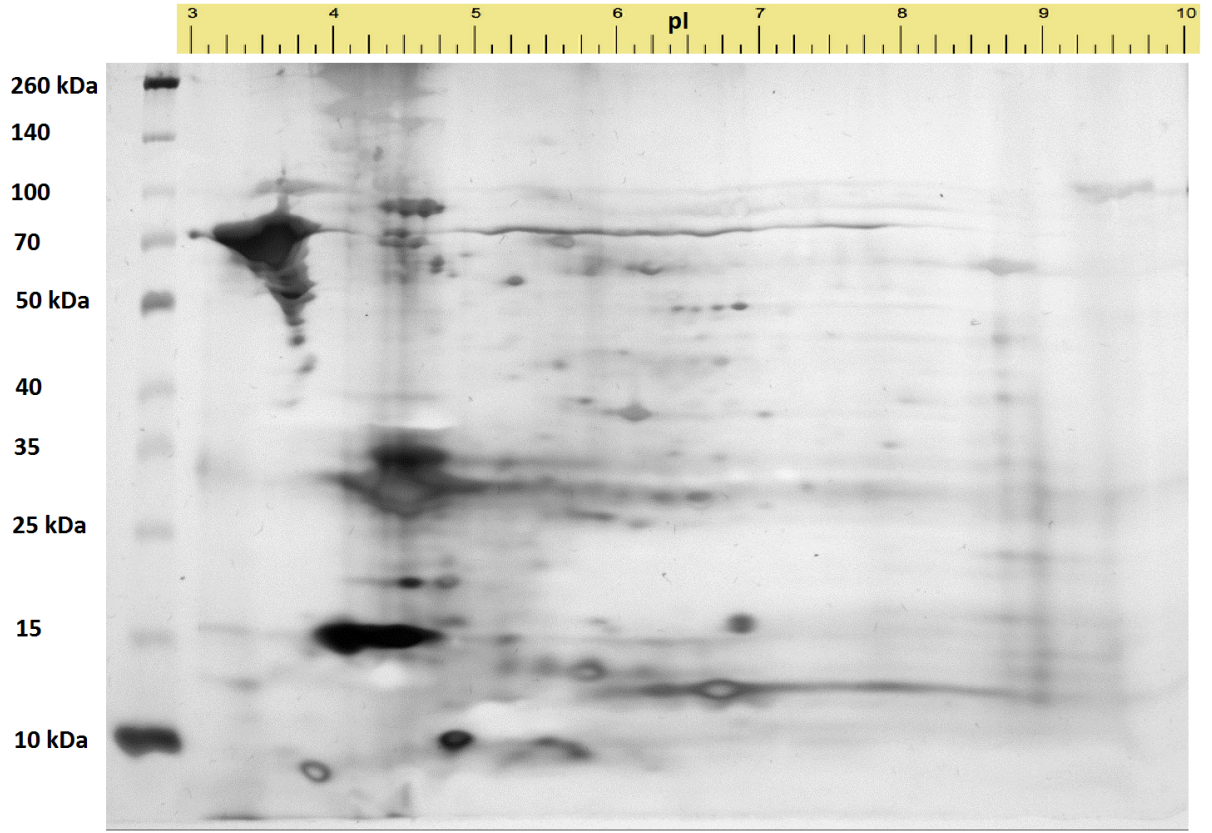
Tablo 3: Dilüsyonlara Göre Akım Sitometrisi Sonuçlarının Toplu Değerlendirmesi

4.3 Protein Analizi (2-D PAGE)

Çalışmada, 2-D PAGE analiz cihazı ile yapılan incelemede elde edilen SDS-PAGE ve 2-D PAGE görüntüleri, Şekil 7 ve 8'de gösterilmiştir. SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlık göstergesi kullanılarak yapılan inceleme ile, 2-D PAGE analizinde pI ve moleküler ağırlık göstergesi kullanılarak yapılan inceleme sonuçları Tablo 4'de gösterilmiştir.



Şekil 7 : Maggot TVS Proteinlerinin SDS-PAGE (1-D PAGE) ile Analizi



Şekil 8: Maggot TVS Proteinlerinin 2-D PAGE ile Analizi

Tablo 4: 1 ve 2-D PAGE ile Tespit Edilen Proteinlerin Özellikleri (kDa ve pI)

SDS-PAGE	2-D PAGE	
Moleküler Ağırlık (kDa)	Moleküler Ağırlık (kDa)	pI
260	260; 33; 72	3
250	12; <10	3.3
240	70	3.5
85	260; 105; 100; 70; 55; 48; 45; 42; 37; <10	3.7
75	30; 15; 8	4
67	260; 120; 87; 75; 70; 68; 60; 40; 35; 20; 15	4.5
60	65; 60; 23; 20; 15; 10	4.8
48	60; 42; 34; 15;12	5.2
40	70; 45; 28; 12; 10	5.5
35	68; 38; 27; 15; 12; 7	5.8
30	68; 45; 37; 30; 25; 14; 13; 12	6.2
27	50; 35; 30	6.5
15	50; 47; 45; 30; 15; 12	6.8
12	50; 38; 30	7
	48; 34	7.5
	40; 34	8
	70; 48; 40; 35; 25	8.7
	30; 25; 23; 15; 14; 13; 12	9

kDa: Kilodalton; pI: İzoelektrik nokta; SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi; 2-D PAGE: İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi

5. TARTIŞMA

5.1 Antibakteriyel Analizler

Çalışmada kullanılan maggotlar, hastalardan alınmamış, laboratuvar koşullarında üretilmişlerdir. Diğer çalışmaların genellikle laboratuvardan steril alınan ve/veya hasta üzerine uygulanmış maggotlar üzerinde yapıldığı göze çarpmaktadır (41,52-55,63,70,94). Ancak bu çalışmada, laboratuvar ortamında üretilen maggotlar, *S.aureus* ve *E.coli* ile enfekte edilmiş sığır karaciğeri üzerine konularak, kendilerini “yara üzerinde” zannetmeleri sağlanmıştır. Bu yöntemi uygulayan başka araştırmacı yoktur. Ancak bu yöntemle; Doğandemir’in çalışmasında (94) bahsedilen, hastadan tek seferde alınan maggotların yeterli miktarda sıvı vermemesi, tüm bakterilere karşı aynı koşullar altında yetişmiş larvaların uygulanamaması, hastaların yara türü ve yara yeri enfeksiyonlarında (etken patojen vb) standardizasyonunun sağlanamaması, hastaların antibiyotik kullanması veya başka bir tedavi daha almaları (hiperbarik oksijen tedavisi gibi) gibi ortak standartlar olmaması gibi benzeri sorunları ortadan kaldırılabilmektedir.

Yara yerinde genellikle tek bir bakteri enfeksiyonu olmaması, olsa bile yara koşullarının sığır karaciğeri ile farklılık gösterebilmesi ihtimali (patojenlerin kolonizasyon ve enfeksiyon kabiliyetinin yara yeri ile karaciğer arasında değişiklik gösterip göstermediğinin bilinmemesi vb), çalışma metodolojisine uymadığından, bu hususlar çalışmamızın kısıtlılıklarıdır. Ayrıca, yara yerinden kantitatif alınacak kültürler ile maggot etkisi altında enfeksiyon etkeninin yara yerinden temizlendiğinin gözlenmesinin mümkün olmaması da çalışmamızın kısıtlılıkları arasındadır.

