



**BAZI ANTİBİYOTİK VE ANTİBİYOFİLM PEPTİD  
KOMBİNASYONLARININ *Staphylococcus aureus*  
BİYOFİLM YAPISI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Umut Çağrı KOÇAK**

**Yüksek Lisans Tezi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI**

**2022  
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI ANTİBİYOTİK VE ANTİBİYOFİLM PEPTİD KOMBİNASYONLARININ  
*Staphylococcus aureus* BİYOFİLM YAPISI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Umut Çağrı KOÇAK**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Erzurum**

**2022**

**Her hakkı saklıdır**

## **ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

27 / 06 / 2022

Umut Çağrı KOÇAK

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### BAZI ANTİBİYOTİK VE ANTİBİYOFİLM PEPTİD KOMBİNASYONLARININ *Staphylococcus aureus* BİYOFİLM YAPISI ÜZERİNE ETKİSİ

Umut Çağrı KOÇAK

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI

Antibiyotik direncinin hızla yayılması ve yeni antimikrobiyallerin keşfedilmesinin zorluğu nedeniyle daha önceden keşfedilen antibiyotiklerin yeniden kullanım ve kombinasyon stratejileri ön plana çıkmıştır. Bu çalışmada, kloramfenikol ile siprofloksasinin ve nisin antibiyofilmi peptidi ile *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 suşuna karşı kombinasyonel etkinliğini araştırıldı. Siprofloksasin, nisin ve kloramfenikolün MIC değeri sırasıyla 0,25, >64 ve 32 µg/mL idi. Kloramfenikol ile siprofloksasinin ve nisin molekülü arasındaki sinerjizmin incelenmesi için checkerboard (dama tahtası) testi yapıldı. Kristal viyole testi ile antibiyofilmi etkilerinin değerlendirilmesi gerçekleştirildi. Ayrıca, koloni biyofilmi testi ve qRT-PCR kullanılarak çeşitli virülans genlerinin (*agrA*, *spa*, *icaA* ve *saeR*) ifadeleri araştırıldı. Nisin, kloramfenikol ve kombinasyon uygulamalarında *agrA* geninin ekspresyon seviyesinin kontrole göre azaldığı gösterildi. Diğer genlerin ekspresyon seviyelerinin ise kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlendi. Sonuçlar, nisin ve kloramfenikol kombinasyonunun aktivitesinin sinerjistik ve antibiyofilmi aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Ancak nisin ile siprofloksasin arasında bir etkinlik belirlenmedi.

2022, 55 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Staphylococcus aureus*, Kombinasyon, Antibiyotik direnci, Nisin, Kloramfenikol

## ABSTRACT

MS. Thesis

### THE EFFECTS OF SOME ANTIBIOTIC AND ANTIBIOFILM PEPTIDE COMBINATIONS ON *Staphylococcus aureus* BIOFILM STRUCTURE

Umut Çağrı KOÇAK

Erzurum Technical University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ayşenur YAZICI

Due to the rapid spread of antibiotic resistance and the difficulty of discovering new antimicrobials, the reuse and combinational strategies of previously discovered antibiotics have come to the fore. In this study, the combinational efficacy of chloramphenicol and ciprofloxacin with nisin against the ATCC 6538 strain of *Staphylococcus aureus* were investigated. The MIC values of ciprofloxacin, nisin and chloramphenicol were 0,25, >64 and 32 µg/mL, respectively. The checkerboard assay was carried out for the inspection of synergism between nisin with ciprofloxacin and chloramphenicol. Furthermore, the crystal violet assay was employed to assess antibiofilm effects. Additionally, the expressions of various virulence genes (*agrA*, *spa*, *icaA* and *saeR*) were investigated using the colony biofilm assay and qRT-PCR methods. It was shown that the expression level of the *agrA* gene decreased compared to the control in the nisin, chloramphenicol and combinational applications. The expression levels of other genes were increased compared to the control. The results showed that the activities of nisin and chloramphenicol combinations had synergistic and antibiofilm activity. However, no efficacy was determined between nisin and ciprofloxacin.

2022, 55 page

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Combination, Antibiotic resistance, Nisin, Chloramphenicol

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi'nde (YUTAM) bulunan mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması sürecinde yapmış olduğu yardımını hiçbir desteğini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI'ya teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca, çalışmalarına katkılarından dolayı Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ ve Prof. Dr. Ümit İNCEKARA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirirken vermiş oldukları bilgilerden, yapmış olduğum sunumlarda kendimi geliştirmemi sağlamalarından, laboratuvarıda beraber geçirmiş olduğum vakitten keyif almamı sağlayan Alpgiray TURGUT'a, Arş. Gör. Ayşe ÜSTÜN'e, Yüksek Lisans Öğrencisi Recep AYDINYURT'a ve Yüksek Lisans Öğrencisi Muhammed Kürşad COŞKUN'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her türlü süreçte arkamda olduklarından emin olduğum babam Zekayi Erkin KOÇAK'a, annem Azize KOÇAK'a ve kardeşim Metehan KOÇAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Umut Çağrı KOÇAK**

**Mayıs/2022**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                     | <u>Sayfa</u> |
|---------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>ÖZET</b> .....                                                   | i            |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                               | ii           |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....                                               | iii          |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....                                            | iv           |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....                                | vi           |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....                                        | viii         |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....                                      | ix           |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                                               | 1            |
| 1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> ) .....        | 1            |
| 1.2. Çekirdek Algılama Mekanizmaları ve Biyofilm ile İlişkisi ..... | 3            |
| 1.3. <i>S. aureus</i> 'ta Bulunan Biyofilm Yapısı .....             | 5            |
| 1.4. Antimikrobiyal Peptidler (AMP) ve Etki Mekanizmaları .....     | 10           |
| 1.5. Çalışmada Kullanılan AMP'lerin Özellikleri.....                | 15           |
| 1.5.1. Kloramfenikol .....                                          | 15           |
| 1.5.2. Nisin .....                                                  | 16           |
| 1.5.3. Siprofloksasin.....                                          | 17           |
| 1.6. Kombinasyonel Tedavi .....                                     | 18           |
| 1.6. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi.....                           | 18           |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....                                     | 20           |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....                                  | 25           |
| 3.1. Materyal .....                                                 | 25           |
| 3.1.1. Kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları .....               | 25           |
| 3.1.2. Kullanılan cihazlar .....                                    | 26           |
| 3.1.3. Sarf malzemeleri .....                                       | 27           |
| 3.1.4. Kullanılan solüsyonlar ve antibiyotikler .....               | 27           |
| 3.2. Yöntem .....                                                   | 29           |
| 3.2.1. <i>S. aureus</i> 'un hazırlanması .....                      | 29           |
| 3.2.2. Disk difüzyon testi .....                                    | 29           |
| 3.2.3. Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) testi .....            | 29           |
| 3.2.4. Kristal violet (CV) testi .....                              | 30           |

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.5. Checkerboard (Dama Tahtası) testi.....                                       | 30        |
| 3.2.6. Koloni biyofilm testi .....                                                  | 32        |
| 3.2.7. RNA izolasyonu ve cDNA eldesi .....                                          | 32        |
| 3.2.8. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) uygulaması . | 33        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>                                      | <b>35</b> |
| 4.1. S. aureus'un Hazırlanması ve Disk Difüzyon Testi .....                         | 35        |
| 4.2. Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitesi .....                                | 36        |
| 4.3. Checkerboard Testi .....                                                       | 40        |
| 4.4. Gen İfadesi Analizi .....                                                      | 42        |
| <b>5.SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>                                                     | <b>45</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                              | <b>49</b> |
| <b>EKLER.....</b>                                                                   | <b>55</b> |
| EK 1 gyrB, agrA, icaA, saeR ve spa genlerinin qRT-PCR analizi.....                  | 55        |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklaması

|     |                  |
|-----|------------------|
| °C  | Santigrat derece |
| (+) | Pozitif          |
| (-) | Negatif          |
| g   | Gram             |
| L   | Litre            |
| mm  | Milimetre        |
| µg  | Mikrogram        |
| µL  | Mikrolitre       |
| µm  | Mikrometre       |
| mL  | Mililitre        |
| %   | Yüzde            |

### Kısaltmalar

|                |                                                                |
|----------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>Agr</i>     | Aksesuar gen regülatörü                                        |
| AHLs           | Açıl-homoserin laktonlar                                       |
| AIP            | Otoindükleyici peptid                                          |
| AMP            | Antimikrobiyal Peptidler                                       |
| ATCC           | American Type Culture Collection                               |
| Bap            | Biyofilmden Sorumlu Protein                                    |
| BMBL           | Mikrobiyolojik ve Biyomedikal Laboratuvarları                  |
| BSL            | Biyogüvenlik Seviyesi                                          |
| CV             | Kristal Viyole                                                 |
| eDNA           | Ekstraselüler DNA                                              |
| EPS            | Ekstraselüler polimerik madde                                  |
| EUCAST         | The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| FIC            | Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu                           |
| <i>icaADBC</i> | İnterselüler Adezyon Lokusu                                    |

|      |                                                         |
|------|---------------------------------------------------------|
| LB   | Luria-Bertani                                           |
| MHA  | Muller-Hiltone Agar                                     |
| MHB  | Muller-Hiltone Broth                                    |
| MIC  | Minimum inhibitör konsantrasyonu                        |
| MRSA | Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>        |
| MSSA | Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>         |
| PBP2 | Penisilin bağlayıcı protein 2                           |
| PIA  | Polisakkarit Hücreler Arası Adezin                      |
| PSM  | Fenolde çözünen modilin                                 |
| SaeR | <i>Staphylococcus</i> ekzoprotein ekspresyon proteini R |
| SAM  | S-adenosilmetiyonin                                     |
| Spa  | <i>Staphylococcus</i> protein A                         |
| WHO  | Dünya Sağlık Örgütü                                     |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. <i>S. aureus</i> 'ta bulunan bir çekirdek algılama sistemi .....                                                                                                                   | 4  |
| Şekil 1.2. Biyofilm oluşumu .....                                                                                                                                                             | 6  |
| Şekil 1.3. <i>Staphylococcus</i> Spp.'lerde İca operonuna bağımlı (a) ve İca operonundan bağımsız (b) biyofilm mekanizmalarının şeması.....                                                   | 8  |
| Şekil 1.4. Çeşitli AMP kaynakları.....                                                                                                                                                        | 11 |
| Şekil 1.5. AMP'lerin yapısal çeşitliliği.....                                                                                                                                                 | 12 |
| Şekil 1.6. AMP'lerin bazı etki mekanizmalarının şematize edilmiş hali.....                                                                                                                    | 13 |
| Şekil 1.7 Kloramfenikol'ün molekül yapısı .....                                                                                                                                               | 15 |
| Şekil 1.8. Nisin AMP'inin molekül yapısı .....                                                                                                                                                | 16 |
| Şekil 1.9. Siprofloksasin'in molekül yapısı .....                                                                                                                                             | 17 |
| Şekil 3.1. Nisin ve kloramfenikol checkerboard testi well plate dizaynı.....                                                                                                                  | 31 |
| Şekil 3.2. Nisin ve siprofloksasin checkerboard testi well plate dizaynı .....                                                                                                                | 31 |
| Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda nisin (A) ve kloramfenikol (B) moleküllerinin disk difüzyon testi Sonuçları .....                                                                        | 36 |
| Şekil 4.2. CV testi kloramfenikol 16 µg/mL (A), nisin 32 µg/mL (B), siprofloksasin 0,125 µg/mL (C) konsantrasyonlarındaki ışık mikroskobu görüntüleri ve spektrofotometre sonuç grafiği ..... | 38 |
| Şekil 4.3. Checkerboard testi plate görüntüsü.....                                                                                                                                            | 41 |
| Şekil 4.4. <i>S. aureus</i> 'un koloni biyofilm testi 48 saat inkübasyonu sonucu biyofilm yapıları.....                                                                                       | 42 |
| Şekil 4.5. qRT-PCR sonucunda gen ekspresyon seviyelerinin grafikleri.....                                                                                                                     | 44 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1. LB Agar besiyerinin içeriği .....                   | 25 |
| Çizelge 3.2. MHA besiyerinin içeriği .....                       | 26 |
| Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi..... | 27 |
| Çizelge 3.4. cDNA Reverse Transkripsiyon kiti içeriği .....      | 33 |
| Çizelge 3.5. HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix plus içeriği .....  | 34 |
| Çizelge 3.6. qRT-PCR için tasarlanmış olan primerler.....        | 34 |
| Çizelge 3.7. qRT-PCR programı .....                              | 34 |



### 1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar, mikroskobik boyutlarda olan tek veya hücre kolonisi halinde yaşayan organizmalardır. Mikroorganizmaların keşfedilmesi 1665 yılında Robert Hooke'un küçük boyutlardaki yapıları büyütebilecek bir cihaz kullanarak küflerin görüntülerini çizmeyi başararak meydana gelmiştir (Gesh 2005). 1673 yılında, tek lensli mikroskobun atasını icat etmiş olan Anton van Leeuwenhoek'un gözlemleri ile devam etmiştir. Bu süreçte daha iyi büyütme sağlayan lensler ve bu lenslerin geliştirilmesiyle Leeuwenhoek mikroorganizmaların varlığını ve günümüzde kullandığımız mikroskop teknolojisini bilim dünyasına kazandırmıştır (Lane 2015). 1860'lı yıllarda Louis Pasteur, gıda bozulmalarını engellemek amaçlı yapmış olduğu çalışmalarda bu bozulmaların mikroorganizma kaynaklı olduğunu bulmuştur (Bordenave 2003). 1876 yılında ise Robert Koch çeşitli hastalıkların kaynağının mikroorganizmalar olduğunu tespit etmiştir. Bu tespit sonucunda hastalık etmeninin mikroorganizma olup olmadığını belirlemek için Koch postülatlarını geliştirmiştir (O'Brien and Goedert 1996).

Mikroorganizmalar insanlık için birçok açıdan işlevseldir. İstenilen ürünlerin elde edilmesinden beslenmeye kadar olan katkıları oldukça önemlidir. İnsan vücudunda da birçok faydalı mikroorganizma bulunmaktadır. Ancak çeşitli hastalıklara sebep olan mikroorganizmalar -patojen mikroorganizmalar olarak da adlandırılır- insan hayatı ve sağlığı açısından büyük tehdit unsurlardır. Bilim insanları patojen mikroorganizmalara karşı stratejiler geliştirmeye devam etmektedir. Bu tehditlerden birisi olan biyofilm, mikroorganizmaların geliştirilen stratejilere karşı kendilerini korumalarını sağlayan bir yapıdır (Cascioferro et al. 2021; Kakoullis et al. 2021).

#### 1.1. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

*S. aureus*, kok şeklinde, 0,5-1,5 µm çapında, Gram pozitif (+) ve fakültatif aerob bir bakteridir. Robert Koch tarafından 1878 yılında tanımlanmıştır. Oksijen yokluğunda fermentasyon yoluyla gelişebilir. *Bacteria* domainin *Firmicutes* şubesinde bulunan bu bakteri, oldukça patojen bir yapıda olması nedeniyle hastane enfeksiyonlarında en sık görülen beş türden birisidir (Masalha et al. 2001; Yüksekdağ ve Baltacı 2013; Zhou et al. 2019). *S. aureus* tedavi amaçlı kullanılan neredeyse bütün antibiyotiklere karşı hızlı

direnç gerçekleştirmesi açısından da oldukça önemlidir. 2015 yılında Avrupa verilerine göre alt türlerden birisi olan metisiline dirençli *S. aureus* 'un (MRSA), 148.000'den fazla enfeksiyondan ve 7.000 ölümden sorumlu olduğu ortaya koyulmuştur (Kakoullis et al. 2021). Bu bakteriler genellikle deride ve solunum sistemi organlarında, özellikle de burun kısmında bulunurlar. İçermiş olduğu geniş virülans faktörleriyle enfeksiyon kapasitesi yüksek bir fırsatçı patojendir. Pnömoni, toksik şok sendromu, bakteriyemi, yumuşak doku ve kan dolaşımı enfeksiyonları gibi çeşitli ciddi enfeksiyonlara *S. aureus*'un virülans faktörleri yol açmaktadır (Hodille et al. 2017). Ayrıca, birçok suşu biyofilm meydana getirme kapasitesine sahiptir (Masalha et al. 2001; Zhou et al. 2019; Seethalakshmi et al. 2020).

MRSA ayrıca metisiline ve içinde  $\beta$ -laktam halkası içeren antibiyotiklerin hepsine de direnç geliştirmiştir. Bu direnç, penisilin bağlayıcı protein 2 (PBP2)'nin bir homolog proteini olan PBP2a'nın hücrede üretilmesiyle gerçekleşmiştir. PBP2a'nın  $\beta$ -laktamlara dirençli olmasının sebebi PBP2a'nın aktif bölgesinde bulunan ve hedeflenen serin amino asidinin antibiyotikler tarafından erişilemeyen bir bölgede bulunmasındandır. Bu yapısal değişiklik sayesinde MRSA, bu antibiyotik sınıfına karşı tamamen dirençli hale gelmektedir. Yeni geliştirilen beşinci nesil sefaloprin olan seftarolin fosamile, MRSA'da bulunan bu mekanizmanın üstesinden gelinmesi için özel olarak geliştirilmiştir. Allosterik etki gösteren seftarolin fosamile erişilemeyen bölgedeki serinin ortaya çıkmasını sağlayıp PBP2a'nın konformasyonel bir değişikliğine neden olması açısından antibiyotiklerin PBP2a'yı inhibe etmesine olanak sağlamaktadır (Kakoullis et al. 2021).

Bu tezde kullanılan *S. aureus* suşu, *S. aureus* subsp. *aureus* *Rosenbach* ATCC 6538'dir (ATCC, ABD) ve insan lezyonundan izole edilmiş, bütün genomu dizilenmiş, yüksek biyofilm yapma yeteneğine sahip bir alttürüdür. *S. aureus* ATCC 6538 suşu günümüzde bulaşıcı hastalık araştırmaları ve kalite kontrolü için kullanılmaktadır (Abbas et al. 2019; Chen et al. 2020). Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) olan bu suş biyoinformatik, ilaç geliştirme ve benzeri birçok alanda çalışmaya da uygundur. Biyogüvenlik seviyesi (BSL), ABD Sağlık ve İnsan Hizmetleri Departmanı'nın Mikrobiyolojik ve Biyomedikal Laboratuvarlarında (BMBL) belirlenen risk

değerlendirmesine göre BSL 2 seviyesindedir (Larsen et al. 2008; Anonymous 2019; Lancellotti et al. 2019).

### 1.2. Çekirdek Algılama Mekanizmaları ve Biyofilm ile İlişkisi

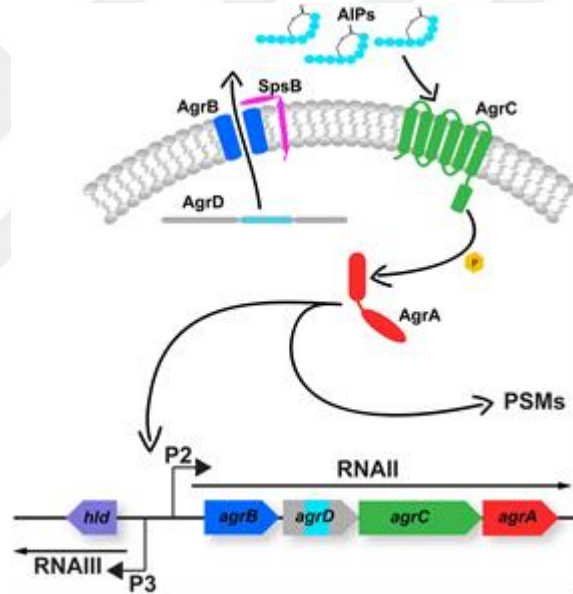
Çekirdek algılama, mikrobiyal topluluğun ortamda bulunan hücre topluluğunun yoğunluğunu anlamasını sağlayan bir hücresel iletişim şeklidir. Yoğunluğa bağlı olarak çekirdek algılama yapan hücre çevresindeki durum değişikliklerine karşı yanıt oluşturabilir ve mikroorganizmanın hayatta kalmasını kolaylaştıran bir yapı oluşturmaya izin verebilir. Bu sistem, çekirdek algılama sentazlar sayesinde üretimi gerçekleşen otoindükleyici ismi verilen birtakım moleküllerin sentezini, ekstraselüler matrise salınımı ve hücre topluluğunda bu moleküllerin algılanarak yanıtın oluşması ile çalışır. Ortamdaki bakteri popülasyonunun artması otoindükleyici moleküllerin de birikmesiyle ya da popülasyonun azalması ile bu moleküllerin azalması sayesinde hücreler kaderlerini belirlerler. Kısaca, hücreler popülasyon miktarının değişmesini algılayarak hücresel davranışında değişikliğe gitmektedir. Bu sistem hücrelerin biyoluminesans özellik göstermesi, duruma bağlı olarak virülans faktörlerinin sentezlenmesi ve biyofilm yapısı oluşturmaya gibi birçok özelliğin meydana getirilmesini sağlamaktadır. Çekirdek algılama yapmak için gerekli moleküller hücre açısından oldukça maliyetlidir ancak evrimsel süreçte hücreler hayatta kalıp yeni nesiller oluşturmak için bu stratejileri gerçekleştirmek zorundadır (Papenfort and Bassler 2016; Abisado et al. 2018).

