

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

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLERİN ÇEŞİTLİ ENFEKSİYON  
ETKENLERİNE KARŞI İN VİTRO ANTİBAKTERİYEL  
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**MERVE ATAMAN**

**DANIŞMAN  
YARD. DOÇ. DR. SİBEL DÖŞLER**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2016**

## TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Programında Merve ATAMAN tarafından hazırlanan "Antimikrobiyal Peptidlerin Çeşitli Enfeksiyon Etkenlerine Karşı İn Vitro Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

08 / 01 / 2016

### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

- 1.Prof.Dr.Şengül DERBENTLİ
- 2.Prof.Dr.Ümran SOYOĞUL GÜRER
- 3.Doç.Dr.Berna ÖZBEK ÇELİK
- 4.Doç.Dr.A.Seher BİRTEKSÖZ TAN
- 5.Yard.Doç.Dr.Sibel DÖŞLER



**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

MERVE ATAMAN



## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım ilk günden beri bana her konuda destek olan, tez çalışmamın her safhasında beni yönlendiren ve çalışmalarımı gerçekleştirirken benden güvenini ve desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Sayın Yard.Doç.Dr.Sibel DÖŞLER'e çok teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında sağladığı katkılardan dolayı İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof.Dr.Gülten ÖTÜK'e, her zaman bilgi ve tecrübelerini paylaşan, her konuda yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç.Dr.A.Seher BİRTEKSÖZ TAN, Doç.Dr. Berna ÖZBEK ÇELİK, Doç.Dr.Çağla BOZKURT GÜZEL, Kimyager Emine TUNCER'e, Anabilim Dalımızdaki tüm arkadaşlarıma ve çalışanlarına içtenlikle teşekkür ederim.

Desteklerini ve sevgilerini her daim yanımda hissettiğim eşime ve aileme de sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 52354

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Antimikrobik peptidlerin yapısal özellikleri .....	5
2.1.1. $\alpha$ -helezonal peptidler .....	6
2.1.2. $\beta$ şeridi içeren peptidler.....	7
2.1.3. Halka yapısındaki peptidler .....	8
2.1.4. Uzun zincirli peptidler .....	8
2.2. Antimikrobik peptidlerin etki mekanizmaları.....	8
2.2.1. Membran Aktif AMP'ler .....	9
2.2.2. Hücre içinde etkili AMP'ler .....	13
2.3. Antimikrobik peptidlere direnç mekanizmaları .....	16
2.3.1. Hücre içine girişin engellenmesi .....	18
2.3.2. Peptidlerin proteolizi.....	19
2.3.3. Peptidlerin hücre dışına pompalanması .....	19
2.3.4. Hücre içindeki hedeflerin değişikliğe uğraması.....	20
2.4. Antimikrobik peptidlerin klinik kullanımları.....	20
2.5. Çalışmada kullanılan antimikrobik peptidler .....	24
2.5.1. Temporin A .....	24
2.5.2. Apidaesin 1B.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Antimikrobik maddeler ve çözeltileri .....	27
3.2. Besiyerleri .....	29
3.2.1. Triptik Soya Agar (Difco).....	29

3.2.2. Mueller Hinton Buyyon (Difco) .....	29
3.3. Bakteri suşları .....	29
3.3.1. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması .....	29
3.3.2. İnokulumdaki bakteri sayısının belirlenmesi .....	30
3.4. Diğer malzemeler .....	30
3.5. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesi .....	30
3.5.1. Deney koşullarının standardizasyonu .....	30
3.5.2. Çalışmada kullanılan antimikrobik peptidlerin MİK değerlerinin saptanması .....	31
3.5.3. CLSI yöntemi ile çalışmada kullanılan antibiyotiklerin MİK değerlerinin saptanması .....	31
3.5.4. Çalışmada kullanılan suşların antibiyotiklere duyarlılık oranlarının belirlenmesi .....	32
3.6. Minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) değerlerinin belirlenmesi .....	33
3.7. Antimikrobik maddelerin kombinasyon halinde oluşturdukları etkinin mikrodilüsyon “checkerboard” yöntemi ile belirlenmesi .....	33
3.8. “Time-kill curve” yöntemiyle antibiyotiklerin kombinasyon halinde oluşturdukları etkilerin saptanması .....	36
3.8.1. Antibiyotiklerin kombinasyon halinde etkilerinin araştırılması .....	36
3.8.2. Antibiyotiklerin bakterisidal etkilerinin araştırılması .....	37
4. BULGULAR .....	39
4.1.1. Deney koşullarının standardizasyonuna ait bulgular .....	39
4.1.2. Çalışmada kullanılan AMP’ler ve antibiyotiklerin MİK değerlerine ait bulgular .....	40
4.1.3. Çalışmada kullanılan suşların antibiyotiklere duyarlılık oranlarının belirlenmesine ait bulgular .....	41
4.2. Minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) saptanmasına ait bulgular .....	42
4.3. Mikrodilüsyon “checkerboard” yöntemi ile AMP’lerin kombinasyon halindeki etkilerine ait bulgular .....	43
4.4. Time kill curve yöntemi ile AMP’lerin kombinasyon halindeki etkilerine ait bulgular .....	44
5. TARTIŞMA .....	47
KAYNAKLAR .....	59
ETİK KURUL KARARI .....	72
ÖZGEÇMİŞ .....	73