Yaptığımız disk difüzyon testinin metodolojik olarak standardı bulunmakta, ancak inhibisyon alan çapları konusunda maggot sıvılarının bir standardı bulunmamaktadır. Bu nedenle inhibisyon alanı oluşmadığı için “etkinlik yok” olarak değerlendirilmiş; inhibisyon alanı çapı var ise “doz bağımlı” olabileceği şartı ile “etkinlik olabilir” olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada, *P.aeruginosa* için etkinlik gözlenmemiş, ancak diğer bakterilerde etkinlik saptanmıştır. Bakteri türleri birbirinden farklı olduğundan, inhibisyon

alan çapları arasında ilişki kurmak, alan çapları arası karşılaştırma yapıp göreceli olarak duyarlılığı karşılaştırmak mümkün değildir. Ayrıca, standardizasyonu oluşturulmuş antibiyotikler ile yapılan testlerde bile, disk difüzyon testi *in vivo* etkinliğe karşılık gelmemektedir. Bu nedenle, maggot sıvılarının antibakteriyel etkinliğini araştırmak için ikinci bir yöntem olarak akım sitometrisi çalışılmıştır.

Akım sitometrisi ile maggot ES'lerinin antibakteriyel etkinliğinin gösterilmesi daha önce sınırlı olarak çalışılmıştır. Bexfield ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (52), *S.aureus* ve *E.coli* zerinde ES'lerin etkilerini akım sitometrisi ile değerlendirmişler ve total ES'ler için *S.aureus* bakterisine karşı yoğun bakteriyostatik etki, *E.coli* bakterisinde ise bakteriyosidal etki gözlemişlerdir. Ancak çalışmalarında dilüsyonel yaklaşım uygulamamışlar, düşük konsantrasyon durumundaki antimikrobiyal etkiyi belirlememişlerdir. Ayrıca alışma ES'ler üzerine kuruludur. Çalışmamızda ise TVS kullanılmıştır. Akım sitometrisi ile maggot TVS'leri çalışması konusunda daha önce bir standardizasyon olmadığından, alışmamızda, MİK değerleri için Doğandemir'in çalışması (94) esas alınmıştır. Doğandemir'in mikrodilüsyon analizlerinde, hiçbir bakteri için 1/64'den daha düşük inhibisyon dilüsyonu saptanmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda maggot TVS'lerinin dilüsyonları, her dört bakteri için de 1/64'e kadar ayarlanıp akım sitometrisi ile çalışılmıştır. Akım sitometrisi için aldığımız sonuçlara bakılacak olursa, tüm bakteriler için, 1/8'den 1/64'e kadar olan dilüsyonlarda gittikçe artan oranlarda antimikrobiyal etkinlik tespit edilmiştir. Bu şartlar altında dilüsyonun 1/64'n altına çekilmesi ve daha düşük dilsyonlardaki etkinliğin gözlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda eşik değeri 1/64 tuttuğumuzdan, bu husus, çalışmamızın kısıtlılığıdır. Burada, konsantrasyon dşke antimikrobiyal etkinlikte artış gözlenmesinin iki açıklaması olabilir. Birincisi; maggot sıvıları hakikaten düşük konsantrasyonlarda daha etkili olabilir ki bu durum bir paradokstur. İkinci olarak; 1/2 ve 1/4 konsantrasyonlarında gördüğümüz otofloresans etkisinin, daha düşük konsantrasyonlarda kısmen devam etmesi ve bu nedenle, yüksek konsantrasyonlarda yalancı bir düşük ölüm oranı ortaya çıkmasına (mikroorganizmalar gözlenemediğinden) neden olmasıdır (110). Bu durumda beklendiği üzere konsantrasyon dşke otofloresans etkisi azalacağından, yükselen bir ölüm oranı eğrisi görmek olağandır.

Görülen çelişkinin en olağan açıklaması da bu gibi gözükmetedir. Ancak, her iki ihtimali de gösterebilmek için daha önce belirttiğimiz kısıtlılığımızı (dilüsyonu 1/64 ile sınırlı tutmak) ortadan kaldırmak gerekir. Burada belirtilmesi gereken kritik nokta; tüm bakteriler için çalıştığımız en düşük konsantrasyon olan 1/64 dilüsyonunda bile, bakteriler için “duyarlı” kabul edilecek %30 ölüm oranının üzerinde sonuçlar alınmış olmasıdır. Yani, daha önce bahsettiğimiz “yalancı ölüm oranı artışı eğrisi” var olsa bile, bu durum, maggot TVS’lerin antibakteriyel etkinliğinin düşük konsantrasyonlarda dahi var olduğu gerçeğini değiştirmez.

Van der Plas ve arkadaşlarının *S.aureus* ve *P.aeruginosa* biyofilmlerinin maggot ES’leri karşısındaki çözümlerinin arasındaki süre farkını bildirdikleri çalışmaya bakacak olursak (89), maggot sıvılarının *P.aeruginosa*’ya antibakteriyel etkisi olabilmesi için daha uzun süreli inkübasyon gerekmektedir. Daeschlein ve arkadaşları (111), *S.aureus* ve *E.coli*’ye karşı maggot sıvılarının antibakteriyel etkilerinin zaman içerisinde azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Yani, maggot sıvılarının peptid olması nedeniyle denature olmaları ya da diğer başka mekanizmalar, bu tür çalışmalar için sorun teşkil edebilir.

Çalışmada, *P.aeruginosa* suşu dışındaki tüm suşlarda disk difüzyon testinde inhibisyon alanı oluşmuştur. Yine akım sitometrisi ile alınan sonuçlarda da *P.aeruginosa*’nın ölüm oranları antimikrobiyal etkinliğin kısıtlı olduğuna işaret etmektedir. *P.aeruginosa*, kronik yaralarda, özellikle de yoğun bakım ünitesindeki hastaların enfeksiyonlarında sıklıkla görülen bir mikroorganizmadır. Yaralar üzerinde biyofilm yapabilme özelliği ile çoklu ilaç direnci gösterebilmesi yeteneği de ayrıca karşımıza çıkan önemli sorunlardır (12). Huberman ve arkadaşları (54), maggot vücut sıvılarının, *P.aeruginosa* ile birlikte çok sayıda bakteriye karşı antibakteriyel etkisi olduğunu göstermişler ve hatta çalıştıkları gram negatif bakteriler içerisinde vücut sıvılarının en güçlü antibakteriyel etkisini *P.aeruginosa* üzerinde gördüklerini bildirmişlerdir. Cazander ve arkadaşları (42,88), maggot ES’lerinin *P.aeruginosa* biyofilmleri üzerinde yıkıcı/geriletici etkisini gözlemleyebilmişlerdir. Pöppel ve arkadaşları (112), *L.sericata* üzerinde yaptıkları moleküler analizlerde *P.aeruginosa*’ya karşı antimikrobiyal etkinliğe neden olan çok sayıda peptidin genetik kodlamasını da

