



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences



**KLİNİK ÖRNEKLERDEN
SOYUTLANAN BAKTERİLERDE
DIŞA ATIM POMPA İNHİBİTÖRLERİNİN
ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN ETKİNLİĞİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAŞAK BÜŞRA TAŞPINAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 1039.09



BALIKESİR

2023

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLİNİK ÖRNEKLERDEN SOYUTLANAN BAKTERİLERDE
DIŞA ATIM POMPA İNHİBİTÖRLERİNİN
ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN ETKİNLİĞİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAŞAK BÜŞRA TAŞPINAR

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MEHMET ÜNLÜ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Bilim Alan Kodu: 1039.09

Proje No: 2020/054- Balıkesir Üniversitesi BAP

BALIKESİR
2023



**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütölmüş olan
**“KLİNİK ÖRNEKLERDEN SOYUTLANAN BAKTERİLERDE
DIŞA ATIM POMPA İNHİBİTÖRLERİNİN ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN
ETKİNLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ”**
başlıklı tez çalışması, Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/04/2023

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ
Balıkesir Üniversitesi
Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Yener ÖZEL
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ
Kocaeli Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi, sınav jüri komisyonu tarafından imzalanarak
16/05/2023 tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Ziya İLHAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi **beyan ederim.**

02/03/2023

Başak Büşra TAŞPINAR

TEŞEKKÜR

Tezimin yürütülmesinde bana rehberlik eden ve her türlü desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ'ye, bilimsel katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Gülhan VARDAR ÜNLÜ'ye ve Sayın Doç. Dr. Tuğba KULA ATİK'e, laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yener ÖZEL'e, bu araştırmaya sağladığı desteklerden dolayı Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğüne, hastane rutin mikrobiyoloji ve COVID-19 Tanı Laboratuvarı çalışanlarına, yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman her koşulda yanımda olan, hiçbir yardımını ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIİ
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIİİ
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Antibiyotik Direnci	3
2.1.1. Doğal Direnç	5
2.1.2. Kazanılmış Direnç	5
2.1.3. Antimikrobiyal Dirençte Dışa Atım Pompalarının Rolü.....	6
2.2. Dışa Atım Pompaları.....	7
2.2.1. Dışa Atım Pompa Yapısı	9
2.2.2. Dışa Atım Pompalarının Sınıflandırılması	10
2.2.2.1. ATP Binding Casette (ABC) Tipi Pompalar	10
2.2.2.2. Major Faciliator Superfamily (MFS) Tipi Pompalar	11
2.2.2.3. Small Multidrug Resistance (SMR) Tipi Pompalar	12
2.2.2.4. Resistance Nodulation Division (RND) Tipi Pompalar	13
2.2.2.5. Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Tipi Pompalar	14
2.2.2.6. Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE) Tipi Pompalar	15
2.3. Dışa Atım Pompa İnhibitörleri	15
2.3.1. Verapamil	17
2.3.2. Rezerpin.....	18
2.3.2. Karbonil Siyanid-3-klorofenil-hidrazon	18
2.4. Bakteriler	20
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.4.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	21
2.4.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
2.4.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23

2.4.5. <i>Escherichia coli</i>	24
2.5. Antibiyotikler	24
2.5.1. Tetrasiklin.....	24
2.5.2. Tigesiklin.....	25
2.5.3. Gentamisin.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Bakteri Kökenleri	28
3.1.1 Bakterilerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi	28
3.2. DAPİ'lerin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi	28
3.2.1 Disk Difüzyon Yöntemi.....	29
3.2.2 MİK ve MBK Değerlerinin Belirlenmesi	29
3.3. DAPİ'lerin MİK Değerleri Üzerine Etkisinin Araştırılması	32
3.3.1 Antibiyotiklerin Belirlenmesi.....	32
3.3.2 Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	32
3.3.3 DAPİ'lerin Hazırlanması.....	33
3.3.4 DAPİ'lerin Antibiyotikler ile Etkileşiminin <i>Checkerboard</i> Yöntemiyle Belirlenmesi.....	34
4. BULGULAR	37
4.1. Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	37
4.2. DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliğinin İncelenmesi	39
4.2.1 Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliğinin İncelenmesi	39
4.2.2 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliğinin İncelenmesi	41
4.3. DAPİ'ler ve Antibiyotikler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	43
5. TARTIŞMA.....	54
5.1. <i>S. aureus</i> İzolatlarına Karşı DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliği	55
5.2. <i>E. faecalis</i> İzolatlarına Karşı DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliği	56
5.3. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarına Karşı DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliği	57
5.4. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarına Karşı DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliği	58
5.5. <i>E. coli</i> İzolatlarına Karşı DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliği.....	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR.....	63
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÖZET

KLİNİK ÖRNEKLERDEN SOYUTLANAN BAKTERİLERDE DIŞA ATIM POMPA İNHİBİTÖRLERİNİN ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN ETKİNLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

İnsanlığın karşı karşıya kaldığı en önemli halk sağlığı sorunlarından birisi olan antibiyotik direnci, antimikrobiyal ajan geliştirmede yeni stratejileri ve yaklaşımları zorunlu kılmaktadır. Dışa atım pompa inhibitörleri ve diğer aday ajanlar ile ilgili gelişmeler umut verici olmakla birlikte, mevcut antibiyotiklerin kullanım sürelerini ve etkinliklerini artırabilme arayışları da devam etmektedir.

Bu çalışmada verapamil, rezerpin ve karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon (CCCP) olmak üzere üç adet dışa atım pompa inhibitörünün, 5 standart suş ve 15 klinik izolata karşı, antibakteriyel etkisi disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile, çeşitli antibiyotiklerle sinerjistik etkileşimi ise *checkerboard* yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışma kapsamında, çoklu ilaç dirençli üçer adet *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* klinik izolatu ile *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 olmak üzere 5 adet ATCC suşu kullanılmıştır.

Dışa atım pompa inhibitörlerinin antibakteriyel etkilerinin güçlü olmamasına karşın, denenen antibiyotiklerle etkileşiminin çoğunlukla sinerjistik veya aditif olduğu saptandı.

Bu çalışmada dışa atım pompa inhibitörlerinin, kullanılan izolatlardaki dışa atım pompaları ile olası etkileşimi sonucu denenen antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon değerlerini düşürebildiğinin gösterilmesi, dışa atım pompa inhibitörlerinin antibiyotiklerle kombine kullanımının, antibiyotiklerin etki spektrumunu artırabileceğine, bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç düzeyini ve direncin ortaya çıkma sıklığını azaltabileceğine yönelik düşünceleri desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel aktivite, Antibiyotikler, Antibiyotik direnci, Dışa atım pompa inhibitörleri

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF EFFLUX PUMP INHIBITORS ON THE EFFICACY OF VARIOUS ANTIBIOTICS IN BACTERIA ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS

Antibiotic resistance, one of the most important public health problems faced by humanity, requires new strategies and approaches to develop new antimicrobial agents. Although developments regarding efflux pump inhibitors and other candidate agents are promising, the search for increasing the duration and effectiveness of existing antibiotics continues.

In this study, the antibacterial effect of 3 efflux pump inhibitors verapamil, reserpine and carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) against 5 standard strains and 15 clinical isolates were determined by disc diffusion and broth microdilution method, and the synergistic interactions with various antibiotics by the checkerboard method.

Within the scope of the study, multidrug-resistant 3 clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* each and *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922 and standard strains were used.

Although the antibacterial effect of the efflux pump inhibitors alone were not strong, the interaction with the antibiotics tested was mostly synergistic or additive.

In this study, the demonstration that efflux pump inhibitors can decrease the minimum inhibitory concentration values of the tested antibiotics, as a result of their possible interaction with the efflux pumps in the isolates used, supports the thoughts that the combined use of efflux pump inhibitors with antibiotics may increase the effect spectrum of antibiotics, reduce the level of resistance to antibiotics and the frequency of occurrence of resistance in bacteria.

Keywords: Antibacterial activity, Antibiotics, Antibiotic resistance, Efflux pump inhibitors

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABC	: ATP-Binding Cassette (Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset)
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)
CCCP	: Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institue (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
ÇİDB	: Çoklu İlaç Dirençli Bakteri
DAP	: Dışa Atım Pompası
DAPI	: Dışa Atım Pompa İnhibitörü
DHA	: Drug/H ⁺ Antiporter
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DS	: Distile Su
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi)
GN	: Gentamisin
GSBL	: Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz
KKMHA	: Koyun Kanlı Mueller Hinton Agar
MATE	: Multidrug and Toxic Compound Extrusion (Çoklu İlaç ve Toksik Bileşik Çıkarım)
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MFS	: Major Facilitator Superfamily (Majör-Yönetici Süper Ailesi)
MRSA	: Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
PACE	: Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux
REZ	: Rezerpin
RND	: Resistance-Nodulation-Division (Direnç-Düğüm-Hücre Bölümü)
SMR	: Small Multidrug Resistance (Küçük Çoklu İlaç Direnç)
TET	: Tetrasiklin
TGC	: Tigesiklin
VER	: Verapamil
VRE	: Vankomisin Dirençli Enterokok

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Antibiyotik Direncinin Ana Mekanizmaları	3
Şekil 2.2. DAP'ların Şematik Görüntüsü.....	8
Şekil 2.3. Gram Pozitif ve Gram Negatif Bakterilerde DAP'ın Yapısı	9
Şekil 2.4. Enerji Kaynakları Gösterilen DAP'ların Şematik Görüntüsü	10
Şekil 2.5. Gram Negatif Bakterilerde DAP İnhibisyon Yolları.....	16
Şekil 2.6. Verapamil'in Kimyasal Yapısı	17
Şekil 2.7. Rezerpin'in Kimyasal Yapısı.....	18
Şekil 2.8. CCCP'nin Kimyasal Yapısı	19
Şekil 3.1. Disk Difüzyon Yönteminin Şematik Görüntüsü	29
Şekil 3.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yönteminin Şematik Görüntüsü	30
Şekil 3.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile MİK Belirlenmesi	31
Şekil 3.4. MBK Yönteminin Şematik Görüntüsü	31
Şekil 3.5. KKMHA'da MBK Testi	32
Şekil 3.6. Dışa Atım Pompa İnhibitörleri	33
Şekil 3.7. Checkerboard Metodunda Birinci Mikroplakanın Hazırlık Şeması.....	34
Şekil 3.8. Checkerboard Metodunda İkinci Mikroplakanın Hazırlık Şeması	35
Şekil 3.9. Checkerboard Mikroplakasının İnkübasyon Sonrası Görünüm Şeması ...	36

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Çeşitli Antibiyotiklere Karşı Direnç Profili	37
Tablo 4.2. <i>E. faecalis</i> İzolatlarının Çeşitli Antibiyotiklere Karşı Direnç Profili	38
Tablo 4.3. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarının Çeşitli Antibiyotiklere Karşı Direnç Profili	38
Tablo 4.4. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Çeşitli Antibiyotiklere Karşı Direnç Profili	38
Tablo 4.5. <i>E. coli</i> İzolatlarının Çeşitli Antibiyotiklere Karşı Direnç Profili	39
Tablo 4.6. <i>S. aureus</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin İnhibisyon Zonu Ölçümleri.....	39
Tablo 4.7. <i>E. faecalis</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin İnhibisyon Zonu Ölçümleri....	40
Tablo 4.8. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin İnhibisyon Zonu Ölçümleri.....	40
Tablo 4.9. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin İnhibisyon Zonu Ölçümleri.....	41
Tablo 4.10. <i>E. coli</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin İnhibisyon Zonu Ölçümleri.....	41
Tablo 4.11. <i>S. aureus</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin MİK ve MBK Değerleri.....	42
Tablo 4.12. <i>E. faecalis</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin MİK ve MBK Değerleri.....	42
Tablo 4.13. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin MİK ve MBK Değerleri.....	42
Tablo 4.14. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin MİK ve MBK Değerleri.....	43
Tablo 4.15. <i>E. coli</i> İzolatlarına Karşı DAPI'lerin MİK ve MBK Değerleri.....	43
Tablo 4.16. <i>S. aureus</i> İzolatlarına Karşı Tetrasiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	44
Tablo 4.17. <i>S. aureus</i> İzolatlarına Karşı Tigesiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	44
Tablo 4.18. <i>S. aureus</i> İzolatlarına Karşı Gentamisin ve DAPI'ler Arasındaki	

Sinerjik Etkileşim	45
Tablo 4.19. <i>E. faecalis</i> İzolatlarına Karşı Tetrasiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	46
Tablo 4.20. <i>E. faecalis</i> İzolatlarına Karşı Tigesiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	46
Tablo 4.21. <i>E. faecalis</i> İzolatlarına Karşı Gentamisin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	47
Tablo 4.22. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarına Karşı Tetrasiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	48
Tablo 4.23. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarına Karşı Tigesiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	48
Tablo 4.24. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarına Karşı Gentamisin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	49
Tablo 4.25. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarına Karşı Tetrasiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	49
Tablo 4.26. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarına Karşı Tigesiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	50
Tablo 4.27. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarına Karşı Gentamisin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	51
Tablo 4.28. <i>E. coli</i> İzolatlarına Karşı Tetrasiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	51
Tablo 4.29. <i>E. coli</i> İzolatlarına Karşı Tigesiklin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	52
Tablo 4.30. <i>E. coli</i> İzolatlarına Karşı Gentamisin ve DAPI'ler Arasındaki Sinerjik Etkileşim	53

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi boyunca enfeksiyon hastalıklarına karşı önlem olarak; boyalar, tütsüler ve çeşitli kimyasal maddeler sıklıkla kullanılmıştır (Töreci, 2003; Çiftçi ve Aksoy, 2015). Enfeksiyonlara karşı antibiyotiklerin kullanımı ise 19. yüzyılın sonundan itibaren antibiyotik çağının başlamasıyla gerçekleşmiştir (Töreci, 2003).

Antibiyotik direnci, mikroorganizmaların bir veya birden fazla antimikrobiyal ajanın terapötik dozuna karşı geliştirdiği bir savunma mekanizmasıdır (Çevikbaş, 1990). Antibiyotiklere karşı kazanılan direnç, bakterinin izole edildiği bölge, hastane kaynaklı veya toplumda kazanılan enfeksiyonlar, altta yatan diğer hastalıklar, yaş ve immunité gibi çeşitli nedenlerin yanı sıra; antibiyotiklerin yaygın veya bilinçsiz kullanımı, yapılan duyarlılık testlerinin hatalı değerlendirilmesi gibi birçok farklı etkene bağı olarak gelişebilmektedir (Zarakolu, 2003).

Artan antibiyotik direnci, giderek korkutucu ve endişe verici bir hale dönüşmeye başlamıştır (Yılmaz ve Özcengiz, 2017; Livermore, 2009). Mevcut antibiyotiklerin modifiye edilerek tekrar kullanılması ve yeni antibiyotik keşiflerinin direnç gelişim hızına kıyasla yavaş seyretmesi, antibiyotik direncini önlenmede yetersiz kalmakta ve birtakım alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Bunların arasında yeni tekniklerle üretilen aşılar, antivirölans yaklaşımlar, terapötik antikorlar, antimikrobiyal peptidler, bakteriyofajlar, lizinler, lipopolisakkarit inhibitörler, antibakteriyel özellikli biyomedikal ürünler, metallo-antibiyotikler ve dışa atım pompa inhibitörleri yer almaktadır (Bhardwaj ve Mohanty, 2012; Fernebro, 2011; Mandal ve ark., 2014).

Son yıllarda yeni antimikrobiyallerin keşfine yönelik araştırmaların hızının, önemli ölçüde azalmasıyla direnç mekanizmalarına etki edebilecek yeni moleküllerin araştırılması zorunlu hale gelmiştir (Pages ve ark., 2005). Dışa atım pompa inhibitörlerinin, antibiyotik direnciyle mücadelede antimikrobiyal ajanların klinik performansını artıracabilecek umut verici bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir (Tegos ve ark., 2011).

Bu çalışmada, dışa atım pompa inhibitörlerinden verapamil, rezerpin ve karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazonun, 5 farklı standart suş ve 15 klinik örnekten soyutlanan çoklu ilaç dirençli bakteri izolatına karşı, antibakteriyel etkisinin disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile, çeşitli antibiyotiklerle sinerjistik etkileşiminin ise *checkerboard* yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

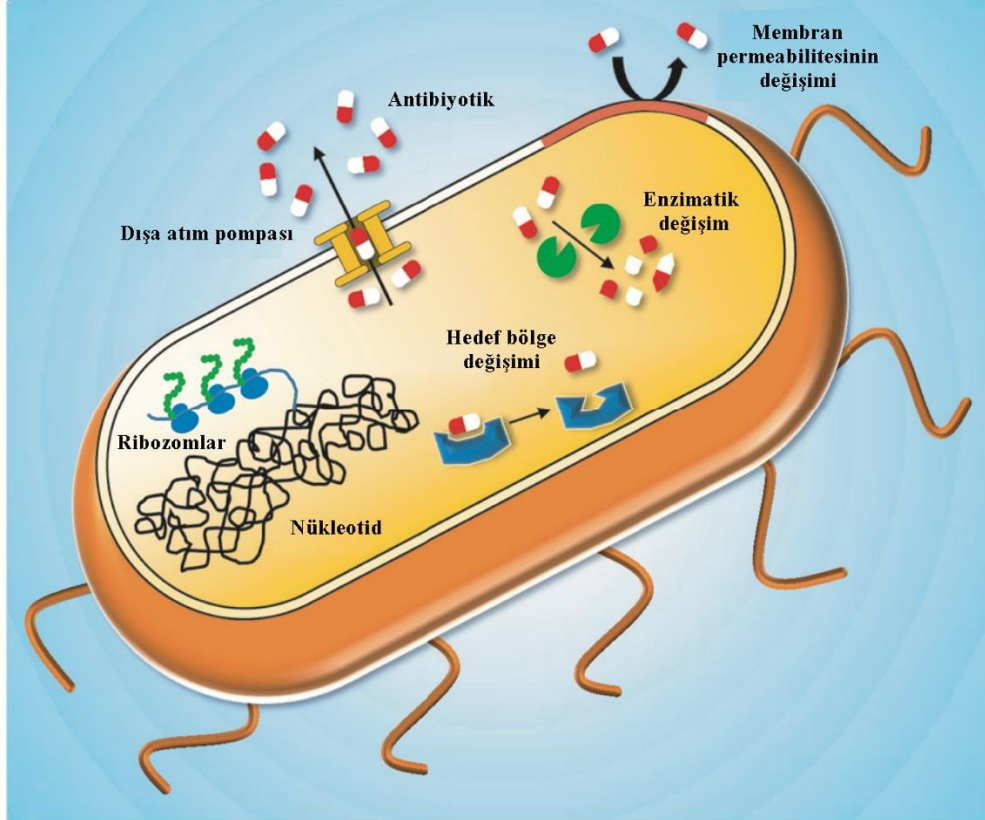


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotik Direnci

Antimikrobiyal ilaçlar, 1928 yılında Pasteur ve Joubert öncülüğünde keşfedilmeye başlanmıştır. Ancak, Alexander Fleming, küf mantarından elde ettiği ilk antibiyotik olan penisiline karşı, eğer bakterilerle uzun süre maruz kalırsa direnç gelişebileceğini bildirmiştir (Kayaş, 2019).

Antibiyotik direnci, mikroorganizmalara karşı kullanılan kemoterapötik maddelerin etkisiz kalması olarak tanımlanmaktadır. Direnç gelişimi, doğal olabileceği gibi sonradan da kazanılabilmektedir (Daş ve Atmaca, 2015).



Şekil 2.1. Antibiyotik direncinin ana mekanizmaları (Sharma ve ark., 2019).

Antibiyotik direnci, evrimin ve bakteri genetiğinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Antibiyotiklerin yaygın ve/veya bilinçsiz kullanılması, bakterilerin evrimini hızlandırarak dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Somer, 2010; Sharma ve ark., 2019). Antibiyotik direncinin, 1970'lerden itibaren önem kazanarak ciddi morbidite ve mortaliteye neden olduğu bildirilmektedir (Akalin, 2011; Kayış, 2019).

Antibiyotik direnci, 1941'de penisilinin piyasaya sürülmesinden 1 yıl sonra stafilokoklarda, streptokoklarda ve gonokoklarda saptanmaya başlanmıştır. Daha sonra klinik olarak sülfonamide dirençli *Streptococcus pyogenes* ortaya çıkmıştır. 1950'li yıllara gelindiğinde çoklu ilaç dirençli enterik bakteriler sorun olmaya başlamıştır. 1960 yılında, penisiline dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının tedavi edilmesi için piyasaya çıkarılan metisiline, aynı yıl *S. aureus* bakterisinde direnç geliştiği gözlenmiştir. 1980'lerde Gram negatif bakterilere karşı kullanılması amaçlanan florokinolonlara da zamanla direnç gelişmiştir (Selvarajan ve ark., 2022).

Günümüzde metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), koagülaz negatif stafilokok, penisiline dirençli pnömokok, makrolid dirençli streptokok ve vankomisine dirençli enterokok (VRE) gibi Gram pozitif bakteriler; *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli* ve *Acinetobacter baumannii* gibi Gram negatif bakteriler ve çoklu ilaç dirençli *Mycobacterium tuberculosis* gibi aside dirençli mikroorganizmalarda gözlenen antibiyotik direnci, bu etkenlere bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde sorun oluşturmaktadır (Demirtürk ve Demirdal, 2004).