Çekirdek algılama, hem Gram pozitif (+) hem de Gram negatif (-) bakteriler tarafından gerçekleştirilmektedir. Gram negatif (-) bakteriler dört temel özellik ile çekirdek algılama gerçekleştirirler. İlk olarak otoindükleyici molekül için açıl-homoserin laktonlar (AHLs) ya da S-adenosilmetiyonin'den (SAM) sentezlenen diğer moleküller kullanılır. Gram pozitif (+) bakterilerden farklı olarak bu moleküller boyutları gereği transmembran reseptörlerine ihtiyaç duymadan hücre içine ve dışına serbestçe salınabilirler. Bu sayede sitoplazmada bulunan spesifik reseptörler tarafından rahatlıkla tanınır. Tanınmadan sonra hücre gen ekspresyonunda değişiklikler yaparlar. Son olarak otoindüksiyon denilen süreçle popülasyondaki hücreler hem kendilerini hem de birbirlerini uyararak senkronize bir şekilde yanıt oluştururlar. Gram negatif (-) bakteriler

## 1. GİRİŞ

birçok otoindükleyici molekül kullanır. Bu da çevrede bulunan tehdite karşı oldukça başarılı bir şekilde spesifik yanıt verilmesini sağlar (Papenfort and Bassler 2016).

Gram pozitif (+) bakterilerde membran yapıları gereği membrana bağlı histidin kinaz reseptörleri ve bu reseptörlere uygun oligopeptidler kullanılır. Hücre içine yönlendirilen sinyal, spesifik olarak sitoplazmik transkripsiyon faktörlerinden faydalanıp iki bileşenli bir sistem olarak gen ekspresyonunda değişiklikleri yönlendirir. Bir gram pozitif (+) bakteri olan *S. aureus*, aksesuar gen regülatörü (*Agr*) sistemi tarafından bir çekirdek algılama sistemine sahiptir. Sinyali 7-9 aminoasit uzunluğunda olan tiolakton halkası içeren bir peptid sağlamaktadır (Papenfort and Bassler 2016; Jenul and Horswill 2019).



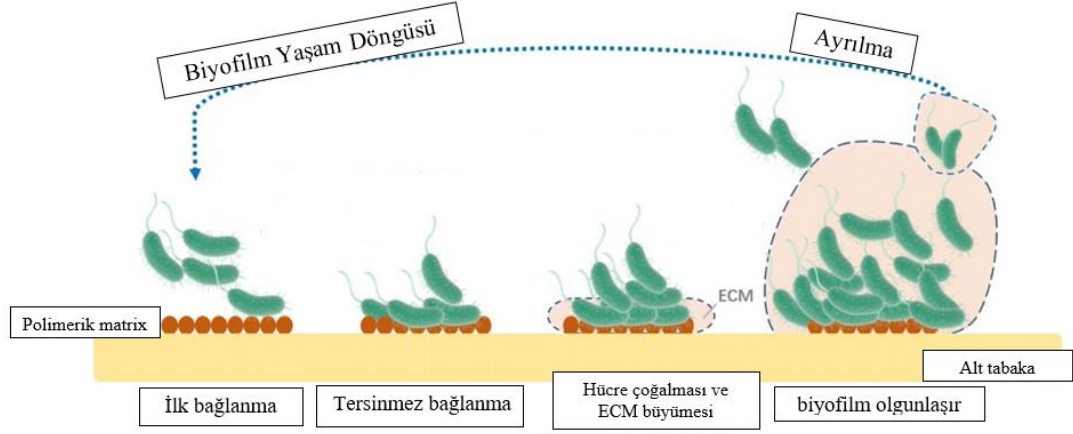
**Şekil 1.1.** *S. aureus*'ta bulunan bir çekirdek algılama sistemi (Jenul and Horswill 2019)

Şekil 1.1.'de *S. aureus*'ta *Agr* quorum sensing mekanizması gösterilmiştir. Otoindükleyici peptid (AIP) sinyali, operondaki *AgrD* tarafından kodlanır. *AgrD* otoindükleyicisi sinyal molekülü haline getirilmesi için sinyal peptidaz olan *SpsB*'nin yardımıyla transmembran *AgrB* proteini tarafından düzenlenir ve ekstrasellüler matrise salınımı gerçekleşir. Ekstrasellüler matriste bulunan AIP'lerin konsantrasyonu istenilen seviyeye ulaştığında otofosforilasyona uğrayan histidin kinaz *AgrC* tarafından algılanır. Bu sinyal iletimi, sırasıyla P2 ve P3 promotörlerini bağlayabilen ve bu sayede RNAII ve RNAIII transkriptlerinin ekspresyonunu sağlayan *AgrA*'ya aktarılır. RNAII, hem AIP'nin biyosentezini sağlayan hem de AIP'nin tanınmasını sağlayan yolağın kodlandığı

*agrBDCA* operonunu içerir. RNAII ise *agr* operon sisteminin akış aşağı hedef genlerinin ekspresyonundan sorumludur. Ayrıca intrasellüler fosforillenmiş *AgrA* fenolde çözünen modilin (*PSM*) genlerinin promotörlerine bağlanarak ekspresyonuna yol açar (Jenul and Horswill 2019).

### 1.3. *S. aureus*'ta Bulunan Biyofilm Yapısı

Biyofilm, patojen mikroorganizmanın enfeksiyon etkilerinin kalıcılığını arttıran ve normalde tutunamayacağı yüzeylere tutunmasını sağlayan bir hücre topluluğu savunma yapısıdır. Biyofilm terimi, Costerton tarafından 1978 yılında yapılmış olduğu çalışmalar sonucunda bilim camiasına tanıtılmıştır. Klinik çalışmalarda *P. aeruginosa*, *S. aureus* gibi birçok bakteri türünün tek ya da çoklu ilaç direnci oluşturmak için biyofilm yaptığı bildirilmiştir. Biyofilm yapısı içinde bulunan hücreler biyofilm yapısı dışında bulunan hücrelere -yani planktonik formlarına- kıyasla antibiyotiklere karşı 10-1.000 kat daha dirençli haldedirler. Özellikle de bakteriler, ortamdaki besinlerin miktarı gibi çevresel etmenleri çekirdek algılama mekanizması ile algılayıp gen ekspresyonunu entegre ederek biyofilm yapısı oluşturabilirler. Bu durumun, antibiyotik gibi biyosit moleküllerin kullanımının yaygınlaşması ile mikroorganizmaların hayatta kalabilmek için biyofilm yapısı oluşturmaya başladığını ve bu sayede kullanılan biyositlere karşı direnç gösterdiklerini belirtmektedir. Hücrelerin ekstrasellüler matrise salgılamış oldukları asidik maddelerden dolayı pH değişikliğine bağlı olarak bazı antibiyotikleri olumsuz yönde etkiledikleri de belirlenmiştir. Günümüzde bilim insanları bakterilerin birçoğunun serbest bir şekilde bulunmadığını, yüzeylere tutunduklarını belirtmişlerdir. Özellikle de klinikte bulunan, ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* spp.) olarak adlandırılan ve mortalitesi oldukça yüksek olan bir grup bakterinin biyofilm yapılarının anlaşılması üzerinde yoğunlaşmıştır (Yüksekdağ ve Baltacı 2013; Rabin et al. 2015).



**Şekil 1.2.** Biyofilm oluşumu (Lu et al. 2019)

Şekil 1.2’de biyofilm oluşumu şematize edilmiştir (ECM=EPS: ekstrasellüler polimerik madde). Biyofilm temelde dört aşamadan meydana gelen bir yaşam döngüsünden ibarettir ve çekirdek algılama mekanizmaları ile yönlendirilir. İlk olarak biyofilm, bakterinin yüzeye tutunması ile başlar ve daha sonrasında tersinmez olarak bağlanması ile devam eder. Bu süreçte bakteriler ekstrasellüler DNA (eDNA), çeşitli proteazlar, polimerik matrix, çeşitli biyofilmden sorumlu proteinler gibi birtakım molekülleri sentezlemektedir. Bir sonraki aşamada hücre çoğalması ile EPS yapısını büyümesi gözlemlenir. Çekirdek algılama mekanizmaları bu ve son aşamasında daha etkin bir şekilde çalışır. Biyofilm yapısı büyürken çeşitli otoindükleyici moleküller ve regüle ettikleri transkripsiyonel reseptörler, biyofilm yapısının stabil kalması için ve hücrenin çevresel denge yapısına katkıda bulunması için virülans faktörlerin üretimini belirler. En son olarak biyofilm yapısı iyice olgunlaştıktan sonra bakteriler yeni bir yüzeye tutunmak ve biyofilm yapısının dengesini korumak için biyofilmden ayrılabilir. Bu sayede yeni biyofilm yapısı başlatarak biyofilm döngüsünü devam ettirebilirler. Biyofilm yapısının engellenmesine ilişkin yeni stratejiler, ekstrasellüler matrix oluşumunu, bakterilerin bu yapıya bağlanmasının inhibisyonunu, meydana getirilmiş EPS yapısının bozulması, çeşitli çekirdek algılama faktörlerinin engellenmesi ve benzeri birçok aşamayı hedefler. Biyofilmin engellenmesinde mekanizmanın iyi tanımlanması ile her aşamada hedeflenecek yapıların olmasına dikkat çekilmelidir (Lu et al. 2019).

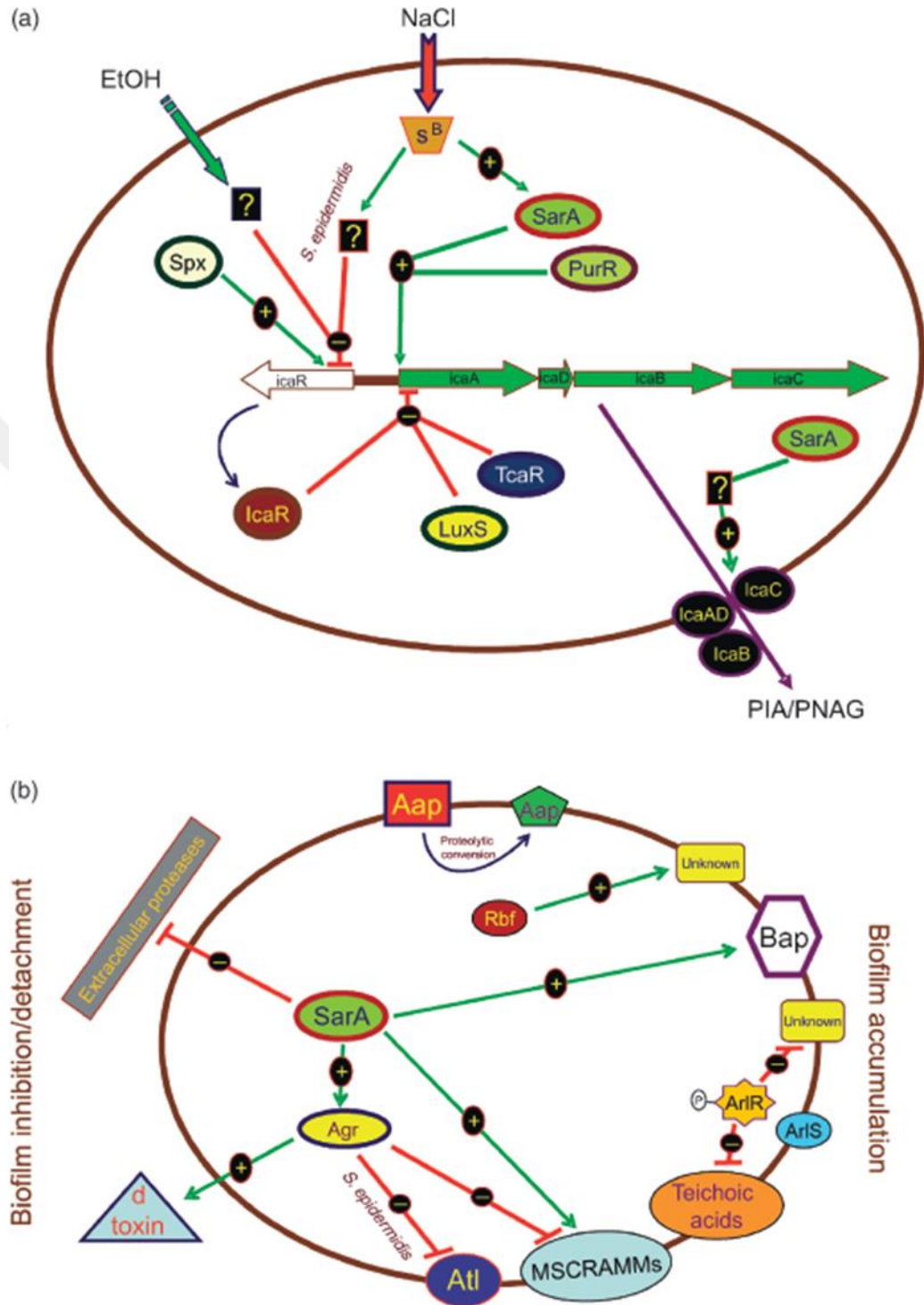
Biyofilm yapısı yani EPS, 3 ana yapıdan meydana gelmektedir. Bunlar şu şekildedir: bir veya birden fazla türde ekzopolisakkarit, eDNA ve çeşitli proteinler. İlk olan ekzopolisakkaritler hem hücre içinde hem de hücre dışında sentezlenebilen dış

ortama salınımı gerçekleşen makromoleküllerdir. Hücre yüzeyine bağlanan ve geniş bağlantılar kuran lineer ya da dallanmış şekilde ipliklere benzer halde gözlemlenirler. Yapılarında fazlaca mannoz, galaktoz ve glukoz bulundurlar. Ekzopolisakkaritler, biyofilm yapısının oluşması için temel görevi görürler ve diğer makromoleküllerin yapışmasını sağlarlar. Her bir türün kendine spesifik ekzopolisakkarit molekülü vardır. *S. aureus*'ta, biyofilm yapısından sorumlu ekzopolisakkarit lineer ve polimer yapılı, PIA görevindeki Poli-N-asetil glukozamin'dir. PIA'nın biyosentezi *IcaADBC* operonundan yani *IcaA*, *IcaB*, *IcaC* ve *IcaD* genleri tarafından gerçekleştirilir. İkinci olarak eDNA'lar, biyofilm oluşumunda ve bağlanmasında önemli rolü olan, aktif olarak hücreden salgılanabilen makromoleküllerdir. Salgılanmış eDNA'lar yapışmanın kolay olması için hücrenin yüzeyindeki reseptörlerle etkileşime girer. Ayrıca negatif (-) yüklü olmasıyla da bazı pozitif (+) yüklü antibiyotikleri de inhibe edebilirler. *S. epidermidis* 'te vankomisin biyofilm yapısının içine taşınmasını engellediği bulunmuştur. Bunun dışında eDNA ile ilgili bilgiler yeterli değildir ve aydınlatılması için bu konu üzerine düşülmesi gerekmektedir. Ana yapılardan sonuncusu olan proteinler, EPS'nin önemli diğer bir bileşenidir. Hücre yüzeyine ve ekzopolisakkaritlere bağlanarak biyofilmin oluşmasına ve stabil olarak kalmasına yardımcı olmaktadır. *S. aureus*'ta biyofilmden sorumlu protein (Bap) bu görevi gerçekleştiren proteindir. Çizelge 1.1'de bazı biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ve biyofilmden sorumlu proteinleri listelenmiştir. Biyofilmden sorumlu proteinlerin dışında bazı enzimlerin kontrollü salınımı ile biyofilm yapısındaki bileşenler parçalanarak kısa süreli hücrenin temel ihtiyaçları karşılanabilir. Bu enzimlerle hücre başka bir bölgede biyofilm oluşturmak için planktonik hücreler de meydana getirebilir (Gün ve Ekinci 2009; Rabin et al. 2015).

İnsan enfeksiyonlarında *S. aureus*, biyofilm oluşumunun ilk adımını fibronektin, fibrinojen gibi insan matris proteinlerine bağlanması ile başlatır. Bu süreçte hücre yüzeyindeki bileşenler aracılığıyla *S. aureus* tersinmez bir şekilde kovalent bağlanma eğilimi gösterir. Yüzeye bağlanan hücrelerde biyofilm gerçekleşmesi için hücreler birbirlerini uyararak EPS yapısı oluşturulur. Biyofilm büyüyene kadar üst üste hücrelerin eklenmesini teşvik eder. Bu sırada ekstraselüler matrise yani biyofilm yapısına çeşitli moleküller salgılanarak hücreler biyofilm içindeki konumunu düzenler. Son aşama olarak ortamda besin miktarının azalması, biyofilm yapısının stabil halini koruyamaması gibi birçok faktör nedeniyle biyofilm yapısının dağılması için hücreler ayrılarak planktonik

## 1. GİRİŞ

hücreler olarak döngüyü devam ettirmek için farklı noktalara hareket ederler (Rabin et al. 2015).



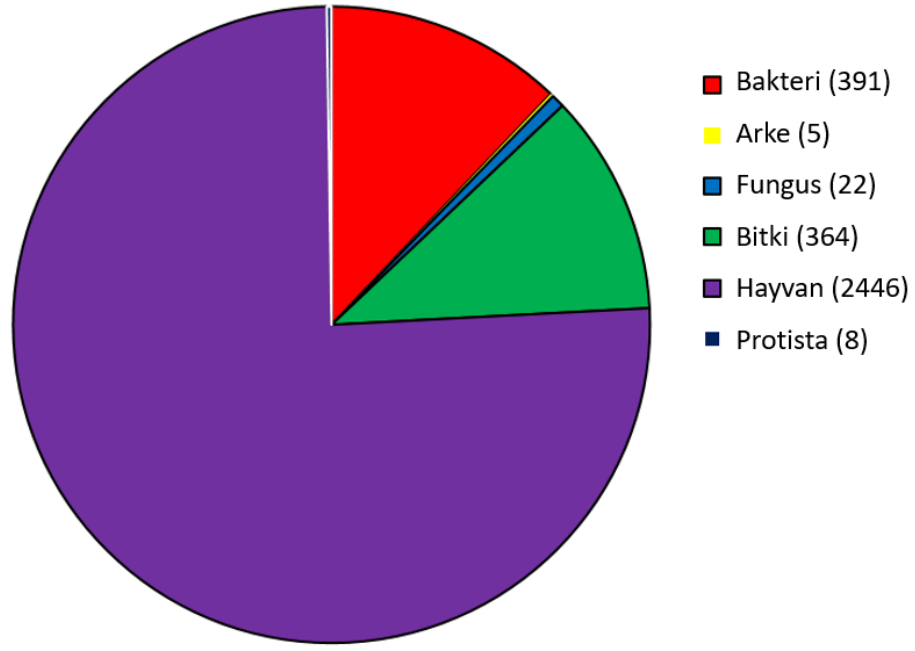
**Şekil 1.3.** *Staphylococcus* Spp.'lerde İca operonuna bağımlı (a) ve İca operonundan bağımsız (b) biyofilm mekanizmalarının şeması (O'Gara 2007)

Şekil 1.3'te *Staphylococcus* Spp.'lerde *ica* operonuna bağımlı ve *ica* operonundan bağımsız biyofilm mekanizmaları şematize edilmiştir. İki mekanizmada da (a,b) yeşil renkli oklar pozitif regülatör yolları, kırmızı renkli oklar negatif regülatör yolları belirtir. İca operonuna bağımlı sistem (a) kısaca şu şekilde gerçekleşir: çekirdek algılama gerçekleştirmek için sırasıyla ortamdaki NaCl veya EtOH konsantrasyonuna bağlı olarak *İcaADBC* operonunun ürünleri üretilir ya da operonun akış yukarısı olan *İcaR* geninin ürünü üretilir. Operondaki *İcaADBC* ürünleri hücrenin biyofilm yapısı meydana getirmesine olanak sağlayıp pozitif regülatör olarak rol oynarken akış yukarı *İcaR* geninin ürünü bu operonun negatif regülatörü olarak rol oynamaktadır. *İca* operonundan bağımsız sistemde (b) ise *SarA* hem *Agr* sistemini hem de *Bap* geninin pozitif regülatörü olarak görev yaparak biyofilm yapısının İca operonuna bağımlı olmadan da gerçekleşmesini sağlamaktadır (O'Gara 2007).