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Membran aktif AMP'lerin etki mekanizmaları.....	12
Tablo 2.2. Çeşitli klinik çalışma aşamalarda bulunan AMP'ler.....	22
Tablo 3.1. Deneylede kullanılan antimikrobik maddelere ait çözücü ve seyreltici madde çözeltileri.....	28
Tablo 3.2. <i>S. aureus</i> suşları için CLSI'da belirtilen duyarlılık sınırları.....	32
Tablo 3.3. <i>E. coli</i> suşları için CLSI'da belirtilen duyarlılık sınırları.....	32
Tablo 4.1. Antibiyotiklerin standart suşlara karşı saptanan MİK değerleri.....	39
Tablo 4.2. Antimikrobik etkili katyonik peptidlerin standart suşlara karşı saptanan MİK değerleri.....	40
Tablo 4.3. Antimikrobik maddelerin 12 adet <i>S. aureus</i> suşuna karşı saptanan MİK aralıkları, MİK <sub>50</sub> ve MİK <sub>90</sub> değerleri (µg/ml).....	40
Tablo 4.4. Antimikrobik maddelerin 12 adet <i>E. coli</i> suşuna karşı saptanan MİK aralıkları, MİK <sub>50</sub> ve MİK <sub>90</sub> değerleri (µg/ml).....	41
Tablo 4.5. 12 adet <i>S. aureus</i> suşunun antibiyotiklere duyarlılık oranları (%).....	41
Tablo 4.6. 12 adet <i>E. coli</i> suşunun antibiyotiklere duyarlılık oranları (%).....	42
Tablo 4.7. Antimikrobiyal peptidlerin 12 adet <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> suşlarına karşı saptanan MBK aralıkları, MBK <sub>50</sub> ve MBK <sub>90</sub> değerleri (µg/ml).....	42
Tablo 4.8. Temporin A'nın antibiyotiklerle oluşturulan kombinasyonlarının <i>S. aureus</i> suşları üzerine etkileri.....	43
Tablo 4.9. Apidaesin 1B'nin antibiyotiklerle oluşturulan kombinasyonlarının <i>E. coli</i> suşları üzerine etkileri.....	44



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Antimikrobiyal peptidlerin sekonder yapıları.....	7
Şekil 2.2. Antimikrobiyal peptidlerin bakteri dış ve sitoplazma membranından geçişi .....	10
Şekil 2.3. Membran model mekanizmaları .....	13
Şekil 2.4. AMP'lerin hücre içine alınma mekanizmaları .....	15
Şekil 2.5. AMP direnç mekanizmalarının şematik gösterimi .....	17
Şekil 2.6 Apidaesin 1B yapısı .....	26
Şekil 2.7. Apidaesin etki mekanizması .....	26
Şekil 3.1. Mikrodilüsyon “Checkerboard” yöntemi ile iki antibiyotiğin kombinasyon halinde elde edilen konsantrasyonları .....	34
Şekil 3.2. Mikrodilüsyon “Checkerboard” yöntemiyle antibiyotik kombinasyonlarının değerlendirilmesi .....	35
Şekil 3.3. Time kill curve yöntemiyle antibiyotik kombinasyonlarının değerlendirilmesini gösteren örnek grafikler .....	38
Şekil 3.4. Time kill curve yöntemiyle antibiyotiklerin bakterisidal etkisini gösteren örnek grafik .....	38
Şekil 4.1. MRSA ve MSSA suşlarına karşı Temporin A ve antibiyotik kombinasyonlarına ait zaman ölüm grafikleri .....	45
Şekil 4.2. MDR / GSBL+ ve GSBL - <i>E.coli</i> suşlarına karşı apideasin 1B ve antibiyotik kombinasyonlarına ait zaman ölüm grafikleri .....	46