ortaya koymuşlardır. Ancak bu peptidlerin tek başlarına antimikrobiyal etkisinin olmasının yanında, güçlü bir sinerjistik etki ile hareket ettiklerini özellikle belirtmişlerdir. Brown ve arkadaşları (113), *L.sericata* larvalarının ES içeriğinde bulunan DNAaz-1 aracılığı ile *P.aeruginosa* biyofilmini yıktığını bildirmişlerdir. Yine Jiang ve arkadaşları (114) da benzer sonuçları yayımlamışlardır. Ekleme gerekir ki; biyofilm formunu oluşturan planktonik dönemdeki bakterilerin antimikrobiyallere karşı çok daha ciddi direnç gösterdiği bilinmektedir (115). Öte yandan, MDT'nin *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türleri ile enfekte yaralarda sınırlı bir etkinlik gösterdiği görüşü de hakimdir (116). Nitekim, Doğandemir'in mikrodilüsyon çalışmalarında da (94), maggotlar hasta yaralarından alınmış olsalar dahi, *P.aeruginosa*'ya karşı bir antimikrobiyal etkinlik gözlenememiştir. Ancak tüm araştırmacıların birleştiği nokta, maggot sıvılarının bakterilere karşı olan etkinliklerinin "provokasyon bağımlı" olduğunu, etkinin ortaya çıkması için bakteri ile larvanın karşı karşıya gelmesi gerektiği yönündedir. Huberman ve arkadaşları (55) ve başka bir çalışmada da Kerridge ve arkadaşları (70), bakteriye maruz kalan larvaların, düşük molekül ağırlıklı antibakteriyel proteinleri hemen (ve steril larvalara göre miktar olarak çok daha fazla) salgıladığını, daha büyük molekül ağırlıklı olanların ise daha sonraki sürelerde üretilerek salgılandığını bildirmişlerdir. Pöppel ve arkadaşlarının çalışması da (112) bu sonucu desteklemektedir. Buradan da çıkan sonuç, maggotların steril hallerindeyken salgılanan ES'ler ile bakteriye maruz kaldıktan sonraki ES'lerin muazzam farklılık gösterdiği ve normalde tespit edilemeyen *P.aeruginosa*'ya yönelik antibakteriyel etkinin bu şekilde ve peptidlerin sinerjistik etkisi ile ortaya çıktığıdır. Çalışmamızda maggot sıvılarını provoke etmek amacıyla *S.aureus* ve *E.coli* kullanmamıza rağmen, çalışmamızın sonuçlarına göre *P.aeruginosa*'ya karşı herhangi etki gözlemlenmemiştir. Bu durum, provokasyonu *P.aeruginosa* bakterisi ile yapmamamızdan kaynaklanıyor olabilir. Bu sonuç da, maggotların, karşı karşıya kaldıkları bakterileri tanımladıklarını, genetik aktivasyonlarını bu yönde belirlediklerini ve onlara has antibakteriyel etkinlik gösteren proteinler üretilip salgıladıklarını düşündürmektedir. Ancak *P.aeruginosa* ve *E.faecalis* konusunda çelişkili veriler veren çalışmalar da ortadadır. Bu durum, farklı çalışmacıların, farklı sıvılarla ve sıvı elde etme yöntemleri ile çalışmalarından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, farklı bakteri suşlarının farklı direnç paternleri gösterenleri dahi dahil edilerek, çalışmaların

genişletilmesi gerekmektedir. Ayrıca, CLSI M26-A ölçütlerine göre “Time-Kill Analizi”nin yapılması ve her bakteri için minimum bakterisidal konsantrasyonun saptanması da antibakteriyel etkinlik değerlendirmesindeki verileri destekleyecektir (117).

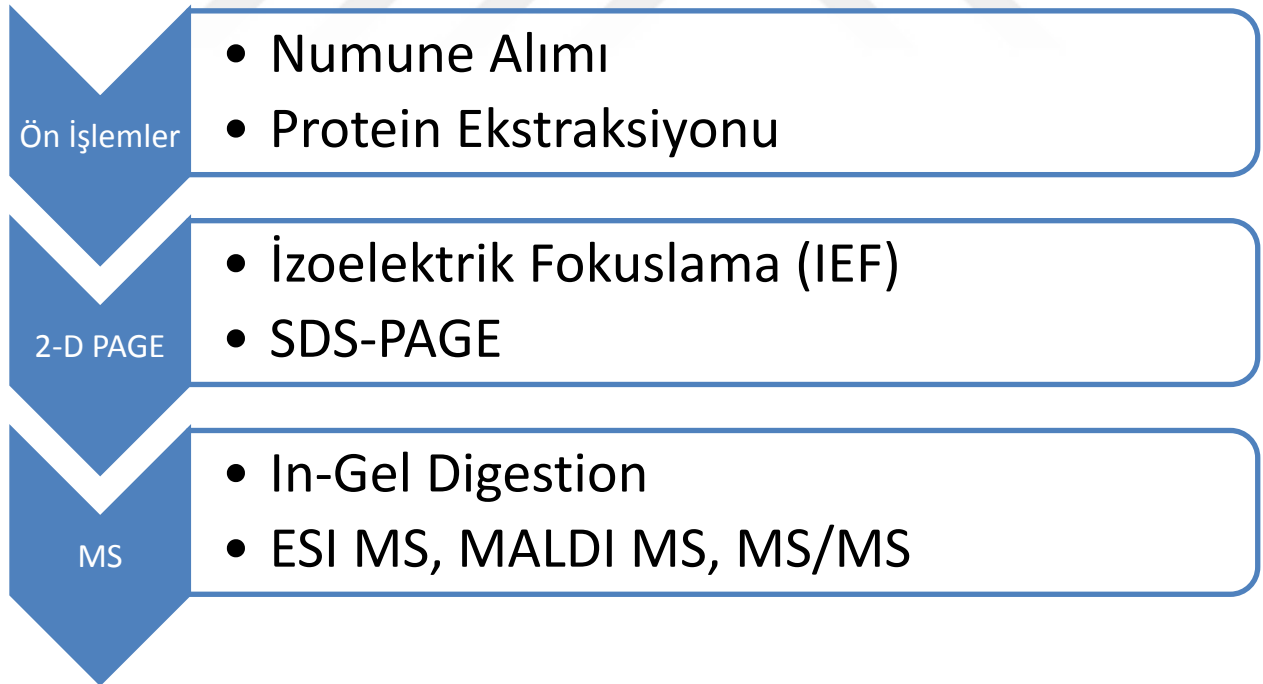
Gram pozitif bakteriler (*S.aureus*, *E.faecalis*) ile *E.coli* için ise sonuçlar son derece olumludur. Doğandemir (94) tarafından daha önce yapılmış olan mikrodilüsyon analizlerinde maggot vücut sıvılarının *E.faecalis* üzerinde etkisiz, *S.aureus* üzerinde yüksek etkili, *E.coli* üzerinde ise orta etkili olduğu gözlenmiştir. Kruglikova ve arkadaşları (56) ile Chernysh ve arkadaşları (71) *L.sericata* larvalarının eksoeksresyonlarının antibakteriyel etkinliklerini *S.aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *E.coli* gibi gram pozitif ve negatif birkaç bakteri üzerinde test etmişler; çeşitli molekül ağırlıklarındaki peptidlerin *E.coli* üzerinde bakteriyostatik, bazı gram negatif bakteriler ve mantarlar üzerinde bakterisidal ve fungisidal ve gram pozitifler üzerinde de bakterisidal etkisini bildirmişlerdir. Cazander ve arkadaşları (42,88) ile Van der Plas ve arkadaşları (89) çeşitli gram negatif ve pozitif bakterilerde bakterisidal etkileri bildirmişlerdir. Bu konudaki genel düşünce, maggot sıvılarının gram pozitif bakteriler üzerinde daha yoğun antibakteriyel etki gösterdiği yönündedir (40,118). Çalışmamızda, *S.aureus*, *E.faecalis* bakterilerine karşı yoğun antibakteriyel etki gözlenmiştir. Ancak öte yandan, *E.coli* bakterisinde de benzer şekilde antibakteriyel etki saptanmıştır. Bu durumda, maggot TVS'lerinin etkilerinin bakteri hücre duvarının temel peptidoglikan yapısından çok, başka mekanizmalar ile etki gösterdiğini veya bakterilerin virülans faktörleri gibi kendisine has durumların bu mekanizmalarda etkili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamız, maggot TVS'leri üzerine yapılmıştır. Ancak, daha önce de belirtildiği üzere, maggotların yara üzerindeki öncelikli faaliyeti “yemek”tir. Bu yeme faaliyetleri sırasında mikroorganizmaları da yemesi, nekrotik dokuyu tüketerek yaranın adeta besiyeri gibi olan niteliğini ortadan kaldırması ve ortamı alkalileştirmesi, *P.aeruginosa* ve diğer bakteriler için antibakteriyel nitelik taşıyabilir (77,119,120). Bu nedenle *in vitro* olan bu deneylerin yanında *in vivo* çalışmaların da yapılması şarttır.