*S. aureus* ATCC 6538'de biyofilm yapısı çekirdek algılama mekanizmaları ile iki şekilde meydana gelmektedir. Bunlardan ilki *icaADBC* operonuna bağımlı olan sistemdir (Yüksekdağ ve Baltacı 2013). Biyofilm oluşumunda önemli olan polisakkarit hücreler arası adezin (PIA) molekülü *icaADBC* operonu tarafından çekirdek algılama iletişimi sayesinde kodlanır. Operondan elde edilen *İcaA* transmembran proteini, *icaD* proteinin sorumlu olduğu bir proteindir (O'Gara 2007). Biyofilm yapısı için ikinci sistem ise İca operonundan bağımsız sistemdir. Bu sistem biyofilm oluşturmak dışında çeşitli virülans faktörlerin de sentezlenmesini sağlamaktadır. *Agr* operonu, çekirdek algılama ile ilişkili küresel bir regülatördür. *S. aureus*'ta bulunan *Agr* operon sisteminin, delta-hemolizin toksini (*hdi*), alfa toksini (*hla*), serin proteaz (*SplA-F9*) ve *Staphylococcus* proteini A (*Spa*) gibi çeşitli virülans faktörlerin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Painter et al. 2014; Singh ve Ray 2014; Jenul ve Horswill 2019). Özellikle deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında *Agr* aktivitesinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Cheung et al. 2011). *Spa*, özellikle zatüre, kan dolaşımı enfeksiyonları ve septik artrite neden olan bir diğer önemli virülans faktörüdür (Jenul ve Horswill 2019). *Spa*, *Agr* bağımlı düzenleyici olan RNAIII tarafından aşağı regüle edilir (Cheung et al. 2001).

### 1.4. Antimikrobiyal Peptidler (AMP) ve Etki Mekanizmaları

AMP'ler neredeyse bütün canlılar tarafından üretilen, 15 ile 150 amino asit uzunluğunda düşük molekül ağırlığına sahip olan peptidlerdir. 1922 yılında ilk AMP olan lizozim Alexander Fleming tarafından tanımlanmıştır (Di Somma et al. 2020). AMP'ler yapıcı basit moleküllerdir ve bu sayede evrimsel süreçte çeşitliliği de artmaktadır. Bireysel olarak hücrelere çevresel nişte rekabet oluşturmaları açısından AMP'ler avantaj sağlamaktadır. Çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Bunlardan birisi olan bakteriyel AMP'ler –bakteriyosin olarak da adlandırılır- iki ana kategoriye ayrılır: lantibiyotikler ve lantibiyotik olmayanlar. Lantibiyotikler isminden de anlaşıldığı üzere molekül yapısında lantionin içeren AMP'lerdir. Örnek olarak bir lantibiyotik olan nisin, izole edilen ilk AMP'lerdendir. Yaklaşık olarak 50 yıldır gıda koruyucusu olarak kullanılan nisin, 1947 yılında *Lactococcus lactis*'ten izole edilmiştir. Ancak günümüzde bildirilen AMP'lerden birçoğu ökaryotik hücrelerden elde edilmektedir. Ökaryotik canlılarda AMP'ler, bağışıklıkta önemli rol oynarlar. Bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlara karşı temel savunma yapısı oluşturmaktadırlar (Kumar et al. 2018; Lazzaro et al. 2020). Genel anlamda pozitif yüklü oldukları için negatif yüklü bakteri membranına teması oldukça kolaydır. Bu sayede dolaylı ya da doğrudan hücre lizisine yol açarak hücre bütünlüğünü bozabilirler. Membran geçirgenliğini arttırarak diğer AMP'lerin hücre içine geçişini kolaylaştırmak gibi daha karmaşık hücre aktivitelerine de sahip olabilirler. Bugüne kadar çeşitli kaynaklardan doğal olarak ya da sentetik olarak 3.000'den fazla AMP molekülü tanımlanmıştır. Son zamanlarda AMP'lerin mikroorganizmalara karşı kullanımı yaygınlaşmaktadır (Anonymous 2016; Boparai and Sharma 2020; Lazzaro et al. 2020).

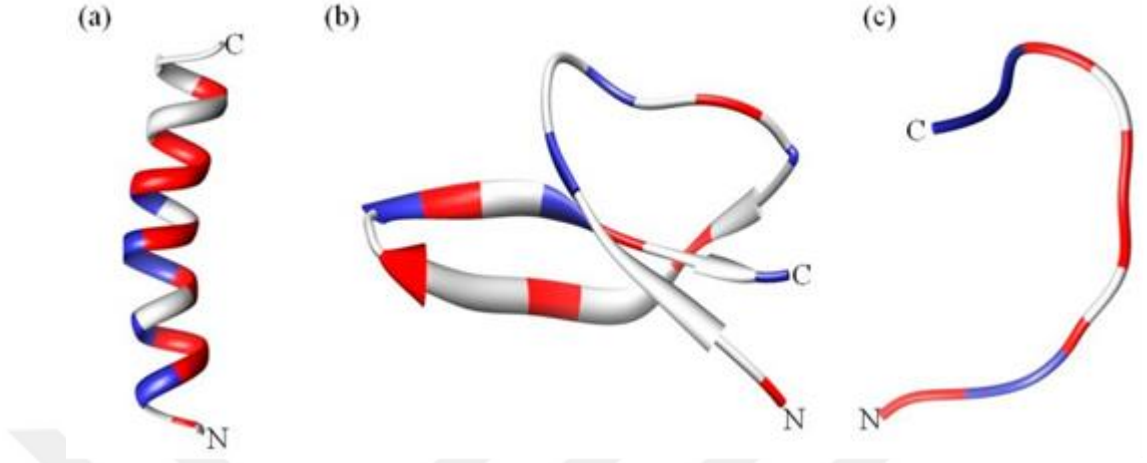


**Şekil 1.4.** Çeşitli AMP kaynakları (Anonymous 2016)

Şekil 1.4'te Antimikrobiyal peptid veritabanı (APD3, <https://aps.unmc.edu/>) kullanılarak hazırlanan grafikte çeşitli AMP kaynakları belirtilmiştir. 391 *Bacteria*, 5 *Archaea*, 22 *Fungus*, 364 *Bitki*, 2446 *Hayvan* kaynaklı olmak üzere toplamda 3236 adet AMP tanımlanmıştır. Siteden edinilen veriler ışığında grafikte mevcut olmayan sentetik AMP'ler eklendiğinde 3324 AMP veritabanında mevcuttur (Anonymous 2016).

Tanımlanmış AMP'ler, yapısı ve çeşitli grupları içermesi gibi birtakım farklılıklarına rağmen neredeyse hepsinde ortak olan birtakım özellikleri vardır. Ortak özelliklerden birisi, AMP'ler katyonik alan içerebilen, +2 ile +13 arasında değişen pozitif yük göstermeleridir. Lizin ve Arginin varlığı bu katyonik alan içermelerine olanak sağlamaktadır. Bir diğer ortak özellik ise hidrofobik yapıda olmalarıdır. Bu durum peptid dizisinde valin, lösin, izolösin, alanin, fenilalanin, gibi hidrofobik özellik kazanmasını sağlayan aminoasitler içermesinden kaynaklanır. Genellikle %50 hidrofobik aminoasitlerin bulunması idealdir. Hidrofobiklik membran geçirgenliği ile ilgilidir ve lipid tabakasının ne ölçüde açılacağını belirleyebilir. Ortak özelliklerin sonuncusu olarak AMP'ler amfipatik özelliktedir. Üç boyutlu yapı oluşturduğunda AMP'ler genellikle  $\alpha$  sarmalı içerirler ve bu sarmal yapı peptide hidrofilik özellik kazandıran polar ve polar olmayan iki farklı yüz oluşturmasını sağlamaktadır. Ayrıca çoğunlukla  $\beta$ - pileli tabakaya

sahip olan AMP'ler olduğu gibi genişletilmiş bobin yapısı denilen bir yapıya sahip AMP'ler de mevcuttur (Kumar et al. 2018).



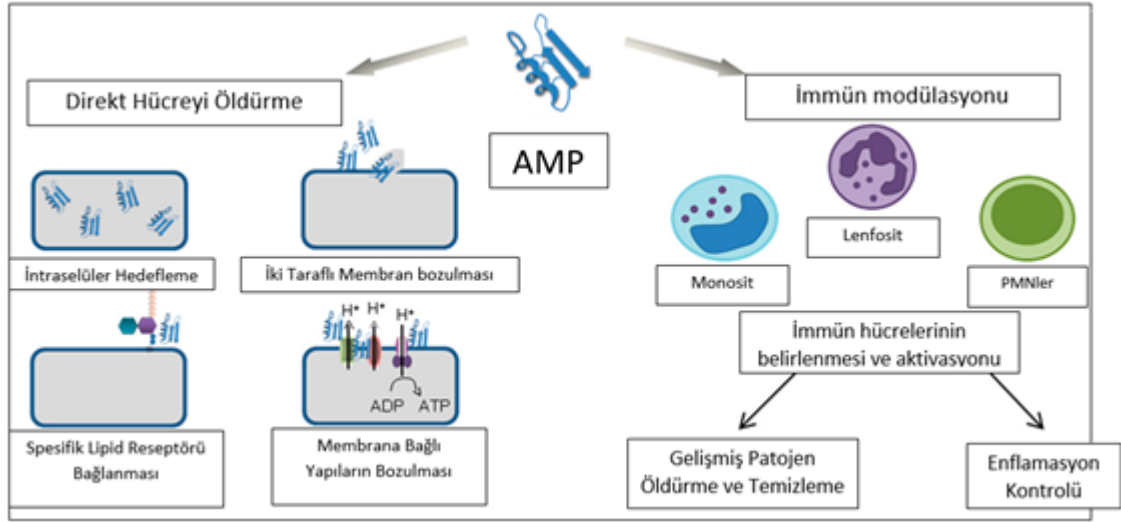
**Şekil 1.5.** AMP'lerin yapısal çeşitliliği (Kumar et al. 2018)

Şekil 1.5'te AMP'lerin yapısal çeşitliliği örnekler ile şematize edilmiştir (N- ve C- terminal uçları belirtilerek pozitif yüklü kalıntılar mavi renkle, hidrofobik kalıntılar ise kırmızı renkle gösterilmiştir.). İlki olan  $\alpha$  sarmal yapıda magainin (a), genellikle kurbağaların ve böceklerin ekstraselüler matrisinde bulunan AMP'lerdir. Yapısı gereği sulu solüsyonlarda kararlı konformasyona sahip değildirler. Bu yüzden yapılandırmak için deterjanlar gibi yüzey aktif maddelerle temas halinde olmalıdırlar. İkinci olarak en büyük AMP grubunun bir üyesi olan  $\beta$  tabaka yapılı insan defensin 5 (b), korunmuş ve disülfid bağları oluşturan sistein kalıntılarına sahip bir AMP'dir. Bu sayede proteazlar tarafından bozunması en aza indirgenir. Sulu ortamdan membran ortamına geçerken büyük yapısal değişikliğe uğramazlar. Son olarak genişletilmiş bobin yapılı indolisidin (c), yalnızca 13 amino asitten meydana gelerek en kısa AMP'lerden birisi olan, sıgır nötrofillerinde bolca bulunan triptofan zengin bir AMP'dir. Misel varlığında membranla ilişkisi oldukça yüksektir (Kumar et al. 2018).

Yapıca basit olan AMP'ler geniş spektrumlu aktiviteye sahip olarak düşünülmekteydi. Ancak yapılan çalışmalarla hücrel savunma sistemleri enfeksiyon kaynağına özgün olacak şekilde olduğunu göstermektedir. Örnek olarak *Tenebrio molitor* böceğinde mevcut olan AMP genlerinin işlevini yitirmesi, *S. aureus* tarafından enfekte olmasına neden olabilmektedir. Yapılan başka bir çalışma *Drosophila melanogaster*'in sistematik olarak AMP ile ilişkili genlerinin silinmesi ile silinen genlere göre çeşitli

## 1. GİRİŞ

bakterilerin enfeksiyonun kontrolünden sorumlu olduklarını göstermektedir. (Lazzaro et al. 2020) Ayrıca AMP'ler bakterilerin çeşitli stratejilerine karşı da kullanılabilir. 2015 yılında battasin peptidlerinin sentezi ve yapı aktivite ilişkisi çalışmaları ile bakteriyel biyofilme karşı yüksek inhibitör olduklarını göstermiştir (Boparai and Sharma 2020).



**Şekil 1.6.** AMP'lerin bazı etki mekanizmalarının şematize edilmiş hali (Kumar et al. 2018)

Şekil 1.6'da AMP'lerin etki mekanizmaları şematize edilmiştir (PMN: polimorfonüklere nötrofiller, ADP: adenozin difosfat, ATP: adenozin trifosfat). Etki mekanizmaları iki ana kategoriye ayrılmaktadır. İlki doğrudan hücreyi öldürme şeklindedir (Kumar et al. 2018). Çoğunlukla AMP'ler, günümüzde kullandığımız antibiyotiklerin aksine hücre membranı ile elektrostatik etkileşime girerek hücrenin direnç geliştirmesini zorlaştırırlar. Etkileşim yapısına göre AMP'ler, iki farklı alt sınıfa ayrılırlar. Alt sınıftan ilki olan membran etkili olan AMP'ler membran yapısını tahribata uğratan katyonik peptidler ihtiva ederler. Prokaryotik hücreler, negatif yüke sahip membran yapısında oldukları için etkileşime girmek oldukça kolaydır. Defensin, melittin, nisin ve LL-37 gibi AMP'ler membran etkili AMP'lere örnek verilebilir. Sistemi açıklayacak olursak nisin, hücre duvarına özellikle de lipid II molekülüne yüksek afiniteyle bağlanır. Bu sırada nisinde bulunan diğer bir bölge membranda gözenek oluşturmaya olanak sağlamaktadır. Bu şekilde hücre kendisini stabil tutamadığı için elemine olur. Bu süreçte hedeflemede membranlar arası farklar ele alındığında AMP'ler tedavi amaçlı kullanıma da uygundurlar (Boparai and Sharma 2020).

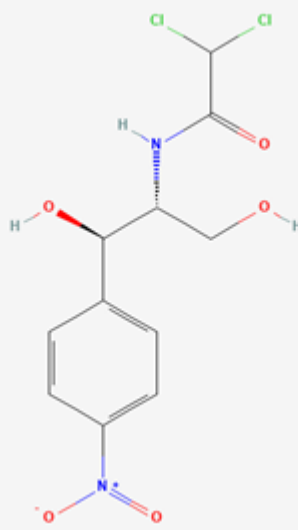
Ana sınıftan ikincisi olan membran etkili olmayan AMP'ler ise membrana zarar vermeden translokasyon yapabilirler. Membran etkili olmayan AMP'ler de iki alt sınıfa ayrılmaktadır. İlki olan hücre duvarını hedefleyenler, hücre duvarı sentezini inhibe edebilmektedir. Ayrıca geleneksel antibiyotiklerin aksine AMP'ler hücre duvarı için gerekli öncü moleküllere de bağlanabilirler. Nisin örneğindeki gibi birincil hedef molekölü lipid II'dir. Buforin II, dermaseptin, HNP-1 ve mersasidin gibi AMP'ler membran boyu hareket ederek normal hücre işleyişini etkilerler (Kumar et al. 2018; Boparai ve Sharma 2020). Alt sınıftan ikincisi olan intrasellüler hedefli AMP'ler üzerinde ilk yapılan çalışmalarda hücre içi hedefli oldukları bilinmiyordu. D- veya L- forma sahip olmalarına göre farklı aktivitelerinin oldukları sonradan keşfedilmiştir. Bu keşifle beraber hücre içi aktiviteye sahip oldukları da belirlenmiştir. Bu AMP'ler öncelikle sitoplazmik membran ile etkileşime girerler. Etkileşim arttıkça hücre içinde biriken AMP miktarına bağlı olarak membran ile ilişkili hücresel süreçleri engelleyebilir. Hücresel süreçleri yerine getiremeyen hücre elemin olur (Kumar et al. 2018).

Ana kategoriden ikincisi olan immün modülasyonu, AMP'lerin doğrudan hücre öldürmesi dışında bağışıklık sistemini uyarması ile gerçekleşir. Çoğunlukla AMP'ler bağışıklık hücreleri tarafından üretildikleri için organizma için tehditle karşılaşan ilk yapılardandır. AMP'ler ayrıca akyuvar aktivasyonu, anjiyogenezin uyarılması gibi birtakım mekanizmaların kontrol edilmesinden de sorumlu olabilirler. Örnek olarak LL-37 gibi insandan elde edilen AMP'ler, dentritik hücreler, mast hücreleri ve benzeri bağışıklık hücrelerini etkileşime girme özelliğine sahiptirler. Bu sayede hücreler patojenlere karşı gerekli tedbiri alıp istenilen immün yanıtın verilmesi sağlanmaktadır (Kumar et al. 2018).

Bir başka örnekte de *S. aureus*'ta biyofilmden sorumlu *icaADBC* operonundan elde edilen *icaA*, *icaR* ve *icaD* genlerinin ekspresyonu  $\beta$ -defensin 3 kullanımı ile azalmıştır (Di Somma et al. 2020).

### 1.5. Çalışmada Kullanılan AMP'lerin Özellikleri

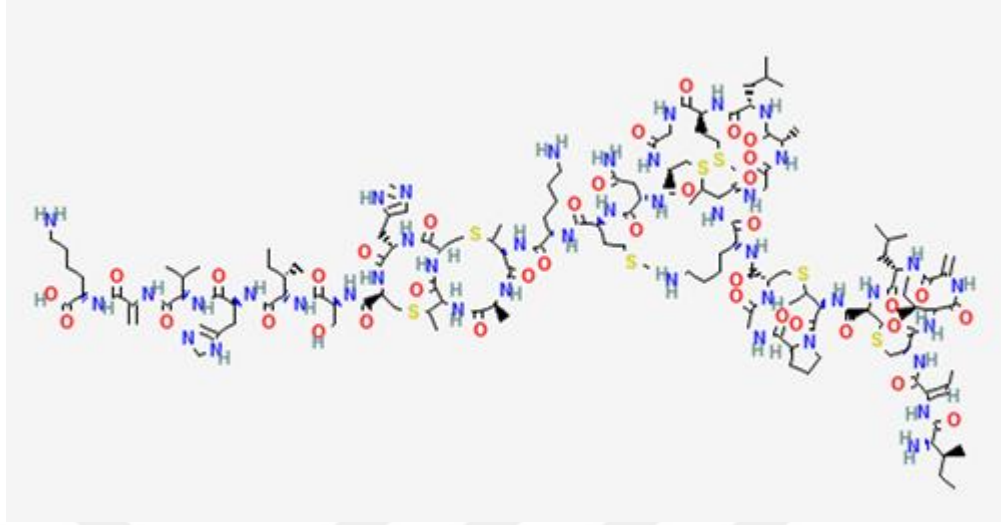
#### 1.5.1. Kloramfenikol



**Şekil 1.7.** Kloramfenikol'ün molekül yapısı (Anonymous 2004a)

Kloramfenikol, 1948'te *Streptomyces venezuelae*'den elde edilip kimyasal yapısı analiz edildikten sonra yarı sentetik bir şekilde üretilerek kullanılmaya başlanan ancak ciddi yan etkilerinden dolayı nadiren kullanılan geniş spektrumlu en aktif antibiyotiklerden biridir. Moleküler formülü  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  şeklindedir (Anonymous 2004a). Diğer antibiyotiklerin tedavi etmekte yetersiz kaldığı durumlar haricinde kullanılması tavsiye edilmez. Hücre duvarından difüze olabilir ve ribozomun 50S alt birimiyle etkileşime girerek hücrede protein sentezini inhibe eder. Bunun dışında blok peptidil transferaz aktivitesini de inhibe ederek protein zincir uzamasını engeller. Ancak kloramfenikol nörotoksisite ve hematolojik bozukluklar gibi ciddi yan etkilerinden dolayı ilk olarak tercih edilmez (Schlünzen at al. 2001; Tevyashova 2021). Normalde kloramfenikol bakteriyostatiktir ancak yüksek dozlarda bakterisidal olabilir (Anonymous 2004a). Ciddi yan etkileri olmasına rağmen hücrelerde antibiyotik direncinin artması nedeniyle kullanımı yeniden gözden geçirilmektedir.