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- AMP : Antimikrobiyal Peptid
- MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
- MBK : Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
- MHB : Mueller Hinton Broth
- GSBL : Genişletilmiş Spektrumlu  $\beta$ -laktamaz
- MRSA : Metisiline Dirençli *S.aureus*
- MSSA : Metisiline Duyarlı *S.aureus*
- VRSA : Vankomisin Dirençli *S.aureus*
- TSA : Triptik Soy Agar
- VRE : Vankomisin Dirençli *Enterococcus*
- MDR : Çoklu İlaç Dirençli
- LPS : Lipopolisakkarit Tabakası
- FİK : Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu
- HIV : İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
- CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
- CFU : Koloni Oluşturan Birim

## ÖZET

Ataman M. Antimikrobiyal Peptidlerin Çeşitli Enfeksiyon Etkenlerine Karşı İn Vitro Antibakteriyel Aktivitelerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2016.

Günümüzde kliniklerde yoğun bir şekilde kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerin yüksek oranda direnç geliştirmesi nedeniyle yaşanan sorunlar araştırmacıları yeni antimikrobik etkili kaynakların arayışına yöneltmiştir. Bunların arasında en fazla öne çıkan grup, canlıların çevrelerini kuşatan mikroorganizmalara karşı savunmalarında etkili olan doğal bağışıklığın önemli unsurlarından olan antimikrobiyal peptidlerdir. Bu maddeler mikroorganizmalardan insanlara kadar her türlü canlıdan elde edilebilmekte olup gerek tek başlarına, gerekse antibiyotiklerle kombinasyonları halinde Gram pozitif ve Gram negatif birçok bakteriye, ayrıca mantarlar, zarflı virüsler ve protozoonlar gibi çeşitli mikroorganizmalara karşı etki göstermektedirler. Çalışmamızda, AMP'lerden temporin A ve apidaesin 1B'nin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* suşlarına karşı tek başlarına ve sık kullanılan antibiyotiklerle kombinasyon halindeki etkileri in-vitro koşullarda araştırılmıştır. MSSA suşlarına karşı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen minimum inhibitör konsantrasyonu MİK<sub>90</sub> değerleri temporin A, doksisisiklin, eritromisin, klindamisin, linezolid ve vankomisin için sırasıyla 8, 125, 0.5, 0.125, 2 ve 0.5 µg/ml olarak; MRSA suşlarına karşı MİK<sub>90</sub> değerleri sırası ile 8, 4, 16, 0.25, 2 ve 1 µg/ml olarak bulunmuştur. *E.coli* suşlarına karşı MİK<sub>90</sub> değerleri apidaesin 1B, piperasilin, sefotaksim, meropenem, gentamisin ve levofloksasin için sırasıyla 16, >256, 2, 0.016, 1 ve 16 µg/ml olarak; MDR *E.coli* suşlarına karşı MİK<sub>90</sub> değerleri ise sırasıyla 16, >256, >256, 0.031, 128 ve 32 µg/ml olarak saptanmıştır. AMP'lerin minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) değerleri ise genellikle MİK değerlerine eşit veya iki katı konsantrasyonlarda bulunmuştur. Çalışmada AMP'lerin antibiyotiklerle kombinasyon halindeki etkileri mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemi ile araştırılarak fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksine göre değerlendirilmiştir. Buna göre en fazla sinerjistik etki görülen kombinasyonlar apidaesin 1B-gentamisin %33 en az sinerjistik etki görülen kombinasyonlar ise apidaesin 1B-meropenem %17 olarak tespit edilmiştir. Kombinasyonların hiçbirinde antagonist etki saptanmamıştır. Ayrıca AMP'lerin tek başlarına ve antibiyotiklerle kombinasyon halindeki etkileri de zamana bağlı öldürme yöntemiyle belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulguların, antimikrobiyal peptidlerin ilaç haline getirilerek klinik kullanıma girebilmeleri için yapılan çalışmalara yardımcı olacağı inancındayız.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobik peptid, Temporin A, apidaesin 1B, checkerboard, zamana bağlı öldürme

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 52354

## ABSTRACT

ATAMAN, M. In Vitro Antibacterial Activities of Antimicrobial Peptides against Several Infectious Agents. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Microbiology, Post graduate thesis, İstanbul, 2016.