5.2 Protein Analizi

Peptid Kütle Parmakizi [Peptide Mass Fingerprinting (PMS)], proteinlerin ayrıştırılması ve tanımlanmasına yönelik işlemlere genel olarak verilen addır. Proteomiks işlemlerinde, proteinler, ekstrakte edilir, ayrıştırılır, takibinde proteinlere kütle spektrometrisi teknikleri uygulanarak tanımlamaları yapılır (Şekil 9) (121).

Protein ekstraksiyon yöntemleri değişkendir. Özellikle bu çalışmada da olduğu gibi, ökaryotların kompleks proteinlerini ayrıştırmak için iki ayrı ekstraksiyon tekniğini uygulamak idealdir. Çalışmamızda, maggotlar havanda dövülerek mekanik ekstraksiyon, çeşitli kimyasallar ile kimyasal ekstraksiyon yapılmıştır. Bu şekilde iki teknik uygulayarak en saf proteinler elde edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 9: Proteomiks İşlem Sırası

En etkili protein ayrıştırma yöntemlerinden biri, 2-D PAGE'dir. Kolay, tekrarlanabilir ve biyoloji laboratuvarlarına kolayca uygulanabilen bir tekniktir. Birçok firmanın ürettiği kitler ile işlemler daha da kolaylaşmıştır. Gümüş boyama kullanıldığında

tekniknin duyarlılığı daha da artar (her protein bandında 0,5 ng tespit sınırı). Ayrıca, 2-D PAGE, proteinlerin farklı izoformlarını ve modifikasyonlarını da ayırabilir. Geniş spektrumlu IPG stripleri kullanılarak protein spot sayıları artırılabilir ve ayrıca özel arayüzler aracılığı ile spotlarda protein yoğunlukları ve kantitasyonları da çıkartılabilir (121-123). Çalışmamızda, proteomiks işlemleri 2-D PAGE ile sınırlı tutulmuş ve fonksiyonel analiz yapılmamıştır. 2-D PAGE ile pI ve moleküler ağırlığı açısından proteinler ayrıştırılmıştır. Maggot TVS proteinlerinin fonksiyonel olarak ortaya konması için bu aşamadan sonra “in-gel digestion” ve kütle spektrometrisi yapılmalıdır. Protein ID incelemesi ile proteinler tek tek hem yapısal hem de fonksiyonel olarak ayrılmış olur. Burada yapılması gereken ana test, steril maggot TVS ile provoke edilmiş maggot TVS proteinlerinin farklılıklarını çıkarmaktır. Bu şekilde antimikrobiyal etkinliği olan asıl proteinler gözlemlenebilir. Ancak, daha önce de belirttiğimiz gibi, bu proteinleri tek tek belirlemek ve antimikrobiyal etkinliklerini ortaya koymak gerçek etkinliği ortaya koymayacaktır.

Maggot ES'leri ve TVS'leri daha önce birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Chernysh ve arkadaşları (71) gram negatif bakteriler ve mantarlar üzerinde öldürücü etkisi belirtilmiş difterisin (8882 ve 9025 Da) proteinlerini tanımlamışlardır. Krugligova ve arkadaşları ise (56) bu çalışmanın üzerine; 1014, 1128, 1269, 5772, 8631, 8882 ve 9025 Da molekül ağırlıklarında, *E. coli* üremesini engelleyen peptid molekülleri ile molekül ağırlıkları 174-904 Da arasında değişen, düşük molekül ağırlıklı peptidleri izole etmişlerdir. Anti-gram-pozitif etkinin ise 6466 ve 6633 Da ağırlığındaki proteinler ile molekül ağırlıkları 129–700 Da arasında olan, düşük molekül ağırlıklı peptidler aracılığı ile oluştuğu belirtilmiştir (71). Ceřovský ve arkadaşları (72), “Lucifensin” molekülünü tanımlamışlar (4,113.89 Da), bunu “Lucifensin II” (4,127.93 Da) molekülünün izolasyonu izlemiştir (74). Protein analizlerindeki en geniş araştırmalardan birini Andersen ve arkadaşları yapmış (40), BLAST-Protein bankası aracılığı ile lektin, defensin, attacin ve kitin bağlayıcı protein gibi birçok proteini tespit etmeyi başarmışlardır. Valachova ve arkadaşları (75), larvaların, üç farklı serin proteaz, fenil metalloproteaz, sinyal peptid proteaz ve kimotripsin salgılarını ve amplikonlarını göstermiş, bir başka çalışmada da (76) midgut lizozimlerini ortaya koymuşlardır. Tüm bunları Pöppel ve arkadaşlarının (79) “lucimycin” (8,2 kDa) proteinini keşfi izlemiştir. Son olarak yine Pöppel ve arkadaşları

2015 yılında yayımladıkları makalede (113), *L.sericata*'ya ait antimikrobiyal peptid ürettiren 47 gen tespit etmişler ve bu genlerden türettikleri 23 sentetik proteini tanımlayıp test etmişlerdir. Araştırmacılar, 2758 Da'dan 8200 Da kadar "cecropin", "cecropin like", "proline rich", "stomoxyn", "defensin" ve antifungal nitelikte 23 ayrı proteini izole edip antimikrobiyal etkinliklerini çalışmışlardır. Ayrıca, enfeksiyon ile üretim görülen (elevated during infection – edin) proteinleri de kısmen gösterebilmişlerdir. Bu çalışmada beklenen ve gözlemlenebilen ilginç veri ise, proteinleri kombinasyon halinde çalıştıklarında sinerjistik ve additif etkileri de net olarak gösterebilmeleridir. Ayrıca araştırmacılar, protein analizlerini *L.sericata* larvalarının tükrük bezleri, kursak ve bağırsak kısımlarında ayrı ayrı yaptıklarını ve antimikrobiyal peptid sentezinin tükrük bezlerine (yani tükrük salgısına) has bir durum olmadığını belirtmişlerdir. Bahsettiğimiz çalışmalar göstermiştir ki, yeni tanımlanan lucifensin, lucimycin gibi moleküller, salgılanan çok sayıda antimikrobiyal peptidin sadece birkaçıdır. Anlaşılmaktadır ki antimikrobiyal peptidler, hem tek başlarına hem de birbirlerinin etkilerini büyüterek hareket etmektedirler. Bu konuda yapılan başlıca çalışmalar, Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5: Maggot Proteinlerine Yönelik Başlıca Çalışmaların Sonuçları