### 1.5.2. Nisin

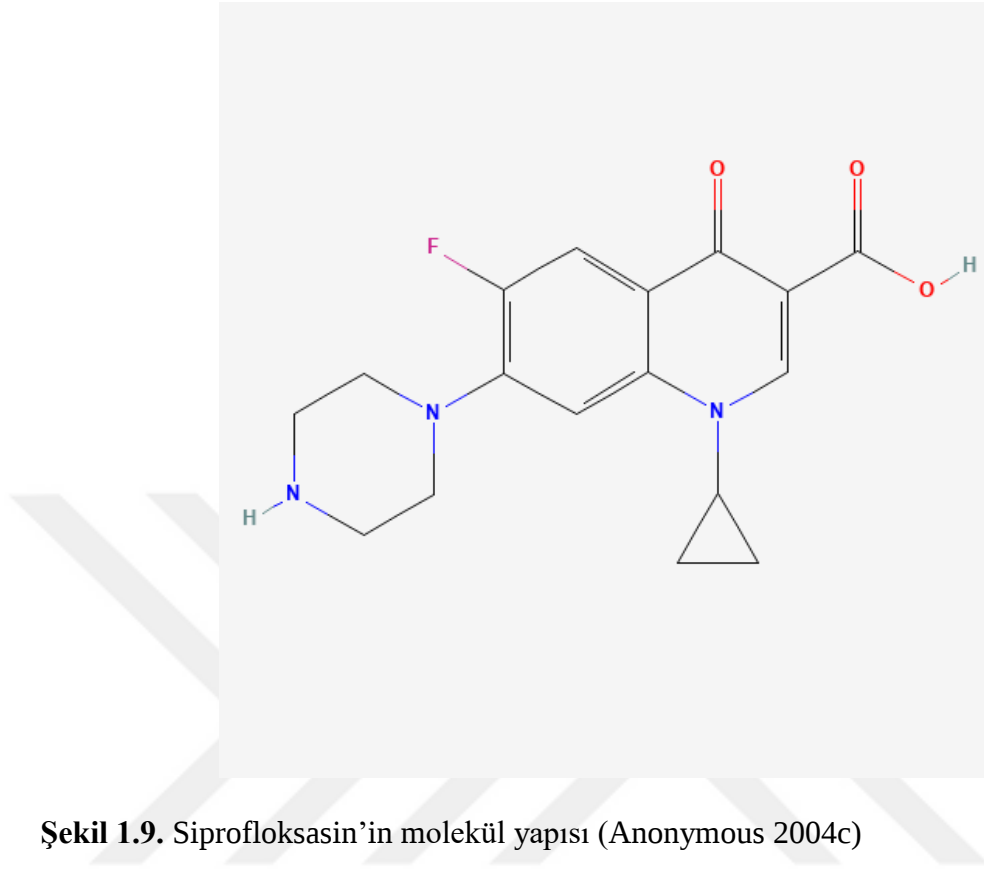


**Şekil 1.8.** Nisin AMP'inin molekül yapısı (Anonymous, 2004b)

Nisin, *Lactococcus lactis*'ten elde edilen ve üretilen I. grup bakteriyosinlere ait bir AMP'dir (de Freire Bastos ve Ceotto 2011). 1933 yılında protein yapısı tanımlanmış ilk olarak 1953 yılında İngiltere'de ticari olarak satılmıştır. 1969 yılında da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gıda koruyucu olarak kullanımı onaylanmıştır. Günümüzde 50'ye yakın ülke tarafından gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır. I. Grup bakteriyosinlerin en bilinen üyesidir (Chung et al. 1989; Akkoç vd 2009). Moleküler formülü  $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$  şeklindedir. *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* gibi Gram pozitif (+) bakterilere karşı inhibitör etkisi vardır. Bakteri membranı üzerinde gözenek yapısı oluşturur. Ayrıca lipid II molekülüne bağlanarak hücre duvarı sentezini engeller (Akkoç vd 2009; Punyauppa-path ve Phumkhachorn 2015).

Nisin, hücre duvarına özellikle de lipid II molekülüne yüksek afiniteyle bağlanır. Bu sırada nisinde bulunan diğer bir bölge membranda gözenek oluşturmaya olanak sağlamaktadır (Boparai and Sharma 2020).

### 1.5.3 Siprofloksasin



Siprofloksasin, flor içeren kinolon grubu antibiyotikler arasında etkinliklerine göre ayrılan dört kuşaktan ikinci kuşakta bulunan bir antibiyotiktir. Moleküler formülü  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$  şeklindedir. Çeşitli cilt enfeksiyonlarına ve idrar yolu enfeksiyonlarına karşı olarak kullanılmaktadır. 1960'lı yıllardan itibaren kullanımı yaygınlaşmıştır. İlk kullanılan kinolon grubu üyesi nalidiksik asittir ve içlerinde siprofloksasin de bulunan diğer bütün kinolon grubu üyeleri bu asidin modifikasyonu sayesinde sentetik olarak elde edilmiştir. Siprofloksasinin 1987 yılında Amerika'da kullanıma başlanmıştır ve az direnç gelişimine sebep olmasından, uzun yarılanma ömrüne sahip olmasından, hem gram pozitif (+) hem de gram negatif (-) bakterilere karşı etkinliğinin olmasından dolayı popülerliği artmıştır (Şenol 2002; Anonymous 2004c).

Siprofloksasin, diğer türevlerinde olduğu gibi benzer bir etki mekanizmasına sahiptir. Gram negatiflerde ve Gram pozitiflerde topoizomerazlara afiniteyle bağlanarak DNA sentezini inhibe eder. Aralarında bulunan en önemli fark ise Gram pozitiflerde

topoizomera IV'e karşı afinitesi yüksekken gram negatiflerde DNA giraza karşı afinitesi yüksektir. Bu bağlamda siprofloksasin, bakterisidal bir etkinliğe sahiptir (Şenol 2002).

### 1.6. Kombinasyonel Tedavi

Patojen bakterilerde çoklu ilaca direncin artması, insan sağlığını önemli ölçüde tehdit etmektedir. Antibiyotiklerin keşfinden bu yana enfeksiyonlara karşı kullanımı bu direnci olumsuz yönde etkilemektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), çoklu ilaca dirençli bakterilerin en büyük üç tehditten birisi olduğunu belirtmiştir. Örnek olarak 2003 yılında kullanıma başlanan daptomisine karşı bir yıl sonra *Enterococcus faecium*'lu hastalarda direnç olduğu gözlemlenmiştir. Bu yüzden çoklu ilaca karşı direnç mekanizmaları için yenilikçi yaklaşımlar geliştirmek önem arz etmektedir. Çoklu antibiyotik direncine karşı mücadeleye yönelik yeni bir yaklaşım da iki veya daha fazla antimikrobiyal ajanın kombinasyonel olarak kullanılmasıdır (Worthington and Melander 2013; Annunziato 2019; Angst et al. 2021). Sinerjetik etkileriyle iki antimikrobiyal ajanın birlikte kullanımı günümüzde yaygın olup daha fazla çalışılması gereken bir stratejidir. Bu sayede kullanılmayan antibiyotiklerin sinerjetik etkilerinden faydalanılarak antibiyotik direncine karşılık yeniden kullanılması sağlanabilir. Ayrıca etki mekanizması zaten aydınlatılmış ilaçların sinerjetik kullanımı hem kısa sürede klinikte uygulanabilir hem de maliyet açısından yeni bir antimikrobiyal molekülün keşfedilmesinden da az maliyetli olacaktır. Tek molekül tek hedef yerine hücrede birçok farklı mekanizmanın hedeflenmesi tedavi sürecinin de başarı oranını arttıracaktır. Son zamanlarda, geleneksel antibiyotikler ve yeni nesil antibiyotikler olarak adlandırılan AMP'lerin kombinasyonları, enfeksiyonla mücadele için umut verici sonuçlar göstermektedir (Worthington and Melander 2013).

### 1.7. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi

Günümüzdeki sağlık problemlerinin büyük bir kısmı antibiyotik direncinden kaynaklanan enfeksiyonlardan meydana gelmektedir (Cascioferro et al. 2021; Kakoullis et al. 2021). Antibiyotiklerin yanlış kullanımı veya fazla kullanımı bu durumu tetikleyen durumlardan en önemlisidir (Kakoullis et al. 2021). Bu çalışmada odaklanılan *S. aureus* klinik olarak incelenmiş çoklu antibiyotiğe dirençli bakterilerden birisidir (Seethalakshmi

et al. 2020). Bu nedenle, yeni antimikrobiyal moleküllere ve yeni stratejilere olan ihtiyaç artmaktadır.

Günümüzde artan antibiyotik direnci özellikle de biyofilm kaynaklı ise var olan antibiyotiklere karşı oldukça hızlı evrimleşen bir süreçtir. Antibiyotik direncinin genetik temeli mutasyonlar ve hareketli genetik unsurlardır. Mutasyonlar, antibiyotik hedeflerinde değişikliklere, hücre membran geçirgenliğinin azalmasına ve ilaç birikiminin azalmasına neden olur. Mobil genetik elemanlar, bakteriler arasında antibiyotik direnç genlerinin transferine yol açar. Ancak antibiyotik direncinin hızlı evrimleşmesine karşılık olarak yeni antimikrobiyal moleküllerin keşfedilmesi o kadar hızlı değildir ve maliyetli bir süreçtir. Bu açıdan bakıldığında antibiyotik direncine sahip olan mikroorganizmalar ciddi ekonomik kayıplara yol açmasından ziyade çok sayıda ölüme de yol açmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların geliştirdiği stratejilere karşı yeni teknikler bulunmalıdır. Bu çalışmanın amacı kullanımı mümkünse tercih edilmeyen bir antibiyotik olan kloramfenikol ve siproflaksasin ile I. grup bakteriyosin olan nisin AMP'sinin kombinasyon stratejileriyle yeniden kullanılmasının yaygınlaşmasıdır.

### 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sieradzki ve Tomasz (1997) *S. aureus*'ta bulunan  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine karşı direncin baskılanmasında erken hücre duvarı inhibitörlerinin ve bazı antibiyotiklerin kombinasyonlarının sinerjik etkisinin olduğunu bulgulamışlardır. Hem  $\beta$ -laktamaz hem de *mecA* ile ilişkili mekanizmalara sahip olan MRSA suşunda kombinasyon tedavisinin etkinliği analiz edilmiştir. Hücre duvarı sentezinin erken bir basamağıyla ilgili olan *mecA* Tn551 yerleştirme geninin mutant suşlarında metilisinin azalmasını ve bu sayede kombinasyon tedavisinin de başarılı olabileceği gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında kontrol grubu olarak  $\beta$ -laktamaz üretimi olmayan ve *mecI/mecR* düzenleyici gen grubuna sahip olmayan MRSA suşu tercih edilmiştir. Çeşitli antibiyotikler ile erken hücre duvarı inhibitörlerinin birlikte kullanımı yüksek metilisine karşı dirençli hücrelerde direncin azalması ile sonuçlanmıştır. Hücre duvarı sentezinin inhibe edilmesinden kaynaklanan hücre yapı bozuklukları kontrol ile karşılaştırıldığında birbirine yakın sonuçlar doğurmaktadır. Sonuç olarak kombinasyon tedavisi ile yüksek antibiyotik direncine karşılık olarak alternatif olabileceği belirlenmiştir (Sieradzki and Tomasz 1997).

Lomovskaya ve arkadaşları (2001) çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*'da bulunan efflux pompalarının inhibitörlerinin inhibe edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. *P. aeruginosa*, antibiyotik tedavisine sahip oldukları çeşitli mekanizmalardan dolayı oldukça dirençli bir yapıdadır. Bu mekanizmalardan birisi olan efflux pompaları hücrede antibiyotiğin birikmesine engel olmasıyla hücrenin inhibe edilmesine engel olmaktadır. *P. aeruginosa*'da bulunan dört çok bileşenli efflux pompasının tanımlanmasını ve karakterizasyonunu sağladıktan sonra bu yapıların inhibe edilmesi üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Substratları antibiyotik olan efflux pompalarının inhibisyonunda klinik açıdan olumlu yönde gelişmeler gözlemlenmiştir. Efflux pompaları inhibitörleri ile çeşitli antibakteriyel ajanların kombinasyonlarında tedavi için kullanılmalıdır ve bu alanda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır (Lomovskaya et al. 2001).

Petersen ve arkadaşları (2009) Penem  $\beta$ -laktamaz inhibitörü BLI-489 ile piperasilin kombinasyonunun sistemik enfeksiyonunun murin modellerinde etkinliğini analiz etmişlerdir.  $\beta$ -laktamaz üretimi gerçekleştiren organizmaların artması sağlık açısından küresel bir sorun teşkil etmektedir. Literatirden elde edilen bilgiler ışığında *in*

*vivo* çalışma ortamı oluşturmak için akut ölümcül sistemik enfeksiyonlara sahip fareler tercih edilmiştir. Kontrol grubu için enfekte edilen fareler 48 saat içinde tedavi edilmezler ise ölüm ile sonuçlanacaktır. Üç ayrı test için yedi günlük hayatta kalma oranları bilgisayarlı bir analiz sistemi kullanılarak gözlemlenmiştir. Bunlar sırasıyla  $\beta$ -laktamaz inhibitörü çeşitlerini üreten sınıf A, sınıf D ve Sınıf C organizmalardır. Çeşitli oranlarda uygulanan Piperasilin-BLI-489 kombinasyonları *in vivo* olarak test edilmiştir. Tıbbi açıdan tedavi ihtiyacını karşılamak amaçlı geliştirilen penemler, sefalosporinler ve karbapenemler gibi bitakım yeni bileşikler bu çalışmada yeni kombinasyon stratejileriyle *in vivo* deneylerde sınıf A, sınıf D ve sınıf C organizmalar üzerinde etkinlikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen bulgular ticari inhibitörlere göre bir avantaj oluşturmuştur (Petersen et al. 2009).

Rogers ve arkadaşları (2010) konvansiyonel antibiyotikler ve 2-aminoimizadol türevli antibiyofilm ajanları arasındaki sinerjik etkileri araştırmışlardır. Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler biyofilm dışında bulunan bakterilere kıyasla 1000 kattan daha fazla dirençli durumdadır ve bu durum antibiyotik tedavisini engelleyici niteliktedir. Ayrıca patojen bakterilerin birbirleri arasında antibiyotik direnç genlerini aktarması çoklu ilaca dirençli patojen bakterilerin artmasına neden olmaktadır. Biyofilm yapısını inhibe edecek moleküller ile geleneksel antibiyotiklerin kombinasyon halinde kullanımı her iki molekülün ayrı ayrı kullanılmasından daha fazla oranda tedavi edeceğini düşünmüşlerdir. Çeşitli yüksek biyofilm yapma yeteneğine sahip bakterilere biyofilm yapısı oluşturularak kombinasyon tedavisi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu PVC plate içerisinde sinerjetik etkiler gözlemlendikten sonra kristal viyolet raportör testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak konvansiyonel antibiyotiklerle 2-aminoimizadol türevli antibiyofilm ajanları kombinasyon tedavisi sayesinde biyofilm yapısı iyileştirilmiş olup çoklu ilaca dirençli bakterilerin yeniden geleneksel antibiyotiklere dirençli hale gelmiştir. En son olarak elde edilen kombinasyonun hücre kültürlerinde ve model organizmalarda toksik özelliklerinin de olmadığı bulgulanmıştır (Rogers et al. 2010).

Bassetti ve arkadaşları (2011) bu çalışmada çoklu ilaca karşı dirençli bakterilerin günümüzde insan sağlığı açısından en önemli üç sorundan birisi olduğunun belirterek gram negatif (-) bakterilerin artan direncine karşı yeni tedavi seçeneklerinin neler olabileceğini tartışmışlardır. Çalışmada gram negatif bakterilerde bulunan direnç

mekanizmaları hakkında bilgi verildikten sonra antimikrobiyal ajanlar ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. Ayrıca ayrıntılı şekilde açıklanan antimikrobiyal ajanların kombinasyon stratejileriyle etkinliklerinin artacağından ve buna bağlı olarak çoklu ilaca karşı dirençli bakterilerin tedavisinde umut ışığı olduklarından da bahsetmektedir. Bu düşünce yapısını  $\beta$ -laktam ajanı/ $\beta$ -laktamaz inhibitörü kombinasyonu, Seftazidim/ oksapenemlerin kombinasyonu, seftazidim/sefotaksim kombinasyonu gibi birtakım örneklerle de pekiştirmektedir. Gram pozitif olan MRSA'ya karşı beşinci nesil sefalosporinlerin kullanılmasının avantaj sağladığını ancak gram negatif bakterilerde karşı hiçbir avantajının olmadığını da belirtmektedir. En son olarak Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinin zorluluğunu vurgularak bu alanda daha çok çalışmanın yapılmasını teşvik etmektedir (Bassetti et al. 2011).

Page ve arkadaşları (2011) bir sınıf C  $\beta$ -Laktam olan BAL30376 ve çift  $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonu kullanarak *in vitro* ve *in vivo* olarak test etmişlerdir.  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı direncin artması ile yeni alternatiflerin bulunmasını teşvik etmektedir. Literatürden elde edilen bilgiler ışığında klinik olarak  $\beta$ -laktam ile  $\beta$ -laktamaz inhibitörünün kombinasyonunun kullanılmasının yararlı olduğu bildirilmiştir. Klinikte kullanılan çeşitli örnekler ile bu durumun üstüne daha fazla düşülmesi gerektiği vurgulanarak bu çalışmada  $\beta$ -laktam olan BAL30376 ve çift  $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonunu çoklu çift  $\beta$ -laktamaz eksprese eden Gram negatif (-) Basilli'lere karşı analiz edilmiştir. *In vivo* olarak enfekte edilmiş fareler üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışılan organizmaların çoğunda BAL30376'ya karşı kararlı direncin var olduğu belirlendikten sonra zamana ve konsantrasyona bağlı olarak deneyler gerçekleştirilmiştir Antibiyotiğin iki inhibitör kullanılarak çeşitli  $\beta$ -laktamaz eksprese eden organizmalara karşı bakterisidal etkili olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak yeni bir kombinasyon tedavisi ile birçok çoklu ilaca dirençli gram negatif organizmalar için geniş spektruma sahip antibiyotik geliştirilmiştir. *In vivo* deneyler de bu aktiviteyi doğrulamaktadır (Page et al. 2011).

Campbell ve arkadaşları (2012) *S. aureus*'ta bulunan teikoik asit ve peptidoglikan biyosentezlerinin bağlantılı olduklarını sentetik letal bileşiklerin kombinasyonları ile ortaya koymuşlardır. Peptidoglikan yapılı hücre duvarını hedefleyen  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine karşı hücrenin oluşturduğu direnç yüzünden *S. aureus*'lar sağlık

açısından tehdit olmaya başlamıştır. Bu süreçte hücrelerin geliştirmiş olduğu  $\beta$ -laktamazlar  $\beta$ -laktam antibiyotikleri inhibe ettikleri için  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri ile antibiyotiklerin kombinasyonu şeklinde kullanımını yaygınlaştırmışlardır. Ancak özellikle MRSA suşlarında geliştirilen PBP2'nin homoloğu olan PBP2A,  $\beta$ -laktam antibiyotikler tarafından hedeflenemez ve bu nedenle tedavi gerçekleştirilemez. Bu çalışmada hücre duvarını hedefleyen başka alternatiflerin oluşturulması gerektiği vurgulanarak literatürden elde edilen bilgiler ışığında teikoik asit biyosentezine odaklanılması gerektiği belirtilmektedir. Hücre duvarı bileşenlerinden olan teikoik asidin biyosentez mekanizması açıklanarak çeşitli sentetik letal bileşikler ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak teikoik asit sentezine odaklanıldığında çeşitli bileşikler ile maruz bırakılan hücrelerin  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine de duyarlı olduklarını analiz etmişlerdir. Bu durum kombinasyon tedavilerine ışık tutmaktadır (Campbell et al. 2012).