Bir bakterideki antibiyotik direnci tek bir mekanizma ile gelişebileceği gibi birden fazla mekanizma ile de oluşabilmektedir. Bakterilerde gelişen direnç mekanizmaları başlıca doğal ve kazanılmış direnç olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

2.1.1 Doğal Direnç

Bir mikroorganizma türünün tüm suşlarının bazı antibiyotiklerden etkilenmemesi doğal direnç veya intrinsik direnç olarak tanımlanmaktadır. Doğal direnç, bakterinin genellikle yapısal ve biyokimyasal özelliklerine bağlı olarak meydana gelebilmektedir (Somer, 2010; Çiftçi ve Aksoy, 2015).

Hücre duvarına etkili olan antibiyotiklerin, hücre duvarı olmayan bakterilere karşı etkisiz kalması ya da makrolidlerin, hedefine ulaşmak için hücre duvarından geçemeyecek kadar büyük bir molekül olması doğal dirence örnek verilebilir (Çiftçi ve Aksoy, 2015). Buna benzer şekilde zorunlu anaerob bakteriler aminoglikozid grubu antibiyotiklere, mikoplazmalar ise beta-laktam grubu antibiyotiklere doğal olarak dirençlidir (Somer, 2010).

2.1.2. Kazanılmış Direnç

Kazanılmış direnç, bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlı iken çeşitli mekanizmalarla antibiyotiklerden etkilenmeyecek hale gelmeleri olarak tanımlanmaktadır (Çiftçi ve Aksoy, 2015). Kazanılmış direnç, transpozon veya plazmid aracılığıyla bakterideki genetik özelliklerin aktarılması ile gerçekleşebilmektedir (Kayış, 2019). Direnç geni, dirençli bakterilerden duyarlı bakterilere de aktarılabilir (Somer, 2010).

Kazanılmış direnç, çeşitli bakteri türlerinde farklı mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Kazanılmış direnç mekanizmaları, biyokimyasal olarak dört farklı kategoride incelenmektedir. Bunlardan ilki antibiyotik inaktivasyonu sonucu gelişen direnç olup antibiyotiğin değişimiyle ya da yapısının bozulmasıyla oluşan direnç mekanizmasıdır. Antibiyotiğin inaktivasyonu hidrolitik enzimler, grup transferi veya redoks mekanizması gibi nedenlerle gerçekleşebilmektedir. Enzimatik yoldan antibiyotiğin inaktivasyonu ile kazanılan dirençte en önemli antibiyotik gruplarını kloramfenikol ve beta-laktam grubu oluşturmaktadır. İkinci direnç mekanizması hedef molekülün değişmesi sonucu meydana gelmektedir. Antibiyotiğin bakterilerdeki hedef bölgesinde meydana gelen modifikasyon sonucunda, antibiyotik bu bölgeye

bağlanamamaktadır. Bu tip direnç mekanizması sıklıkla trimetoprim ve sülfonamide dirençli bakterilerde gözlenmektedir. Bakterilerin geliştirdiği bir diğer direnç mekanizması ise biyofilm oluşumudur (Çiftçi ve Aksoy, 2015). Biyofilm oluşturan bakterilerde antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizması, antimikrobiyal maddenin biyofilm katmanlarına nüfuz edememesi ile açıklanmaktadır (Costerton ve ark., 1999). Biyofilm içindeki bakteriler, ihtiyaç duydukları besin maddelerinin ortamda bulunmaması durumunda, yavaş üreme fazına veya üremenin olmadığı bir döneme geçebilmektedir. Biyofilmdeki pH değişimleri de antibiyotik potensine etki ederek antibiyotik duyarlılığını olumsuz yönde etkilemektedir. Son direnç mekanizması ise dışa atım pompa (DAP)'ları ile antibiyotiğin hücre içindeki konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak gelişmektedir. Günümüzde ise bu mekanizmanın beta-laktamların da aralarında bulunduğu birçok antibiyotik grubuna karşı gelişen dirençte önemli rol oynadığı bilinmektedir. DAP'lar başta makrolid, tetrasiklin ve florokinolon olmak üzere çoğu antibiyotik grubunu etkilemektedir. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa*'daki MexAB-OprM pompa kompleksi beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnci artırmaktadır. Bu suşlar aynı zamanda kinolonlara, tetrasiklinlere, kloramfenikole ve trimetoprim de dirençli hale gelmektedir (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

2.1.3. Antimikrobiyal Dirençte Dışa Atım Pompalarının Rolü

DAP aracılı antimikrobiyal ilaç direnci; bakteri, mantar, protozoon ve kanser hücrelerinde tanımlanmıştır (Ayaz ve ark., 2017). Bakterilerdeki DAP'lar, zararlı maddelerin ve metabolik son ürünlerin hücre dışına atılmasında etkili olarak, bakterilerin birbirleri ve çevreleriyle olan ilişkilerinin düzenlenmesini sağlayan proteinlerdir (Kayaş, 2019). DAP'lar hem ilacın dışa atımında hem de çoklu ilaç direncindeki rolleriyle önem kazanmaktadır (Sun ve ark., 2014).

DAP aracılığıyla oluşan direnç, plazmid veya kromozom kontrolünde enerji ve iyon taşıma sistemlerine bağlı olarak gelişebilmektedir (Yüce, 2001; Seukep ve ark., 2020). DAP'lar; doğal ve kazanılmış dirence katkı sağlamaktadır. Düşük seviyelerde eksprese edilen farklı DAP'lar doğal dirence katkıda bulunabilir. Kazanılmış direnç, DAP geninin yatay gen transferi yoluyla ya da DAP'ın aşırı ekspresyonuna neden

olabilecek bir kromozomal mutasyonla oluşabilmektedir (Hernando-Amado ve ark., 2016).

DAP'lar; kinolonlara, 14 üyeli makrolidlere, beta-laktamlara, streptograminlere, azalide ve kloramfenikole karşı dirençte rol almaktadır (Yüce, 2001). Stafilocoklarda gelişen kinolon direncinden de DAP'lar sorumludur (Somer, 2010). *Staphylococcus epidermidis* suşlarında bulunan *msrA* ve *erpA* pompa genlerinin, 14 ve 15 üyeli makrolidlere dirençten sorumlu olduğu bildirilmiştir (Yüce, 2001). *P. aeruginosa*'da varlığı gösterilen MexAB-OprM ve MexXY-OprM pompa kompleksleri; beta-laktam, florokinolon ve tetrasiklin gibi çeşitli antibiyotik gruplarının yanı sıra kloramfenikol direncinden de sorumludur (Somer, 2010). *E. coli*'deki AcrAB-TolC pompa kompleksi de florokinolon, tetrasiklin ve beta-laktam grubu antibiyotikler ile kloramfenikol, novobiyosin, rifampin, fusidik asit ve nalidiksit asit gibi antibiyotiklere karşı dirençte rol oynamaktadır (Sun ve ark., 2014).

2.2. Dışa Atım Pompaları

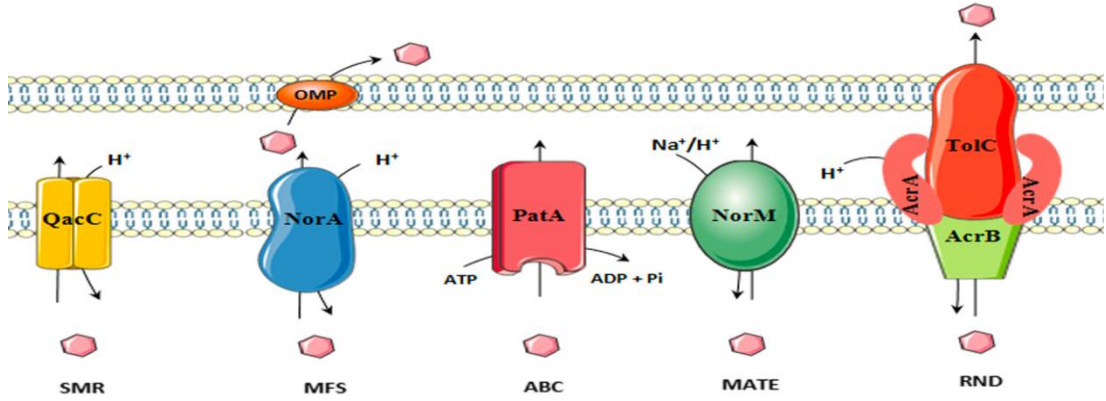
Dışa atım pompa (DAP)'ları, antibiyotik gibi maddelerin hücre dışına atımını sağlayan, ilaç direncinden sorumlu ve plazma zarına entegre olan proteinlerdir (Limaverde ve ark., 2017; Sharma ve ark., 2019). DAP'lar, çoklu ilaç direncine sahip olan bakterilerde transpozon, kromozom ve/veya plazmid üzerindeki direnç genleri aracılığıyla kodlanmaktadır (Sharma ve ark., 2019).

P-glikoprotein, 1970'lerin ortalarında memeli kanser hücrelerinde görülen ve ilaç direncinde rol oynayan ilk DAP örneğidir. Prokaryotlarda ilk DAP örneği ise *E. coli*'de tetrasikline karşı direnç mekanizması olarak tanımlanmıştır (Dwivedi ve ark., 2015). DAP'lara bağlı direnç mekanizmaları ilk kez 1970'lerin sonlarında tetrasiklin için kabul edilmiş ve zamanla birçok bakteride antibiyotik, biyosit ve çözücü gibi çeşitli antibakteriyel ajanlara karşı DAP aracılı direnç bildirilmiştir (Kumar ve Schweizer, 2005).

DAP'lar, bakterilerde antibiyotik direncine yol açmasının yanı sıra hücre zarı geçirgenliğinin azaltılması, antibiyotik inaktivasyonu veya değişimi, biyofilm

oluşumu ve *quorum sensing* gibi çeşitli mekanizmalarda da rol almaktadır (Seukep ve ark., 2020). Substratların tanınmasında ve taşınmasında rol oynayan DAP'lar, belli bir antimikrobiyale özgü olabileceği gibi farklı tipte terapötik ajanları da taşıyabilmektedir (Seukep ve ark., 2020).

DAP'lar günümüzde beş grupta kategorize edilmektedir. Bunlar: Major Facilitator Superfamily (Majör-Yönetici Süper Ailesi, MFS), ATP-Binding Cassette (Adenozin Trifosfat Kaset Bağlayıcı, ABC), Small Multidrug Resistance (Küçük Çoklu İlaç Direnç, SMR), Resistance-Nodulation-Division (Direnç-Düğüm-Hücre Bölümü, RND) ve Multidrug and Toxic Compound Extrusion (Çoklu İlaç ve Toksik Bileşik Çıkarım, MATE) gruplarıdır (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

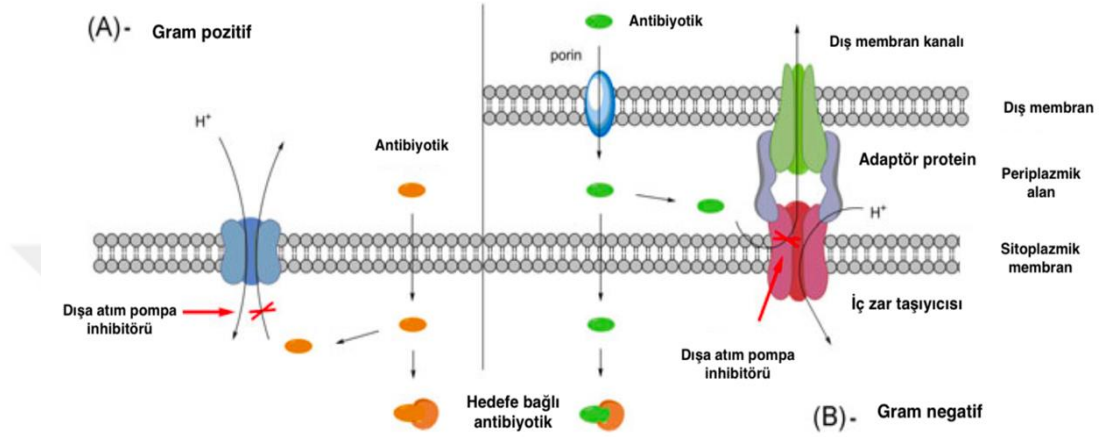


Şekil 2.2. DAP'ların şematik görüntüsü (Yılmaz ve Özcengiz, 2017).

Kompozisyonuna, transmembran geçiş bölgesine, enerji kaynağına ve substrat sayısına göre DAP'lar ikiye ayrılmaktadır (Kumar ve Schweizer, 2005). Birincil tip pompalar (ABC pompaları), ilgili maddeleri bakteri hücresi dışına atmak için ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanırken ikincil tip pompalar (MFS, SMR, RND, MATE) H^+ veya Na^+ katyonunun membran elektrokimyasal gradyanından gelen enerjiyi kullanmaktadır (Seukep ve ark., 2020).

DAP'lardan MATE, SMR ve RND aileleri prokaryotlarda bulunurken MFS ve ABC taşıyıcı aileleri hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yer almaktadır (Shriram ve ark., 2018). DAP'lar, hemen hemen tüm bakteri türlerinde bulunmaktadır (Kumar ve Schweizer, 2005). Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde SMR, MFS, MATE ve ABC ailesi yaygın iken RND ailesi sadece Gram negatif bakterilerde bulunmaktadır.

(Yılmaz ve Özcengiz, 2017). DAP'lar ait oldukları pompa ailesine bağlı olarak çeşitli antimikrobiyallerin bakteri hücresi dışına doğrudan atımını sağlamaktadır (Sun ve ark., 2014). Tek bileşenli pompalar, substratlarını sitoplazmik membran boyunca taşıırken Gram negatif bakterilerde bulunan çok bileşenli pompalar, tüm hücre zarı boyunca yer almaktadır (Kumar ve Schweizer, 2005).



Şekil 2.3. (A) Gram pozitif ve (B) Gram negatif bakterilerde DAP'ın yapısı (Lamut ve ark., 2019).

DAP'lar için gereken enerjinin veya DAP genlerinin ekspresyonunun bloke edilmesi ile pompalar inhibe edilebilmektedir. Bazı DAP genlerinin ekspresyonu için indüksiyon veya mutasyon gerekirken bazı DAP genleri ise sürekli olarak eksprese edilebilmektedir. Bu ekspresyon ile antibiyotiklere karşı doğal direnç oluşmaktadır (Bharwaj ve Mohanty, 2012).

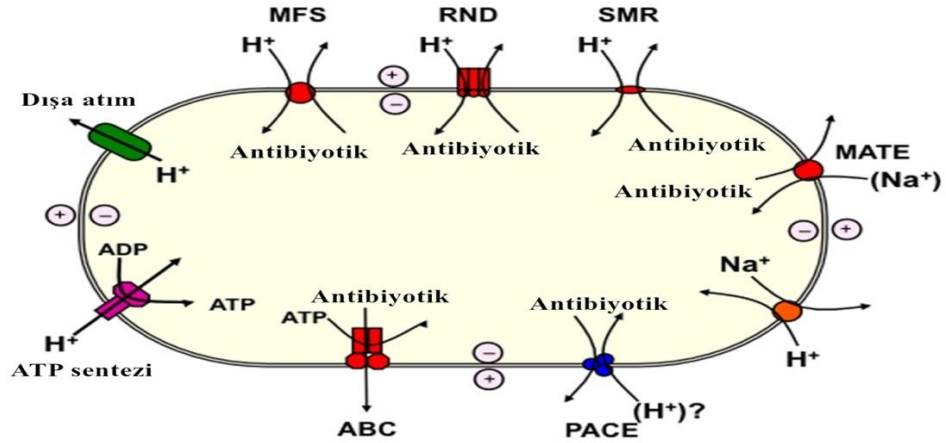
2.2.1. Dış Atım Pompa Yapısı

Antibiyotik veya hücrelerin ürettiği toksin gibi maddelerin dışa atımından sorumlu olan DAP'lar, antibiyotik direncine yol açan önemli direnç mekanizmalardan biridir (Marquez, 2005). DAP, ilk olarak 1980'de tetrasiklinlere karşı doğal direnç mekanizması olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde bulunabilen yaygın bir mekanizma olduğu anlaşılmıştır (Van Bambeke ve ark., 2006; Lamut ve ark., 2019).

Tüm DAP'lar çift tabakalı zar yapısına uygun bir bağlanma yüzeyi sağlamak için lipofilik yapıdadır. DAP'lar enerji kaynağı, filogenetik ilişki ve substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılmaktadır (Van Bambeke ve ark., 2000).

2.2.2. Dışa Atım Pompaların Sınıflandırılması

DAP'lar, enerji kaynağı ve substrat çeşitliliğine göre iki sınıfta incelenmektedir. Birinci sınıf DAP'lar, dışa atım için ATP'yi hidrolize ederek serbest kalan enerjiyi kullanan ABC pompaları, ikinci sınıf DAP'lar ise antimikrobiyallerin dışa atımı için H^+ veya Na^+ iyonlarının transmembran elektrokimyasal gradyanını kullanan MFS, SMR, RND ve MATE tipi pompalardır (Song ve Wu, 2016).



Şekil 2.4. Enerji kaynakları gösterilen DAP'ların şematik görüntüsü
(Hassan ve ark., 2015).

2.2.2.1. ATP Binding Casette (ABC) Tipi Pompalar

ATP Binding Casette (ABC) ailesi hem ökaryot hem de prokaryot hücrelerde bulunan ATP bağlama bölgelerine sahip pompalardır (Song ve Wu, 2016; Seukep ve ark., 2020). Substratların hem içe alımından hem de dışa atımından sorumludur (Kumar ve Schweizer, 2005). Ailedeki ilk temsilci P-glikoprotein'dir (Song ve Wu, 2016).

Yapısal olarak, 1200 amino asitten ve 6 transmembran protein segmentinden oluşmaktadır. Hidrofobik alanı iki transmembran segmenti oluşturmaktadır. İlk transmembran segmenti olan transmembran alanı, substratın tanınmasında ve taşınmasında sorumluyken nükleotid bağlama alanı olan diğer transmembran segmenti ATP'nin hidrolize edilmesinde ve bağlanmasında görev almaktadır (Seukep ve ark., 2020; Kumar ve Schweizer, 2005). ABC ailesi; şeker, aminoasit, iyon, ilaç gibi çeşitli maddelerin taşınmasında ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanmaktadır (Kumar ve Schweizer, 2005).

Staphylococcus spp. ve *Enterococcus spp.* gibi Gram pozitif bakterilerde makrolid grubu antibiyotiklere ve basitrasine direnç sağlayan ABC tipi pompalar bulunmaktadır (Ayaz ve ark., 2017). Ayrıca *Vibrio cholerae* ve *Mycoplasma spp.* gibi çeşitli mikroorganizmalarda çoklu ilaç direncine neden olan ABC tipi pompalar yer almaktadır (Ayaz ve ark., 2017). ABC ailesinin en önemli temsilcisi *Lactococcus lactis*'e ait LmrA pompası olarak belirlenmiştir (Kumar ve Schweizer, 2005). Gram negatif bakterilerde ABC pompaları bir dış zar proteini ve periplazmik adaptör proteini ile etkileşime girerek substratların dışa atımını sağlamaktadır ve en tipik örneği ise *E. coli*'ye ait MacAB-TolC pompa kompleksidir (Seukep ve ark., 2020).

2.2.2.2. Major Faciliator Superfamily (MFS) Tipi Pompalar

Major Faciliator Superfamily (MFS) ailesi, binden fazla pompası tanımlanan, 12-14 transmembran protein segmenti ve 400-600 amino asit yapısına sahip proteinlerdir. Bu ailenin üyeleri H^+ veya Na^+ gradyanına dayalı olarak şekerlerin, metabolitlerin, anyonların ve ilaçların dışa atımından sorumludur (Kumar ve Schweizer, 2005; Seukep ve ark., 2020).

MFS pompaları ökaryotik protistlerde bakterilerde, maya ve mantarlarda bulunmaktadır (Ayaz ve ark., 2017). Gram pozitif bakterilerde tek bileşenli yapı olarak bulunan MFS pompaları Gram negatif bakterilerde zar yapısından dolayı bir adaptör ve bir dış membran protein kompleksinden oluşmaktadır (Yılmaz ve Özcengiz, 2017; Hernando-Amado ve ark., 2016). MFS ailesi, ilaç/ H^+ antiporter (drug/ H^+ antiporter,

DHA) 1-2-3 olmak üzere üç alt aileden oluşmaktadır. Prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunan DHA-1 ve DHA-2, çeşitli antimikrobiyal maddelerin dışa atımını sağlamaktadır. DHA-1 pompaları şeker, monoamin, poliamin, asetilkolin, metilglioksal gibi maddelerin dışa atımında görevliken substrat özgüllüğü dar olan DHA-2 üyeleri, safra tuzlarının ve boyaların dışa atımını sağlamaktadır. DHA-3'ün ise yalnızca prokaryotlarda bulunduğu, makrolid ve tetrasiklin gibi antibiyotik gruplarının dışa atımından sorumlu olduğu bilinmektedir (Kumar ve Schweizer, 2005).