Peptidler	Moleküler Ağırlık (Da)	Kaynak
Lucifensin	4114	71
Lucifensin II	4128	72, 74
Lucimycin	8200	79
Değişik Peptidler	30 - 9025 arası	56
	2758 - 8200 arası	112
	< 500	52

Çalışmamızda SDS-PAGE analizinde (1-D PAGE) 12kDa'dan 260kDa'a kadar farklı molekül ağırlıklarındaki proteinler gözlenmiştir (Şekil 3). SDS-PAGE görüntüsünde band kalınlıkları ile yoğunlukları (intensity) farklılık gösterdiğinden, bu proteinlerin maggot TVS'ndeki miktarları/konsantrasyonlarının da farklılık gösterdiğini yorumlamak mümkündür. Aynı yorum, 2-D PAGE analizinde de yapılabilir. Ancak bu tür kantitasyon için çoğunlukla otomatize analiz cihazları kullanılmaktadır (çalışmamızda

kullanılmamıştır). 2-D PAGE analizimizde ise farklı izoelektrik noktalara sahip farklı moleküler ağırlıkta çok sayıda protein spot izlenmiştir (Şekil 4). Bu spotların bazılarının aynı moleküler ağırlığa sahip olmasına rağmen farklı izoelektrik noktalara sahip olması nedeniyle kolaylıkla ayrıştırılabildiği gözlenmiştir. Bu şekildeki proteinler birbirlerinin izoformları olabilecekleri gibi, farklı proteinler de olabilmektedirler. Bu spotların gerçek protein niteliğini anlayabilmek için kütle spektrometrisi (MS) analizi şarttır. Çalışmamızda MS incelemesi yapılmamıştır. SDS-PAGE ve 2-D PAGE ile tespit edilen protein band ve spotları, Tablo 4’de gösterilmiştir. Görülmektedir ki SDS-PAGE ile ayırım son derece sınırlıdır ve 2-D PAGE ile daha iyi ayırım yapılabilmektedir. 2-D PAGE sonuçlarında aynı pI değerine sahip farklı Da ağırlığındaki proteinler olduğu gibi aynı Da ağırlığında farklı pI değerleri olan proteinler de saptanmıştır. Buradan anlaşılan, maggot TVS’lerindeki protein yelpazesi son derece geniştir. Daha önceki araştırmacıların, genellikle, proteinleri teker teker izole edip çalıştıkları görülmektedir. Bu şekilde çok düşük ağırlıklı proteinlerin tespiti ve saflaştırılması da mümkün olmuştur (52-55). Çalışmamızda molekül ağırlığı yüksek proteinler gözlenmiştir. Tabi burada çalışmamızda kullandığımız maggotların uyarılmış olduğunu ve TVS’den inceleme yapıldığını belirtmek gerekir. Huberman ve arkadaşları (55) ve başka bir çalışmada da Kerridge ve arkadaşlarının (70) çalışmasından daha önce bahsedilmiştir. Araştırmacılar, bakteriye maruz kalan larvaların, düşük molekül ağırlıklı antibakteriyel proteinleri hemen (ve steril larvalara göre miktar olarak çok daha fazla) salgıladığını, daha büyük molekül ağırlıklı olanların ise daha sonraki sürelerde üretilerek salgılandığını bildirmişlerdir. Maggotları 24-48 saat etüvde “sanal” yara üzerinde inkübe ettiğimiz düşünülürse, aldığımız sonuçlarda yüksek molekül ağırlıklı proteinleri tespit etmemiz beklenen bir durumdur. Öte yandan, TVS kullandığımızdan, maggotların yapısal proteinlerini ayırt etmemiz mümkün olmamıştır. Ancak akım sitometrisiyle almış olduğumuz sonuçlar da göstermektedir ki, yapısal protein olsun olmasın bir antibakteriyel protein aktivitesinin varlığı söz konusudur.

Çalışmada, maggotların TVS’leri incelenmeden önce *S.aureus* ve *E.coli* bakterisine bulanmış sığır karaciğeri ile “sanal” bir yara ortamında maggot sıvıları provoke edilmiştir. Protein analizlerinin, steril maggotlar ve *S.aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Acinetobacter* türleri ile provoke

edilmiş maggotlar ile ayrı ayrı çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz. Bu tür bir değerlendirme, antimikrobiyal etkiye neden olan proteinler (steril maggot – uyarılmış maggot farkı) ile daha önce de bahsettiğimiz, “bakteriye özel antibakteriyel etki” düşüncemizin incelenebilmesi ve türe özgül antimikrobiyal etki gösterildiğinin belirlenmesi için faydalı bilgi verecektir.

Çalışmada, protein analizimiz, 2-D PAGE ile sınırlı kalmıştır. 2-D PAGE, proteinleri pH gradientlerine (pI) ve moleküler ağırlıklarına (Da) göre ayırmaktadır ve özellikle gümüş boyası yapıldığında proteinlerin ayrıştırılmasında duyarlılığı yüksek bir yöntemdir (101-103). Yaptığımız bu analiz ile peptidler hakkında fikir edinebilsek de, en doğru proteomiks sonuçlarını almak için, jel üzerindeki proteinler kesilerek tripsin ile muamele edilmeli ve kütle spektrometrisi çalışması yapılmalıdır. Fonsiyonel analiz için ise, Pöppel ve arkadaşlarının (112) yaptığı gibi RNA analizi, RNA’dan ise proteinler sentezlenerek, proteinler test edilmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Akım sitometrisi analizlerinde dilüsyon daha düşük konsantrasyonlara ayarlanarak ölçümler tekrarlanmalıdır.
2. Her bakteri için ayrı ayrı, o bakteri ile kontamine edilmiş ortamda yetiştirilen maggotların sıvıları çalışılmalıdır. Böylece bakteriler arası gerçek etkinlik farkı ortaya konabilecektir. Ayrıca, CLSI M26-A ölçütlerine göre “Time-Kill Analizi”nin yapılması ve her bakteri için minimum bakterisidal konsantrasyonun saptanması da antibakteriyel etkinlik değerlendirmesindeki verileri destekleyecektir.
3. Protein analizi için 2-D PAGE takiben ESI/MS, MALDI TOF, MS/MS gibi analizler ya da “Edman degradation” analizi ile proteinlerin tanımlaması yapılmalıdır. BLAST Protein ID ile karşılaştırma yapılarak, veritabanındaki proteinler ile amino asit homolojisi çıkartılmalı, transkriptomları ortaya konmalı, proteinler saflaştırılmalı, tek tek ve kombine halde antimikrobiyal etkinliklerine bakılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Tıp, Vikipedi Özgür Ansiklopedi, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Tıp>. [erişim tarihi: 28 Ocak 2015].
2. Snyder L.: American College of Physicians ethics manual. Annals of Internal Medicine, Philadelphia, 156: s. 73-104, 2012.
3. Şarlatanlık, Vikipedi Özgür Ansiklopedi, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Şarlatanlık>. [erişim tarihi: 28 Ocak 2015].
4. World Health Organization (WHO), <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. [erişim tarihi: 28 Ocak 2015].
5. World Health Organization (WHO), WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Cenevre, İsviçre, 2013.
6. Barnes PM, et al. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007.
7. Ceylan, S., Azal, Ö., Taşlipinar, A., Türker, T., Açikel, C. H., Güleç, M. Complementary and alternative medicine use among Turkish diabetes patients. Complement Ther Med, 17(2): 78-83, 2009.
8. Horneber, M., Bueschel, G., Dennert, G., Less, D., Ritter, E., Zwahlen, M. How many cancer patients use complementary and alternative medicine: a systematic review and metaanalysis. Integr Cancer Ther, 21: 1-17, 2011.
9. Integrative medicine, Vikipedi Özgür Ansiklopedi, http://en.wikipedia.org/wiki/Integrative_medicine, [erişim tarihi 28 Ocak 2015].
10. Alternatif Tıp, Vikipedi Özgür Ansiklopedi, http://tr.wikipedia.org/wiki/Alternatif_tıp, [erişim tarihi: 29 Ocak 2015]
11. National Center for Complementary and Integrative Health (NCCIH), <https://nccih.nih.gov/>, [erişim tarihi 28 Ocak 2015]
12. Trøstrup, H., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Høiby, N., Moser, C. What Is New in the Understanding of Non Healing Wounds Epidemiology, Pathophysiology, and Therapies. Ulcers, 8: 1-6, 2013.