Muhammed ve arkadaşları (2015) metilisine dirençli *Staphylococcus aureus* ve vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarına karşı kurşun tiyazol ile glikopeptid antibiyotiklerinin kombinasyon halindeki aktivitelerini analiz etmişlerdir. Ayrıca bu kombinasyonun antibiyofilm aktivitesini analiz etmek için *Staphylococcus epidermidis* tercih etmişlerdir. Sonuç olarak metilisine dirençli *Staphylococcus aureus* vankomisin ile kurşun tiyazol kombinasyonu sinerjik etkinlik göstermiştir. Vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* 512 kat MIC değerini azaltarak vankomisine karşı yeniden duyarlı hale gelmesini sağlamıştır. Kombinasyon *Staphylococcus epidermidis* biyofilm yapısının da önemli ölçüde küçülterek antibiyofilm aktiviteye sahip olduğunu da kanıtlamıştır (Muhammed et al. 2015).

Rasmussen ve arkadaşları (2017) fenoltiyazin, tioridazinin moleküllerinin metilisine dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı dikloksasilin ile kombinasyonunda sinerjik etkinlik gösterdiğini ve inhibe etmede başarılı olduklarını belirterek vankomisin ara duyarlı *Staphylococcus aureus* ve metilisine dirençli *Staphylococcus epidermidis*'te de bu kombinasyonların sinerjik etkinliğin olup olmadığını araştırmıştır. Sonuç olarak metilisine dirençli *Staphylococcus epidermidis*'te test edilen suşların hiçbirisinde sinerjik etkinlik gözlemlenmezken vankomisin ara duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarından üç tanesinde kombinasyonun sinerjik etkinliği gözlemlenmiştir (Rasmussen et al. 2017).

Peel ve arkadaşları (2019) vankomisin ve sefazolin kombinasyonunu, yüzeysel ya da derin şekilde eklemlerde bulunan enfeksiyonlarda kontrollü bir şekilde analiz etmişlerdir. Eklem değiştirme ameliyatlarında meydana gelen enfeksiyonun artmasına bağlı olarak maliyetli ve tehlikeli olan ameliyat sürecinin fırsatçı patojenlerden steril hale gelmesini sağlamak amacıyla çeşitli metilisine dirençli *Staphylococcus Spp.*'leri gibi gram pozitif bakterilerde çalışmışlardır. Sonuç olarak çeşitli gram pozitif bakterilerde faz 4 çalışmasına kadar elde edilen bulgular analiz edilmiş ve kombinasyon tedavisinin eklem bölgelerinde ameliyattan 90 gün sonrasında bile enfeksiyon kaynaklarının bulunmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Peel et al. 2019).

Angst ve arkadaşları (2021) antibiyotik direncini azaltmak için tedavi stratejilerini *in vitro* epidemiyolojik ortamda karşılaştırmışlardır. Antibiyotik direncindeki hızlı artış yüzünden yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca bu tür stratejiler gerçekçi epidemiyolojik koşullarda test edilemediği için doğru şekilde tedaviler oluşturamamaktadır. Bu çalışmada ortaya atılan bir yaklaşımla olası bir tedavi sürecinin epidemiyolojik bir modeli kullanılarak gerçeğe oldukça yakın bir hastane ortamını simüle edilmektedir. Simüle edilen epidemiyolojik modelde üç farklı tedavi stratejisi belirlenmiştir. İki antibiyotiğin monoterapisi ile kombinasyon tedavisinin kıyaslanması şeklinde deney gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak hastane ortamı simüle edildiğinde kombinasyon tedavisi diğer uygulanan monoterapi stratejilerinden daha iyi bir sonuç ortaya çıkarmıştır. Odaklanılan popülasyonda iki antibiyotiğe de direnç olmadığı sürece kombinasyonel tedavinin olumlu sonuçları umut vericidir. Bu durum kombinasyonda kaynaklanan ilaç dozajının artmasından da kaynaklanmamaktadır. Deneysel olarak ortaya atılan hastane ortamı taklidi ile uygulanan kombinasyonel tedavinin başarısı üzerine çeşitli çalışmalar yapılarak daha fazla kanıt elde edilmelidir (Angst et al. 2021).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları

- Luria-Bertani (LB) Broth ve Agar

**Çizelge 3.1.** LB Agar besiyerinin içeriği

| İçerik   | Miktar                                 |
|----------|----------------------------------------|
| Tripton  | 10 g                                   |
| Maya Özü | 5 g                                    |
| NaCl     | 10 g                                   |
| Agar     | 15 g                                   |
|          | 1 L besiyeri için <b>Toplam</b> = 40 g |

LB agar besiyeri, standart bir bakteri besiyeridir. 850 ml saf su içerisine ticari olarak satın alınmış besiyerinden 40 g tartılıp toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak çözdürülmüştür. Homojen bir çözelti haline getirdikten sonra Otoklav yardımıyla 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir. Yaklaşık 50-60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, standart petri kaplarına dökülmüştür.

LB broth besiyeri, LB agar besiyerinin içeriğinde agar olmayan sıvı besiyeridir. 850 ml saf su içerisine ticari olarak satın alınmış besiyerinden 25 g tartılıp toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak çözdürülmüştür. Homojen bir çözelti haline getirdikten sonra otoklav yardımıyla 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir.

- Muller Hiltone Agar (MHA) ve Broth (MHB)

**Çizelge 3.2.** MHA besiyerinin içeriği

| İçerik      | Miktar                                |
|-------------|---------------------------------------|
| Kazein      | 17,5 g                                |
| Sığır özütü | 2 g                                   |
| Nişasta     | 1,5                                   |
| Agar        | 15 g                                  |
|             | 1 L besiyeri için <b>Toplam= 36 g</b> |

MHA, mikrobiyolojik analizlerde kullanıma uygun standart bir besiyeridir. 850 ml saf su içerisine ticari olarak satın alınmış besiyerinden 36 g tartılıp toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak çözdürülmüştür. Homojen bir çözelti haline getirdikten sonra otoklav yardımıyla 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir. Yaklaşık 50-60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, standart petri kaplarına dökülmüştür.

MHB besiyeri, MHA besiyerinin içeriğinde agar olmayan sıvı besiyeridir. “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) tarafından Minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlenmesi için önerilen besiyeridir. 850 ml saf su içerisine ticari olarak satın alınmış besiyerinden 26,5 g tartılıp toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak çözdürülmüştür. Homojen bir çözelti haline getirdikten sonra otoklav yardımıyla 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir.

#### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar Erzurum Teknik Üniversitesi YÜTAM Laboratuvarlarında bulunmaktadır. Cihazların işlevleri ve markaları çizelge 3.3'de belirtirmiştir.

**Çizelge 3.3.** Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi.

| Cihaz İşlevi          | Markası                                   |
|-----------------------|-------------------------------------------|
| +4 Soğutucu           | J.P. Selecta                              |
| -20 Soğutucu          | J.P. Selecta Upright freezers “Templow” S |
| Otoklav               | HMC, HIRAYAMA HV-50L                      |
| Steril Laminar kabin  | ESCO NordicSafe™                          |
| Santrifüj             | Wisd Microcentrifuge CF-10                |
| İnkübatör             | Memmert IN110                             |
| Çalkalayıcı İnkübatör | Zhicheng-ZHWY-2102C                       |
| Spektrofotometre      | Multiskan Go                              |
| PCR Cihazı            | Qiagen Rotor-Gene                         |
| pH Metre              | OHAUS Corporation                         |

#### 3.1.3. Sarf malzemeleri

Bu tezde kullanılan sarf malzemeleri Sigma Aldrich'ten (St. Louis, MO), Merck & Co. (Rahway, NJ) ve Invitrogen'den, (San Diego, CA) satın alınmıştır.

#### 3.1.4. Kullanılan solüsyonlar ve antibiyotikler

%0,5'lik kristal viyole çözeltisi için granül halindeki kristal viyole (CV) boyasından 0,25 g olarak tartılmış ve 35 mL %96'lık etil alkolde çözölmüştür. Üzerine 15 ml saf su eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

%0,1'lik dietil pirokarbonatlı (DEPC) su hazırlamak için 1 mL DEPC alınır ve 999 mL distile su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak çözödürölür. Çözelti hazırlandıktan sonra kullanım için 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır.

%30'luk asetik asit çözeltisi için 70 mL saf suyun üzerine yavaş yavaş olacak şekilde %99,9'luk asetik asitten 30 mL ilave edilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

%0,05'lik asetik asit çözeltisi için 9,995 ml saf suyun üzerine yavaş yavaş olacak şekilde %99,9'luk asetik asitten 5 µL ilave edilmiştir.

500 ml PBS tamponu hazırlamak için 4 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,72 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gereklidir. Beher içerisine 450 mL distile su ve manyetik balık eklenir. Sırasıyla NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılarak beher içerisine ilave edildi. Manyetik karıştırıcı ile iyice çözününceye kadar karıştırıldı. Homojen bir görüntü elde edildikten sonra çözelti distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

%2,5'lik nisin AMP çözeltisi hazırlamak için 400 mg nisin tartılıp 1 ml %0,05'lik asetik asit çözeltisi içinde çözdürüldü. Bu sayede 10 mg/mL Nisin çözeltisi elde edildi.

%100'lük kloramfenikol antibiyotik çözeltisi hazırlamak için 10 mg kloramfenikol tartılıp 1 ml %99,9'luk EtOH de çözdürüldü. Bu sayede 10 mg/mL kloramfenikol çözeltisi elde edildi.

%100'lük siprofloksasin antibiyotik çözeltisi hazırlamak için 10 mg siprofloksasin tartılıp 1 ml saf su (dH<sub>2</sub>O) içinde çözdürüldü. Bu sayede 10 mg/mL siprofloksasin çözeltisi elde edildi.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. *S. aureus*'un hazırlanması

Laboratuvar çalışmalarının gerçekleştirilmesi için deneyde kullanılacak olan *S. aureus* ATCC 6538 suşu frozen stoktan alındı ve LB agar besiyerine ekimi gerçekleştirildi. Ardından LB broth besiyerinde çalkalayıcı inkübatörde geliştirildi. *S. aureus* 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

##### 3.2.2. Disk difüzyon testi

Gece boyu inkübe edilmiş *S. aureus* ATCC 6538 suşu disk difüzyon deneyi için inkübasyondan alındı. 0,5 McFarland standardında 600 nm (OD<sub>600</sub>) ölçüm yapılarak hücre yoğunluğu ayarlanan bakteri MHA besiyeri üzerine yayma ekim yapılarak tüm plate üzerine yayıldı. Yayılan hücreler üzerine petri üzerinde işaretlenmiş kısımlara farklı (8; 16; 32; 64; 128 ug/mL) konsantrasyonda kloramfenikol ve nisin emdirilmiş diskler steril bir penset yardımıyla yerleştirildi. Sonuçların gözlemlenmesi için 24 saat 37 °C'de statik inkübasyona bırakıldı.

##### 3.2.3. Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) testi

MIC testi, besiyerinde bulunan hücrelerin gelişimini inhibe edici doza sahip olan maddenin miktarının belirlenmesinde rol oynayan bir testtir. MIC değerlerinin belirlenmesi (EUCAST) protokolleri ile gerçekleştirilmiştir (<http://www.eucast.org/>). Nisin ve klorafenikol için MIC değerleri, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir (Andrews 2001). 0,5 McFarland standardında hücre yoğunluğu kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda siprofloksasin (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 µg/mL), nisin ve kloramfenikol (0; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128 µg/mL) olan 100 µL bakteri kültürü 96 kuyucuklu well plate kuyucuklarına eklendi. 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra Epoch (Biotek Inc. Santa Clara, CA) kullanılarak 600nm (OD<sub>600</sub>) spektrofotometri ile hücre gelişiminin olmadığı kuyucuklar belirlendi.

#### 3.2.4. Kristal violet (CV) testi

CV testi biyofilm yapmış hücrelerin boyanarak gözlemlenmesini sağlayan bir testtir. 0,5 McFarland standardında MHB besiyerinde 100 µL bakteri kültürü 96 kuyucuklu plakların kuyucuklarına eklendi. Sonrasında artan konsantrasyonlarında siprofloksasin (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 µg/mL), kloramfenikol ve nisin (2; 4; 8; 16; 32; 64; 128 µg/mL) çözeltileri kuyucuklara eklendi. Plate 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kuyucuklara yapışmayan bakteri hücreleri uzaklaştırıldı ve plate üç kez PBS ile yıkandı. Kuyucuklar daha sonra %0,5'lik CV çözeltisi ile 20 dakika boyamaya tabi tutuldu ve 20 dakikanın sonunda her bir kuyucuk PBS ile yıkandı. Son olarak her kuyucuk %30 asetik asit çözeltisi ile sabitlendi. Spektrofotometre 590 nm'de (OD<sub>590</sub>) ölçüm alınarak görüntülendi (Shukla et al. 2017). Ayrıca ½ MIC konsantrasyonunda antibiyotik uygulaması ile ışık mikroskobu görüntüleri alındı.

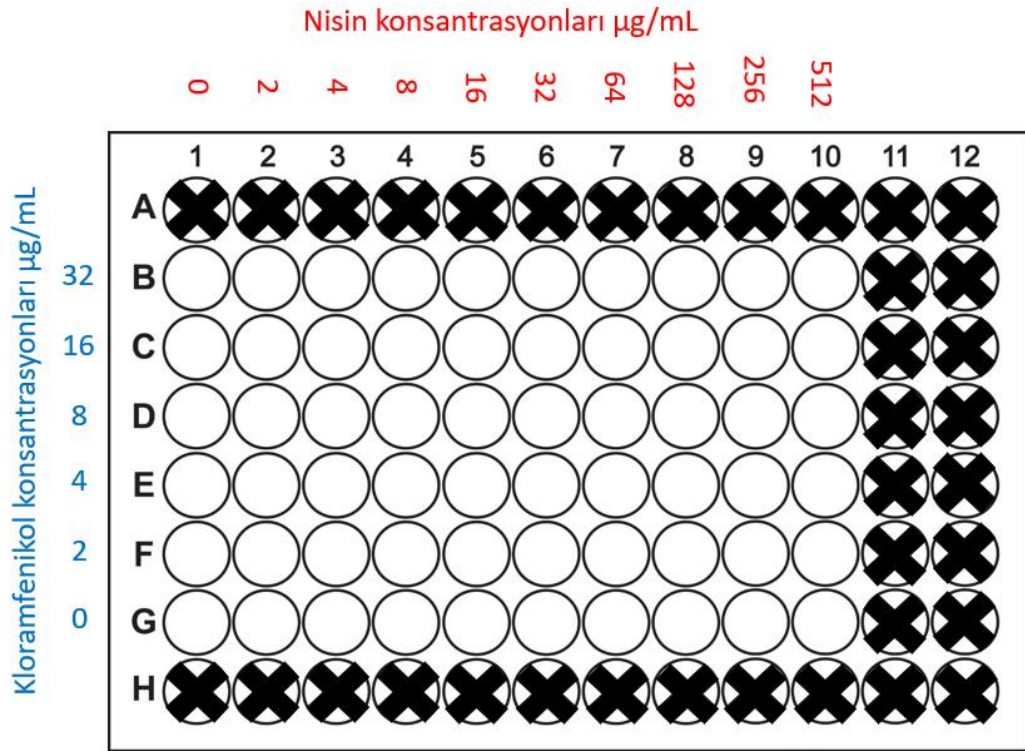
#### 3.2.5. Checkerboard (Dama Tahtası) testi

Checkerboard testi, *S. aureus* ATCC 6538'e karşı kloramfenikol ve siprofloksasin ile nisin antimikrobiyalleri arasında sinerjik olup olmadığını test etmek için kullanıldı (Nagarajan et al. 2019). Kloramfenikol (0; 2; 4; 8; 16; 32 µg/mL) ile nisin (0; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 µg/mL), siprofloksasin (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 µg/mL) ile nisin (0; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 µg/mL) çözeltileri yatay ve dikey yönde artan konsantrasyonlarda iki ayrı 96 kuyucuklu plakların kuyucuklarına eklendi. Plak üzerindeki her kuyucuğa 100 µL 0.5 McFarland standardına ayarlanmış bakteri ilave edildi. Toplam hacim 200 µL'ye MHB besiyeri ile tamamlandı. Plaklar statik durumda 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, elde edilen sonuçlar ve fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FIC) değeri aşağıdaki indekslerine göre hesaplandı:

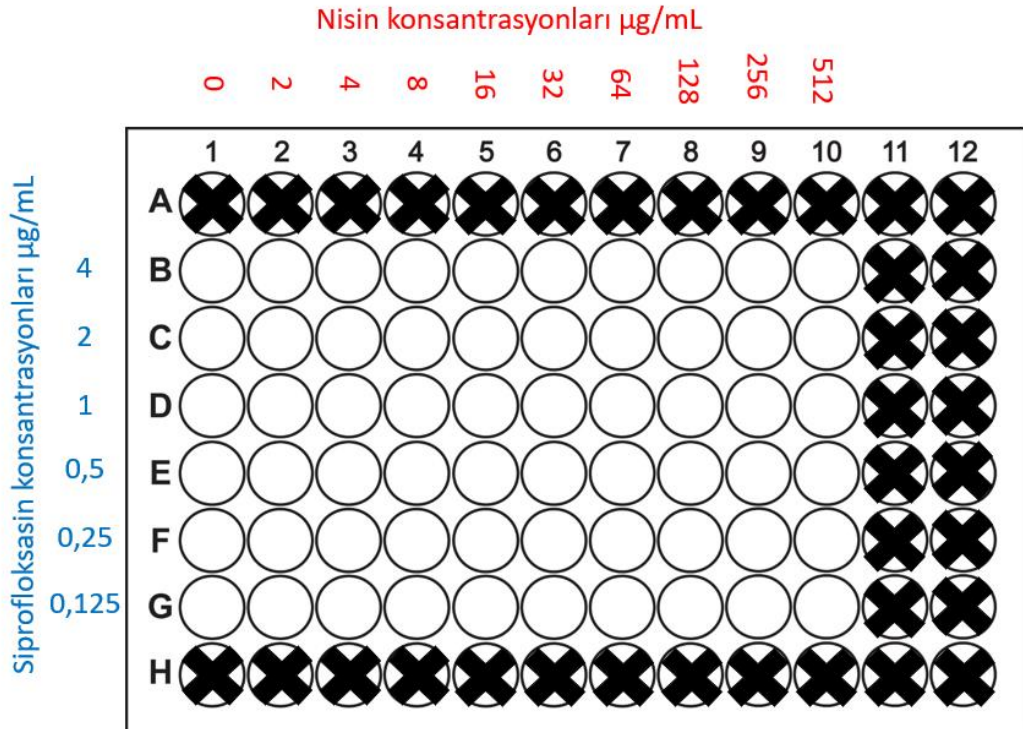
$$\Sigma \text{ FIC} = (\text{FIC}(\text{Nisin}) + \text{FIC}(\text{Kloramfenikol})) \quad (3.1)$$

$$\text{FIC}(\text{Nisin}) = \frac{\text{Kombinasyon durumunda Nisin'in MIC değeri}}{\text{Ten başına Nisin'in MIC değeri}} \quad (3.2)$$

$$\text{FIC(Kloramfenikol)} = \frac{\text{Kombinasyon durumunda Kloramfenikol'ün MIC değeri}}{\text{Ten başına Kloramfenikol'ün MIC değeri}} \quad (3.3)$$



Şekil 3.1. Nisin ve kloramfenikol checkerboard testi well plate dizaynı



Şekil 3.2. Nisin ve siprofloksasin checkerboard testi well plate dizaynı

Checkerboard testi, 2 farklı antimikrobiyal molekülün kombinasyonel olarak uygun olup olmadığını gösteren bir test türüdür. Kombinasyonel olarak uygulanan antimikrobiyal moleküllerin bir aradayken sinerjik etki yapıp yapmadığını belirlemek için yapılır. Checkerboard testinden elde edilen kombinasyon MIC değerleri formül 3.1, 3.2 ve 3.3 kullanılarak kloramfenikol ve nisin moleküllerinin sinerjik etkileri analiz edildi.