MFS pompalarından en çok *E. coli*'ye ait EmrAB-TolC pompa kompleksi üzerinde çalışılmıştır (Hernando-Amado ve ark., 2016). Gram pozitif bakterilerde *S. aureus*'a ait NorA, QacA, QacB ve *L. lactis*'e ait LmrP pompaları; Gram negatif bakterilerde ise *Acinetobacter baumannii*'de bulunan CraA, *E. coli*'deki MdfA ve *Klebsiella pneumoniae*'e ait KpnGH pompası kloramfenikol, norfloksasin, tetrasiklin, seftazidim, sefepim ve streptomisin gibi çeşitli antibiyotiklere karşı direnç sağlamaktadır (Seukep ve ark., 2020).

Bazı bakterilerin plazma zarında bulunan tetrasiklin direncinden sorumlu Tet ve makrolid direncinden sorumlu olan Mef pompaları, MFS ailesini temsil eden en önemli DAP'lardır (Chovanova ve ark., 2015; Song ve Wu, 2016).

2.2.2.3. Small Multidrug Resistance (SMR) Tipi Pompalar

Small Multidrug Resistance (SMR) ailesi, aminoglikozid ve makrolid grubu antibiyotiklerin hidrofobik bölgeleriyle doğrudan etkileşime giren, 110 amino asit ve 4 transmembran protein segmentinden oluşan küçük proteinlerdir (Song ve Wu, 2016; Kumar ve Schweizer, 2005).

SMR pompaları, dışa atımda proton gradyenini kullanmakta ve kromozom, plazmid ve integron aracılığıyla kodlanmaktadır. (Hernando-Amado ve ark., 2016; Li ve Nikaido, 2009). Diğer pompa aileleri ile kıyaslandığında daha dar substrat özgüllüğüne sahiptir (Li ve Nikaido, 2009).

Bu ailede bulunan SMR pompaları; mutasyon, baskılayıcı ve eşleştirilmiş SMR pompaları olmak üzere üç alt aile sınıfından oluşmaktadır. SMR pompaları tek bir genin ekspresyonundan sorumluyken diğer alt aileler çoklu ilaç direncine neden olmaktadır (Seukep ve ark., 2020).

SMR ailesinde 250'den fazla pompa tanımlanmıştır (Li ve Nikaido, 2009). En iyi tanımlanmış pompalar; boyaların, ilaçların ve katyonların dışa atımından sorumlu *S. aureus*'a ait olan QacEr pompası ve *E. coli*'nin EmrE pompasıdır (Kumar ve Schweizer, 2005). SMR ailesinin diğer pompaları arasında *Bacillus subtilis*'te EbrAb pompası, *S. aureus*'da ise SeoA ve QacC pompası bulunmaktadır (Seukep ve ark., 2020).

2.2.2.4. Resistance Nodulation Division (RND) Tipi Pompalar

Bir dış membran proteini ve her iki membranda bulunan bir membran füzyon proteininden oluşan Resistance Nodulation Division (RND) ailesi, bakterinin iç membranına gömülü şekilde bulunan pompalardan oluşmaktadır. RND pompaları substratların dışa atımında proton hareket kuvvetini kullanmaktadır (Hernando-Amado ve ark., 2016). RND pompaları geniş bir tanıma ve taşıma spektrumuna sahiptir (Seukep ve ark., 2020).

RND pompaları, 1000'den fazla amino asitten oluşmaktadır ve diğer pompalara kıyaslandığında yapıcı daha büyüktür (Seukep ve ark., 2020). RND ailesinin, önceleri sadece bakterilerde bulunduğu düşünülürken son dönemlerde ökaryotlarda ve arkealarda de yer aldığı bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2008).

Gram negatif bakteriler arasında oldukça yaygın olarak bulunan RND pompaları, çeşitli antimikrobiyallere karşı Gram negatif bakterilerin direnç kazanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Li ve Nikaido, 2009; Kumar ve Schweizer, 2005). RND pompalarında kazanılmış direnç, kromozomal mutasyon veya plazmid aracılığıyla kodlanmaktadır (Kumar ve Schweizer, 2005). Gram negatif bakterilerde RND pompaları; florokinolon, beta-laktam, tetrasiklin ve linezolid gibi birçok antibiyotiğe karşı gelişen doğal dirence katkı sağlamaktadır (Sharma ve ark.,

2019). *P. aeruginosa*'daki MexAB-OprM pompa kompleksi ve *E. coli*'deki AcrAB-TolC pompa kompleksi RND ailesini temsil eden örneklerdir (Song ve Wu, 2016).

2.2.2.5. Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Tipi Pompalar

Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) ailesine ait pompalar, önceleri MFS ailesinin bir üyesi olarak düşünülse de membran yapısı bakımından benzerlik göstermediği için ayrı bir pompa ailesi olarak tanınmaktadır. Bu pompalar yaklaşık 450 amino asit uzunluğunda ve 12 transmembran protein segmenti içermektedir (Kumar ve Schweizer, 2005). Bugüne kadar MATE ailesine ait yaklaşık 20 adet pompa tanımlanmıştır (Li ve Nikaido, 2009).

MATE ailesi yapısal özelliklerine göre DinF, NorM ve bakteriyel MATE alt ailesi olarak üçe ayrılmaktadır. DinF alt ailesinde antimikrobiyallerin dışa atımında katyonlar, NorM alt ailesinde ise protonlar antiporter olarak görev almaktadır. NorM ve DinF arasındaki bir diğer fark ise NorM alt ailesi, antimikrobiyal substratlar için iki ayrı bağlanma bölgesi bulundururken DinF alt ailesi tek bağlanma bölgesi bulundurmaktadır (Hernando-Amado ve ark., 2016). Bakteriyel MATE alt ailesi, poliaromatik ve katyonik ilaçların akışını sağlamak için H⁺ veya Na⁺ gradyanlarını kullanmaktadır (Du ve ark., 2018).

Bu aileye ait pompa örnekleri arasında ilk kez tanımlanan *Vibrio parahaemolyticus*'un NorM pompası ve onun homoloğu olan *E. coli*'nin YdhE pompası bulunmaktadır (Kumar ve Schweizer, 2005; Bharwaj ve Mohanty, 2012). Ayrıca *P. aeruginosa*'ya ait PmpM pompası ve *A. baumannii*'de bulunan AbeM pompaları, proton hareketlerine bağlı çalışan MATE pompalarına örnek verilmektedir. *S. aureus*'ta bulunan NorM ve MepA pompaları ise en çok araştırılan pompalardır (Seukep ve ark., 2020). MATE ailesi pompaları, sıklıkla florokinolon ve aminoglikozid direncine neden olmaktadır (Kumar ve Schweizer, 2005; Seukep ve ark., 2020).

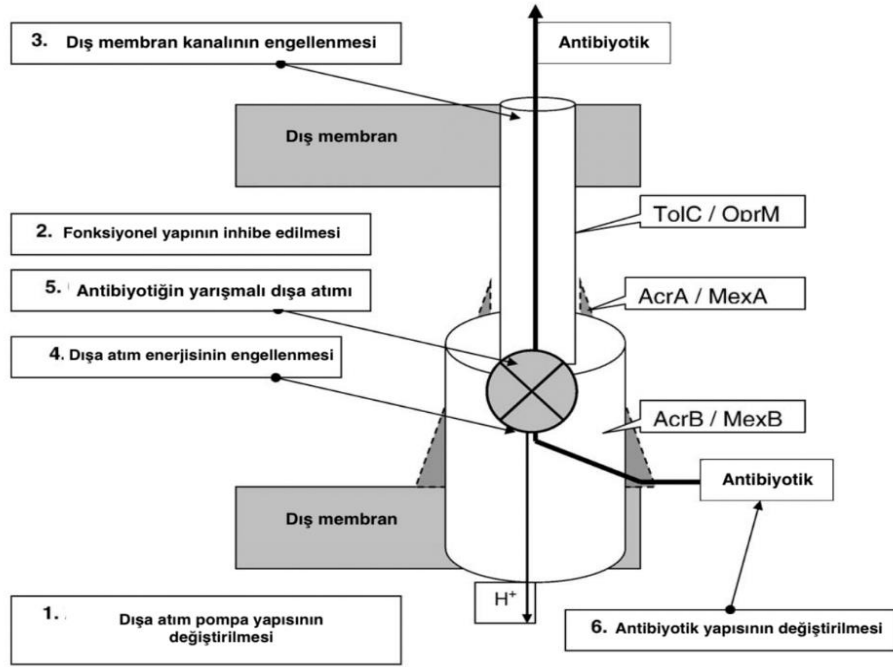
2.2.2.6. Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE)

Tipi Pompalar

SMR ailesine benzer olan Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE) ailesine ait pompalar, yakın zamanda bazı Gram negatif bakterilerde tanımlanmıştır (Lamut ve ark., 2019; Du ve ark., 2018). Dışa atım mekanizması henüz açıklanmamıştır ancak elektrokimyasal gradyanı etkilediği düşünülmektedir (Lamut ve ark., 2019). PACE ailesi hakkında temel bilgiler *Acinetobacter* bakterisinin AdeAB pompaları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Brindangnanam ve ark., 2022). PACE pompalarının bakteri türlerine özgü işlevlerinin olduğu düşünülmektedir (Teelucksingh ve ark., 2020). Son dönemde PACE ailesine ait ve *A. baumannii*'de bulunan bir pompa daha tanımlanmıştır (Seukep ve ark., 2020).

2.3. Dışa Atım Pompa İnhibitörleri

Dışa atım pompa inhibitör (DAPİ)'leri, geleneksel tarama yöntemleriyle rastgele keşfedilen doğal veya sentetik kökenli olabilen, bir veya birden fazla mekanizma ile antimikrobiyallerin dışa atımını inhibe etme yeteneği olan moleküllerdir (Aygül, 2015; Sharma ve ark., 2019). DAPİ'ler, DAP'ların ekspresyonunu düzenleyerek veya enerji mekanizmasını bloke ederek DAP'lara etki etmektedir (Sharma ve ark., 2019).



Şekil 2.5. Gram negatif bakterilerde DAP inhibisyon yolları
(Pages ve Amaral, 2009).

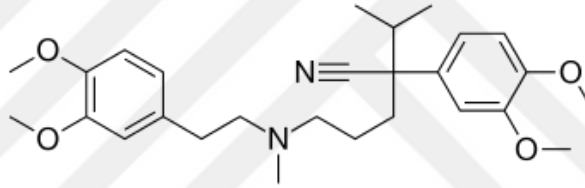
Esas olarak DAPI'ler substratlarla rekabetçi olmadan aynı bölgeye bağlanarak ve pompa hareketini engelleyerek işlev görmektedir. Aynı zamanda DAPI'ler, antibiyotiklerle birlikte uygulandıklarında antibiyotığın dışa atımını önleyerek veya azaltarak ilacın hücre içinde yüksek konsantrasyonda kalmasını sağlamaktadır (Lamut ve ark., 2019).

Bir kimyasal maddenin DAPI olarak nitelendirilebilmesi için sahip olması gereken bazı kriterler bulunmaktadır. Bu kriterler; aday molekülün ökaryotik hücreler üzerinde herhangi bir farmakolojik aktivite içermemesi, antibiyotiklerin aktivitesini artırması, özgül olması, herhangi bir ökaryotik DAP'ı hedeflememesi, yüksek konsantrasyonlarda hücre için toksik etkiye sahip olmaması, terapötik ve güvenilirlik indeksi yüksek olması ve gelişmiş farmokinetik özelliklere sahip olması, gelişmiş serum seviyeleri ve hücresel birikimi sağlamak için proteolitik olarak kararlı olması şeklinde sıralanabilir. Ayrıca ekonomik olması ve eğer biyolojik ise sentezinin zaman alıcı ve zor olmaması gerekmektedir (Sharma ve ark., 2019; Bharwaj ve Mohanty, 2012; Lamut ve ark., 2019).

DAPI'lerin, bakterilere karşı etkinliklerini arttırmak için antimikrobiyallerle kombine edilerek kullanılmasının olumlu sonuçlar verebileceği öngörülmektedir (Sharma ve ark., 2019). DAPI'nin antibiyotiklerle kombinasyon şeklinde kullanılmasının; antibiyotiklerin etki spektrumunu arttırabildiği, bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç düzeyini ve direncin ortaya çıkma sıklığını azaltabildiği bildirilmiştir (Lamut ve ark., 2019).

2.3.1. Verapamil

Kalsiyum kanal blokörü olarak bilinen verapamil (VER), fenilalkilamin türevi bir bileşik olup hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır (McTavish ve Sorkin, 1989; Sharma ve ark., 2019).



Şekil 2.6. Verapamil'in kimyasal yapısı.

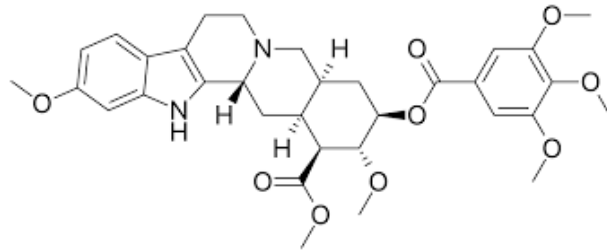
VER, kalp kasında bulunan kalsiyuma özgü membran bağlanma bölgelerine yüksek afinite ile bağlanarak kalsiyum girişinin azalmasına neden olmaktadır. VER'in kalpteki kalsiyum taşınmasına olan etkisi, antiaritmik ve negatif inotropik etkilere ve vasküler düz kas hücrelerinde benzer bir etki ile periferik ve koroner vazodilatasyona yol açmaktadır. VER'in, kalsiyumun yanı sıra sodyumun taşınmasında da rol aldığı bilinmektedir (Singh, 1978).

Bakterilerde yapılan çalışmalarda, VER'in MATE pompalarının aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. MATE pompalarını eksprese etmeyen bakteri hücrelerine karşı düşük miktarda toksisiteye sahiptir (Sharma ve ark., 2019). VER'in düşük konsantrasyonlarda kullanımı, *E. coli*'de proton hareket kuvvetini etkileyerek hücre içi ATP konsantrasyonunu düşürüp DNA, RNA ve protein sentezini etkilemeden bakterinin büyüme hızını yavaşlatmaktadır (Dalhoff, 2021).

VER'in başlıca etkinliğinin *M. tuberculosis*'e ait DAP inhibisyonu ile ilgili olduğu öne sürülmektedir. Birçok tüberküloz ilacıyla sinerjistik etki gösterdiği, minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde ve ilaç dirençlerinde azalmaya neden olduğu bildirilmektedir. *M. tuberculosis*'e karşı etkisinin karbonil siyanid-3-klorofenil-hidrazondan (CCCP), rezerpinden ve klorpromazinden daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Song ve Wu, 2016). *M. tuberculosis* ile yapılan çalışmalarda VER'in, bedakuilin ve ofloksasinin aktivitesini güçlendirdiği gösterilmiştir (Sharma ve ark., 2019).

2.3.2. Rezerpin

Rezerpin (REZ), lipofilik yapılu bir indol alkaloid olup ilk kez Schlittler ve arkadaşları tarafından *Rauwolfia serpentina* bitkisinin kökünden izole edilmiştir (Chen ve Huang, 2005; Song ve Wu, 2016). Antihipertansif ve antipsikotik özellikleri bilinmekle (Song ve Wu, 2016) birlikte günümüzde yaygın olarak kullanılmamaktadır. Genel olarak MFS ve RND ailesi pompalarına özgü bir DAPİ olarak kabul edilmektedir (Lamut ve ark., 2019). Ayrıca ABC pompalarını da inhibe edebilmektedir (Zhang ve ark., 2010).



Şekil 2.7. Reserpin'in kimyasal yapısı.

REZ'in DAPİ olarak aktivitesi ilk kez *Bacillus subtilis*'te tetrasiklinin hücreden atılmasına aracılık eden Bmr pompasının gösterilmesi ile keşfedilmiştir (Stavri, 2007; Lamut, 2019). Ayrıca REZ'in, *S. aureus*'un NorA pompası tarafından kazanılmış direnci azalttığı bilinmektedir (Lamut ve ark., 2019).

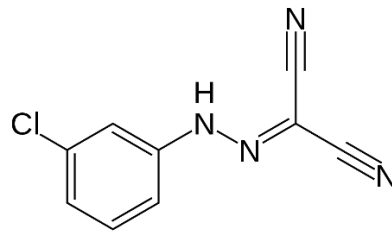
REZ, Gram pozitif bakterilerde florokinolon direnci üzerine etki göstermektedir. Dirençli *S. aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* varyantlarının MİK

değerlerini *in vitro* ortamda azalttığı bildirilmiştir. REZ, Tet (K) pompası bulunduran MRSA suşlarına karşı tetrasiklin aktivitesini de güçlendirmektedir (Marquez, 2005).

REZ, lipofilik yapısında kaynaklı olarak kan-beyin bariyerini geçebilmekte ve sinir sisteminin aktivitesini yavaşlamasına, kalp atış hızının düşmesine, kalp debisinin azalmasına, periferik direncin azalmasına ve kan basının düşmesine neden olabilmektedir (Cheung ve Parmar, 2023). Ek olarak REZ'in antibiyotiklerle birlikte klinik kullanımında, sahip olduğu nefrotoksik özelliğine de işaret edilmektedir (Sharma ve ark., 2019).

2.3.3. Karbonil Siyanid-3-klorofenil-hidrazon (CCCP)

Bir protonofor olan karbonil siyanid-3-klorofenil-hidrazon (CCCP), transmembran elektrokimyasal gradyanına etki ederek DAP'ları inhibe edebilen kimyasal bir madde olup (Zhang ve ark., 2010; Osei ve Amoako, 2017) bakteri zarının enerji seviyesini ve proton hareketlerini engelleyerek hücrenin ölümüne neden olabilmektedir (Pages ve Amaral, 2009). CCCP, *E. coli*'deki QacE pompasını etkileyerek antibiyotiklere karşı gelişen direnç durumunda bakteriyi duyarlı hale getirmektedir. MFS ailesi *Mycobacterium smegmatis*'te Tap pompasını inhibe ederek tetrasiklinin MİK değerini azaltmaktadır. CCCP'nin, MFS ailesinin yanı sıra ABC ve RND ailesi pompaları üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Song ve Wu, 2016; Zhang ve ark., 2010).



Şekil 2.8. CCCP'nin kimyasal yapısı.

CCCP üzerine yapılan *in vitro* çalışmalarda, ökaryotik hücrelerin proton hareket kuvvetinin azalması veya mitokondriyal ATP üretiminin kesilmesi durumunda da hayatta kaldığını göstermektedir. Bu durum, CCCP'ye maruz kalma süresine ve CCCP'nin konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin apoptoza karşı koruyucu mekanizmalar geliştirerek uyum sağlayabilmeleri ile açıklanmaktadır (Kane ve ark., 2018). CCCP, elektrokimyasal gradyan ve proton iletkenliğini artırıp mitokondriyal depolarizasyona neden olarak ATP üretiminin azalmasıyla hücresel metabolizmaya dolaylı yoldan etki etmektedir (Padman ve ark., 2013; Osei ve Amoako, 2017).

CCCP'nin, tek başına kullanıldığında veya antibiyotiklerle kombine edildiğinde Gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Lu ve ark., 2020). Ayrıca karbapenemler ile de sinerji oluşturduğu rapor edilmiştir (Sharma ve ark., 2019). CCCP'nin hücresel ve moleküler düzeyde etkileri tam olarak açıklanamamakla birlikte antibiyotiklerle gösterdiği sinerjistik etkinin, DAP aktivitesine etkisinden mi kaynaklandığı yoksa bakteri hücrelerini metabolik olarak inaktif hale getirmesinde mi kaynaklı olduğu tartışılmaktadır (Junior ve ark., 2020; Pages ve Amaral, 2009). CCCP, memeli hücrelerindeki sitotoksik etkisi nedeniyle, yalnızca laboratuvar kullanımı ile sınırlı kalmaktadır (Sharma ve ark., 2019).

2.4. Bakteriler

2.4.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, *Micrococcaceae* familyasında yer alan Gram pozitif bir bakteri olup nasus, vagina, farenks gibi bazı anatomik bölgelerin normal florasında bulunmaktadır (Limaverde ve ark., 2017; Akata, 2012).

S. aureus, toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biri olup cilt enfeksiyonları, alt solunum yolları enfeksiyonları, pnömoni, osteomyelit, septik artrit, kardiyovasküler enfeksiyonlar ve bakteriyemi gibi lokal ve sistemik birçok hastalığa sebep olabilmektedir (Hernando-Amado ve ark., 2016; Aksaray ve Arıcı, 2019). *S. aureus*'larda ilk kez 1930'lu yıllarda ortaya çıkan antibiyotik direnci

klirik kullanıma giren sülfonamid grubu antibiyotiklerle başlayıp günümüzde glikopeptidlere kadar uzanmaktadır (Altun ve Sancak, 2010; Sancak, 2011).

Sağlık kurumlarında önemli bir sorun haline dönüşen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları kullanımdaki antibiyotiklerin kısıtlılığı ve enfeksiyon kontrol yöntemlerinin yüksek maliyeti nedeniyle tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu oluşturmaktadır (Aksaray ve Arıcı, 2019; Hernando-Amado ve ark., 2016). MRSA suşları, beta-laktam grubu tüm antibiyotiklere dirençli olmakla birlikte makrolid, linkozamid, kinolon ve aminoglikozid gibi antibiyotik gruplarına da direnç göstermektedir (Aksaray ve Arıcı, 2019). Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptid grubu antibiyotiklere ek olarak linezolid, daptomisin ve tigesiklin en sık tercih edilen ilaçlar arasında yer almaktadır (Sancak, 2011).