13. Sood, A., Granick, M.S., Tomaselli, N.L. Wound dressings and comparative effectiveness data. *Adv Wound Care*, 3(8): 511-529, 2014.
14. Nunan, R., Harding, K.G., Martin, P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech*, 7(11): 1205-1213, 2014.
15. Cazander, G., Jukema, G.N., Nibbering, P.H. Complement activation and inhibition in wound healing. *Clin Dev Immunol*, 8: 1-14, 2012.
16. Broussard KC, Powers JG. Wound dressings: selecting the most appropriate type. *Am J Clin Dermatol*, 14(6): 449-459, 2013.
17. Sherman, R.A., Mumcuoğlu K.Y., Grassberger, M., Tantawi T.I. Maggot Therapy. *Biotherapy-history, principles and practice: A practical guide to the diagnosis and treatment of disease using living organisms*. Springer Science & Business Media, Amsterdam, s. 5-29. 2013.
18. Fleischmann, W., Grassberger, M., Sherman, R.A. Maggot therapy: A handbook of maggot-assisted wound healing. Thieme Publication, Londra, 2004.
19. TC Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği. Resmi Gazete, No: 29158, 27 Ekim 2014.
20. Stevens J, Wall R. Classification of the genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae): A preliminary parsimony analysis. *J Nat Hist*, 30(7): 1087-1094, 1996
21. Wells JD, Wall R, Stevens JR. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *Int J Legal Med*, 121(3): 229-233, 2007.
22. Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 9th Ed., Elsevier Publication, Londra, 2015.
23. Nathan, C., Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell*, 140(6): 871-882, 2010.
24. Van der Plas M.J.A. Effect of maggot secretions on microbiological, haematological and immunological processes. *Maggot Therapy's Modes of Action*. EZ Leiden, Leiden Üniversitesi Yayınları, s. 9-35, 2009.
25. Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature*, 453 (7193): 314-321, 2008.

26. Eubank, T.D., Marsh, C.B. Cytokines and Growth factors in the Regulation of Wound Inflammation. *Adv Wound Care*, 1: 211-216, 2010.
27. Daeschlein, G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *Int Wound J*, 10(s1): 9-14, 2013.
28. Römmling, U., Balsalobre, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*, 272(6): 541-561, 2012.
29. Dreifke, M.B., Jayasuriya, A.A., Jayasuriya, A.C. Current wound healing procedures and potential care. *Mater Sci Eng C*, 48: 651-662, 2015.
30. Dunbar, G. Notes on the Ngemba tribe of the central Darling River, western New South Wales. *Mankind*, 3(5):140-8, 1943.
31. Weil, G.C., Simon, R.J., Sweadner, W.R. A biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Am J Surg*, 19(1):36-48, 1943.
32. Baer, W.S. Sacro-iliac joint—Arthritis deformans—viable antiseptic in chronic osteomyelitis. *Proc Int Assembly Interstate Postgrad Med Assoc North Am*. 371:365-72, 1929.
33. Baer, W.S. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). *J Bone Joint Surg*. 13(3):438-75, 1931.
34. Chernin, E. Surgical maggots. *Southern medical journal*, 79(9):1143-5, 1986.
35. Sherman, R.A., Hall, M., Thomas, S. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu Rev Entomol*, 45(1):55-81, 2000.
36. Sherman, R.A., Pechter, E.A. Maggot therapy: a review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Med Vet Entomol*, 2(3):225-30, 1988.
37. Sherman, R.A., Tran, J.M-T., Sullivan, R. Maggot therapy for venous stasis ulcers. *Arch Dermatol*, 132(3):254-6, 1996.
38. Sherman, R.A., Wyle, F.A. Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics, and schools. *Am J Trop Med Hyg*, 54(1):38-41, 1996.
39. Stoddard, S., Sherman, R., Mason, B., Pelsang, D., Sherman, R. Maggot debridement therapy. An alternative treatment for nonhealing ulcers. *J Am Podiatr Med Assoc*, 85(4):218-21, 1995.

40. Andersen, A.S., Sandvang, D., Schnorr, K.M., Kruse, T., Neve, S., Joergensen, B., Karlsmark, T., Krogfelt, K.A. A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemother*, 65(8):1646-54, 2010.
41. Barnes, K.M., Dixon, R.A., Gennard, D.E. The antibacterial potency of the medicinal maggot, *Lucilia sericata* (Meigen): variation in laboratory evaluation. *J Microbiol Methods*, 82(3):234-7, 2010.
42. Cazander, G., Van de Veerdonk, M.C., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Schreurs, M.W., Jukema, G.N. Maggot excretions inhibit biofilm formation on biomaterials. *Clin Orthop Relat Res*, 468(10):2789-96, 2010.
43. Mumcuoglu, K.Y. Clinical applications for maggots in wound care. *Am J Clin Dermatol*, 2(4):219-27, 2001.
44. Whitaker, I.S., Twine, C., Whitaker, M.J., Welck, M., Brown, C.S., Shandall, A. Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgrad Med J*, 83(980):409-13, 2007.
45. Tanyuksel, M., Araz, E., Dundar, K., Uzun, G., Gumus, T., Alten, B., Saylam, F., Taylan-Özkan, A., Mumcuoğlu, K.Y. Maggot debridement therapy in the treatment of chronic wounds in a military hospital setup in Turkey. *Dermatol*, 210(2):115-8, 2004.
46. Mumcuoğlu, K.Y., Taylan-Özkan, A. Süpüratif kronik yaraların maggot debridman Tedavisi. *Türkiye Parazitol Derg*, 33(4): 307-315, 2009.
47. Öztürkcan, S., Bayata, S. Dermatolojide Larva Tedavisi. *Türkiye Klinikleri J Dermatol Spec Top*, 6(1):61-4, 2013.
48. Polat, E., Çakan, H., İpek, T. Larva debridement therapy (LDT). *Turkish Journal of Family Practice*, 14(4):188-91, 2011.
49. Tuğcu, I., Yavuz, F., Safaz, İ., Araz, E., Alaca, R., Tanyüksel, M. Konvansiyonel tedaviye dirençli sakral bölge bası yarasında maggot terapi uygulaması. *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Bilimleri Dergisi*, 12(2):93, 2009.
50. AMCIHAC Clinical Practice Guideline Committee. Clinical Practice Guideline for The Treatment of Acute and Chronic Wounds with Maggot