#### 3.2.6. Koloni biyofilm testi

Koloni biyofilm testi, biyofilm oluşturmuş hücrelerin biyofilm yapısının besiyeri yerine bir membran üzerine yapmasını ve bu sayede diğer çalışmalar için kullanılmasını sağlayan bir testtir. Koloni biyofilm testi için, steril polikarbonat membranlar (Poretics 25 mm çaplı siya polikarbonat membranlar, gözenek boyutu 0,22  $\mu\text{m}$ , GE) otoklavdan sonra antibiyotik eklenen ve antibiyotik eklenmeyen besiyerlerini içeren petri kaplarına yerleştirildi. 0,5 McFarland hücre yoğunluğuna ayarlanan bakteriden 10  $\mu\text{L}$  membranların merkez noktasına ekildi. 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında membranlar yeni petrilere steril penset yardımıyla aktarılarak tekrar 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Toplamda 48 saat 37°C'de statik olarak inkübasyona bırakıldı (Merritt et al. 2011).

#### 3.2.7. RNA izolasyonu ve cDNA eldesi

Koloni biyofilm testinden elde edilen biyofilm gerçekleştirmiş hücreler toplam RNA izolasyonu yapılması için membranlardan falkon tüplerine alındı. TRIzol reaktifi (Invitrogen, San Diego, CA) ile üreticinin yönergeleri izlenerek izole edildi. Toplam RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı, Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, ABD) kullanılarak spektrofotometre ile belirlendi. Bütün örnek RNA'lar 300 ng olacak şekilde Yüksek Kapasiteli cDNA Reverse Transkripsiyon Kiti (Applied Biosystems™) kullanılarak cDNA elde edildi.

**Çizelge 3.4.** cDNA Reverse Transkripsiyon kiti içeriği

| İçerik               | Miktar                    |
|----------------------|---------------------------|
| dH <sub>2</sub> O    | 12,8 µl                   |
| RNAaz inhibitörü     | 4 µl                      |
| 10x RT Buffer        | 8 µl                      |
| dNTP Mix             | 3,2 µl                    |
| Random Primer        | 8 µl                      |
| Reverse transkriptaz | 4 µl                      |
|                      | 4 tüp için Toplam = 40 µl |

#### 3.2.8. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) uygulaması

Antibiyotik ve kombinasyonlarının etkilerini kantitatif olarak analiz edebilmek için elde edilen cDNA’lardan Real-Time PCR gerçekleştirmek gerekir. Bu çalışma kapsamında belirlenmiş olan genlerin (*agrA*, *icaA*, *saeR* ve *spa*) ekspresyon seviyeleri içeriği Çizelge 3.5’te verilen “HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus” (Solis BioDyne, Estonya) kullanılarak qRT-PCR ile değerlendirildi.

Çizelge 3.6.’da belirtilen primerler, Primer3 programı (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) kullanılarak tasarlandı. Kontrol grubu olarak DNA girazın alt birimi B’yi kodlayan *GyrB* geni, housekeeping gen olduğundan tercih edilmiştir. Reaksiyonlar, standart parametreler ile Çizelge 3.7’de bulunan program kullanılarak Rotor-Gene (Qiagen, Düsseldorf, Almanya) ile gerçekleştirildi. Genlerin ekspresyon seviyeleri  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$  yöntemi kullanılarak belirlendi.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

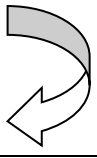
**Çizelge 3.5.** HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix plus içeriği

| İçerik                       | Miktar                |
|------------------------------|-----------------------|
| 5x Master Mix (EvaGreen®)    | 2 µl                  |
| Forward ve Reverse Primerler | 2 x 0,2 µl            |
| İzole edilen mRNA'lar        | 2 µl                  |
| dH <sub>2</sub> O            | 5,6 µl                |
|                              | <b>Toplam = 10 µl</b> |

**Çizelge 3.6.** qRT-PCR için tasarlanmış olan primerler

| Genler      | Forward Primer              | Reverse Primer              |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>IcaA</i> | 5'-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3'  | 5'-TCTGGAACCAACATCCAACA-3'  |
| <i>SaeR</i> | 5'-GTAACAACGACAAGTAGCGGT-3' | 5'-CGAGTTCCCTTGACTAAATGG-3' |
| <i>Spa</i>  | 5'-GCGTAACACCTGCTGCAAAT-3'  | 5'-AGAAGGCGCTTTGTTGATCT-3'  |
| <i>AgrA</i> | 5'-CCTATGGAAATTGCCCTCGC-3'  | 5'-CCAAGTGGGTCATGCTTACG-3'  |
| <i>GyrB</i> | 5'-ATATTGCACAGCCACCGTTG-3'  | 5'-CCGCTTCAATCGCATCTTCA-3'  |

**Çizelge 3.7.** qRT-PCR programı

| PCR Döngüleri | Zaman     | Döngü sayısı                                                                                   |
|---------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 95 °C         | 12 dakika | Tek döngü                                                                                      |
| 95 °C         | 15 saniye |  40 Döngü |
| 60 °C         | 20 saniye |                                                                                                |
| 72 °C         | 20 saniye |                                                                                                |
| 4 °C          | ∞         |                                                                                                |

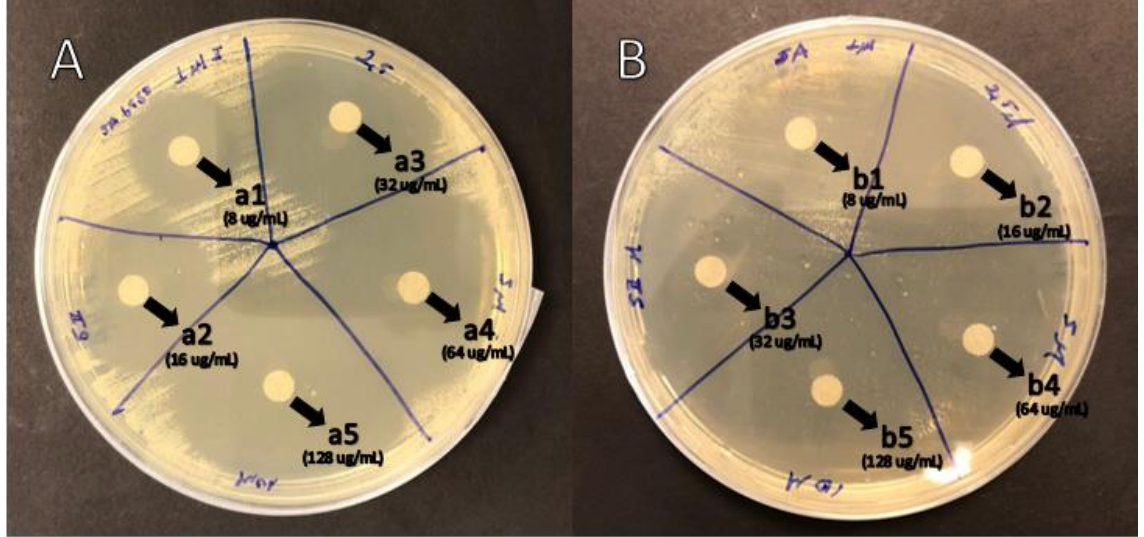
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1. *S. aureus*'un Hazırlanması ve Disk Difüzyon Testi

Frozen stokta bekletilen *S. aureus* ATCC 6538'in hazırlanması günümüzde standart haline gelmiş bir yöntem olan sıvı besiyerinde çalkalayıcı inkübatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Disk difüzyon testi laboratuvarlarda sıklıkla tercih edilen bir testtir ve mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılığını belirleyen yöntemlerden birisidir. Kirby-Bauer tarafından geliştirilen bu test ucuz ve laboratuvarda uygulanması basit bir test olmasıyla çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Steril disklere emdirilen antibiyotiğin besiyerine difüze olması prensibine dayanmaktadır. Besiyerine difüze olmuş antibiyotikli ortamda mikroorganizmanın gelişmemesi ile elde edilen zon yapısı standart haline gelmiş zon tablolarıyla da kıyaslanabilir (Lee and Komarmy 1976). Ancak bu çalışmada gerçekleştirilecek diğer testlerin destekleyici verisi olarak tercih edilmiştir.

24 saatlik inkübasyon sonunda disk difüzyon testi için inkübasyondan alınan *S. aureus* ATCC 6538, spektrofotometre cihazı kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Hücre yoğunluğu istenilen şekilde 0,5 McFarland'a ayarlandığında MHA besiyerine steril hale getirilen laminar kabin içerisinde yayma ekim yapılarak tüm plate üzerine yayılmıştır. Daha önceden hazırlanıp -20 °C'de bekletilen kloramfenikol antibiyotiği ve nisin AMP'si farklı konsantrasyonlarda (a1,b1: 8; a2,b2: 16; a3,b3: 32; a4,b4: 64; a5,b5: 128 ug/mL) steril disklere emdirilerek petri üzerinde işaretlenmiş kısımlara steril bir penset yardımıyla yerleştirilmiştir. Sonuçların gözlemlenmesi için 24 saat 37 °C'de statik inkübasyona bırakılmıştır. Kloramfenikol antibiyotiği ve nisin AMP'si ile ilgili elde edilen sonuçların görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlarda nisin (A) ve kloramfenikol (B) moleküllerinin disk difüzyon testi Sonuçları.

Sonuç olarak *S. aureus* ATCC 6538 tercih edilen bu iki antimikrobiyal molekül ile duyarlıdır. Her iki molekül için de MIC testinde elde edilen değerlerin çok üstünde (A, kloramfenikol için 64, 128 µg/mL; B, nisin için 128 µg/mL) konsantrasyonların kullanılmasının yüksek derecede inhibe edici oldukları gözlemlenmiştir. Bunun dışında MIC testinde elde edilen bulgular ile uyumluluk göstermektedir.

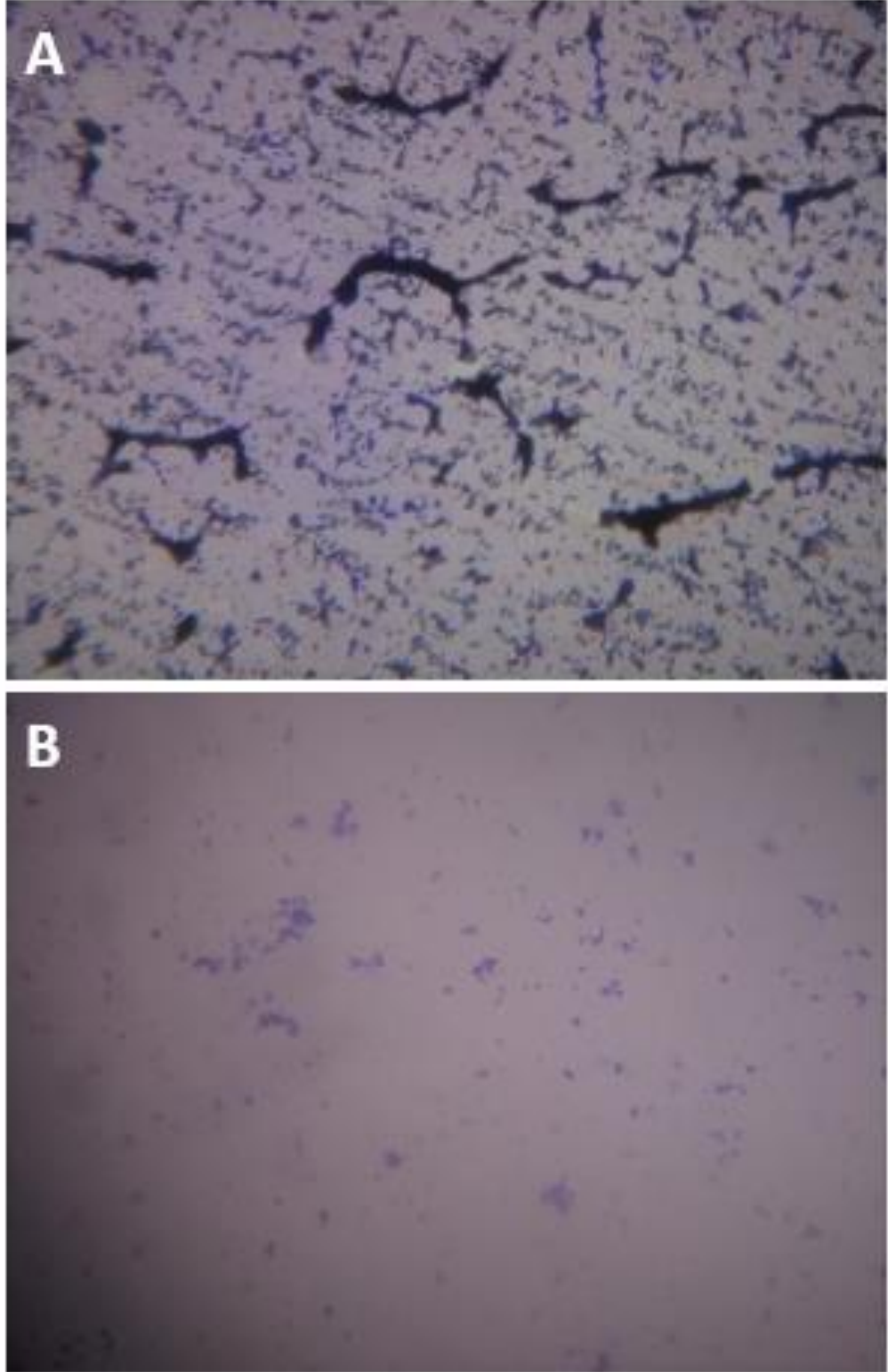
#### 4.2. Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitesi

Siprofloksasin, kloramfenikol ve nisin moleküllerinin antimikrobiyal aktiviteleri MIC testi ile antibiyofilm aktiviteleri CV testi kullanılarak analiz edilmiştir. MIC testi, mikroorganizmayı inhibe edici madde miktarının belirlendiği bir testtir. Antimikrobiyal aktivitenin test edilmesi ve kloramfenikol ile nisin moleküllerinin MIC değerlerinin elde edilmesi için EUCAST protokollerinden yararlanılmıştır (<http://www.eucast.org/>). Kloramfenikol ve nisin için MIC değerleri broth mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. MHB besiyerine ekilip inkübasyondan alınan *S. aureus* ATCC 6538, spektrofotometre cihazı kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır ve 0,5 McFarland standardında hücre yoğunluğuna ayarlanmıştır. Sırasıyla farklı konsantrasyonlarda siprofloksasin (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 µg/mL), nisin ve kloramfenikol (0; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128 µg/mL) eklenmiş 96 kuyulu plağın kuyucuklarına 100 µL bakteri kültürü eklenerek toplam hacim kullanılan besiyeri MHB

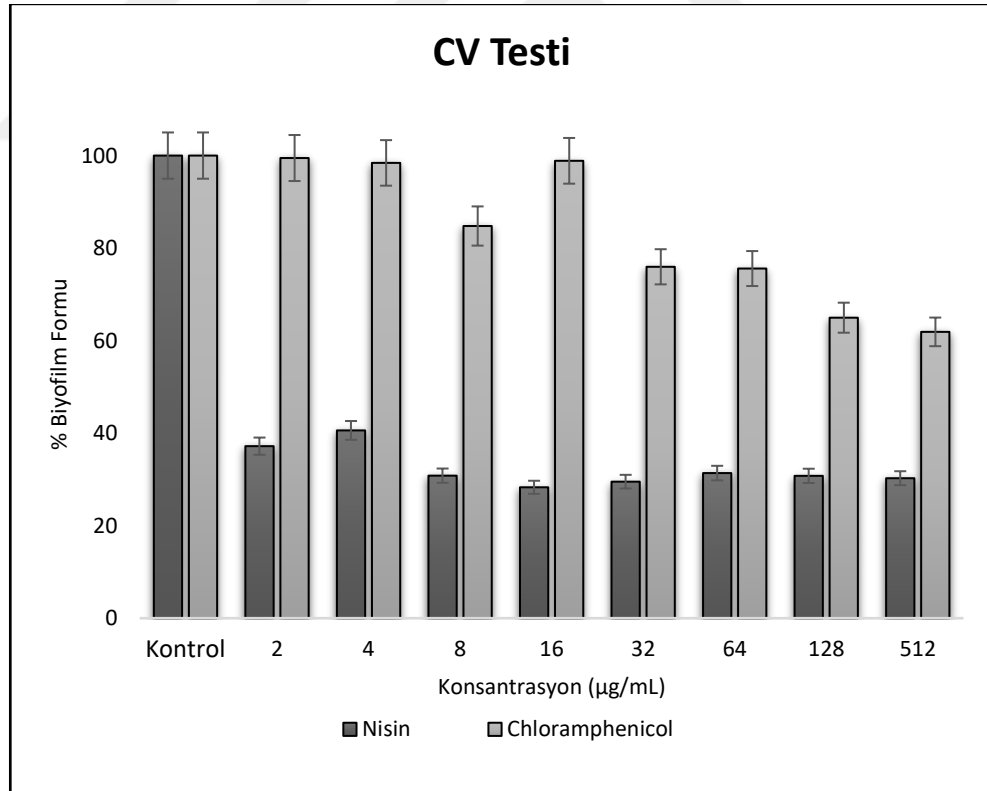
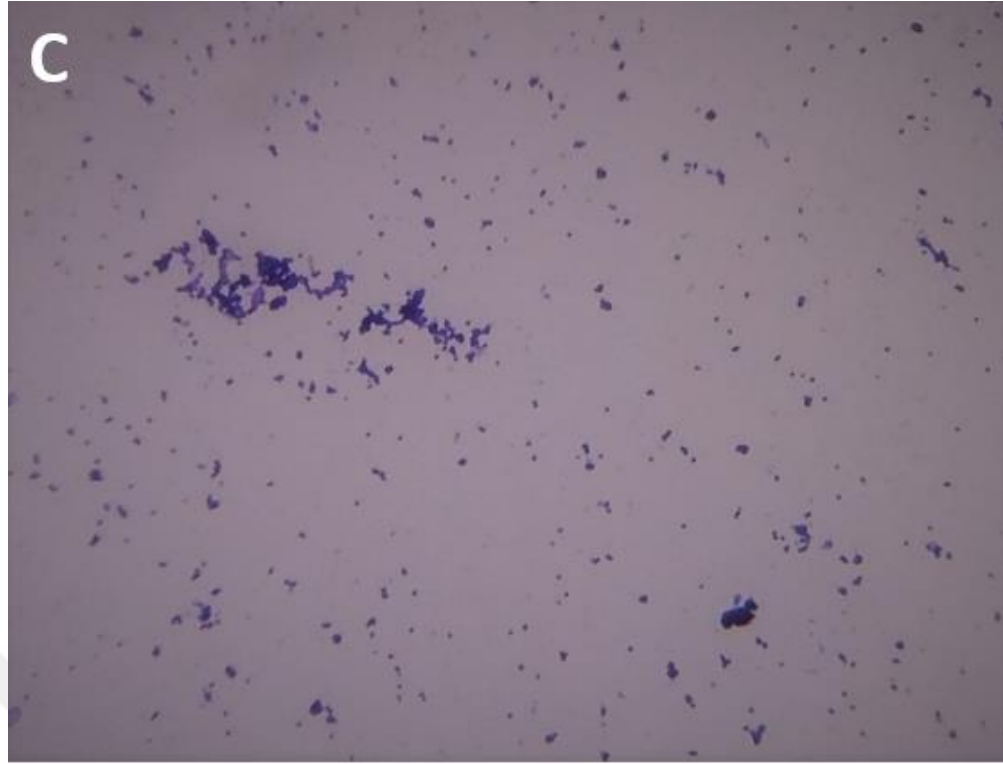
ile 200 µL'ye tamamlanmıştır. 24 saat 37 °C'de statik inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçların gözlemlenmesi için 600 nm (OD<sub>600</sub>) dalga boyunda ölçüm alınması için spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Sonuç olarak siprofloksasin, kloramfenikol ve nisin moleküllerinin MIC değerleri kontrol grubuyla karşılaştırılarak sırasıyla 0,25 µg/mL, 32 µg/mL ve >64 µg/mL olarak belirlenmiştir. *S. aureus*'a karşı kloramfenikol nisinden daha fazla antimikrobiyal etkiye sahiptir. Siprofloksasin ise diğer iki molekülden de oldukça fazla antimikrobiyal etkinliğe sahiptir.