S. aureus'ta antibiyotik direnci kromozomal mutasyon, plazmid veya DAP ile oluşmaktadır (Lamut ve ark., 2019). *S. aureus*'un antibiyotik direncinde DAP'lar önemli bir yer tutmaktadır (Sun ve ark., 2014). *S. aureus*'ta tanımlanan DAP'lardan; MFS ailesinden QacA pompası ve SMR ailesine ait Smr pompası kromozomal olarak; MFS ailesi pompaları ise plazmid ile kodlanmaktadır. MFS ailesinden NorA, NorB, NorC, NorD pompaları, *S. aureus* direncinde önemli rol oynamaktadır. NorA; florokinolon, kinolon gibi antimikrobiyaller ile biyosit gibi maddelerin hücreden atılmasında görev almaktadır. NorA ile %30 sekans benzerliği olan NorB, NorA substratlarına ek olarak tetrasiklinlere direnç sağlamaktadır. NorC, NorB'ye %61 oranında benzerliğe sahiptir ve çeşitli florokinolonlara direnç sağlamaktadır. NorD; kinolonlara, tetrasiklinlere, polimiksin B'ye, trimetoprime ve daptomisine direnç göstermektedir (Kumar ve Schweizer, 2005; Kumar ve ark., 2008; Hernando-Amado ve ark., 2016).

2.4.2. *Enterococcus faecalis*

Enterokoklar, Gram pozitif koklar olup tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunmaktadır. Fakültatif anaerop olan enterokoklar, insanların bağırsak, üretra, oral,

vajen ve safra yollarında mikrobiyota elemanı olarak yer almaktadır (Yıldırım, 2007; Özseven ve ark., 2011).

İnsanlarda toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan enterokoklar; üriner sistem enfeksiyonlarına, yara enfeksiyonlarına, intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlarına; bakteriyemi, menenjit ve endokardite yol açan yaygın ve önemli bir patojendir. Nadiren selülit veya diğer derin doku enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (İraz ve ark., 2012; Aktepe ve ark., 2011; Gülmez ve Hasçelik, 2011; Yıldırım, 2007). Enterokokal enfeksiyonlar içerisinde, diğer türlere oranla *Enterococcus faecalis* ile oluşan enfeksiyonlar 10 kat daha fazla görülmektedir (Yıldırım, 2007).

Tüm dünyada giderek artan çoklu antibiyotik direnci, özellikle nozokomiyal enterokok suşlarında ciddi sorunlara yol açmaktadır. Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi; transpozon, plazmid veya mutasyonla oluşmaktadır (Baylan ve ark., 2011). Klindamisin, trimetoprim-süfametoksazol, sefalosporin ve aminoglikozid grubu gibi yaygın kullanılan antibiyotiklere karşı doğal direnç gösteren bu bakteriler, diğer antibiyotiklere de kolaylıkla direnç geliştirebilmektedir (Gülmez ve Hasçelik, 2011; Gök ve ark., 2020).

Enterokokların antibiyotik direnç oranlarındaki dramatik artışı tedaviyi de güçleştirmektedir (Berktaş ve ark., 2013). Enterokokların neden olduğu üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının çoğu ampisilin, penisilin G ya da vankomisin gibi tek ilaçla tedavi edilebilmekteyken; enterokok endokarditi ve menenjiti için hücre duvarına etkili ajanlarla kombinasyon tedavisinin uygulanması gerekmektedir. Bazı vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşları penisilin G veya ampisiline duyarlı olabileceği için bu enfeksiyonların tedavisinde söz konusu antibiyotikler kullanılabilir (Yıldırım, 2007).

2.4.3. *Klebsiella pneumoniae*

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *Klebsiella pneumoniae*, insanların gastrointestinal sisteminde saprofit olarak bulunan ve çeşitli enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir (Baltacı ve ark., 2020; Tekintaş ve ark., 2017). *K.*

pneumoniae sepsis, pnömoni, üriner sistem enfeksiyonlarına, kateter ilişkili enfeksiyonlara, cerrahi alan enfeksiyonlarına ek olarak hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlara da neden olmaktadır (Yoon ve ark., 2020; Baltacı ve ark., 2020). *K. pneumoniae* enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla aminoglikozid ve beta-laktam grubu antibiyotikler tercih edilmektedir (Kahraman ve ark., 2017).

Birçok antibiyotiğe direnç kazanabilen *K. pneumoniae*'nın, genellikle ampisiline karşı doğal dirence sahip olduğu bildirilmektedir (Kahraman ve ark., 2017). *Klebsiella* türlerinde antibiyotik direncinin en önemli mekanizması genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimidir. *Klebsiella* türleri, GSBL enzimleri ile sefalosporinlere karşı direnç geliştirmektedir. Bu yüzden *K. pneumoniae* ile ilişki enfeksiyonlarda sıklıkla karbapenemler tercih edilmeye başlanmış fakat takip eden süreçte bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, son yıllarda dünyada ve ülkemizde sıklıkla bildirilmeye başlanmıştır (Baltacı ve ark., 2020; Kahraman ve ark., 2017). DAP'lar, *K. pneumoniae* izolatlarında beta-laktam direncinde önemli rol oynamaktadır (Li ve Nikaido, 2009). *K. pneumoniae*'ye ait AcrAB ve OqxAB pompa komplekslerinin klinik öneme sahip olduğu bilinmektedir. AcrAB pompa kompleksi piperatazosilin ve seftulozan-tazobaktam gibi geniş spektrumlu yeni antibiyotikler de dahil olmak üzere çeşitli antibiyotiklerin dışa atımından sorumluyken OqxAB ise florokinolonlar, tigesiklin ve nitrofurantoinin dışa atımını sağlamaktadır (Davin-Regli ve ark., 2021).

2.4.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Dünya çapında yüksek mortalite ve morbitideye neden olan non-fermenter Gram negatif bir basil olan *Pseudomonas aeruginosa*, fırsatçı bir patojendir (Durmaz ve Özer, 2015; Lamut ve ark., 2019). *P. aeruginosa*; bakteriyemi, menenjit, beyin apsesi, pnömoni, otit, septik artrit, osteomyelit, endokardit, diyare, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları; mekanik solunum desteği alan ve immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara, özellikle kistik fibrozis olgularında kronik akciğer enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Yılmaz ve ark., 2010; Öztürk, 2002).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinde penisilinler, sefalosporinler karbapenemler, monobaktamlar, aminoglikozidler, tetrasiklinler ve florokinolonlar kullanılmaktadır (Altındış ve ark., 2015). *P. aeruginosa*, antistafilokokal penisilin, ampisilin-sulbaktam, amoksisilin-kalvulanat, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, trimetoprim-sulfametaksazol ve nalidiksik asit gibi birçok antibiyotiğe doğal dirençli olup kullanımda olan pek çok antimikrobiyal ajana da hızla direnç geliştirmektedir (Durmaz ve Özer, 2015; Berktaş ve ark., 2011).

P. aeruginosa, doğal dirence ek olarak kromozomal mutasyon, plazmid, transpozon ve integron aracılığıyla birçok antibiyotiğe karşı da direnç geliştirebilmektedir (Karakeçe ve ark., 2014). DAP aracılığıyla karbapenemler dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişimi gözlenmektedir (Berktaş ve ark., 2011). *P. aeruginosa* için halihazırda tanımlanmış 12 adet DAP bulunmaktadır. Tümü RND ailesine ait olan MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM pompaları klinik açıdan önemli pompalardır (Hernando-Amado ve ark., 2016). Bildirilen ilk DAP olan MexAB-OprM pompa kompleksi; kinolon, makrolid, tetrasiklin, beta-laktam gibi antibiyotik gruplarıyla novobiyosin, kloramfenikol ve linkomisin gibi antibiyotiklere karşı dirençten sorumludur (Pesingi ve ark., 2019; Kumar ve Schweizer, 2005).

2.4.5. *Escherichia coli*

Escherichia coli, fakültatif anaerob ve Gram negatif basil morfolojisinde olup doğada yaygın olarak bulunabilen bir patojendir. *E. coli* suşlarının çoğu bağırsak florasında yaygın olarak bulunup birçok doku ve organda çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Bozkır ve ark., 2020; Lamut ve ark., 2019; Şahin ve Altan, 2019).

Laboratuvarlarda sıkça izole edilen *E. coli* toplum kökenli veya hastane enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. *E. coli*, sıklıkla idrar yolu enfeksiyonuna neden olmakla birlikte cerrahi alan enfeksiyonlarına, intraabdominal apselere, peritonite, pnömoniye, bakteriyemiye ve nöroşirurji sonrası gelişen menenjitlere yol açabilmektedir (Şahin ve Altan, 2019).

Birçok *E. coli* izolatının ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, norfloksasin, sefuroksim, seftriakson ve ko-trimoksazol gibi antibiyotiklere dirençli olduğu kabul edilmektedir (Bozkır ve ark., 2020). *E. coli* suşlarının genom analizi sonucunda AcrAB, AcrEF, AcrD, YhiUV, MdtABC ve TolC olmak üzere toplam yedi RND ailesi pompası bulundurduğu tespit edilmiştir. AcrAB-TolC pompa kompleksi, *E. coli* için baskın DAP olarak tanımlanmıştır. Çok geniş bir substrat özgüllüğü olan bu pompa kompleksi akriflavin, beta-laktamlar, florokinolonlar, makrolidler, kloramfenikol, etidyum bromür, safra tuzları, yağ asitleri, organik çözücülerini substrat olarak kullanmaktadır (Kumar ve Schweizer, 2005). DAP'ların *E. coli* suşlarında görülen sefuroksim ve florokinolon direncinde de rol aldığı gösterilmiştir (Li ve Nikaido, 2009).

2.5. Antibiyotikler

2.5.1. Tetrasiklin

Streptomyces rimosus'dan 1940'lı yıllarda üretilen tetrasiklin (TET), yarı sentetik bir antibiyotiktir (Poole, 2005; Chopra ve Roberts, 2001). Tetrasiklin, 30S ribozomal alt birime bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir (LaPlante ve ark., 2022).

Tetrasiklin, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, klamidyalara, riketsiyalara ve mikoplazmalara karşı aktiviteye sahip geniş spektrumlu bir ajandır (Eliopoulos ve Roberts, 2003). Cilt enfeksiyonları, pnömoni, kemik ve eklem enfeksiyonları, intraabdominal enfeksiyonlar, riketsiya ve spiroketlerin oluşturduğu enfeksiyonlar; *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* ve *Francisella tularensis* gibi biyolojik ajanların oluşturduğu hastalıkların ve cinsel yolla bulaşan hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (LaPlante ve ark., 2022; Usluer, 2007).

Tetrasiklinin tedavilerde kullanılmaya başlanmasından kısa bir süre sonra, tetrasikline dirençli patojenler tanımlanmaya başlanmıştır. Genellikle plazmid, transpozon ve integron aracılığıyla direnç gelişimi gözlenirse de en yaygın olanı DAP ile gelişen dirençtir (Eliopoulos ve Roberts, 2003; LaPlante ve ark., 2022). DAP'ların çoğu tetrasikline karşı direnç oluşturmaktadır (Chopra ve Roberts, 2001).

MFS ailesinde tetrasiklin direncine aracılık eden Tet pompası çoğunlukla Gram negatif bakterilerde rapor edilirken Gram pozitif bakterilerde ve mikobakterilerde de tanımlanmıştır. Tet pompalarında plazmid, transpozon ve integron ile direnç gelişimi gözlenmektedir (Poole, 2005; Poole, 2007). Tetrasiklin direnci için 20 farklı tipte Tet pompası bulunmaktadır (Poole, 2005). Baskın Tet aracılı dirence sahip olan *S. aureus* ve *Helicobacter pylori* Gram pozitif bakterilere; *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* ve *Acinetobacter* spp. gibi bakteriler de Gram negatif bakterilere örnek verilmektedir (Poole, 2007). Kazanılmış dirence ek olarak *Providencia* spp., *Proteus mirabilis* ve *P. aeruginosa* gibi Gram negatif mikroorganizmaların tetrasikline karşı doğal dirence sahip olduğu bildirilmektedir (LaPlante ve ark., 2022).

2.5.2. Tigesiklin

Minosiklin türevi yarı sentetik bir glisilsiklin olan tigesiklin (TGC), 1991’de üretilmiş ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2005 yılında onaylanmıştır (Yoon ve ark., 2020; Slover ve ark., 2007; Wilcox, 2006). Tigesiklin, bakteri hücrelerine aktif taşıma ve pasif difüzyon yoluyla girerek yüksek afiniteli bağlanma bölgesindeki ribozomal reseptöre bağlanıp aminoasil-tRNA’nın ribozoma girişini bloke etmektedir. Böylelikle peptid zincirlerinin uzamasını engellemektedir (Townsend ve ark., 2006; Pournaras ve ark., 2016; Wilcox, 2006).

Tigesiklin, komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının ve intraabdominal enfeksiyonlarının yanı sıra toplum kökenli bakteriyel pnömoninin tedavisinde de kullanılmaktadır (Bender ve ark., 2018; Sun ve ark., 2013). Genel olarak bakteriyostatik etki gösterirken bazı mikroorganizmalara karşı bakterisidal aktivitesi olduğu da bildirilmiştir (Çalık ve Akova, 2007). İntravenöz kullanımda %100 biyoyararlanıma sahiptir (Acar, 2015).

Enterobacteriaceae ve *Acinetobacter* türlerinde tetrasiklin direncinden sorumlu Tet (A-E), Tet (M) ve stafilokoklardaki dirençten sorumlu olan Tet (K) pompalarından etkilenmediği için tetrasikline kıyasla tigesiklinin etki spektrumu daha geniştir (Çalık ve Akova, 2007; Peterson, 2008; Pournaras ve ark., 2016). Buna

karşılık, MDR tipi DAP'ın aşırı ekspresyonu tigesiklin duyarlılığının azalmasına yol açmaktadır (Slover ve ark., 2007).

Tigesiklin Gram pozitif mikroorganizmalardan *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, metisiline dirençli *S. epidermidis*, penisiline dirençli *St. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, VRE ve *Listeria monocytogenes*'e karşı etkilidir. Tigesiklin, Gram negatif mikroorganizmalardan GSBL üreten suşlar da dahil olmak üzere *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*, *Serratia marcescens*, *A. baumannii* ve *Stenotrophomonas maltophilia*'ya etkiliyken *P. aeruginosa*, *Morganella*, *Proteus* ve *Providencia* türleri için etkinliği düşüktür. *Bacteriodes fragilis* gibi anaerob mikroorganizmalarda ise tigesiklin tetrasiklinlerden daha etkilidir (Acar, 2015; Slover ve ark., 2007; Ulusoy, 2006). *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* ve *Pseudomonas* türlerinde, tigesikline karşı RND tipi DAP'ların aracılık ettiği doğal direncin varlığı da bilinmektedir (Pournaras ve ark., 2016).

2.5.3. Gentamisin

Gentamisin (GN), *Micromonospora purpurea* ve *Micromonospora echinospora* tarafından üretilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. FDA, gentamisinin intramusküler kullanımını 1969'da, intravenöz kullanımını ise 1971'de onaylamıştır (Abou-Zeid ve Shehata, 1977). Gentamisin, 30S ribozomal alt birimdeki spesifik reseptör bölgelerine bağlanıp polipeptid sentezini inhibe ederek bakterisidal etki göstermektedir (Appel ve Neu, 1978).

Gentamisin, hem *S. aureus* hem de *S. epidermidis*'e karşı oldukça etkiliyken *Diplococcus pneumoniae*, *St. pyogenes* gibi diğer Gram pozitif koklara karşı zayıf etki göstermektedir. Gram negatif mikroorganizmalarda ise çoğu *Enterobacteriaceae* üyesine ve *P. aeruginosa* suşuna etkilidir ancak duyarlılık düzeyleri değişkenlik göstermektedir (Appel ve Neu, 1978).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri Kökenleri

Bu çalışmada, standart bakteri kökenleri ile klinik örneklerden soyutlanmış çoklu antibiyotik dirençli bakteriler (ÇİDB) kullanıldı. Çalışma kapsamında Gram pozitif bakteri olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; Gram negatif bakteri olarak *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kökenleri seçildi. ÇİDB olarak, Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilmiş *S. aureus* ÇİDB, *E. faecalis* ÇİDB, *K. pneumoniae* ÇİDB, *P. aeruginosa* ÇİDB ve *E. coli* ÇİDB kökenlerinden üçer adet klinik izolat seçildi.

3.1.1. Bakterilerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

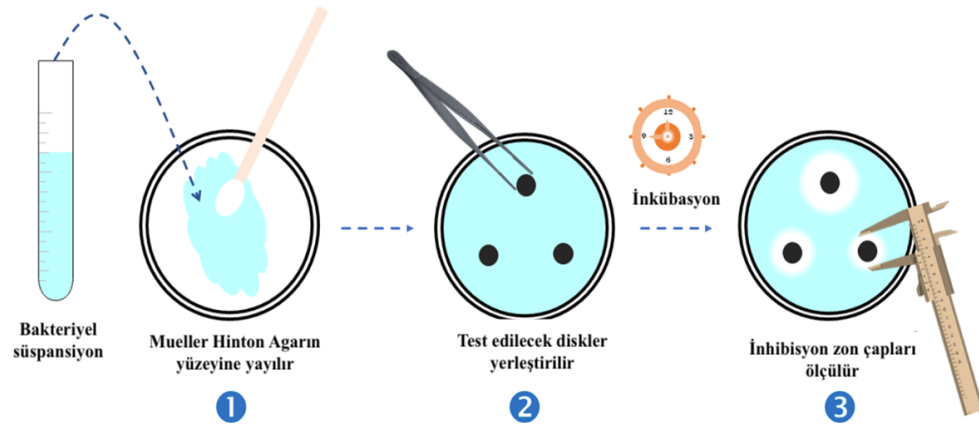
Bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix 100 (Becton and Dickinson Company, ABD) cihazı ile yapıldı. Antibiyotiklerin klinik sınır değerleri için EUCAST klinik sınır değerleri tabloları baz alındı (EUCAST, 2019).

3.2. DAPİ'lerin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

Antibakteriyel aktivite tayini için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile inhibisyon zon çapları, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile de minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) belirlendi (CLSI, 2018).

3.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Verapamil, rezerpin ve CCCP stok solüsyonları 128 mg/mL olacak şekilde; verapamil için distile su (DS), rezerpin ve CCCP için ise dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılarak hazırlandı. DAPİ solüsyonlarından çapı 6 mm olan standart disklerle, miktarı 2.56 mg olacak şekilde hesaplanarak 20 µL emdirildi. Besiyeri olarak %5 koyun kanı ilave edilmiş Mueller-Hinton agar (KKMHA) kullanıldı (Becton and Dickinson, ABD). Test edilecek bakteri kökenleri KKMHA'a ekilerek 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Taze kültürlerden alınan bakteri kolonileri ile McFarland 0.5 yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bakteri süspansiyonu tam saha ekim yöntemi kullanılarak steril silgiç ile plaklara ekildi. Ekim işleminde her bir bakteri kökeni için ayrı bir KKMHA kullanıldı. Plaklar, DAPİ içeren disklerin KKMHA yüzeyine yerleştirilmesinin ardından 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. Çözücü kontrolü olarak DMSO emdirilmiş disk kullanıldı. Çalışmalar üç kez tekrarlanarak, inhibisyon zonu ortalamaları değerlendirmeye alındı (CLSI, 2018).



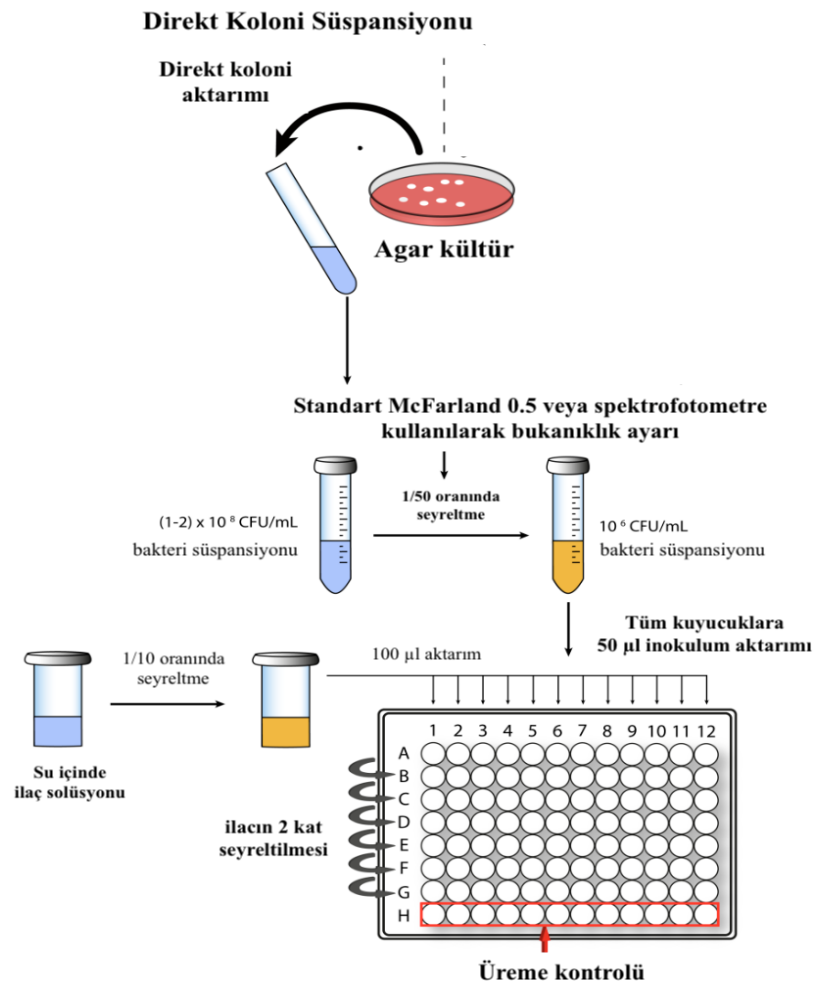
Şekil 3.1. Disk difüzyon yönteminin şematik görüntüsü

(El Guerraf ve ark., 2022).