Recently, because of the problems about rise in a antibiotic resistance in bacteria, researchers tend to the search for a new antimicrobial sources. Among these sources, the most remarkable group is the antimicrobial peptides which are the important component and major players in the innate immune response. Since these agents can be obtained from various kind of organism from microorganisms to humanbeings, whether alone or in combination with antibiotics, they active against many Gram positive and Gram negative bacterias as well as fungi, enveloped viruses and various microorganisms like protozoons. In our study, the activities of apidaecin 1B and temporin A alone and in combination with commonly used antibiotics tested against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains. The MIC<sub>90</sub> values of temporin A, doksisiklin, eritromisin, klindamisin, linezolid, vankomisin aganist MSSA strains were 8, 125, 0.5, 0.125, 2 and 0.5 µg/ml, respectively. Aganist MRSA strains 8, 4, 16, 0.25, 2 and 1 µg/ml, respectively. The MIC<sub>90</sub> values of apidaecin, piperacillin, cefotaxime, meropenem, gentamicin and levofloxacin aganist *E.coli* strains were 16, >256, 2, 0.016, 1 and 16 µg/ml, respectively. Aganist MDR *E.coli* strains 16, >256, >256, 0.031, 128 and 32 µg/ml, respectively. The MBCs were equal or twofold greater than those of the MICs. In our study, we investigated the activities of antimicrobial peptides in combination with some antibiotics using the microdilution “checkerboard” method and the findings were evaluated with FIC indexes. Synergistic interactions were mostly seen with apidaecin 1B-gentamicin combination (33% of tested strains), whereas the least synergistic interactions were observed with apidaecin 1B-meropenem combination (17% of tested strains). No antagonism was observed with any combination. We believe that our findings will helpfull for the investigations to improve the use of antimicrobial peptides in clinics as therapeutich agents.

**Key Words:** Antimicrobial peptides, temporin A, apidaecin 1B, checkerboard, time killing curve

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 52354

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Geçtiğimiz yüzyılın başlarında, çağın en büyük keşiflerinden biri olan antibiyotiklerin bulunması ve üretimi, tıp tarihindeki en büyük başarılarından birini teşkil etmektedir (1). 1940'lı yılların başlarında penisilinin kullanıma sunulması ve antibakteriyal ilaç eldesinde ortaya çıkan büyük gelişmeler ile enfeksiyon hastalıkları ile ilgili olayların gidişatını bütünüyle insanlığın lehine çevrilmiştir (2). Her ne kadar 1945'de Sir Alexander Fleming, araştırmalarından elde ettiği verilerle The New York Times'a yaptığı bir röportajda, penisilinin uygunsuz kullanımının dirençli mutantların seçilimine sebep olacağına dair ilk uyarısını yapmış olsa da (3) hiçkimse, antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların bu kadar hızlı ve farklı mekanizmalar kullanarak direnç geliştirebileceğini öngörememiştir (1). Ancak günümüzde, gerek artan insan popülasyonu nedeniyle antibiyotiğe maruz kalan mikroorganizma sayısındaki artış, gerekse besin üretim tesislerinde yanlış ve fazla antibiyotik kullanımı ile direncin besin zincirine de geçişi, yanlış dezenfektan kullanımı, antimikrobiyal etkili maddelerin su ve toprağa karışarak hali hazırda dirençli genlere kaynaklık eden mikroorganizmalara yeni savunma mekanizmaları kazandırmaları gibi nedenlerle her geçen gün antibiyotiklere karşı görülen direnç miktarı daha da artmakta ve halk sağlığı açısından gittikçe büyüyen bir tehdit oluşturmaktadır (3-5).