Siprofloksasin, kloramfenikol ve nisin moleküllerinin antibiyofilm aktiviteleri CV testi kullanılarak analiz edilmiştir. CV testi biyofilm yapmış hücrelerin boyanarak gözlemlenmesini sağlayan bir testtir. 24 saat MHB besiyerinde inkübe edilmiş *S. aureus* ATCC 6538, 0,5 McFarland standardına ayarlanarak 96 kuyucuklu well plate kuyucuklarının her birisine 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. Artan konsantrasyonlarda siprofloksasin (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 µg/mL), kloramfenikol ve nisin (2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 512 µg/mL) molekülleri hücrelerin olduğu kuyucuklara ilave edilmiştir. Toplam hacim kuyucuk başına 200 µL'ye MHB besiyeri ile tamamlanmıştır ve plak 48 saat 37°C'de statik inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreçte hücrelerin biyofilm yapısı meydana getirmesi sağlanmıştır. Inkübasyondan sonra kuyucuklarda biyofilm yapısı gözlemlenmiştir. Planktonik hücreler olarak da adlandırılan yüzeye yapışmayan hücreler sonucun olumsuz etkilenmemesi için uzaklaştırılmalıdır. Bu yüzden kuyucuklara yapışmayan bakterilerin uzaklaştırılması için üç kere PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra %0,5'lik CV çözeltisi kullanılarak 20 dakika boyunca hücreler boyanmıştır. 20 dakikanın sonunda her bir kuyucuk PBS ile yıkanmıştır. Son olarak her kuyucuk %30 asetik asit çözeltisi ile sabitlenmiştir. Blank ayarlanıp spektrofotometre kullanılarak 590 nm (OD<sub>590</sub>) dalga boyunda ölçüm alınarak analiz edilmiştir (Shukla et al. 2017). Ayrıca ½ MIC konsantrasyonunda antibiyotik tedavisi ile maruz bırakılan kuyucuktan elde edilen hücreler ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. Sonuçlar ve ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** CV testi kloramfenikol 16 µg/mL (A), nisin 32 µg/mL (B), siprofloksasin 0,125 µg/mL (C) konsantrasyonlarındaki ışık mikroskobu görüntüleri ve spektrofotometre sonuç grafiği

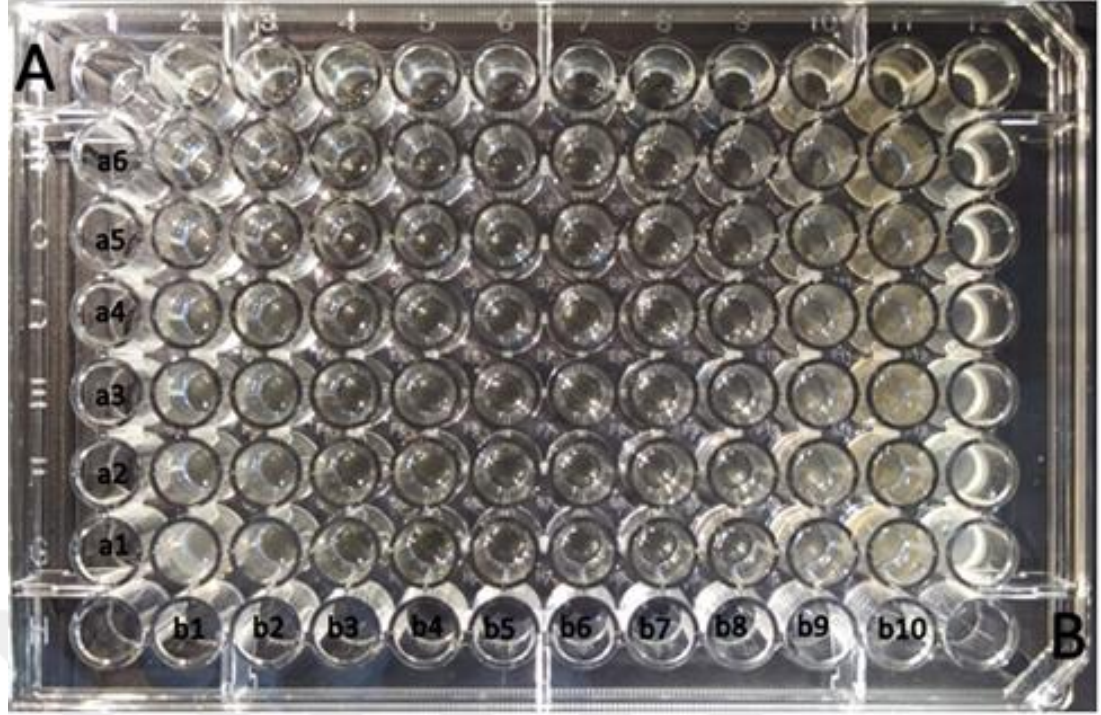


**Şekil 4.2.** CV testi kloramfenikol 16  $\mu\text{g/mL}$  (A), nisin 32  $\mu\text{g/mL}$  (B), siprofloksasin 0,125  $\mu\text{g/mL}$  (C) konsantrasyonlarındaki ışık mikroskobu görüntüleri ve spektrofotometre sonuç grafiği (devam)

Sonuç olarak Şekil 4.2’de bulunan grafiğe göre kontrol grubuna kıyasla hem kloramfenikol hem de nisin artan konsantrasyonlarda biyofilm yapısının inhibe edilmesini sağlamıştır. Elde edilen bulgular ışığında nisin, kloramfenikole kıyasla biyofilm yapısının inhibe edilmesinde daha başarılıdır. Literatürde antibiyofilm peptit olarak belirtilmesindeki sebep de biyofilm yapısı üzerine etkili olmasındandır. Özellikle kloramfenikol 16 µg/mL üstü konsantrasyonlarda biyofilmin inhibesinde daha etkili olurken 16 µg/mL dahil alt konsantrasyonlarda hiç etkili olamamıştır. Ancak nisin, bütün konsantrasyonlarda birbirine yakın seviyelerde biyofilm inhibesini sağlamıştır. Bu durum iki molekülün hedeflediği yapı ile alakalı olabilir. Nisinin MIC değeri konsantrasyonu olan >64 µg/mL baz alındığında ölçülen biyofilm yapısı oranı kontrole kıyasla nisin için %31,37 iken kloramfenikolda %75,58 şeklindeydi. Kloramfenikolün MIC değeri konsantrasyonu olan 32 µg/mL baz alındığında ölçülen biyofilm yapısı oranı kontrole kıyasla nisin için %29,51 iken kloramfenikolda %75,96 şeklindeydi. Ayrıca Şekil 4.2’de, ½ MIC konsantrasyonunda kuyucuklardan izole edilen hücreler (A, B, C) ışık mikroskopunda 400 kat yakınlaştırma oranında elde edilen görüntüleri verilmiştir.

#### 4.3. Checkerboard Testi

Checkerboard testi iki antibiyotiğin kombinasyon olarak kullanıldığında *in vitro* etkisini analiz etmemize yarayan bir testtir. Uygulanmasının ve sonuçların yorumlanmasının kolay olması nedeniyle laboratuvarlarda sıklıkla tercih edilmektedir. Kloramfenikol ve nisin moleküllerinin *S. aureus* ATCC 6538’e karşı arasında sinerjik bir etkinin olup olmadığını test etmek için kullanılmıştır (Nagarajan et al. 2019). 96 kuyucuklu well plate kuyucuklarına yatay ve dikey yönde sırasıyla nisin (0; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 µg/mL) ile kloramfenikol (0; 2; 4; 8; 16; 32 µg/mL), siprofloksasin (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 µg/mL) ile nisin (0; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 µg/mL) martan konsantrasyonlarda eklenmiştir. Plate üzerindeki her kuyucuğa MHB besiyerinde 100 µL 0.5 McFarland standardına ayarlanmış *S. aureus* ilave edilmiştir. Toplam hacim MHB besiyeri ile 200 µL’ye tamamlanmıştır. Plate 24 saat 37°C’de statik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra elde edilen plak görüntüsü Şekil 4.3’te verilmiştir. Bir blank ayarlanıp spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Spektrofotometri ölçümünden elde edilen MIC değerleri FIC değerinin belirlenmesi amacıyla formül 3.1, 3.2 ve 3.3’te kullanılmıştır.



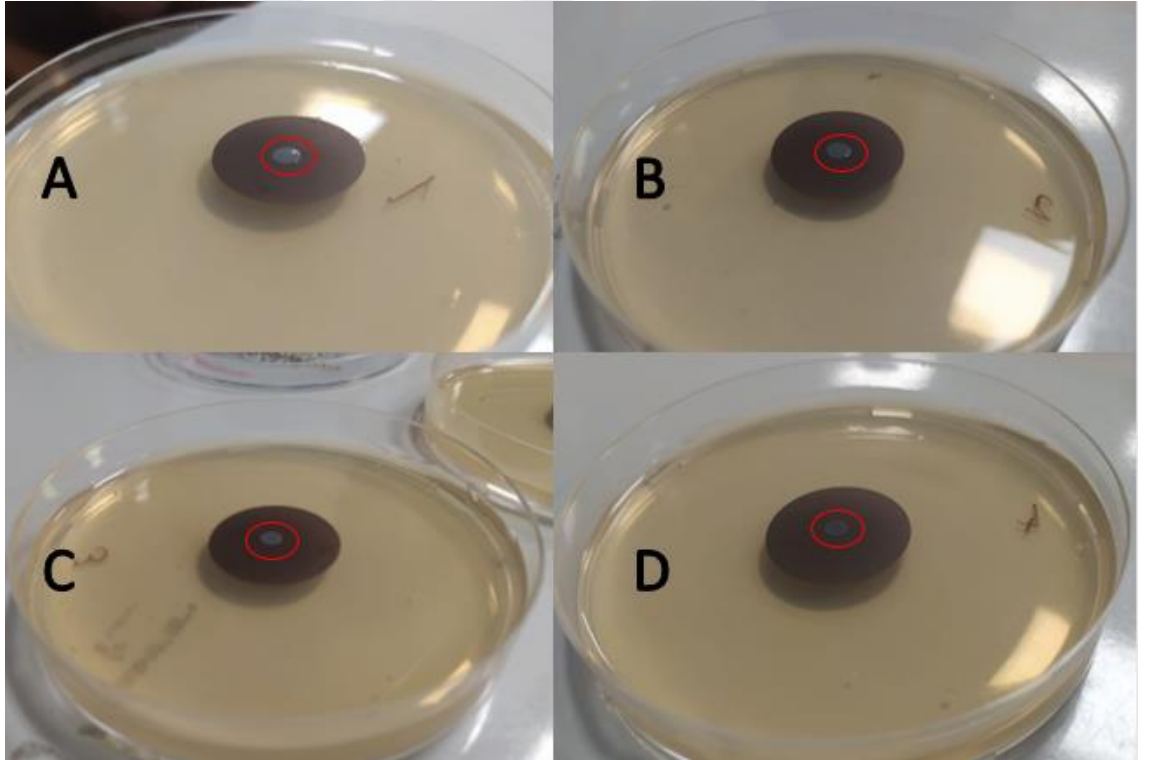
**Şekil 4.3.** Checkerboard testi plate görüntüsü (Dikey yönde A: Kloramfenikol, Yatay yönde B: Nisin)

Spektrofotometre sonucuna göre kloramfenikolün MIC değeri kombinasyon halinde iken 8 µg/mL (a4), nisinin MIC değeri kombinasyon halinde iken 5 µg/mL (b3-b4) olarak analiz edilmiştir. MIC değerlerine göre hesaplanan FIC indeksi 0,32'dir ve bu durum 0,5'ten küçük FIC indeksi ( $\Sigma FIC < 0,5$ ) olduğunu dolayısıyla iki antimikrobiyal arasında sinerjistik bir etkileşimin olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak *S. aureus* ATCC 6538'e karşı kloramfenikol ve nisin kombinasyon tedavisi sinerjik bir etki göstermiştir. Ancak siprofloksasin ile nisin kombinasyonunda, siprofloksasinin MIC değeri 0,25 iken nisinin MIC değeri 128 olarak analiz edilmiştir. Hesaplanan FIC indeksi 3 olduğu için 0,5 ile 4 arası FIC indeksi ( $0,5 < \Sigma FIC < 4$ ) iki antimikrobiyal arasında bir etkileşimin olmadığını göstermektedir. Bu kombinasyon tedaviye uygun değildir.

Gen ifadesinin analizi için kloramfenikol ile nisin kombinasyonu tercih edilirken siprofloksasin ile nisin kombinasyonu herhangi bir etkileşime sahip olmadığı sonucu elde edildiği için tercih edilmemiştir.

##### 4.4. Gen İfadesi Analizi

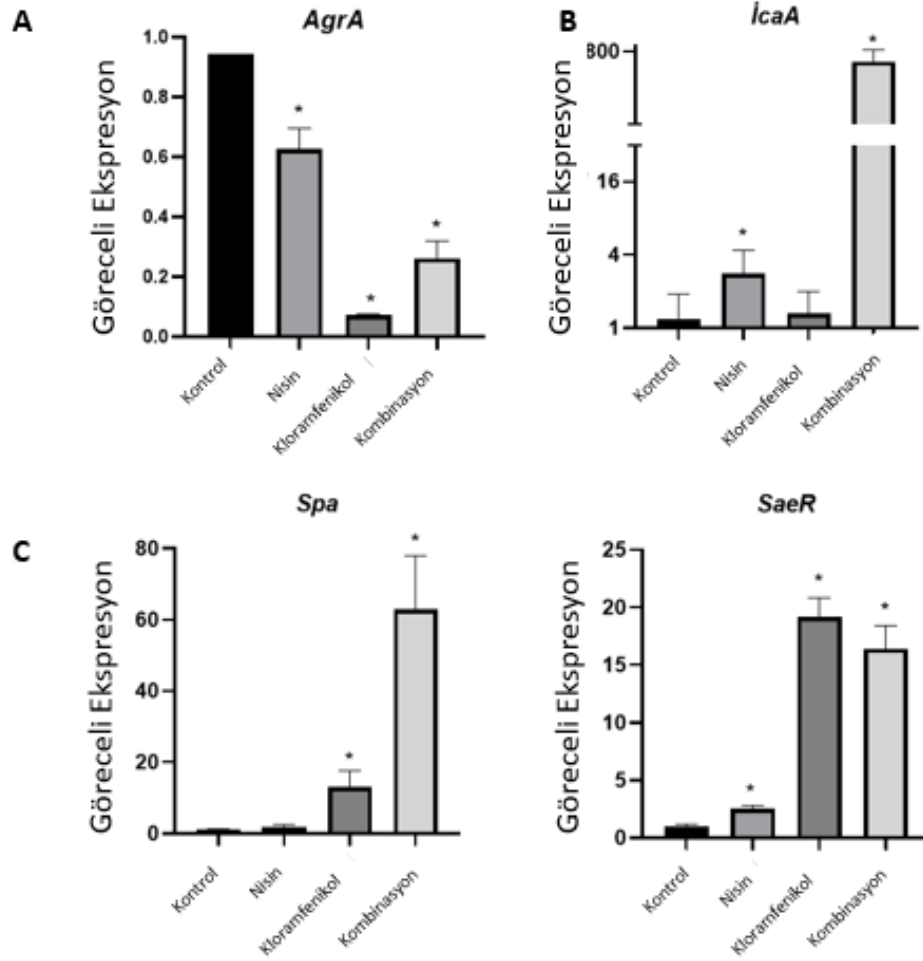
Tekli ve kombinasyon uygulamasının gen ifadesi üzerine etkilerini analiz etmek için koloni biyofilm testi gerçekleştirilmiştir. Koloni biyofilm testi, bir membran üzerinde geliştirilen hücrelerin biyofilm yapmalarına olanak sağlayan bir testtir. Steril polikarbonat membranlar antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine steril bir penset yardımıyla yerleştirilmiştir. Nisin, kloramfenikol ve kombinasyonu  $\frac{1}{2}$  MIC değeri şeklinde uygulanmıştır. 0,5 McFarland hücre yoğunluğuna ayarlanan bakteriden 10  $\mu$ L polikarbonat membranların merkez noktasına ekilmiştir. 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda antibiyotiklerin yarılanma ömürlerinin kısa olmasından dolayı membranlar dikkatli bir şekilde steril penset yardımıyla yeni petrilere aktarılıp tekrar 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Toplamda 48 saat inkübasyondan sonraki petrilerin son durumları Şekil 4.4'te verilmiştir.



**Şekil 4.4.** *S. aureus*'un koloni biyofilm testi 48 saat inkübasyonu sonucu biyofilm yapıları. (A: kontrol petrisi, B: nisin içeren petri, C: kloramfenikol içeren petri, D: kombinasyon içeren petri; membran üzerinde biyofilm yapmış hücreler kırmızı yuvarlak ile işaretlenmiştir.)

Sonuç olarak koloni biyofilm testinde 48 saat inkübasyondan sonra membran üzerindeki hücrelerin biyofilm yapıları gözlemlenmiştir. CV testi sonuçlarına paralel bir şekilde kloramfenikol bulunan besiyerinin (C) üzerindeki koloni nisin bulunan besiyerinin (B) üzerindeki koloniden daha büyük bir biyofilm yapısı içermektedir. Ayrıca kombinasyonun olduğu besiyeri (D) üzerindeki koloni, sinerjik etkinliğin nicel bir kanıtı olarak nisin ve kloramfenikolün tek tek kullanılmasından çok daha az biyofilm yapısı oluşturmuş bir şekilde gözlemlenmiştir.

Gen ifadesinin analizinin gerçekleştirilmesi için ilk olarak toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. Biyofilm yapısı oluşturmuş hücreler membranlardan geri kazanılıp falkon tüplerine alınarak TRIzol reaktifi ile üreticinin yönergeleri izlenip toplam RNA'ları izole edilmiştir. Toplam RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı, spektrofotometre ile belirlendikten sonra bütün örnek RNA'lar 300 ng olacak şekilde sabitlenip Yüksek Kapasiteli cDNA Reverse Transkripsiyon Kiti kullanılarak cDNA'ları elde edilmiştir. Son olarak *agrA*, *spa*, *icaA* ve *saeR* aktif virülans genlerinin, kontrol olarak da *gryB* geninin ekspresyon seviyelerinin analizi için qRT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Antibiyotik olmayan besiyerinin biyofilm yapısı qRT-PCR için kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan grafikler Şekil 4.5'te, Rotor Gene Q Series Yazılımı kullanılarak elde edilen sonuçların ekran görüntüsü Ek-1'de verilmiştir.



**Şekil 4.5.** qRT-PCR sonucunda gen ekspresyon seviyelerinin grafikleri (A: *agrA* geni, B: *icaA* geni, C: *spa* geni, D: *saeR* geni.)

Şekil 4.5'te *agrA* (A), *icaA* (B), *spa* (C), *saeR* (D) genleri ile ilgili qRT-PCR sonuçlarının grafikleri verilmiştir. Koloni biyofilm testinde nisin, kloramfenikol ve kombinasyon tedavisi uygulanan hücrelerde *agrA* (A) geninin ekspresyon seviyeleri kontrol grununa kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Ancak diğer tüm gruplarda *icaA*, *spa* ve *saeR* gen ekspresyonlarının yukarı regüle olduğu analiz edilmiştir. *Spa* ve *saeR* genleri, kloramfenikol uygulamasında sırasıyla 16 ve 30 kat yukarı regüle edilmiş olduğu belirlenmiştir.

Grafiklerde bulunan kombinasyon sonrası genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edildiğinde kontrole oranla *agrA* geni önemli ölçüde azalmaktayken, *icaA*, *spa* ve *saeR* genlerinin ekspresyonu kombinasyona yanıt olarak önemli ölçüde yukarı doğru regüle edildiği bulunmuştur. Hücrelerde *icaA* geni 820 kat yukarı doğru regüle edilirken *Spa* geni 108 kat ve *saeR* geni 29 kat yukarı regüle edilmiştir.

### 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

*S. aureus* oldukça patojen bir yapıda olması nedeniyle hastane enfeksiyonlarında en sık görülen beş türden birisidir (Masalha et al. 2001; Yüksekdağ ve Baltacı 2013; Zhou et al. 2019). *S. aureus* tedavi amaçlı kullanılan neredeyse bütün antibiyotiklere karşı hızlı direnç gerçekleştirmesi açısından da oldukça önemlidir. 2015 yılında Avrupa verilerine göre MRSA 148.000'den fazla enfeksiyondan ve 7.000 ölümden sorumlu olduğu analiz edilmiştir (Kakoullis et al. 2021). Genellikle deride ve solunum sistemi organlarında, özellikle de burun kısmında bulunurlar. İçermiş olduğu geniş virülans faktörleriyle enfeksiyon kapasitesi yüksek bir fırsatçı patojendir. Pnömoni, toksik şok sendromu, bakteriyemi, yumuşak doku ve kan dolaşımı enfeksiyonları gibi çeşitli ciddi enfeksiyonlara *S. aureus*'un bu virülans faktörleri yol açmaktadır (Hodille et al. 2017). Kombinasyon tedavisi şeklinde kullanılan antibiyotikler, hücrelerdeki bu dirence karşı çözümler sunabilir. İleriye dönük olarak, enfeksiyonları önlemenin bir yolu olarak antibiyotikler ve antimikrobiyal peptidlerin kombinasyonuna artan bir ilgi vardır.