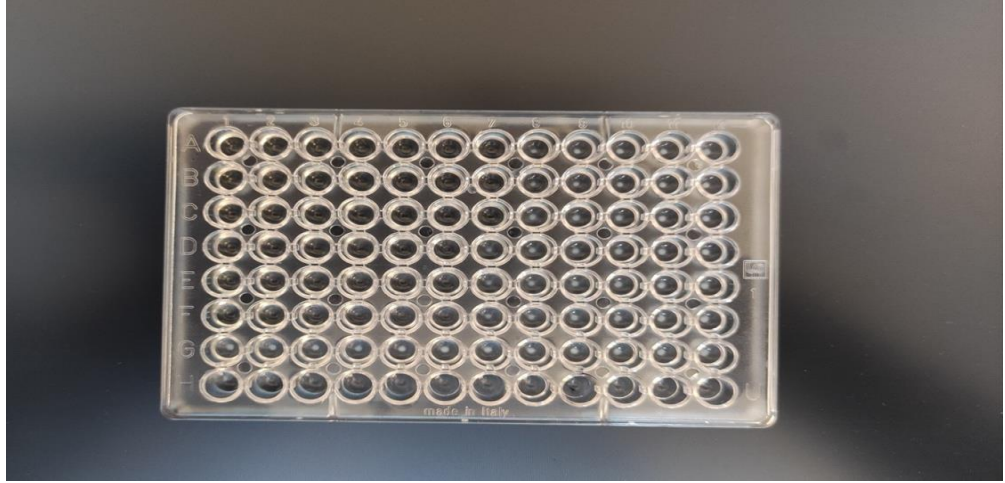
3.2.2. MİK ve MBK Değerlerinin Belirlenmesi

DAPİ'lerin MİK ve MBK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 96 kuyucuklu U tabanlı steril mikropalakalar kullanılarak belirlendi. Tüm çalışmalar Mueller-Hinton Broth (MHB) (Becton and Dickinson, ABD) besiyeri kullanılarak

yapıldı. Mikroplakalardaki her bir kuyucuğa 50 µL MHB pipetlendi. DAPİ'lerin seri sulandırımı 256-0.125 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. KKMHA'da üretilmiş her bir bakteri kökeninden McFarland 0.5 yoğunlukta olacak şekilde bakteri süspansiyonları (10^8 kob/mL) hazırlanarak, 1/100 oranında seyreltildi (10^6 kob/mL). Mikroplakalardaki her bir kuyucuğa son konsantrasyonu 5×10^5 kob/mL olacak şekilde bakteri süspansiyonundan 50 µL eklendi. Mikroplaka üzerinde üreme kontrolü (MHB+bakteri), çözücü kontrolü (MHB+bakteri+DMSO/DS), besiyeri kontrolü (MHB) ve sterilite kontrolü (MHB+DAPİ) için birer kuyucuk kullanıldı. Mikroplakaların kapakları kapatılarak 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Bakteri üremesinin gözle görülemediği en düşük konsantrasyon, DAPİ için MİK değeri olarak belirlendi. Tüm çalışmalar üç kez tekrarlanarak, ortalamaları değerlendirmeye alındı (CLSI, 2018).

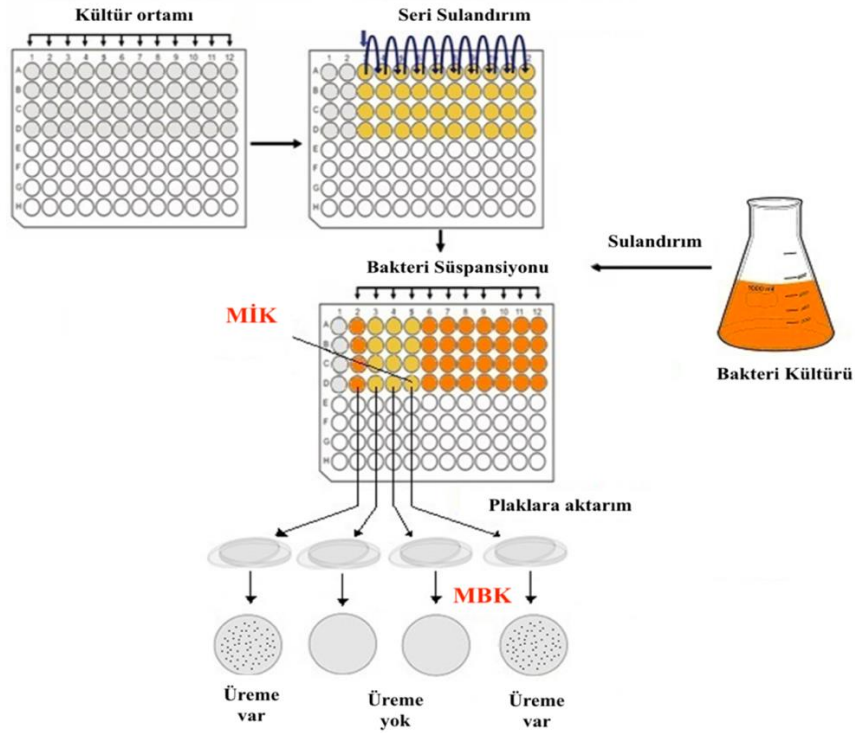


Şekil 3.2. Sıvı mikrodilüsyon yönteminin şematik görüntüsü (Molchanova ve ark., 2017'den değiştirilerek alınmıştır).



Şekil 3.3. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK belirlenmesi.

MBK tespiti için, MİK değerleri belirlendikten sonra mikroparka üzerinde bakteri üremesi görülmeyen kuyucukların her birinden 10 µL alınarak birbirine karışmayacak şekilde KKMHA'a pipetlendi. Besiyerleri 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. KKMHA üzerinde bakterinin %99,9'unu öldüren en küçük konsantrasyon MBK olarak kabul edildi (CLSI, 2018).



Şekil 3.4. MBK yönteminin şematik görüntüsü (Paiva ve ark., 2013).



Şekil 3.5. KKMHA’da MBK testi.

3.3. DAPI’lerin MİK Değerleri Üzerine Etkisinin Araştırılması

3.3.1. Antibiyotiklerin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında kullanılacak antibiyotik etken maddelerinden gentamisin, Bilim İlaç firmasından (Bilim İlaç, Türkiye); tetrasiklin (T7660) ve tigesiklin (PZ0021), ise Sigma firmasından (Sigma-Aldrich, ABD) ticari olarak temin edildi.

3.3.2. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Antibiyotiklerin etken maddeleri ile gönderilen protokollerden uygun çözücü/sulandırıcı çeşidi ve potens değerine ulaşıldı. İstenen antibiyotik konsantrasyonunun hazırlanması Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterleri (2018) doğrultusunda yapıldı. Antibiyotikler hazırlanırken çözücü ve sulandırıcı olarak su kullanıldı. Antibiyotiklerin 2560 µg/mL’lik stok çözeltileri aşağıdaki formüle göre hazırlandı.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \text{Hacim (mL)} \times \text{Konsantrasyon (µg/mL)} / \text{Potens (µg/mg)}$$

Hazırlanan stok çözeltiler 1 mL’lik miktarlarda ayrı tüplere konularak test edilecekleri zamana kadar -20 °C’de saklandı. Sıvı mikrodilüsyon ve *checkerboard* çalışması öncesinde hazırlanan antibiyotik stok solüsyonları, 1/10 oranında seyreltilip 256 µg/mL’lik çalışma solüsyonları elde edildi.

3.3.3. DAPİ’lerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında DAPİ olarak verapamil (V4629), rezerpin (R0875) ve CCCP (C2759) seçildi. DAPİ’ler Sigma firmasından (Sigma-Aldrich, ABD) ticari olarak sağlandı.



Şekil 3.6. Dışa atım pompa inhibitörleri.

Dışa atım pompa inhibitörleriyle birlikte gönderilen protokollerden uygun çözücü çeşidine ulaşıldı. Rezerpin ve CCCP DMSO’da, verapamil ise distile suda çözüldürüldü.

3.3.4. DAPİ’lerin Antibiyotikler ile Etkileşiminin *Checkerboard* Yöntemiyle Belirlenmesi

DAPİ ve antibiyotikler arasındaki etkileşimin *checkerboard* yöntemiyle belirlenmesi amacıyla 2 adet 96 kuyucuklu “U” tabanlı steril mikropłaka kullanıldı. Birinci mikropłakaya MHB’dan 50 µL dağıtılıp DAPİ MİK değeriinin 2-3 sulandırım

üstünden başlayıp 5-6 sulandırım altına kadar yukarıdan aşağıya doğru seyreltildi. İkinci mikropalakaya ise MHB'dan 50 µL dağıtılarak antibiyotik MİK değerinin 2-3 sulandırım üstünden 5-6 sulandırım altına kadar sağdan sola doğru seyreltildi. İkinci mikropalakadaki sulandırım ilk mikropalakaya birebir aynı kuyucuğa gelecek şekilde 50 µL aktarılarak her kuyucukta iki antibakteriyel maddenin farklı kombinasyonları elde edildi (Eliopoulos ve Moellering, 1996).

KKMHA'da üretilmiş her bir bakteri kökeninden McFarland 0.5 yoğunlukta olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları (10^8 kob/mL) 1/100 oranında seyreltildi (10^6 kob/mL). Mikropalakalardaki her bir kuyucuğa son konsantrasyon 5×10^5 kob/mL olacak şekilde kontrol kuyucukları hariç diğer tüm kuyucuklara bakteri süspansiyonundan 50 µL eklendi. Birinci mikropalaka üzerinde üreme kontrolü (MHB + bakteri), besiyeri kontrolü (MHB), çözücü kontrolü (MHB+bakteri+DMSO/DS) ve sterilit kontrolü (MHB+DAPI) için kuyucuklar kullanıldı. Mikropalakalar 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. Tüm çalışmalar üç kez tekrarlanarak, ortalamaları değerlendirmeye alındı. *Checkerboard* mikropalakalarının hazırlık şemaları Şekil 3.7, Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da gösterilmiştir.

BİRİNCİ MİKROPLAKA (DAPI MİKROPLAKASI)											
DAPI SERİ SULANDIRIM ALANI								KONTROL ALANI		MİK ALANI	
										AB	DAPI
128	128	128	128	128	128	128	128	ÜREME KONTROL (MHB+BAKTERİ)	ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO+MHB+BAKTERİ)	128	2560
64	64	64	64	64	64	64	64			64	1280
32	32	32	32	32	32	32	32			32	640
16	16	16	16	16	16	16	16			16	320
8	8	8	8	8	8	8	8	BESİYERİ KONTROL (MHB)	STERİLİTE KONTROL (MHB+DAPI)	8	160
4	4	4	4	4	4	4	4			4	80
2	2	2	2	2	2	2	2			2	40
1	1	1	1	1	1	1	1			1	20

Şekil 3.7. Checkerboard metodunda birinci mikropalakanın hazırlık şeması.

Antibiyotikler ile DAPİ arasındaki etkileşim, fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksi (FİKİ) hesaplanarak belirlendi. Bu hesaplama için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$FİKİ = FİK \text{ DAPİ} + FİK \text{ Antibiyotik}$$

$$FİKİ = \frac{\text{Kombinasyondaki DAPİ MİK} + \text{Kombinasyondaki Antibiyotik MİK}}{\text{DAPİ MİK} + \text{Antibiyotik MİK}}$$

Hesaplanan FİKİ değerleri, sınır değerlere göre yorumu yapıldı. Etkileşimler ≤ 0.5 : sinerji; $> 0.50-1 \geq$: aditif; $> 1.00-2.00 >$: etkisiz (indifferent) ve ≥ 2.00 : antagonizma olarak değerlendirilmeye alındı (EUCAST, 2000).

İKİNCİ MİKROPLAKA (ANTİBİYOTİK MİKROPLAKASI)							
ANTİBİYOTİK SERİ SULANDIRIM ALANI							BOŞ ALAN
20	40	80	160	320	640	1280	2560
20	40	80	160	320	640	1280	2560
20	40	80	160	320	640	1280	2560
20	40	80	160	320	640	1280	2560
20	40	80	160	320	640	1280	2560
20	40	80	160	320	640	1280	2560
20	40	80	160	320	640	1280	2560
20	40	80	160	320	640	1280	2560

Şekil 3.8. Checkerboard metodunda ikinci mikroplakanın hazırlık şeması.

Checkerboard yöntemi ile DAPI ve tetrasiklin kombinasyonunun *S. aureus* ÇİDB kökeni için şematik olarak görünümü Şekil 3.9’da verilmiştir.

AB DAPI													
DİŞA ATIM POMPA İNHİBİTÖRÜ	2	2 10	2 20	2 40	2 80	2 160	2 320	2 640	2 1280	b	c	4	2560
	1	1 10	1 20	1 40	1 80	1 160	1 320	1 640	1 1280	b	c	2	1280
	0,5	0,5 10	0,5 20	0,5 40	0,5 80	0,5 160	0,5 320	0,5 640	0,5 1280	b	c	1	a 640
	0,25	0,25 10	0,25 20	0,25 40	0,25 80	0,25 160	0,25 320	0,25 640	0,25 1280	b	c	a _{0,5}	320
	0,125	0,125 10	0,125 20	0,125 40	0,125 80	0,125 160	0,125 320	0,125 640	0,125 1280	d	e	0,25	160
	0,062	0,062 10	0,062 20	0,062 40	0,062 80	0,062 160	0,062 320	0,062 640	0,062 1280	d	e	0,125	80
	0,031	0,031 10	0,031 20	0,031 40	0,031 80	0,031 160	0,031 320	0,031 640	0,031 1280	d	e	0,062	40
	0,015	0,015 10	0,015 20	0,015 40	0,015 80	0,015 160	0,015 320	0,015 640	0,015 1280	d	e	0,031	20
		2,5	5	10	20	40	80	160	320	ANTİBİYOTİK			

Şekil 3.9. İnkübasyon sonrası checkerboard mikroplakasının görünüm şeması.

Bakteri üreyen kuyucuklar yeşil, bakteri üremeyen kuyucuklar beyaz ve FİKİ hesaplanacak kuyucuklar pembe renk ile temsil etmektedir, ^aDAPI ve antibiyotiğin MİK değeri, ^bÜreme kontrolü (MHB+Bakteri), ^cÇözücü kontrolü (MHB+ Bakteri+DMSO/DS), ^dBesiyeri kontrolü (MHB), ^eSterilite kontrolü (MHB+DAPI), DAPI: Dışa Atım Pompa İnhibitörü, AB: Antibiyotik

4. BULGULAR

4.1. Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Çalışmada çoklu ilaç dirençli üçer adet *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* klinik izolatu ile *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 olmak üzere 5 adet ATCC suşu kullanılmıştır. *S. aureus* izolatlarından ikisi metisiline dirençliydi. Klinik izolatların antibiyotik duyarlılıkları BD Phoneix 100 (Becton, Dickinson and Company, ABD) cihazıyla belirlendi.

Bu çalışmaya alınan iki *S. aureus* izolatu tetrasikline dirençli iken diğer izolat duyarlı, tüm izolatların ise gentamisine duyarlı olduğu bulundu. *S. aureus* izolatlarına ait direnç profilleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *S. aureus* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profili.

İzolat No	Tetrasiklin	Gentamisin
İzolat No.1 (MRSA)	>2	<=1
İzolat No.2 (MRSA)	>2	<=1
İzolat No.3	<=0.5	<=1

Bu çalışmaya alınan tüm *E. faecalis* izolatları tetrasikline ve gentamisine dirençli bulundu. *E. faecalis* izolatlarına ait direnç profilleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. *E. faecalis* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profili.

İzolat No	Tetrasiklin	Gentamisin
İzolat No.1	>2	>4
İzolat No.2	>2	>4
İzolat No.3	>2	>4

Bu çalışmaya alınan *K. pneumoniae*'nin bir izolatı tigesikline karşı dirençli iken diğer iki izolatı duyarlı, tüm izolatları ise gentamisine karşı dirençli bulundu. *K. pneumoniae* izolatlarına ait direnç profilleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. *K. pneumoniae* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profili.

İzolat No	Tigesiklin	Gentamisin
İzolat No.1	<=1	>8
İzolat No.2	1	>8
İzolat No.3	<=1	>8

Bu çalışmaya alınan tüm *P. aeruginosa* izolatları tigesikline dirençli bulundu. *P. aeruginosa*'nın iki izolatı gentamisine duyarlı iken diğer izolatı dirençliydi. *P. aeruginosa* izolatlarına ait direnç profilleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. *P. aeruginosa* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profili.

İzolat No	Tigesiklin	Gentamisin
İzolat No.1	>2	<=2
İzolat No.2	>2	<=2
İzolat No.3	>2	2

Bu çalışma kapsamındaki tüm *E. coli* izolatları tigesikline karşı duyarlı iken iki *E. coli* izolatı gentamisine karşı dirençli, diğer izolat ise duyarlı bulundu. *E. coli* izolatlarına ait direnç profilleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. *E. coli* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profili.

İzolat No	Tigesiklin	Gentamisin
İzolat No.1	<=1	<=2
İzolat No.2	2	>8
İzolat No.3	2	>8

4.2. DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi

4.2.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi

DAPİ'lerin disk difüzyon çalışmaları, CLSI (2018) kriterleri doğrultusunda yapıldı. REZ ve CCCP tüm bakteri gruplarında inhibisyon zonu oluştururken VER'in, *S. aureus* hariç diğer bakteri gruplarında inhibisyon zonu oluşturmadığı görüldü.

VER'in *S. aureus*'a karşı oluşturduğu inhibisyon zonu 6-8 mm aralığında, REZ'in 6-7 mm aralığında ve CCCP'nin 17-26 mm olduğu saptandı. VER ve REZ'in, *S. aureus* izolatlarında benzer inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlendi. CCCP ise diğer DAPİ'ler ile kıyaslandığında *S. aureus* izolatlarında inhibisyon zonunun 3-4 kat daha geniş olduğu gözlemlendi. *S. aureus* izolatlarına ait disk difüzyon sonuçları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. *S. aureus* izolatlarına karşı DAPİ'lerin inhibisyon zonu ölçümleri.

İzolat No	Zon Çapı Değerleri (mm)		
	VER	REZ	CCCP
ATCC (29213)	9	7	26
İzolat No.1	7	7	25
İzolat No.2	7	7	17
İzolat No.3	8	7	22

VER: Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon

REZ'in *E. faecalis*'e karşı oluşturduğu inhibisyon zonu 6-8 mm aralığında, CCCP'nin ise 9-14 mm olduğu saptandı. *E. faecalis* izolatlarında VER'in inhibisyon zonu oluşturmadığı, CCCP'nin oluşturduğu inhibisyon zonunun ise 11-14 mm arasında olup REZ'e kıyasla iki kat geniş olduğu görüldü. *E. faecalis* izolatlarına ait disk difüzyon sonuçları Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. *E. faecalis* izolatlarına karşı DAPI'lerin inhibisyon zonu ölçümleri.

İzolat No	Zon Çapı Değerleri (mm)	
	REZ	CCCP
ATCC (29212)	8	9
İzolat No.1	7	14
İzolat No.2	7	14
İzolat No.3	7	11

REZ: Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon

REZ'in *K. pneumoniae*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonu 6-7 mm aralığında, CCCP'nin ise 8-9 mm olduğu saptandı. *K. pneumoniae* izolatlarında VER'in inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlemlendi. CCCP ve REZ'in benzer inhibisyon zonu oluşturduğu ancak CCCP'nin 1-3 mm daha geniş zon oluşturduğu saptandı. *K. pneumoniae* izolatlarına ait disk difüzyon sonuçları Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. *K. pneumoniae* izolatlarına karşı DAPI'lerin inhibisyon zonu ölçümleri.

İzolat No	Zon Çapı Değerleri (mm)	
	REZ	CCCP
ATCC (7006003)	7	8
İzolat No.1	7	8
İzolat No.2	7	9
İzolat No.3	7	8

REZ: Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon

REZ'in *P. aeruginosa*'ya karşı oluşturduğu inhibisyon zonu 6-8 mm aralığında, CCCP'nin ise 7-9 mm olduğu saptandı. *P. aeruginosa* izolatlarında VER'in inhibisyon zonu oluşturmadığı saptandı. Her iki DAPI'nin de benzer inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlendi. *P. aeruginosa* izolatlarına ait disk difüzyon sonuçları Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. *P. aeruginosa* izolatlarına karşı DAPİ'lerin inhibisyon zonu ölçümleri.