- Debridement Therapy. Mexican Association for Wound Care and Healing Document, Meksiko, 2010.
51. Game, F.L., Apelqvist, J., Attinger, C., Hartemann, A., Hinchliffe, R.J., Löndahl, M., Price, P.E., Jeffcoate, W.J. IWGDF Guidance on use of interventions to enhance healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. International Working Group on Wound Healing Document, Amsterdam, 2015.
 52. Bexfield, A., Bond, A.E., Roberts, E.C., Dudley, E., Nigam, Y., Thomas, S., Newton, R.P., Ratcliffe, N.A. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a < 500Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes Infect*, 10(4):325-333, 2008.
 53. Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., Ratcliffe, N.A. Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect*, 6(14):1297-1304, 2004.
 54. Huberman, L., Gollop, N., Mumcuoglu, K.Y., Block, C., Galun, R. Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *J Wound Care*, 16(3):123-127, 2007.
 55. Huberman, L., Gollop, N., Mumcuoglu, K.Y., Breuer, E., Bhusare, S.R., Shai, Y., Galun, R. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol*, 21(2):127-131, 2007.
 56. Kruglikova, A., Chernysh, S. Antimicrobial compounds from the excretions of surgical maggots, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae). *Entomological Review*, 91(7):813-819, 2011.
 57. Nuesch, R., Rahm, G., Rudin, W., Steffen, I., Frei, R., Rufli, T., Zimmerli, W. Clustering of bloodstream infections during maggot debridement therapy using contaminated larvae of *Protophormia terraenovae*. *Infection*, 30(5):306-309, 2002.
 58. Mudge, E., Price, P., Neal, W., Harding, K.G. A randomized controlled trial of larval therapy for the debridement of leg ulcers: Results of a multicenter,

- randomized, controlled, open, observer blind, parallel group study. *Wound Repair Regen*, 22(1):43-51, 2014.
59. Church, J. Re: Bleeding complications in patients treated with maggot debridement therapy, Steenvoorde, P. ve Oskam, J., *IJLEW* 2005; 4 (1):57-58. *Int J Low Extrem Wounds*, 4(1):59, 2005.
 60. Steenvoorde, P., Jacobi, C.E., Oskam, J. Maggot debridement therapy: free-range or contained? An in-vivo study. *Adv Skin Wound Care*, 18(8):430-435, 2005.
 61. Mumcuoglu, K.Y., Davidson, E., Avidan, A., Gilead, L. Pain related to maggot debridement therapy. *J Wound Care*, 21(8):400-5, 2012.
 62. Steenvoorde, P., Buddingh, T.J., Engeland, A.V., Oskam, J. Maggot therapy and the "Yuk" factor: An issue for the patient? *Wound Repair Regen*, 13(3):350-352, 2005.
 63. Bexfield, A., Bond, A.E., Morgan, C., Wagstaff, J., Newton, R.P., Ratcliffe, N. A., Dudley, E., Nigam, Y. Amino acid derivatives from *Lucilia sericata* excretions/secretions may contribute to the beneficial effects of maggot therapy via increased angiogenesis. *Br J Dermatol*, 162(3):554-562, 2010.
 64. Cherniack, E.P. Bugs as drugs, Part 1: Insects: the "new" alternative medicine for the 21st century. *Altern Med Rev*, 15(2):124-135, 2010.
 65. Sherman, R.A. Maggot therapy for foot and leg wounds. *Int J Low Extrem Wounds*, 1(2):135-142, 2002.
 66. Barnard, D. Skeletal-muscular mechanisms of the larva of *Lucilia sericata* (Meigen) in relation to feeding habit (Diptera: Calliphoridae). *Pan-Pac Entomol*, 3(1): 34-8, 1977.
 67. Thomas, S., Wynn, K., Fowler, T., Jones, M. The effect of containment on the properties of sterile maggots. *Br J Nurs*, 11(Sup2):21-28, 2002.
 68. Erdmann, G., Khalil, S. Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*, 23(2):208-211, 1986.

69. Greenberg, B. Model for destruction of bacteria in the midgut of blow fly maggots. *J Med Entomol*, 5(1):31-38, 1968.
70. Kerridge, A., Lappin-Scott, H., Stevens, J. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol*, 19(3):333-337, 2005.
71. Chernysh, S.I., Gordja, N.A., Simonenko, N.P. Diapause and immune response: induction of antimicrobial peptides synthesis in the blowfly, *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae). *J Entomol Sci*, 3(1):139-144, 2000.
72. Čeřovský, V., Žďárek, J., Fučík, V., Monincová, L., Voburka, Z., Bém, R. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci*, 67(3): p. 455-466, 2010.
73. Valachová, I., Bohová, J., Pálošová, Z., Takáč, P., Kozánek, M., Majtán, J. Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments. *Cell Tissue Res*, 353(1):165-171, 2013.
74. El Shazely, B., Veverka, V., Fučík, V., Voburka, Z., Žďárek, J., & Čeřovský, V. Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*, 50(3): 571-578, 2013.
75. Valachova, I., Majtan, T., Takac, P., Majtan, J. Identification and characterisation of different proteases in *Lucilia sericata* medicinal maggots involved in maggot debridement therapy. *J Appl Biomed*, 12(3):171-177, 2014.
76. Valachova, I., Takac, P., Majtan, J. Midgut lysozymes of *Lucilia sericata*—new antimicrobials involved in maggot debridement therapy. *Insect Mol Biol*, 23(6):779-787, 2014.
77. Robinson, W., Baker, F. The enzyme urease and the occurrence of ammonia in maggot-infected wounds. *J Parasitol*, 25(2):149-155, 1939.
78. Chambers, L., Woodrow, S., Brown, A.P., Harris, P.D., Phillips, D., Hall, M., Church, J.C.T., Pritchard, D.I. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the

- clinical debridement of non-healing wounds. Br J Dermatol, 148(1):14-23, 2003.
79. Pöppel, A.K., Koch, A., Kogel, K.H., Vogel, H., Kollewe, C., Wiesner, J., Vilcinskas, A. Lucimycin, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. Biol Chem, 395(6):649-656, 2014.
80. Polat, E., Cakan, H., Aslan, M., Sirekbasan, S., Kutlubay, Z., Ipek, T., Özbilgin, A. Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions in vitro and in vivo on *Leishmania tropica*: first work. Exp Parasitol, 132(2):129-134, 2012.
81. Armstrong, D.G., Salas, P., Short, B., Martin, B.R., Kimbriel, H.R., Nixon, B.P., Boulton, A.J. Maggot therapy in "lower-extremity hospice" wound care: fewer amputations and more antibiotic-free days. J Am Podiatr Med Assoc, 95(3):254-257, 2005.
82. Dumville, J.C., Worthy, G., Soares, M.O., Bland, J.M., Cullum, N., Dowson, C., Torgerson, D.J. VenUS II: a randomised controlled trial of larval therapy in the management of leg ulcers. Health Technology Assessment, 2009:1-220, 2009.
83. Sherman, R.A. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. Wound Repair Regen, 10(4):208-214, 2002.
84. Sherman R.A. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. Diabetes care, 26(2): 446-451, 2003.
85. Van der Plas, M.J., van der Does, A.M., Baldry, M., Dogterom-Ballering, H.C., van Gulpen, C., van Dissel, J.T., Nibbering, P.H., Jukema, G.N. Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. Microbes Infect, 9(4):507-514, 2007.
86. van der Plas, M.J., Baldry, M., van Dissel, J.T., Jukema, G.N., Nibbering, P.H. Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. Diabetologia, 52(9):1962-1970, 2009.