Bu çalışmada, bir florokinolon olan siprofloksasin, AMP'lerin bir alt grubu olan antibiyofilm peptit olan nisin ve protein sentezi inhibitörü olan kloramfenikol kullanıldı (Tong et al. 2014; Dinos et al. 2016). Nisin ile kloramfenikolün ve nisin ile siprofloksasinin kombinasyon etkileşimi, *S. aureus* ATCC 6538'e karşı checkerboard testi ile değerlendirildi. Toplam FIC indeksi 0,5'ten küçükse ( $\Sigma \text{FIC} < 0.5$ ), iki antimikrobiyal arasında sinerjik bir etkileşim vardır. FIC indeksi 0,5 ile 4 ( $0,5 \leq \Sigma \text{FIC} \leq 4$ ) arasındaysa, toplamsal bir etki vardır. FIC indeksi 4'ten büyükse ( $\Sigma \text{FIC} > 4$ ), antagonistik bir etki vardır (Meletiadis et al. 2010; Nagarajan et al. 2019). Bu değerlendirme ile antimikrobiyal ilaçların birlikte kullanılması durumunda oluşabilecek etkiler *in vitro* koşullarda değerlendirilir.

Brumfitt et al. (2002), yapmış oldukları çalışmada 20 klinik *S. aureus* izolatında nisin ve kloaramfenikol arasında bulunan etkileşimi göstermiştir. Ancak 18 izolatta antagonistik etkileşim bulunmuştur (Brumfitt et al. 2002). Bu tez çalışmasında *S. aureus* ATCC 6538 ile gerçekleştirilen kombinasyon tedavisinde sinerjik bir etkileşim gözlemlendi. Muhtemel bir sebep, farklı suşların antibiyotiklere ve antibiyotiklerin kombinasyonlarına karşı farklı tepkiler göstermesidir. Ayrıca Tong et al. (2014), nisin ve kloramfenikolün

*Enterococcus faecalis* OG1RF ve ATCC 29212 suşlarına karşı sinerjistik etki gösterdiğini göstermiştir (Tong et al. 2014).

Biyofilm yapısında ekstrasellüler matris, polisakkaritler, eDNA ve çeşitli proteinleri içeren mikrobiyal topluluklardır. Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizma, plaktonik hücrelere kıyasla farklı gen ekspresyon modelleri gösterirler (Lister and Horswill 2014). Biyofilm üreten *S. aureus*, antibiyotiklere karşı yüksek direnme kabiliyeti göstermesi yüzünden genellikle kronik enfeksiyonlara neden olmuştur (Moormeier and Bayles 2017). Bu çalışmada, *S. aureus* ATCC 6538 suşunda bulunan virülans genlerin ekspresyonunu; nisin, kloramfenikol ve bu moleküllerin kombinasyonlarının alt MIC değerlerinde inkübe edilmiş koloni biyofilm testi kullanılarak araştırıldı. Biyofilm yapısının ve bileşenlerinin incelenmesini sağlamasının yanında antimikrobiyal moleküllerin bakteri öldürme seviyelerinin etkisini de belirleyen statik bir yöntemdir (Merritt et al. 2011). Bakteri hücrelerini yarı geçirgen polikarbonat yapılı bir membran üzerinde gelişmesi sağlanır. Membran üzerinde büyüyen bakteriler antibiyotik moleküllerinin yarılanma ömürlerinden kaynaklandığı durumlardan dolayı belirli periyotlarda yeni besiyerlerine alınır (Merritt et al. 2011). Ayrıca hücrelerin biyofilmden ayrılma, göç etme ve yeni bölgelerde biyofilm oluşturma gibi yetenekleri de sınırlandırılır. Bu yöntem antibiyotik direnci ve biyofilme bağlı direnç çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir.

CV testi sonucunda spektrofotometri ile elde edilen veriler (Şekil 4.2) ile koloni biyofilm testinde elde edilen biyofilm yapıları (Şekil 4.4) birbirleriyle uyumluluk göstermektedir. Kolonilerde bulunan biyofilm yapıları nicel olarak değerlendirildiğinde sinerjik etkinliğin bir kanıtı olmaktadır.

Koloni biyofilm testinden elde edilen hücrelerde *agrA*, *spa*, *icaA* ve *saeR* genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile tespit edildi. *Agr* operonu, hücreler arası çekirdek algılama ilişkili küresel bir düzenleyicidir ve *ica* operonundan bağımsız biyofilm oluşumunda rol aynamaktadır. *Agr* operon sisteminin, delta-hemolizin toksini (*hdi*), alfa toksini (*hla*), serin proteaz (*SplA-F9*) ve *Staphylococcus* proteini A (*Spa*) gibi çeşitli virülans faktörlerin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Painter et al. 2014; Singh and Ray 2014; Jenul and Horswill 2019). Özellikle deri ve yumuşak doku

enfeksiyonlarında *Agr* aktivitesinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Cheung et al. 2011). PCR sonuçlarına göre *agrA* geninin kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesindeki azalması (Şekil 4.5A), biyofilm oluşumunu ve biyofilm yaşam döngüsünün son basamağı olarak biyofilmin dağılmasını azalttığını belirtir. *Spa*, özellikle zatüre, kan dolaşımı enfeksiyonları ve septik artrite neden olan bir diğer önemli virülans faktörüdür (Jenul ve Horswill 2019). *Spa*, *agr* bağımlı düzenleyici olan RNAIII tarafından aşağı regüle edilir (Cheung et al. 2001). Biyofilm oluşumunda önemli bir yeri olan PIA, *icaADBC* operonu tarafından kodlanır ve bu çalışmada kullanılan *İcaA* geninin ürünü, *icaD* proteinin neden olduğu bir transmembran proteindir (O'Gara 2007). İlginç bir şekilde, bütün uygulamalardan elde edilen değerlerde (Şekil 4.5B, C, D) *icaA*, *spa* ve *saeR* genlerinin ekspresyon seviyeleri yukarı doğru regüle edilmiştir. Bu durum *S. aureus*'ta virülans faktörlerinin üretimini karmaşık yollarla gerçekleşmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca gözlemlendiği üzere MIC altı konsantrasyonlarda gerçekleşecek antimikrobiyal uygulamalar bakteride direnç neden olabilir.

*S. aureus*'ta biyofilm oluşumunda iki farklı mekanizma mevcuttur. Bunlar sırasıyla *ica* operonuna bağımlı ve *ica* operonundan bağımsız mekanizmalardır (O'Gara 2007). Bu yüzden biyofilm oluşumunda hücre, *ica* genlerine her zaman gerek duymamaktadır. Ayrıca protein sentez yolunu etkileyen antibiyotiklerin biyofilm oluşumuna fazla etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Örneğin, tetrasiklinler ve streptograminin, *S. epidermidis*'te *icaA* geninin ekspresyon seviyesini arttırdığı bildirilmiştir (Rachid et al. 2000). Bununla birlikte, klorafenikol, *S. epidermidis*'te indüklenen *icaA* ekspresyon düzeyi etkilememektedir. Benzer şekilde bu çalışmada da kloramfenikol ve nisin uygulamalarının *icaA* geninin ekspresyon düzeyini arttırdığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, siprofloksasin, nisin ve kloramfenikolün ayrı ayrı ve kombinasyon halinde etkilerini değerlendirdik. Nisin ve kloramfenikolün *in vitro* koşullarda *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı sinerjistik bir etkiye sahip olduğu belirlendi. Nisin, kloramfenikolün antibiyofilm etkisini arttırmak için antimikrobiyal tedavide kullanılabilir. Ancak siprofloksasin ve nisin *in vitro* koşullarda *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlendi. Nisin, siprofloksasin kombinasyonunda tek kullanımına kıyasla 2 kat MIC değeri artışı göstermiştir. FIC

indeksine göre etkinliğin olmadığı aralıkta ( $0,5 \leq \Sigma \text{FIC} \leq 4$ ) olmasına rağmen MIC değerindeki artış siprofloksasinin nisine karşı antagonistik bir etkinliğe sahip olduğu düşünülmektedir.

1. Çoklu ilaca tetikleyen durumlardan en önemli iki sebep olan antibiyotiklerin yanlış kullanımı veya fazla kullanımı ile ilgili daha fazla bilgilendirme yapılmalıdır.
2. Biyofilm yapısı oluşturmaya olanak sağlayan mekanizmalar hakkında daha fazla bilgi edinilmelidir.
3. Antimikrobiyal kombinasyonlar ve bunların antibiyotik direnciyle mücadele etmek için virülans genleri üzerindeki etkileri ile ilgili daha çok çalışılmalı ve daha iyi bir şekilde aydınlatılmalıdır.
4. *S. aureus* dahil yüksek biyofilm yapma yeteneğine sahip mikroorganizmalar için farklı özellikteki moleküllerin (Antibiyotik, AMP) kombinasyon çalışması gerçekleştirilmelidir.
5. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular *in vivo* antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesi açısından çalışılarak değerlendirilmedi.

## KAYNAKLAR

- Abbas, H. A., Elsherbini, A. M., Shaldam, M. A. 2019. Glyceryl trinitrate blocks staphyloxanthin and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. African Health Sciences, 19(1), 1376-1384.
- Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., Chandler, J. R. 2018. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. mBio, 9(3).
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M. 2009. Bakteriyosinler: alternatif gıda koruyucuları. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 25(1-2), 59–70.
- Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 5–16.
- Angst, D. C., Tepekule, B., Sun, L., Bogos, B., Bonhoeffer, S. 2021. Comparing treatment strategies to reduce antibiotic resistance in an *in vitro* epidemiological setting. Proceedings of the National Academy of Sciences, 118(13).
- Annunziato, G. 2019. Strategies to overcome antimicrobial resistance (AMR) making use of non-essential target inhibitors: A review. International Journal Molecular Sciences, 20, 5844.
- Anonymous, 2004a. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5959>, Erişim Tarihi: 19/12/2021.
- Anonymous, 2004b. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16219761>, Erişim Tarihi: 19/12/2021.
- Anonymous, 2004c. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin> Erişim Tarihi: 19/12/2021.
- Anonymous, 2016. Web Sitesi: <https://aps.unmc.edu/> Erişim Tarihi: 29/12/2021.
- Anonymous, 2019. Web Sitesi: <https://www.atcc.org/products/6538> Erişim tarihi: 10/12/2021.
- Bassetti, M., Ginocchio, F., Mikulska, M. 2011. New treatment options against gram-negative organisms. Critical care (London, England), 15(2), 215.
- Boparai, J. K., Sharma, P.K. 2020. Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. Protein and Peptide Letters, 27(1), 4–16.
- Bordenave, G. 2003. Louis Pasteur (1822–1895). Microbes and Infection, 5(6), 553-560.
- Brumfitt, W., Salton, M. R. J., Hamilton-Miller, J. M. T. 2002. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: Activity against methicillin-resistant

*Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococci*. J. Antimicrobial Chemotherapy, 50, 731–734.

- Campbell, J., Singh, A. K., Santa Maria, J. P., Jr, Kim, Y., Brown, S., Swoboda, J. G., Mylonakis, E., Wilkinson, B. J., Walker, S. 2011. Synthetic lethal compound combinations reveal a fundamental connection between wall teichoic acid and peptidoglycan biosyntheses in *Staphylococcus aureus*. ACS Chemical Biology, 6(1), 106–116.
- Cascioferro, S., Carbone, D., Parrino, B., Pecoraro, C., Giovannetti, E., Cirrincione, G., Diana, P. 2021. Therapeutic strategies to counteract antibiotic resistance in MRSA biofilm-associated infections. ChemMedChem, 65-80.
- Chen, Q., Xie, S., Lou, X., Cheng, S., Liu, X., Zheng, W., Zheng, Z., Wang, H. 2020. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. Microbiologyopen, 9(1), e00946.
- Cheung, A. L., Schmidt, K., Bateman, B., Manna, A. C. 2001. SarS, a SarA homolog repressible by agr, is an activator of protein a synthesis in *Staphylococcus aureus*. Infection and Immunity. 69, 2448–2455.
- Cheung, G. Y. C., Wang, R., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., Otto, M. 2011. Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. Infection and Immunity, 79, 1927–1935.
- Chung, K. T., Dickson, J. S., Crouse, J. D. 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. Applied and Environmental Microbiology, 55, 1329–1333.
- de Freire Bastos, M. C., Ceotto, H. 2011. Bacterial antimicrobial peptides and food preservation. Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality, 62–76, Cambridge, M.A, USA.
- Di Somma, A., Moretta, A., Canè, C., Cirillo, A., Duilio, A. 2020. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. Biomolecules, 10(4), 652.
- Dinos, G. P., Athanassopoulos, C. M., Missiri, D. A., Giannopoulou, P. C., Vlachogiannis, I. A., Papadopoulos, G. E., Papaioannou, D., Kalpaxis, D. L. 2016. Chloramphenicol derivatives as antibacterial and anticancer agents: historic problems and current solutions. The Journal of Antibiotics, 5(2), 20.
- Gest, H. 2005. The Remarkable Vision of Robert Hooke (1635-1703): First Observer of the Microbial World. Perspectives in Biology and Medicine, 48(2), 266-272.
- Gün, İ. Ekinçi, F. Y. 2009. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. Gıda, 34(3), 165-173.
- Hodille, E., Rose, W., Diep, B. A., Goutelle, S., Lina, G., Dumitrescu, O. 2017. The role of antibiotics in modulating virulence in *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews, 30(4), 887-917.

- Jenul, C., Horswill, A. R. 2019. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiology Spectrum*, 7(2).
- Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P., Panos, G. 2021. Mechanisms of antibiotic resistance in important gram-positive and gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *The Journal of Antibiotics*, 10(415).
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., Straus, S. K. 2018. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules*, 8(1), 4.
- Lancellotti, P., Musumeci, L., Jacques, N., Servais, L., Goffin, E., Pirotte, B., Oury, C. 2019. Antibacterial activity of ticagrelor in conventional antiplatelet dosages against antibiotic-resistant gram-positive bacteria. *JAMA Cardiology*, 4(6), 596–599.
- Lane, N. 2015. The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals'. *Series B, Biological Sciences*, 370(1666), 20140344.
- Larsen, A. R., Stegger, M., Sørum, M. 2008. spa typing directly from a mecA, spa and pvl multiplex PCR assay—a cost-effective improvement for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surveillance. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 611–614.
- Lazzaro, B. P., Zasloff, M., Rolff, J. 2020. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6490), eaau5480.
- Lee, W. S., Komarmy, L. 1976. New method for detecting in vitro inactivation of penicillins by *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10(3), 564–566.
- Lister, J. L., Horswill, A. R. 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: Recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, 4, 1–9.
- Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H., Lee, V. J. 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), 105–116.
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z. Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J., Li, M. 2019. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine* 14(11), 1-17.
- Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., Cohen, G. 2001. Analysis of Transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class *ib* and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7260–7272.

- Meletiadiis, J., Pournaras, S., Roilides, E., Walsh, T. J. 2010. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), 602–609.
- Merritt, J. H., Kadouri, D. E., O'Toole, G. A. 2011. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols Microbiology*, 1, 1-17.
- Moormeier, D. E., Bayles, K. W. 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, 365–376.
- Mohammad, H., Mayhoub, A. S., Cushman, M., Seleem, M. N. 2015. Anti-biofilm activity and synergism of novel thiazole compounds with glycopeptide antibiotics against multidrug-resistant staphylococci. *The Journal of Antibiotics*, 68(4), 259–266.
- Nagarajan, D., Roy, N., Kulkarni, O., Nanajkar, N., Datey, A., Ravichandran, S., Thakur, C., T, S., Aprameya I. V., Sarma S. P., Chakravortty D., Chandra, N. 2019.  $\Omega 76$ : A designed antimicrobial peptide to combat carbapenem-and tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Science advances*, 5(7), eaax1946.
- O'Gara, J. P. 2007. *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 179–188.
- Page, M. G., Dantier, C., Desarbre, E., Gaucher, B., Gebhardt, K., Schmitt-Hoffmann, A. 2011. *In vitro* and *in vivo* properties of BAL30376, a  $\beta$ -lactam and dual beta-lactamase inhibitor combination with enhanced activity against Gram-negative *Bacilli* that express multiple  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), 1510–1519.
- Painter, K. L., Krishna, A., Wigneshweraraj, S., Edwards, A. M. 2014. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends in Microbiology*, 22(12), 676–685.
- Papenfort, K., Bassler, B. L. 2016. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576–588.
- Peel, T., Astbury, S., Cheng, A. C., Paterson, D., Buising, K., Spelman, T., Tran-Duy, A., de Steiger, R. S. 2019. Multicentre randomised double-blind placebo controlled trial of combination vancomycin and cefazolin surgical antibiotic prophylaxis: the Australian surgical antibiotic prophylaxis (ASAP) trial. *BMJ Open*, 9(11), e033718.
- Petersen, P. J., Jones, C. H., Venkatesan, A. M., Bradford, P. A. 2009. Efficacy of piperacillin combined with the Penem beta-lactamase inhibitor BLI-489 in murine models of systemic infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1698–1700.

- Punyauppa-path, S., Phumkhachorn, P. 2015. Nisin: production and mechanism of antimicrobial action. *International Journal of Current Research and Review*, 7, 47–53.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H. O. 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W. 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 3357–3363.
- Rasmussen, K. S., Poulsen, M. Ø., Jacobsen, K., Skov, M. N., Kolmos, H. J., Kallipolitis, B. H., Klitgaard, J. K. 2017. Combination of thioridazine and dicloxacillin as a possible treatment strategy of staphylococci. *The New Microbiologica*, 40(2), 146–147.
- Rogers, S. A., Huigens, R. W., Cavanagh, J., Melander, C. 2010. Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2112–2118.
- Seethalakshmi, P. S., Rajeev, R., Kiran, G. S., Selvin, J. 2020. Promising treatment strategies to combat *Staphylococcus aureus* biofilm infections: an updated review. *Biofouling*, 36, 1159–1181.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., Franceschi, F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413, 814–821.
- Shukla, S. K., Rao, T. S. 2017. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate, *bioRxiv*, 1-10.
- Sieradzki, K., Tomasz, A. 1997. Suppression of beta-lactam antibiotic resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through synergic action of early cell wall inhibitors and some other antibiotics. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39(1), 47–51.
- Singh, R., Ray, P. 2014. Quorum sensing-mediated regulation of *staphylococcal* virulence and antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 9(5), 669–681.
- Şenol, E. 2002. Siprofloksasin. *ANKEM Dergisi*, 16(3), 382–384.
- Tevyashova, A. N. 2021. Recent trends in synthesis of chloramphenicol new derivatives. *The Journal of Antibiotics*, 10(4), 370.
- Tong, Z., Ni, L., Ling, J. 2014. Antibacterial peptide nisin: a potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides*, 60, 32–40.

- Tong, Z, Zhang Y, Ling J, Ma, J., Huang, L., Zhang, L. 2014. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. PLoS One, 9(2), e892.
- O'Brien, S. J., Goedert, J. J. 1996. HIV causes AIDS: Koch's postulates fulfilled. Current Opinion in Immunology, 8(5). 613-618.
- Worthington, R. J., Melander, C. 2013. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. Trends in Biotechnology, 31(3), 177–184.
- Yüksekdağ, Z. N., Baltacı, N. 2013. *Staphylococcus aureus* Türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyetleri Dergisi, 43(3), 77-83.
- Zhou, G., Peng, H., Wang, Y., Huang, X., Xie, X., Shi, Q. 2019. Enhanced synergistic effects of xylitol and isothiazolones for inhibition of initial biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Journal of Oral Science, 61(2), 255-263.

## EKLER

### EK 1- *gyrB*, *agrA*, *icaA*, *saeR* ve *spa* genlerinin qRT-PCR analizi