İzolat No	Zon Çapı Değerleri (mm)	
	REZ	CCCP
ATCC (27853)	7	8
İzolat No.1	8	8
İzolat No.2	7	7
İzolat No.3	7	9

REZ: Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon

REZ'in *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonu 7-8 mm aralığında, CCCP'nin ise 8-11 mm olduğu saptandı. *E. coli* izolatlarında VER'in inhibisyon zonu oluşturmadığı saptandı. CCCP'nin oluşturduğu inhibisyon zonu ise 8-11 mm arasında olup bir izolat dışında REZ ile benzer olduğu görüldü. *E. coli* izolatlarına ait disk difüzyon sonuçları Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10. *E. coli* izolatlarına karşı DAPİ'lerin inhibisyon zonu ölçümleri.

İzolat No	Zon Çapı Değerleri (mm)	
	REZ	CCCP
ATCC (25922)	7	8
İzolat No.1	7	11
İzolat No.2	8	8
İzolat No.3	7	8

REZ: Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon

4.2.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi

VER, REZ ve CCCP'nin antibakteriyel aktivitesi, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. DAPİ'lerin sıvı mikrodilüsyon sonuçları incelendiğinde tüm bakteri izolatlarına karşı VER'in MİK değerleri >64-64 µg/mL arasında değişirken REZ'in MİK değerleri >64-4 µg/mL arasında ve CCCP'nin MİK değerleri ise 64-1 µg/mL arasında bir dağılım gösterdi.

S. aureus izolatlarına karşı VER'in, MİK ve MBK değerleri >64-64 µg/mL arasında olup benzer dağılım göstermiştir. Tüm izolatlara karşı REZ'in MİK değeri 32 µg/mL, MBK değeri >64 µg/mL olarak saptandı. CCCP'nin ise tüm izolatlara karşı MİK değeri 1 µg/mL, MBK değeri 8-16 µg/mL arasında dağılım gösterdiği saptandı. DAPİ'lere ait MİK ve MBK değerleri Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11. *S. aureus* izolatlarına karşı DAPİ'lerin MİK ve MBK değerleri (µg/mL).

İzolat No	VER		REZ		CCCP	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
ATCC (29213)	64	64	32	64	2	4
İzolat No.1	>64	>64	32	>64	1	8
İzolat No.2	64	64	32	>64	1	16
İzolat No.3	>64	>64	32	>64	1	8

VER: Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **MİK:** Minimum inhibitör konsantrasyonu, **MBK:** Minimum bakterisidal konsantrasyon

E. faecalis tüm izolatlarına karşı VER'in, MİK ve MBK değerleri >64 µg/mL olduğu saptandı. Tüm izolatlara karşı REZ'in MİK değeri 4 µg/mL iken MBK değeri 16-64 µg/mL arasında dağılım gösterdiği saptandı. CCCP'nin ise tüm izolatlara karşı MİK değeri 1 µg/mL, MBK değeri 4-8 µg/mL arasında dağılım gösterdiği saptandı. DAPİ'lere ait MİK ve MBK değerleri Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. *E. faecalis* izolatlarına karşı DAPİ'lerin MİK ve MBK değerleri (µg/mL).

İzolat No	VER		REZ		CCCP	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
ATCC (29212)	>64	>64	4	32	8	32
İzolat No.1	>64	>64	4	32	1	8
İzolat No.2	>64	>64	4	16	1	8
İzolat No.3	>64	>64	4	64	1	4

VER: Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **MİK:** Minimum inhibitör konsantrasyonu, **MBK:** Minimum bakterisidal konsantrasyon

K. pneumoniae tüm izolatlarına karşı VER'in, MİK ve MBK değerleri >64 µg/mL olduğu saptandı. REZ'in MİK değeri 16-64 µg/mL arasında iken MBK değeri >64-32 µg/mL arasında dağılım gösterdiği saptandı. Tüm izolatlara karşı CCCP'nin MİK değeri 64 µg/mL, MBK değeri >64 µg/mL arasında dağılım gösterdiği saptandı. DAPİ'lere ait MİK ve MBK değerleri Tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.13. *K. pneumoniae* izolatlarına karşı DAPİ'lerin MİK ve MBK değerleri (µg/mL).

İzolat No	VER		REZ		CCCP	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
ATCC (700603)	>64	>64	64	64	64	>64
İzolat No.1	>64	>64	64	>64	64	>64
İzolat No.2	>64	>64	64	>64	64	>64
İzolat No.3	>64	>64	16	32	64	>64

VER: Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **MİK:** Minimum inhibitör konsantrasyonu, **MBK:** Minimum bakterisidal konsantrasyon

P. aeruginosa tüm izolatlarına karşı VER ve REZ'in, MİK ve MBK değerleri >64 µg/mL olduğu saptanırken CCCP'nin MİK değeri 64 µg/mL, izolatların MBK değeri >64-64 µg/mL arasında dağılım gösterdiği saptandı. DAPİ'lere ait MİK ve MBK değerleri Tablo 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.14. *P. aeruginosa* izolatlarına karşı DAPİ'lerin MİK ve MBK değerleri (µg/mL).

İzolat No	VER		REZ		CCCP	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
ATCC (27853)	>64	>64	>64	>64	64	>64
İzolat No.1	>64	>64	>64	>64	64	64
İzolat No.2	>64	>64	>64	>64	64	>64
İzolat No.3	>64	>64	>64	>64	64	>64

VER: Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **MİK:** Minimum inhibitör konsantrasyonu, **MBK:** Minimum bakterisidal konsantrasyon

E. coli tüm izolatlarına karşı VER'in, MİK ve MBK değerleri >64 µg/mL olduğu saptandı. REZ'in MİK değeri 16-64 µg/mL arasında iken MBK değeri >64-32 µg/mL arasında dağılım gösterdiği saptandı. İzolatın CCCP'nin MİK değeri 64-32 µg/mL, MBK değeri >64-64 µg/mL arasında dağılım gösterdiği saptandı. DAPI'lere ait MİK ve MBK değerleri Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.15. *E. coli* izolatlarına karşı DAPI'lerin MİK ve MBK değerleri (µg/mL).

İzolat No	VER		REZ		CCCP	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
ATCC (25922)	>64	>64	64	64	32	>64
İzolat No.1	>64	>64	64	>64	32	64
İzolat No.2	>64	>64	16	32	32	>64
İzolat No.3	>64	>64	16	32	64	>64

VER: Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **MİK:** Minimum inhibitör konsantrasyonu, **MBK:** Minimum bakterisidal konsantrasyon

4.3. DAPI'ler ve Antibiyotikler Arasındaki Sinerjik Etkileşim

Checkerboard yöntemi ile yapılan kombinasyon çalışmaları, inkübasyonun ardından *checkerboard* mikrop plakasında üreme olmayan en düşük konsantrasyonlardaki her kuyucuğun hem DAPI hem antibiyotik için hesaplanan fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) değerleri toplanarak fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FİKİ) hesaplandı. En küçük FİKİ değeri baz alınarak denenen antibiyotik ve DAPI'nin kombinasyon sonuçları değerlendirildi.

TET'in tüm *S. aureus* izolatlarına karşı VER veya REZ ile kombinasyonunda sinerji saptandı. CCCP ile kombinasyonunda ise iki *S. aureus* izolatına karşı aditif etki görüldü. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.16. *S. aureus* izolatlarına karşı tetrasiklin ve DAPİ'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TET}	FİK _i	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TET}	FİK _i	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TET}	FİK _i	Etk.
ATCC (29213)	0.25/0.25	0.50	Sinerji	0.031/0.50	0.531	Aditif	0.248/0.496	0.744	Aditif
İzolat No.1	0.125/0.125	0.25	Sinerji	0.125/0.125	0.25	Sinerji	1/0.125	1.125	Etkisiz
İzolat No.2	0.125/0.062	0.187	Sinerji	0.007/0.125	0.132	Sinerji	0.496/0.25	0.746	Aditif
İzolat No.3	0.062/0.062	0.125	Sinerji	0.007/0.125	0.132	Sinerji	0.008/0.50	0.508	Aditif

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_i:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TET:** Tetrasiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

TGC'nin tüm *S. aureus* izolatlarına karşı CCCP ile kombinasyonunda ve iki *S. aureus* izolatına karşı REZ ile kombinasyonunda sinerji saptanırken, diğer kombinasyonlarda aditif etki saptandı. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17. *S. aureus* izolatlarına karşı tigesiklin ve DAPİ'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TGC}	FİK _i	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TGC}	FİK _i	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TGC}	FİK _i	Etk.
ATCC (29213)	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.124/0.125	0.249	Sinerji
İzolat No.1	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.125/0.125	0.25	Sinerji	0.248/0.25	0.498	Sinerji
İzolat No.2	0.125/0.50	0.625	Aditif	0.007/0.25	0.257	Sinerji	0.031/0.25	0.281	Sinerji
İzolat No.3	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.015/0.50	0.515	Aditif	0.25/0.25	0.50	Sinerji

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_i:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TGC:** Tigesiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

GN'nin iki *S. aureus* izolatına karşı VER veya REZ ile kombinasyonlarında ve bir izolata karşı CCCP ile kombinasyonunda sinerji görüldü. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.18'de verilmiştir.

Tablo 4.18. *S. aureus* izolatlarına karşı gentamisin ve DAPI'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{GN}	FİK _i	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{GN}	FİK _i	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{GN}	FİK _i	Etk.
ATCC (29213)	0.25/0.25	0.50	Sinerji	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.50/0.50	1	Aditif
İzolat No.1	0.015/0.50	0.515	Aditif	0.50/0.50	1	Aditif	0.496/0.003	0.499	Sinerji
İzolat No.2	0.25/0.25	0.50	Sinerji	0.25/0.25	0.50	Sinerji	0.056/0.50	0.556	Aditif
İzolat No.3	0.25/0.25	0.50	Sinerji	0.125/0.25	0.375	Sinerji	0.112/0.50	0.612	Aditif

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_i:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **GN:** Gentamisin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

TET'in bir *E. faecalis* izolatlarına karşı CCCP ile kombinasyonunda sinerji saptanırken, diğer tüm kombinasyonlarda aditif etki görüldü. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.19'da verilmiştir.

TGC'nin bir *E. faecalis* izolatına karşı CCCP ile kombinasyonunda sinerji saptanırken, iki izolatın REZ veya CCCP ile kombinasyonlarında aditif etki görüldü. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.20'de verilmiştir.

Tablo 4.19. *E. faecalis* izolatlarına karşı tetrasiklin ve DAPI'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TET}	FİK _I	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TET}	FİK _I	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TET}	FİK _I	Etk.
ATCC (29212)	0.015/0.50	0.515	Aditif	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.015/0.50	0.515	Aditif
İzolat No.1	0.50/0.50	1	Aditif	0.015/0.50	0.515	Aditif	0.25/0.25	0.50	Sinerji
İzolat No.2	0.015/0.50	0.515	Aditif	0.50/0.50	1	Aditif	0.062/0.50	0.562	Aditif
İzolat No.3	0.50/0.50	1	Aditif	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.50/0.50	1	Aditif

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_I:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TET:** Tetrasiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

Tablo 4.20. *E. faecalis* izolatlarına karşı tigesiklin ve DAPI'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TGC}	FİK _I	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TGC}	FİK _I	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TGC}	FİK _I	Etk.
ATCC (29212)	0.015/0.50	0.515	Etkisiz	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.125/0.50	0.625	Aditif
İzolat No.1	0.50/0.50	1	Etkisiz	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.062/0.25	0.312	Sinerji
İzolat No.2	0.015/0.50	0.515	Etkisiz	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.062/0.50	0.562	Aditif
İzolat No.3	0.50/0.50	1	Etkisiz	0.007/1	1.007	Etkisiz	0.25/0.50	0.75	Aditif

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_I:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TGC:** Tigesiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

GN'nin iki *E. faecalis* izolatına karşı CCCP ile kombinasyonunda sinerji saptanırken, bir izolatın VER ile kombinasyonu hariç diğer tüm kombinasyonlarda aditif etki görüldü. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.21'de verilmiştir.

Tablo 4.21. *E. faecalis* izolatlarına karşı gentamisin ve DAPI'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{GN}	FİKİ	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{GN}	FİKİ	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{GN}	FİKİ	Etk.
ATCC (29212)	0.003/0.50	0.503	Aditif	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.125/0.25	0.375	Sinerji
İzolat No.1	0.015/1	1.015	Etkisiz	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.007/0.50	0.507	Aditif
İzolat No.2	0.031/0.50	0.531	Aditif	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.125/0.25	0.375	Sinerji
İzolat No.3	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.062/0.25	0.312	Sinerji

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİKİ:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **GN:** Gentamisin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

TET'in tüm *K. pneumoniae* izolatlarına karşı REZ veya CCCP ile kombinasyonlarında sinerji saptanırken, VER ile kombinasyonunda aditif etki saptandı. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.22'de verilmiştir.

Tablo 4.22. *K. pneumoniae* izolatlarına karşı tetrasiklin ve DAPI'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TET}	FİKİ	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TET}	FİKİ	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TET}	FİKİ	Etk.
ATCC (700603)	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.062/0.50	0.562	Aditif	0.25/0.25	0.50	Sinerji
İzolat No.1	0.50/0.50	1	Aditif	0.062/0.25	0.312	Sinerji	0.062/0.125	0.187	Sinerji
İzolat No.2	0.50/0.50	1	Aditif	0.007/0.25	0.257	Sinerji	0.25/0.25	0.50	Sinerji
İzolat No.3	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.25/0.25	0.50	Sinerji	0.031/0.125	0.156	Sinerji

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİKİ:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TET:** Tetrasiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

TGC'nin iki *K. pneumoniae* izolatına karşı CCCP ile kombinasyonunda ve bir izolatla VER ile kombinasyonunda sinerji saptanıp, iki *K. pneumoniae* izolatına REZ

ile kombinasyonunda etki görülmezken, diğer kombinasyonlarda aditif etki görülürdü. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.23'te verilmiştir.

Tablo 4.23. *K. pneumoniae* izolatlarına karşı tigesiklin ve DAPİ'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TGC}	FİKİ	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TGC}	FİKİ	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TGC}	FİKİ	Etk.
ATCC (700603)	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.007/1	1.007	Etkisiz	0.031/0.25	0.281	Sinerji
İzolat No.1	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.007/1	1.007	Etkisiz	0.125/0.25	0.375	Sinerji
İzolat No.2	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.007/1	1.007	Etkisiz	0.25/0.50	0.75	Aditif
İzolat No.3	0.25/0.25	0.50	Sinerji	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.125/0.125	0.25	Sinerji

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİKİ:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TGC:** Tigesiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

GN'nin tüm *K. pneumoniae* izolatlarına karşı DAPİ'ler ile kombinasyonlarında aditif etki saptandı. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.24'te verilmiştir.

Tablo 4.24. *K. pneumoniae* izolatlarına karşı gentamisin ve DAPİ'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{GN}	FİKİ	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{GN}	FİKİ	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{GN}	FİKİ	Etk.
ATCC (700603)	0.50/0.50	1	Aditif	0.25/0.25	0.5	Sinerji	0.062/0.25	0.312	Sinerji
İzolat No.1	0.062/0.50	0.562	Aditif	0.50/0.50	1	Aditif	0.25/0.50	0.75	Aditif
İzolat No.2	0.50/0.50	1	Aditif	0.50/0.50	1	Aditif	0.125/0.50	0.625	Aditif
İzolat No.3	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.50/0.031	0.531	Aditif

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİKİ:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **GN:** Gentamisin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

TET'in bir *P. aeruginosa* izolatına karşı REZ ile kombinasyonunda etki görülmemesi dışında diğer tüm kombinasyonlarda aditif etki görüldü. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.25'te verilmiştir.

Tablo 4.25. *P. aeruginosa* izolatlarına karşı tetrasiklin ve DAPI'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TET}	FİK _i	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TET}	FİK _i	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TET}	FİK _i	Etk.
ATCC (27853)	0.50/0.50	1	Aditif	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.125/0.50	0.625	Aditif
İzolat No.1	0.50/0.50	1	Aditif	0.50/0.50	1	Aditif	0.015/0.50	0.515	Aditif
İzolat No.2	0.50/0.50	1	Aditif	0.015/0.50	0.515	Aditif	0.031/0.50	0.531	Aditif
İzolat No.3	0.125/0.50	0.625	Aditif	0.015/1	1.015	Etkisiz	0.007/0.50	0.507	Aditif

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_i:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TET:** Tetrasiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

Tüm *P. aeruginosa* izolatlarına karşı TGC'nin CCCP ile kombinasyonlarında sinerji saptanırken, bir izolatta REZ ile kombinasyonu dışında diğer tüm kombinasyonlarda aditif etki saptandı. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.26'da verilmiştir.

GN'nin bir *P. aeruginosa* izolatına karşı VER ile kombinasyonu ve bir başka *P. aeruginosa* izolatına karşı REZ kombinasyonu dışında diğer tüm kombinasyonlarda sinerji saptandı. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.27'de verilmiştir.

Tablo 4.26. *P. aeruginosa* izolatlarına karşı tigesiklin ve DAPİ’ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TGC}	FİK _I	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TGC}	FİK _I	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TGC}	FİK _I	Etk.
ATCC (27853)	0.062/0.50	0.562	Aditif	0.031/0.50	0.531	Aditif	0.031/0.50	0.531	Aditif
İzolat No.1	0.062/0.50	0.562	Aditif	0.50/0.50	1	Aditif	0.062/0.25	0.312	Sinerji
İzolat No.2	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.062/0.25	0.312	Sinerji
İzolat No.3	0.031/0.50	0.531	Aditif	0.007/1	1.007	Etkisiz	0.062/0.25	0.187	Sinerji

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_I:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TGC:** Tigesiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

Tablo 4.27. *P. aeruginosa* izolatlarına karşı gentamisin ve DAPİ’ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{GN}	FİK _I	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{GN}	FİK _I	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{GN}	FİK _I	Etk.
ATCC (27853)	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.125/0.25	0.375	Sinerji	0.007/0.50	0.507	Aditif
İzolat No.1	0.50/0.50	1	Aditif	0.125/0.125	0.25	Sinerji	0.125/0.25	0.375	Sinerji
İzolat No.2	0.125/0.25	0.375	Sinerji	0.125/0.25	0.375	Sinerji	0.25/0.25	0.50	Sinerji
İzolat No.3	0.031/0.25	0.281	Sinerji	0.015/1	1.015	Etkisiz	0.031/0.25	0.281	Sinerji

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_I:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **GN:** Gentamisin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

TET’nin bir *E. coli* izolatına karşı VER ve CCCP ile kombinasyonunda sinerji saptanıp iki *E. coli* izolatına karşı VER ile kombinasyonunda etki görülmezken diğer kombinasyonlarda aditif etki saptandı. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.28’de verilmiştir.

Tablo 4.28. *E. coli* izolatlarına karşı tetrasiklin ve DAPİ'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TET}	FİK _i	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TET}	FİK _i	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TET}	FİK _i	Etk.
ATCC (25922)	0.007/1	1.007	Etkisiz	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.25/0.25	0.375	Sinerji
İzolat No.1	0.125/0.25	0.375	Sinerji	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.50/0.25	0.75	Aditif
İzolat No.2	0.007/1	1.007	Etkisiz	0.50/0.50	1	Aditif	0.125/0.25	0.375	Sinerji
İzolat No.3	0.50/1	1.5	Etkisiz	0.125/0.50	0.625	Aditif	0.25/0.50	0.75	Aditif

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_i:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TET:** Tetrasiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

TGC'nin bir *E. coli* izolatına karşı CCCP ile kombinasyonunda sinerji saptanırken diğer tüm kombinasyonlarda aditif etki saptandı. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.29'da verilmiştir.

Tablo 4.29. *E. coli* izolatlarına karşı tigesiklin ve DAPİ'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	FİK _{VER} / FİK _{TGC}	FİK _i	Etk.	FİK _{REZ} / FİK _{TGC}	FİK _i	Etk.	FİK _{CCCP} / FİK _{TGC}	FİK _i	Etk.
ATCC (25922)	0.062/0.50	0.562	Aditif	0.003/0.50	0.503	Aditif	0.062/0.062	0.124	Sinerji
İzolat No.1	0.007/0.50	0.507	Aditif	0.015/1	1.015	Aditif	0.25/0.50	0.75	Aditif
İzolat No.2	0.50/0.50	1	Aditif	0.50/0.50	1	Aditif	0.125/0.25	0.375	Sinerji
İzolat No.3	0.015/0.50	0.515	Aditif	0.25/0.50	0.75	Aditif	0.003/0.50	0.503	Aditif

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİK_i:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **TGC:** Tigesiklin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

GN'nin iki *E. coli* izolatına karşı VER ile kombinasyonunda ve bir *E. coli* izolatına karşı CCCP ile kombinasyonunda sinerji saptanıp, bir izolata karşı VER ile kombinasyonunda etki görülmezken, diğer tüm kombinasyonlarda aditif etki görüldü. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.30'da verilmiştir.

Tablo 4.30. *E. coli* izolatlarına karşı gentamisin ve DAPI'ler arasındaki sinerjik etkileşim.