87. Horobin, A.J., Shakesheff, K.M., Woodrow, S., Robinson, C., Pritchard, D. I. Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components. *Br J Dermatol*, 148(5):923-933, 2003.
88. Cazander, G., van Veen, K.E., Bouwman, L.H., Bernards, A.T., Jukema, G.N. The influence of maggot excretions on PAO1 biofilm formation on different biomaterials. *Clin Orthop Relat Res*, 467(2):536-545, 2009.
89. Van Der Plas, M.J., Jukema, G.N., Wai, S.W., Dogterom-Ballering, H.C., Legendijk, E.L., van Gulpen, C., van Dissel, J.T., Bloemberg, G.V., Nibbering, P.H. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 61(1):117-122, 2008.
90. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method, version 5.0, Ocak 2015.
91. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard — Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
92. Reller, L.B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*, 49(11):1749-1755, 2009.
93. Mouton, J.W., Brown, D.F.J., Apfalter, P., Cantón, R., Giske, C.G., Ivanova, M., MacGowan, A.P., Rodloff, A., Soussy C.J., Steinback, M., Kahlmeter, G. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect*, 18(3): E37-E45, 2012.
94. Doğandemir, G. *Lucilia sericata*'nın Kronik Yaralarda Kolonize Olan Mikroorganizmalar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliğinin Araştırılması, Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara, 2010.
95. Brehm-Stecher, B.F., Johnson, E.A. Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68(3):538-559, 2004.

96. Givan, A.L. Flow Cytometry: An Introduction. *Methods Mol Biol.* 699:1-29, 2011.
97. Pieretti, B., Masucci, A., Moretti, M. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology, *Clinical Flow Cytometry - Emerging Applications*, InTech, s17-42, 2012.
98. Loehfelm, T.W., Luke, N.R., Campagnari, A.A. Identification and Characterization of an *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein. *J Bacteriol.* 190(3):1036-1044, 2008.
99. Nielsen, M.W., Sternberg, C., Molin, S., Regenberg, B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* Biofilm in Flow Cells. *J Vis Exp.* 15(47):2383, 2011.
100. Kim, J.S., Anderson, G.P., Erickson, J.S., Golden, J.P., Nasir, M., Ligler, F.S. Multiplexed Detection of Bacteria and Toxins Using a Microflow Cytometer. *Analyt Chem*, 81(13): 5426-5432; 2009.
101. Friedman, D.B., Hoving, S., Westermeier, R. Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 463:515-540, 2009.
102. Garfin DE. Gel electrophoresis of proteins. *Essential Cell Biology Vol. 1: Cell Structure, A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, Birleşik Krallık, s. 197-268, 2003.
103. Righetti, P.G., Sebastiano, R., Citterio, A. Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis. *Proteomics*, 13:325-340, 2013.
104. Michelsen, C.F., Christensen, A.M.J., Bojer, M.S., Høiby, N., Ingmer, H., Jelsbak, L. *Staphylococcus aureus* alters growth activity, autolysis, and antibiotic tolerance in a human host-adapted *Pseudomonas aeruginosa* lineage. *J Bacteriol*, 196(22):3903-3911, 2014.
105. Faria-Ramos, I., Espinar, M.J., Rocha, R., Santos-Antunes, J., Rodrigues, A.G., Cantón, R., Pina-Vaz, C. A novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*, 19(1): E8-E15, 2013.

106. Nuding, S., Zabel, L.T. Detection, identification, and susceptibility testing of bacteria by flow cytometry. J Bacteriol Parasitol, S5:005, 2013.
107. Becton Dickinson (BD) BioSciences. Application Note: Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry [<http://www.bdbiosciences.com/us/home>, Erişim tarihi: 15 Mayıs 2016].
108. Portig, I., Pankuweit, S., Lottspeich, F., Maisch, B. Identification of stress proteins in endothelial cells. Electrophoresis, 17(4): 803-808, 1996.
109. Kılıç, A., Doğan, E., Kaya, S., Ören, S., Tok, D., Ardiç, N., Baysallar, M. Rapid Identification of *Klebsiella pneumoniae* by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Detection of Meropenem Resistance by Flow Cytometric Assay. J Clin Lab Anal, 00:1-7, 2016.
110. Mosiman, V.L., Patterson, B.K., Canterero, L., Goolsby, C.L. Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method. Cytometry, 30(3):151-156, 1997.
111. Daeschlein, G., Mumcuoglu, K.Y., Assadian, O., Hoffmeister, B., Kramer, A. In vitro antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions. Skin Pharmacol Physiol, 20(2): 112-115, 2006.
112. Pöppel, A.K., Vogel, H., Wiesner, J., Vilcinskas, A. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. Antimicrob Agents Chemother, 59(5): 2508-2514, 2015.
113. Brown, A., Horobin, A., Blount, D. G., Hill, P.J., English, J., Rich, A., Williams, P.M., Pritchard, D.I. Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Med Vet Entomol, 26(4):432-439, 2012.
114. Jiang, K.C., Sun, X.J., Wang, W., Liu, L., Cai, Y., Chen, Y.C., Luo, N., Yu, J.H., Cai, D.Y., Wang, A.P. Excretions/secretions from bacteria-pretreated maggot are more effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. PloS one, 7(11): e49815, 2012.

115. Bjarnsholt, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Apmis*, 121(s136):1-58, 2013.
116. Čeřovský, V., Bém, R. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals*, 7(3):251-264, 2014.
117. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline CLSI document M26-A. Jorgensen JH: CLSI; 1999.
118. Jaklič, D., Lapanje, A., Zupančič, K., Smrke, D., Gunde-Cimerman, N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol*, 57(5):617-625, 2008.
119. Mumcuoglu, K.Y., Miller, J., Mumcuoglu, M., Friger, M., Tarshis, M. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*, 38:162–166, 2001.
120. Robinson, W., Norwood, V.H. Destruction of pyogenic bacteria in the alimentary tract of surgical maggot implanted in infected wounds. *J Lab Clin Med* 7:581–586, 1934.
121. Roepstorff, P. Mass spectrometry based proteomics, background, status and future needs. *Protein cell*, 3(9):641-647, 2012.
122. Granvogl, B., Plösch, M., Eichacker, L.A. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Anal Bioanal Chem*, 389(4):991-1002, 2007.
123. Rogowska-Wrzesinska, A., Le Bihan, M. C., Thaysen-Andersen, M., Roepstorff, P. 2D gels still have a niche in proteomics. *J Proteomics*, 88:4-13, 2013.