İzolat No	VER			REZ			CCCP		
	$\frac{FİK_{VER}}{FİK_{GN}}$	FİKİ	Etk.	$\frac{FİK_{REZ}}{FİK_{GN}}$	FİKİ	Etk.	$\frac{FİK_{CCCP}}{FİK_{GN}}$	FİKİ	Etk.
ATCC (25922)	0.007/1	1.007	Etkisiz	0.25/0.25	0.50	Sinerji	0.25/0.25	0.50	Sinerji
İzolat No.1	0.007/1	1.007	Etkisiz	0.125/0.50	0.625	Aditif	0.25/0.25	0.50	Sinerji
İzolat No.2	0.062/0.25	0.312	Sinerji	0.125/0.50	0.625	Aditif	0.062/0.50	0.562	Aditif
İzolat No.3	0.125/0.125	0.25	Sinerji	0.125/0.50	0.625	Aditif	0.062/0.25	0.312	Sinerji

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, **FİKİ:** Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi, **GN:** Gentamisin, **VER:** Verapamil, **REZ:** Rezerpin, **CCCP:** Karbonil Siyanid 3-klorofenil-hidrazon, **Etk.:** Etkileşim

5. TARTIŞMA

İnsanlık tarihinin en önemli keşiflerinden biri kabul edilen antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz kullanılması, antimikrobiyal dirence yol açarak dirençli mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlara yol açmaktadır (Yüce, 2001; Şanlı ve ark., 2021). Son yıllarda ise antimikrobiyal direnç, bütün insanlığı tehdit edecek bir sorun haline gelmiştir (Öztürk, 2002). Dünya Sağlık Örgütü, antibiyotik direncinin, halk sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan biri olduğunu bildirmiştir. (WHO, 2020). Günümüzde hemen her bakteri, kullanımda olan antibakteriyel ajanlara karşı belli bir oranda direnç geliştirmekte ve bu direnç durumunun gün geçtikçe daha da kötüye gideceği öngörülmektedir (Öztürk, 2002; Somer, 2010).

Bakterilerde gözlenen antibiyotik direnci ile mücadele için en önemli stratejik yaklaşımlardan biri olan DAP, ekzojen veya endojen kaynaklı çeşitli maddeleri hücre dışına atan membran taşıma proteinleridir (Mandal ve ark., 2014; Poole, 2005). Birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakteride tanımlanan DAP'lar, antibiyotiklerin hücre içi konsantrasyonunu azaltarak etkinliklerini artırmaktadır (Munita ve Arias, 2016; Laws ve ark., 2019). DAP'lar florokinolon, beta-laktam, karbapenem ve polimiksin gibi birçok antibiyotik grubunu etkilemektedir (Munita ve Arias, 2016).

DAP'ları hedefleyen DAPİ'ler, antibiyotik etkinliğini artırmadaki potansiyelleri nedeniyle antibiyotik direncinde önemli ve umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir (AlMatar ve ark., 2020; Handzlik ve ark., 2013). DAPİ'lerin, antibiyotik direnç gelişimini yavaşlatmasının, ikili antibiyotik kombinasyonları ile tedavi sırasında oluşabilecek direncin engellenmesi ve mutant suşların ortaya çıkmasının önlenmesi ve klinik kullanımından kaldırılmış olan antibiyotiklerin tekrar kullanımı açısından faydalı olabileceği bildirilmiştir (Mahmood ve ark., 2016; Seukep ve ark., 2020). DAPİ'lere yönelik araştırmalar, 1976 yılından günümüze dek yaygın olarak araştırılsa da henüz klinik kullanımı gerçekleştirilememiştir (AlMatar ve ark., 2020; Mahmood ve ark., 2016).

Antibiyotik direnci ile mücadelede antibiyotik direnç mekanizmalarının tanımlanması ve bu mekanizmaya uygun DAPI'lerin kullanılmasının klinik açıdan önemli olabileceği düşünülmektedir (Çetinkaya ve ark., 2008; Adabi ve ark., 2015). DAPI'lerin, birçok bakteri kökenine karşı antibiyotiklerle kombine edilerek kullanılması ile antibiyotiğin hücre içi konsantrasyonunda artış görüldüğü bildirilmektedir. DAPI'ler aynı zamanda, antibiyotiğin bakterideki hedef bölge ile etkileşimini artırarak, bu bölgelerin konformasyonunu değiştiren bir adaptör olarak işlev görebilmektedir (Mawabo ve ark., 2015). Kombinasyon çalışmalarında, antibiyotiğin etkinliğini artırmak için DAPI'lerin dozunun optimize edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Ayaz ve ark., 2019).

Bu çalışmada VER, REZ ve CCCP'nin; *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* *P. aeruginosa* ve *E. coli*'nin standart suş ve çoklu ilaç dirençli klinik izolatlarına karşı antibakteriyel etkisi disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile, çeşitli antibiyotiklerle sinerjistik etkileşimi ise *checkerboard* yöntemi ile incelenmiştir.

5.1. *S. aureus* İzolatlarına Karşı DAPI'lerin Antibakteriyel Etkinliği

Staphylococcus aureus hem toplum hem de hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedeni olup, bu bakterinin dirençli olduğu antimikrobiyal ajanların sayısı giderek artmaktadır. Nozokomiyal patojenlerden biri olan MRSA, halk sağlığı için büyük bir tehdit olup, oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde yaşanan sorunlardan dolayı, onu halk sağlığı için büyük bir tehdit haline getirmiştir (Şanlı ve ark., 2021). MRSA kökenleri makrolid, kinolon gibi antibiyotik grupları ve gentamisin gibi çeşitli antibiyotiklere karşı çoklu ilaç direnci göstermektedir (Öztürk, 2002). *S. aureus*'ta MsrA pompası makrolidlere, NorA pompası florokinolonlara ve TetK pompası ise tetrasiklinlere karşı direnç kazandırmaktadır (Gibbons ve Udo, 2000).

Bu çalışmaya alınan *S. aureus* izolatlarında CCCP'nin oluşturduğu inhibisyon zonunun diğer DAPI'ler ile kıyaslandığında 3-4 kat daha geniş olduğu saptanmıştır. DAPI'lerin *S. aureus*'un izolatlarına karşı, tek başına etkisinin CCCP'nin diğer DAPI'lerden 16 kat daha düşük olduğu mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır.

TET'in çalışmaya alınan *S. aureus* izolatlarına karşı VER veya REZ ile kombinasyonunda sinerji, CCCP ile kombinasyonunda çoğunlukla aditif etki; TGC'nin VER ile kombinasyonunda aditif etki, REZ ile kombinasyonunda çoğunlukla sinerji saptanırken, CCCP ile kombinasyonunda sinerji; GN'nin VER veya REZ ile kombinasyonunda çoğunlukla sinerji ve CCCP ile kombinasyonunda ise çoğunlukla aditif etki gözlenmiştir.

Abreu ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus* izolatlarına karşı TET'in REZ ile kombinasyonunda çoğunlukla sinerji görüldüğü bildirilmiştir. Roy ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada *S. aureus*'un iki adet ATCC suşu ve bir adet izolatına karşı norfloksasinin, VER ile kombinasyonunda sinerji ve REZ ile kombinasyonunda ise aditif etki saptadıklarını, Vidaillac ve ark. (2007) ise yaptıkları çalışmada ise *S. aureus*'un iki adet ATCC suşuna karşı norfloksasinin VER ile kombinasyonunda sinerji saptandığını bildirmiştir. Parai ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada *S. aureus*'un ATCC suşuna karşı siprofloksasin, gentamisin, eritromisin ve kloksasilinin VER ile kombinasyonunda aditif etki görüldüğünü bildirmiştir. Holler ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada *S. aureus*'un iki adet ATCC suşuna karşı siprofloksasinin VER ile kombinasyonunda sinerji saptandığı bildirmiştir. Literatürde *S. aureus* çalışmalarına ek olarak Gunics ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada *S. epidermidis* izolatlarına karşı TET'in VER ile kombinasyonunda ve GN'nin VER ile kombinasyonunda etkisiz olduğu bildirilmiştir. Yukarıda belirtilen çalışmalar ile bu çalışmada kullanılan standart suş ve antibiyotik-DAPİ kombinasyonları birebir aynı olmamakla birlikte sonuçlar kıyaslanabilir görünmektedir. *S. auerus* izolatlarında denenen antibiyotikleri substrat olarak kullanan DAP'ların aktif olduğu ve DAPİ'lerin antibiyotikler ile kombinasyonunda, antibiyotiklerin antibakteriyel etkinliğini güçlendirdiği düşünülmektedir.

5.2. *E. faecalis* İzolatlarına Karşı DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliği

Enterococcus faecalis, enterokokal enfeksiyonların çoğundan sorumlu, fırsatçı bir patojendir (Baylan ve ark., 2011; Taji ve ark., 2019). Özellikle gentamisine ve streptomisine karşı yüksek düzeyde dirençli suşların görülme sıklığı artarken penisiline ve kinolonlara karşı da direnç bildirilmektedir (Öztürk, 2002).

Bu çalışmaya alınan *E. faecalis* izolatlarında, VER'in inhibisyon zonu oluşturmadığı, CCCP'nin oluşturduğu inhibisyon zonunun ise 11-14 mm arasında olup REZ'e kıyasla iki kat geniş olduğu görülmüştür. DAPI'lerin *E. faecalis* izolatlarına karşı, tek başına etki göstermediği mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır.

TET'in çalışmaya alınan *E. faecalis* izolatlarına karşı VER veya REZ ile kombinasyonunda aditif etki, CCCP kombinasyonunda ise çoğunlukla aditif etki; TGC'nin REZ veya CCCP ile kombinasyonunda çoğunlukla aditif etki; GN'nin CCCP ile kombinasyonunda çoğunlukla sinerji, VER veya REZ ile kombinasyonunda ise aditif etki saptanmıştır.

Literatürde, *E. faecalis*'e karşı DAPI'lerin antibakteriyel etkinliği üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

5.3. *K. pneumoniae* İzolatlarına Karşı DAPI'lerin Antibakteriyel Etkinliği

Enterobacteriaceae ailesine ait olan *Klebsiella pneumoniae*, insanların gastrointestinal sistem mikrobiyotasında bulunan fırsatçı bir patojendir (Navon-Venezia ve ark, 2017). *K. pneumoniae*, hızlı direnç kazanması ve kazanılan direncin izolatlar arasında kolayca yayılması bakımından diğer bakteri türlerine göre daha fazla önem taşımaktadır (Tekintaş ve ark., 2017; Yiş ve ark., 2021). *K. pneumoniae* özellikle hastanelerin yoğun bakım ünitelerindeki salgınlar ve toplum kökenli enfeksiyonlar için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Chevalier ve ark., 2000; Wang ve ark., 2020). Bu bakteride beta-laktamaz ve geniş spektrumlu sefalosporin gibi birçok antibiyotiğe karşı direnç sıklıkla bildirilmektedir (Chevalier ve ark., 2000). Son yıllarda karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşlarının ortaya çıkması, dünya çapında bir tehdit oluşturmaktadır (Yiş ve ark., 2021).

Bu çalışmaya alınan *K. pneumoniae* izolatlarında VER'in inhibisyon zonu oluşturmadığı, CCCP ve REZ'in oluşturduğu inhibisyon zonunun kayda değer olmadığı saptanmıştır. DAPI'lerin *K. pneumoniae* izolatlarına karşı, tek başına etki göstermediği mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır.

TET'in çalışmaya alınan *K. pneumoniae* izolatlarına karşı REZ veya CCCP ile kombinasyonu sinerji, VER ile kombinasyonunda aditif etki; TGC'nin CCCP ile kombinasyonunda çoğunlukla sinerji, GN'nin tüm DAPI'ler ile kombinasyonlarında ise aditif etki saptanmıştır.

Literatür incelendiğinde, Dey ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada *K. pneumoniae* izolatlarına karşı REZ'in TET ve GN ile kombinasyonunda çoğunlukla sinerji görüldüğü bildirilmiştir. Bu çalışmada, REZ'in GN ile kombinasyonundaki aditif etki bulgusu izolat sayısındaki kısıtlılıktan kaynaklanmış olabilir.

5.4. *P. aeruginosa* İzolatlarına Karşı DAPI'lerin Antibakteriyel Etkinliği

Pseudomonas aeruginosa, non-fermentatif ve nozokomiyal fırsatçı bir patojendir (Livermore, 2009). *P. aeruginosa*'da görülen antibiyotik direncinin temelinde; antibiyotiğe özgül enzimler, hücre duvarı geçirgenliğinde değişiklikler ve DAP'lar yer almaktadır (Aykan ve Çiftçi, 2015). *P. aeruginosa* izolatlarında çeşitli direnç mekanizmalarının gelişmesi ve direnç oranlarının gün geçtikçe artması ciddi sorunlara yol açmaktadır (Mawabo ve ark., 2015). *P. aeruginosa*'nın direnç geliştirme potansiyelinin yüksek olması, bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik seçiminin doğru ve uygun kombinasyonda yapılmasını gerektirmektedir (Berktaş ve ark., 2011). *P. aeruginosa*'da tetrasiklin, kloramfenikol ve norfloksasin dahil olmak üzere çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı birçok DAP tanımlanmıştır (Shinaberger ve ark., 2011).

Bu çalışmaya alınan *P. aeruginosa* izolatlarında VER'in inhibisyon zonu oluşturmadığı, CCCP ve REZ'in oluşturduğu inhibisyon zonunun kayda değer olmadığı saptanmıştır. DAPI'lerin *P. aeruginosa* izolatlarına karşı, tek başına etki göstermediği mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır.

TET'in çalışmaya alınan *P. aeruginosa* izolatlarına karşı VER veya CCCP ile kombinasyonunda aditif etki, REZ ile kombinasyonunda çoğunlukla aditif etki; TGC'nin VER ile kombinasyonunda aditif etki, REZ ile kombinasyonunda çoğunlukla

aditif etki, CCCP ile kombinasyonunda sinerji; GN'in VER veya REZ ile kombinasyonunda çoğunlukla sinerji ve CCCP ile kombinasyonunda ise sinerji saptanmıştır.

Gunics ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada TET'in *P. aeruginosa* izolatına karşı VER ile kombinasyonunda ve GN'nin VER ile kombinasyonunda etkisiz olduğu gözlenirken Oloche ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada siprofloksasinin *P. aeruginosa* izolatlarına karşı VER ile kombinasyonunda sinerji görüldüğü bildirilmiştir. Bu çalışmada, literatürden farklı olarak kombinasyonlarda çoğunlukla sinerji ve aditif etki görülmüştür. Bu veriler DAPİ'lerin *P. aeruginosa* izolatlarında mevcut DAP'lara etki ederek antibiyotiklerin etkinliğini güçlendirdiğini düşündürmektedir.

5.5. *E. coli* İzolatlarına Karşı DAPİ'lerin Antibakteriyel Etkinliği

Enterobacteriaceae ailesinin bir üyesi olan *Escherichia coli*, insanların gastrointestinal sisteminde yaygın olarak bulunan fırsatçı bir patojendir. *E. coli* beta-laktam, kinolon ve aminoglikozid gibi birçok antibiyotik grubuna dirençlidir (Allocati ve ark, 2013). Çoklu ilaç direncine sahip *E. coli* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisi giderek zorlaşmaktadır (Vila ve ark., 2016). *E. coli*'de CCCP'nin etki mekanizmasının, adenilat siklaz aktivitesini inhibe etmesi (Kasianowicz ve ark., 1984) veya hücrenin iyon dengesinin etkilenecek DAP'ın ekspresyonunu inhibe edildiği şeklinde olabileceği ileri sürülmüştür. (Sundaramorty ve ark., 2019; Shinaberger ve ark., 2011). Ayrıca CCCP varlığında *E. coli* suşlarına karşı florokinolonların MİK değerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Shinaberger ve ark., 2011).

Bu çalışmaya alınan *E. coli* izolatlarında VER'in inhibisyon zonu oluşturmadığı, bir izolat hariç CCCP ve REZ'in oluşturduğu inhibisyon zonunun kayda değer olmadığı saptanmıştır. DAPİ'lerin *E. coli* izolatlarına karşı, tek başına etki göstermediği mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır.

TET'in *E. coli* izolatlarına karşı REZ veya CCCP ile kombinasyonunda çoğunlukla aditif etki, TGC'nin REZ ile kombinasyonunda aditif etki, CCCP ile kombinasyonunda çoğunlukla aditif etki, GN'nin VER ile kombinasyonunda çoğunlukla sinerji gözlenirken, REZ ile kombinasyonunda aditif etki ve CCCP ile kombinasyonunda ise çoğunlukla sinerji saptanmıştır.

Gunics ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada *E. coli* izolatına karşı TET'in VER ile kombinasyonunda ve GN'nin VER ile kombinasyonunda etkisiz olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da *E. coli* izolatlarında farklı kombinasyonların etkinliğinin değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir.

Bu çalışmada, çoklu ilaç dirençli izolatlara karşı DAPİ'lerin tek başına antibakteriyel etkinliğinin ve antibiyotiklerle sinerjik etkileşiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Antimikrobiyal direncin üstesinden gelebilmek ve var olan antibiyotiklerin aktivitesini artırmak için direnç mekanizmalarının tanımlanması ve DAPİ'lerin antibiyotikler ile etkileşiminin belirlenmesinin, direncin önlenmesinde klinik açıdan önemli olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, tek başına kullanıldığında DAPİ'lerin antimikrobiyal özelliğinin sınırlı olduğu ancak antibiyotikler ile kombine edilmesi halinde antibiyotiklerin etkinliğini artırarak adjuvan etki gösterdiği görülmektedir. Antibiyotikler ile DAPİ kombinasyonlarında sinerjik etkileşim gözlenen izolatlardaki antibiyotik direncinin, DAP aracılı olabileceği düşünülmektedir. DAPİ'lerin antibiyotiklerle kombinasyonlarında bazı izolatlara karşı herhangi bir etki gözlenmemiştir. Bu izolatlardaki antibiyotik direncinin, farklı DAP varlığına işaret edebildiği gibi plazmid aracılı veya kromozomal mutasyonlar sonucu oluşan farklı direnç mekanizmalarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada dışa atım pompa inhibitörlerinin, kullanılan izolatlardaki dışa atım pompaları ile olası etkileşimi sonucu denenilen antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon değerlerini düşürebildiğinin gösterilmesi, dışa atım pompa inhibitörlerinin antibiyotiklerle kombine kullanımının, antibiyotiklerin etki spektrumunu artırmaya, bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç düzeyini ve

direncin ortaya çıkma sıklığını azaltabileceğine yönelik düşünceleri ve DAPİ'lerin klinik kullanıma girebilme potansiyelini desteklemektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- VER ve REZ'in disk difüzyon yöntemine göre antibakteriyel aktivitesinin yetersiz olduğu, CCCP'nin ise diğer DAPI'lere kıyasla sadece *S. aureus* izolatlarında 3-4 kat daha geniş inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir.
- 2- Denenen DAPI'lerin tek başına kullanıldığında antimikrobiyal etkisinin sınırlı olduğu gözlenmiştir.
- 3- *S. aureus* ve *P. aeruginosa* izolatlarına karşı antibiyotik-DAPİ kombinasyonlarının çoğunlukla sinerji veya aditif etki gösterdiği saptanmıştır.
- 4- *E. faecalis*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarına karşı antibiyotik-DAPİ kombinasyonlarının çoğunlukla aditif etki gösterdiği saptanmıştır.
- 5- Klinik örneklerden soyutlanmış, çok sayıda ve farklı türdeki bakteri kökenine karşı etkinliğini belirlemek için, DAPİ'lerin farklı kaynaklardan elde edilen biyoaktif maddeler ile sinerji çalışmaları önerilebilir.
- 6- Moleküler tabanlı çalışmalarla izolatlarda aktif olarak bulunan DAP varlığı belirlenerek, uygun DAPİ'ler ile sinerji çalışmalarının planlanması önerilebilir.
- 7- Bu çalışmada denenen antibiyotik-DAPİ kombinasyonlarının *time-kill* yöntemi ile desteklenmesinin yararlı olabileceği düşünülmektedir.
- 8- DAPİ'lerin antibiyotikler ile etkileşiminin deney hayvanı modelleri ile gösterilmesi önerilebilir.
- 9- Antimikrobiyal maddelerle birlikte kullanılacak DAPİ'lerin biyolojik aktiviteleri, sitotoksitesi, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin belirlenmesi önerilebilir.

10-Sitotoksitesi yüksek DAPİ'lerin kimyasal yapıları modifiye edilerek çalışmaların yapılması önerilebilir.



KAYNAKLAR

- Abou-Zeid, A. A., Shehata, Y. M. (1977). Gentamicins. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie, 132(2), 97-108.
- Abreu, A. C., Serra, S. C., Borges, A., Saavedra, M. J., Salgado, A. J., Simões, M. (2014). Evaluation of the best method to assess antibiotic potentiation by phytochemicals against *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Jun;79(2):125-34.
- Acar, M., Somer, A., Salman, N. (2015). Yeni antibiyotikler. *Çocuk Dergisi*, 15(3), 99-103.
- Adabi, M., Talebi-Taher, M., Arbabi, L., Afshar, M., Fathizadeh, S., Minaeian, S., ... Majidpour, A. (2015). Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an efflux pump inhibitor. *Infection & chemotherapy*, 47(2), 98-104.
- Akalın, H. (2011). Antimikrobiyal direnç ve önleme politikaları. *ANKEM Dergisi*, 25(3), 190- 195.
- Akata, F. (2012). Stafilokoklarda antibiyotik direnci ve yabancı cisim infeksiyonları. *ANKEM Dergisi*, 26(ek 2):172-179.
- Aksaray, S., Arıcı, N. (2019). Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Metisilin Direncinin Belirlenmesi ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması. *ANKEM Dergisi*, 33(2), 70-76.
- Aktepe, O. C., Aşık, G., Çiftçi, İ. H., Çetinkaya, Z. (2011). Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnç oranları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 41(2), 86-90.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235-6254.
- AlMatar, M., Albarri, O., Makky, E. A., Köksal, F. (2021). Efflux pump inhibitors: new updates. *Pharmacological Reports*, 73(1), 1-16.
- Altındış M., Er, H., Demir, C., Aşık, G. (2015). Seftazidime Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Beta-laktamazların Moleküler epidemiyolojisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49 (2), 156-165.
- Altun, H. U., Sancak, B. (2010). *Staphylococcus aureus*'un tedavisinde yeni antibiyotikler. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 40(2), 63-74.
- Appel, G. B., Neu, H. C. (1978). Gentamicin in 1978. *Annals of Internal Medicine*, 89(4), 528-538.
- Ayaz, M., Subhan, F., Sadiq, A., Ullah, F., Ahmed, J., ... Sewell, R. D. E. (2017). Cellular efflux transporters and the potential role of natural products in combating efflux mediated drug resistance. *Frontiers in Bioscience*, 22(4), 732-756.
- Ayaz, M., Ullah, F., Sadiq, A., Ullah, F., Ovais, M., Ahmed, J., ... Devkota, H. P. (2019). Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. *Chemico-Biological Interactions*, 308, 294-303.
- Aygül, A. (2015). Antibiyotik direncinde dışa atım sistemlerinin ve dirençle mücadelede dışa atım pompa inhibitörlerinin önemi. *Mikrobiyol Bul*, 49(2), 278-291.
- Aykan, Ş., B., Çiftçi, İ. H. (2015). Meta-Analiz: Türkiye’de *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının son 11 yıldaki antibiyotik direnç değişimi. *Mikrobiyol Bul*, 49(3), 352-65.

- Baltacı, S., Topcu, K., Elaldı, N., Çelik, C., Ünlüsavuran, M., Büyüktuna, S., ... Hasbek M. (2020). Yoğun Bakım Ünitende Gelişen Klebsiella pneumoniae Enfeksiyonları: Karbapenem Direnci ve Hasta Mortalitesi İle İlgili Risk Faktörleri. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 54 (3), 378-391.
- Baylan, O., Özyurt, M., Öngen, B., Haznedaroğlu, T., Bektöre, B., Çitil, B., ... Nazik, H. (2011). Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virülans faktörleri arasındaki ilişki. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45 (3), 430-445.
- Bender, J. K., Cattoir, V., Hegstad, K., Sadowy, E., Coque, T. M., Wesrh, H., ... Werner G. (2018). Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resist Updat*, 40:25-39.
- Berktaş, M., Çıkman, A., Parlak, M., Yaman, G., Güdücüoğlu, H. (2011). Nozokomiyal kökenli Pseudomonas aeruginosa izolatlarında antibiyotiklere direnç. *Van Tıp Dergisi*, 18(4), 192-196.
- Berktaş, M., Çıkman, A., Parlak, M., Güdücüoğlu, H., Özkaçmaz A. (2013). Kan kültürlerinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnci. *Sakarya MJ*; 3:76-9.
- Bhardwaj, A., Mohanty, P. (2012). Bacterial Efflux Pumps Involved in Multidrug Resistance and their Inhibitors: Rejuvenating the Antimicrobial Chemotherapy. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, 7(1), 73–89.
- Bozkır, M. A., Uysal, A., Arslan E. (2020). Üropatojenik Escherichia coli Suşlarının Antibiyotik Direnç Profilleri ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 46 (2), 41-65.
- Brindangnanam, P., Sawant, A. R., Prashanth, K., ... Coumar, M. S. (2022). Bacterial effluxome as a barrier against antimicrobial agents: structural biology aspects and drug targeting. *Tissue Barriers*, 10(4), 2013695.
- Chen, F. E., Huang, J. (2005). Reserpine: a challenge for total synthesis of natural products. *Chemical reviews*, 105(12), 4671-4706.
- Cheung, M., Parmar, M. (2023). Reserpine. In: StatPearls [Internet]. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*; 2023 Jan.
- Chevalier, J., Pagès, J. M., Eyraud, A., Malléa, M. (2000). Membrane permeability modifications are involved in antibiotic resistance in Klebsiella pneumoniae. *Biochemical and biophysical research communications*, 274(2), 496-499.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(2), 232-260.
- Chovanová, R., Mezovská, J., Vavřková, Š., & Mikulášová, M. (2015). The inhibition the Tet (K) efflux pump of tetracycline resistant Staphylococcus epidermidis by essential oils from three Salvia species. *Letters in applied microbiology*, 61(1), 58-62.
- CLSI. (2018). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (11th ed., C. CLSI Standart M07). Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 21;284(5418):1318-22.
- Çalık, N., Akova, M. (2007). Tigesiklin, *ANKEM Derg*, 21(Ek 2):29-33.
- Çetinkaya, E., Çoban, A. Y., Durupınar, B. (2008). Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Acinetobacter baumannii ve Staphylococcus aureus klinik izolatlarında dışa atım pompa inhibitörlerinin siprofloksasin MİK değerleri üzerine etkilerinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 42(4), 553-561.

- Çevikbaş, A. (1990). Antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi. *Antibiyotikler*, 164-174.
- Çiftçi, A., Aksoy, A. (2015). Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 1(2), 1-10.
- Dalhoff, A. (2021). Are antibacterial effects of non-antibiotic drugs random or purposeful because of a common evolutionary origin of bacterial and mammalian targets?. *Infection*, 49, 569-589.
- Daş, Y. K., Atmaca, E. (2015). Antibiyotik Direncinin Önlenmesi İçin Yapılması Gerekenler ve Çözüm Önerileri. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci pharmacol Toxicol-Special Topics*, 1 (2): 69-75.
- Davin-Regli, A., Pages, J. M., ... Ferrand, A. (2021). Clinical status of efflux resistance mechanisms in gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 10(9), 1117.
- Demirtürk, N., Demirdal, T. (2004). Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5 (2), 17-21.
- Dey, D., Ghosh, S., Ray, R., & Hazra, B. (2016). Polyphenolic secondary metabolites synergize the activity of commercial antibiotics against clinical isolates of β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytotherapy Research*, 30(2), 272-282.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., Van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J., ... Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523-539.
- Durmaz, S., Özer, T. T. (2015). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *Abant Tıp Dergisi*, 4(3), 239-242.
- Dwivedi, G. R., Tiwari, N., Singh, A., Kumar, A., Roy, S., Negi, A. S., ... Darokar, M. P. (2016). Gallic acid-based indanone derivative interacts synergistically with tetracycline by inhibiting efflux pump in multidrug resistant *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2311-2325.
- Eliopoulos, G. M., Roberts, M. C. (2003). Tetracycline therapy: update. *Clinical infectious diseases*, 36(4), 462-467.
- El Guerraf, A., Ben Jadi, S., Bakirhan, N. K. (2022). Antibacterial activity and volatile organic compounds sensing property of polypyrrole-coated cellulosic paper for food packaging purpose. *Polym. Bull*, 1-24.
- EUCAST, Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Infect.* 6 (2000) 503e508.
- Fernebro, J. (2011). Fighting bacterial infections—Future treatment options. *Drug Resistance Updates*, 14(2), 125–139.
- Gibbons, S., Udo, E. E. (2000). The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet (K) determinant. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(2), 139-140.
- Gunics, G., Motohashi, N., Amaral, L., Farkas, S., ...& Molnár, J. (2000). Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bacteria. *International journal of antimicrobial agents*, 14(3), 239-242.
- Gök, Ş. M., Türk Dağı, H., Kara, F., Arslan, U., Fındık, D. (2020). Klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* izolatlarının antibiyotik direnci ve virülans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 54 (1): 26-39.

Gülmez, D., Hasçelik, G. (2011). Enterokok suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi ile phoenix otomatize sisteminin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 45(1), 21-27.

Handzlik, J., Matys, A., Kieć-Kononowicz, K. (2013). Recent advances in multi-drug resistance (MDR) efflux pump inhibitors of Gram-positive bacteria *S. aureus*. *Antibiotics*, 2(1), 28-45.

Hassan, K. A., Elbourne, L. D., Li, L., Gamage, H. K., Liu, Q., Jackson, S. M., ... Paulsen, I. T. (2015). An ace up their sleeve: a transcriptomic approach exposes the AceI efflux protein of *Acinetobacter baumannii* and reveals the drug efflux potential hidden in many microbial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 6, 333.

Hernando-Amado, S., Blanco, P., Alcalde-Rico, M., Corona, F., Reales-Calderón, J. A., Sánchez, M. B., ... Martínez, J. L. (2016). Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resistance Updates*, 28, 13-27.

Holler, J. G., Christensen, S. B., Slotved, H. C., Rasmussen, H. B., Gúzman, A., Olsen, C. E., ... & Mølgaard, P. (2012). Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(5), 1138-1144.

Iraz, M., Ceylan, A., Akkoyunlu, Y. (2012). Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg*, 26(4), 176-180.

Júnior, V. V. S., Raposo, B. L., Lopes, A. C., Araújo, P. S., Fontes, A., Cabral Filho, P. E., & Maciel, M. A. (2020). Activity of carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone on biofilm formation and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* using quantum dots-meropenem conjugates as nanotools. *Methods and applications in fluorescence*, 8(4), 045005.

Kahraman, E. P., Karakeçe, E., Erdoğan, F., Uluyurt, H., Köroğlu, M., Çiftçi, İ. H. (2017). *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının antibiyotiklere direnç durumlarının değerlendirilmesi. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 9(1), 12-18.

Kane, M. S., Paris, A., Codron, P., Cassereau, J., Procaccio, V., Lenaers, G., Reynier, P., Chevrollier, A. (2018). Current mechanistic insights into the CCCP-induced cell survival response. *Biochem Pharmacol*, 148:100-110.

Karakeçe, E., Terzi, H. A., Çiftçi, İ. H. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirmesi. *Göztepe Tıp Dergisi*, 29(1), 20-3.

Kasianowicz, J., Benz, R., McLaughlin, S. (1984). The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *The Journal of membrane biology*, 82(2), 179-190.

Kayış, U. (2019). Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi*, 5 (1), 1-12.

Korten, V. (2004). Linezolid. *ANKEM Dergisi* 18 (Ek sayı:2), 178-180.

Kumar, A., Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1486-1513.

Kumar, A., Khan, I. A., Koul, S., Koul, J. L., Taneja, S. C., Ali, I., ... Qazi, G. N. (2008). Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1270-1276.

Lamut, A., Peterlin Mašič, L., Kikelj, D., Tomašič, T. (2019). Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Medicinal Research Reviews*, 39(6), 2460-2504.

LaPlante, K. L., Dhand, A., Wright, K., Lauterio, M. (2022). Re-establishing the utility of tetracycline-class antibiotics for current challenges with antibiotic resistance. *Annals of Medicine*, 54(1), 1686-1700.

Laws, M., Shaaban, A., Rahman, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 490-516.

Li, X. Z., Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 69 (12), 1555-1623.

Limaverde, P. W., Campina, F. F., Da Cunha, F. A., Crispim, F. D., Figueredo, F. G., Lima, L. F., ... Tintino, S. R. (2017). Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 957-961.

Livermore, D. M. (2009). Has the Era of Untreatable Infections Arrived? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(Supplement 1), i29–i36.

Lu, X., Zhang, Z., Xu, Y., Lu, J., Tang, W., ...& Zhang, J. (2020). Effect of new carbonyl cyanide aromatic hydrazones on biofilm inhibition against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *RSC advances*, 10(30), 17854-17861.

Mahmood, Y., Jamshidi, H., Mark Sutton, S., Rahman, K. (2016). Current advances in developing inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps. *Current Medicinal Chemistry*, 23(10), 1062-1081.

Mandal, S. M., Roy, A., Ghosh, A. K., Hazra, T. K., Basak, A., Franca, O. L. (2014). Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 105.

Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87(12), 1137-1147.

Mawabo, I. K., Noumedem, J. A., Kuate, J. R., Kuete, V. (2015). Tetracycline improved the efficiency of other antimicrobials against gram-negative multidrug-resistant bacteria. *Journal of Infection and Public Health*, 8(3), 226-233.

McTavish, D., Sorkin, E. M. (1989). Verapamil: An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension. *Drugs*, 38(1), 19-76.

Molchanova, N., Hansen, P. R., Franzyk, H. (2017). Advances in Development of Antimicrobial Peptidomimetics as Potential Drugs. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22.

Munita, J. M., Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 4-2.

Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 252-275.

Oloche, J. J., Oluremi, B. B., Koya, T. O. (2021). In vitro inhibition of multi-drug resistant *Pseudomonas* efflux pump by *Xylopiia aethiopica* (Dunal) A. Rich. Aroc, *Pharm. Biotechnol.* 2; 20–27

Osei Sekyere, J., Amoako, D. G. (2017). Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in microbiology*, 8, 228.

Özseven, A., Sesli Çetin E., Cicioğlu Arıdoğan, B., Çiftçi, E., Özseven, L. (2011). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi*, 25(4), 256 – 262.

Öztürk, R. (2002): Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. *Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinlerde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi*, 31(11): 83-100.

- Padman, B. S., Bach, M., Lucarelli, G., Prescott, M., Ramm, G. (2013). The protonophore CCCP interferes with lysosomal degradation of autophagic cargo in yeast and mammalian cells. *Autophagy*, 1;9(11):1862-75.
- Pagès, J. M., Masi, M., Barbe, J. (2005). Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends in Molecular Medicine*, 11(8), 382–389.
- Pagès, J. M., Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(5), 826-833.
- Paiva, P. M., Pontual, E. V., Coelho, L. C. B. B., ... Napoleão, T. H. (2013). Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 1, 641-649.
- Parai, D., Banerjee, M., Dey, P., & Mukherjee, S. K. (2020). Reserpine attenuates biofilm formation and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 138, 103790.
- Pesingi, P. V., Singh, B. R., Pesingi, P. K., Bhardwaj, M., Singh, S. V., Kumawat, M., ... Gandham, R. K. (2019). MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* offers resistance to carvacrol: a herbal antimicrobial agent. *Frontiers in microbiology*, 10, 2664.
- Peterson, L. R. (2008). A review of tigecycline—the first glycylcycline. *International journal of antimicrobial agents*, 32, 215-222.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20-51.
- Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of medicine*, 39(3), 162-176.
- Pournaras, S., Koumaki, V., Spanakis, N., Gennimata, V., Tsakris, A. (2016). Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 48(1), 11-18.
- Roy, S. K., Kumari, N., Pahwa, S., Agrahari, U. C., Bhutani, K. K., Jachak, S. M., Nandanwar, H. (2013). NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia*. 90:140-50.
- Sancak, B. (2011). *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45 (3), 565-576.
- Selvarajan, R., Obize, C., Sibanda, T., Abia, A. L. K., ... Long, H. (2022). Evolution and Emergence of Antibiotic Resistance in Given Ecosystems: Possible Strategies for Addressing the Challenge of Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, 12(1), 28.
- Seukep, A. J., Kuete, V., Nahar, L., Sarker, S. D., Guo, M. (2020). Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *Journal of pharmaceutical analysis*, 10(4), 277-290.
- Sharma, A., Gupta, V. K., Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *The Indian journal of medical research*, 149(2), 129.
- Shinabarger, D. L., Zurenko, G. E., Hesje, C. K., Sanfilippo, C. M., Morris, T. W., ... Haas, W. (2011). Evaluation of the effect of bacterial efflux pumps on the antibacterial activity of the novel fluoroquinolone besifloxacin. *Journal of Chemotherapy*, 23(2), 80-86.
- Singh, B. N., Ellrodt, G., Peter, C. T. (1978). Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*, 15, 169-197.

- Shriram, V., Khare, T., Bhagwat, R., Shukla, R., Kumar, V. (2018). Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, 9, 2990.
- Slover, C. M., Rodvold, K. A., Danziger, L. H. (2007). Tigecycline: a novel broad-spectrum antimicrobial. *Annals of Pharmacotherapy*, 41(6), 965-972.
- Somer, A. (2010). Antibiyotiklerde direnç sorunu Çağrılı Yazar. *Türk Pediatri Arşivi*, 45(12), 45-49.
- Song, L., Wu, X. (2016). Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy. *International journal of antimicrobial agents*, 47(6), 421-429.
- Stavri, M., Piddock, L. J., & Gibbons, S. (2007). Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(6), 1247-1260.
- Sun, J., Deng, Z., Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 254-267.
- Sun, Y., Cai, Y., Liu, X., Bai, N., Liang, B., Wang, R. (2013). The emergence of clinical resistance to tigecycline. *International journal of antimicrobial agents*, 41(2), 110-116.
- Sundaramoorthy, N. S., Suresh, P., Selva Ganesan, S., GaneshPrasad, A., Nagarajan, S. (2019). Restoring colistin sensitivity in colistin-resistant E. coli: combinatorial use of MarR inhibitor with efflux pump inhibitor. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Şahin, K., Altan, G. (2019). Kinolon Dirençli Escherichia coli İzolatlarında Diğer Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Araştırılması. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3(3), 197-202.
- Şanlı, K., Kömürcü, S. Z. M., Kansak, N., Adaleti, R. (2021). Staphylococcus aureus' un On beş Yılda Metisilin Direnç ve Antibiyogram Direnç Profilinin ve Görülme Sıklığının Değişimi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 51(1), 15-22.
- Taji, A., Heidari, H., Ebrahim-Saraie, H. S., Sarvari, J., Motamedifar, M. (2019). High prevalence of vancomycin and high-level gentamicin resistance in Enterococcus faecalis isolates. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 66(2), 203-217.
- Tegos, P., Haynes, G., Strouse, M. J., Khan, J. T., Bologa, M. G., Oprea, C. I. T., Sklar, A. L. (2011). Microbial Efflux Pump Inhibition: Tactics and Strategies. *Current Pharmaceutical Design*, 17(13), 1291-1302.
- Tekintaş, Y., Çilli, F., Eraç, B., Yaşar, M., Aydemir, S. S., Hoşgör Limoncu, M. (2017). Klinik Klebsiella pneumoniae izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu ve fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 51(3), 269-76.
- Teelucksingh, T., Thompson, L. K., ... Cox, G. (2020). The evolutionary conservation of Escherichia coli drug efflux pumps supports physiological functions. *Journal of Bacteriology*, 202(22), e00367-20.
- Townsend, M. L., Pound, M. W., Drew, R. H. (2006). Tigecycline: a new glycycline antimicrobial. *International journal of clinical practice*, 60(12), 1662-1672.
- Töreci, K. (2003). Antibiyotik kullanımı ve direnç ilişkisi. *Flora*, 8(2), 89-110.
- Ulusoy, S. (2006). Tigesiklin. *ANKEM Derg*, 20(Ek 2):117-119.
- Usluer, G. (2007). Tetrasiklinler ve kloramfenikol. *ANKEM Derg*, 21(Ek 2):45-51.

- Van Bambeke, F., Balzi, E., Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical pharmacology*, 60(4), 457-470.
- Van Bambeke, F., Lee, V. J. (2006). Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 1(2), 157-175.
- Vidaillac, C., Guillon, J., Arpin, C., Forfar-Bares, I., Ba, B. B., Grellet, J., ... & Quentin, C. (2007). Synthesis of omeprazole analogues and evaluation of these as potential inhibitors of the multidrug efflux pump NorA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(3), 831-838.
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., ... Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS microbiology reviews*, 40(4), 437-463.
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278.
- WHO (World Health Organization) <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (2 Nisan 2023).
- Wilcox, M. H. (2006). Tigecycline and the need for a new broad-spectrum antibiotic class. *Surgical Infections*, 7(1), 69-80.
- Yıldırım, M. (2007). Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. *Duzce Medical Journal*, 9(2), 46-52.
- Yılmaz, Ç., Özcengiz, G. (2017). Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochemical pharmacology*, 133, 43-62.
- Yılmaz, O., Karaman, M., Bahar, İ., Bayrakal, V. (2010). Gentamisin ve imipenem etkisinde *pseudomonas aeruginosa* quorum sensing yanıtları ve biyofilm üretimi: In-vivo modelleme. *ANKEM Dergisi*, 24(2), 76- 81.
- Yiş, R., Gürbüz, E. D., Sarı, A. N., Gülay, Z. (2021). Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Hastanemizde Yayılımı: Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişkinin Araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 51(1), 33-41.
- Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.
- Yoon, E. J., Oh, Y., Jeong, S. H. (2020). Development of tigecycline resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 147 via AcrAB overproduction mediated by replacement of the ramA promoter. *Annals of laboratory medicine*, 40(1), 15-20.
- Zarakolu, P. (2003). Mikroorganizmalarda direnç mekanizması olarak aktif pompa sistemleri. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 131-36.
- Zhang, Z., Liu, Z. Q., Zheng, P. Y., Tang, F. A., Yang, P. C. (2010). Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(10), 1279.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Başak Büşra TAŞPINAR
EĞİTİM	
Lise	: Pendik Fatih Anadolu Lisesi (2013)
Lisans	: Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2014-2019)
Yüksek lisans	: Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (2019-2023)
Doktora	: -
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: İyi derecede (YÖKDİL: 71,25 Eylül 2022)
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti	



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...



Balıkesir Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlık Binası
Çağış Yerleşkesi/BALIKESİR



(0 266) 612 14 62
sagbilen@balikesir.edu.tr
<http://www.balikesir.edu.tr>