Antibiyotik direncinin giderek artması, mevcut antibiyotiklerin sınırlı sayıda olması ve ticari firmaların 1985 yılından beri yeni antimikrobiyal geliştirme çalışmalarına giderek daha az katılıyor olması, içerisinde bulunduğumuz antibiyotik çağını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir (6). 2013 Dünya Ekonomik Forumu'nun 50 küresel tehdit listesinde dahi antibiyotik direnci ilk sırada yer almış ve yakın zamanda dünyanın "antibiyotik sonrası dönem" diye adlandırılan ve en basit enfeksiyon hastalıklarının bile tedavisinde kullanılacak ilaç bulunamayacak bir döneme gireceği konusuna dikkat çekilmiştir (7). Bakteriler arasında giderek artmakta olan direnç problemi, hem toplum kökenli, hem de hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde sorun olmakta ve 1990'lı yılların başından itibaren, çok ilaca dirençli suşların oranının giderek artmakta olduğu bildirilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de bulunan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA)'nın verilerine göre bu ülkedeki hastanelerde her yıl iki milyon kişi bakteriyel enfeksiyonlara yakalanmakta ve bunların

90 bini kaybedilmektedir. Enfeksiyon etkenlerinin de % 70'inin en az bir antimikrobiyale karşı dirençli olduğu vurgulanmaktadır (8, 9).

Antibiyotiklerle ilgili olarak yaşanan bu sorunlar araştırmacıları yeni antimikrobik etkili kaynakların arayışına yöneltmiş olup bu kaynaklar arasında en fazla öne çıkan ve gelecek vaat eden grup antimikrobik peptidler (AMP)'lerdir (10). Çalışmamızın da dayanak noktası olan bu AMP'ler yeni ilaçların olası bileşikleri olup gösterdikleri sıra dışı aktivite ve seçicilikleri ile umut kaynağı olarak görülmektedir (11).

Bütün canlılar, mikroorganizmalara karşı kendilerini korumak amacıyla, doğal bağışıklık sistemlerinin bir parçası olarak çeşitli AMP'ler üretmekte ve bu peptidler yardımıyla meydana gelecek olan enfeksiyonlara karşı özel bir immün yanıt oluşturarak mikroorganizmaları etkisiz hale getirmektedirler. AMP'ler mikroorganizmalardan bitkilere, sürüngenlerden memelilere kadar her türlü canlı organizma tarafından sentezlenebilmekte ve Gram pozitif / Gram negatif bakteriler, mantarlar, bazı parazitler ve virüsler de dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (12). Bu maddeler özellikle solunum yolu gibi mukozayla kaplı yüzeylerde bulunan epitel hücreleri ve fagositik hücreler tarafından düşük enerjiyle seri bir şekilde sentezlenmekte ve kolaylıkla büyük miktarlarda saklanabilmektedir. Depo edildiği yerde hazır bekleyen bu peptidler enfeksiyondan kısa bir süre sonra yüksek miktarlara ulaşarak birçok mikroorganizma türünün üremesini hızla inhibe etmektedir (13, 14). Günümüzde, izole edilen yeni AMP dizileri ve etkinliklerine dair birçok makale yayınlanmakta olup doğal kaynaklardan elde edilen ve 2100'ü aşkın AMP, Antimikrobiyal Peptid veritabanında listelenmektedir (15).

AMP'ler hidrofobik ve hidrofilik kısımları olan 12-50 aminoasitten oluşan pozitif yüklü moleküllerdir. Bu özellikler, moleküllerin su içeren ortamlarda çözünebilmesini ve lipidden zengin membranlara girebilmesini sağlamaktadır (16). AMP'ler, mikroorganizmaların membranları ile etkileşime girdikten sonra hücrelerin dış çevreyle aralarındaki dengeyi bozmak suretiyle hücrenin ölümüne neden olarak antibakteriyal ya da antifungal etki göstermektedirler. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda AMP'lerin, membranla olan etkileşimleri dışında spesifik membran proteinlerinin veya oksidatif stres proteinlerinin sentezinin durdurulması, DNA sentezinin durdurulması, DNA ile etkileşim, hidrojen peroksit oluşumu, ökaryotik

hücrelerde apoptozu tetikleme veya bakteriyal hedeflerde otolizi tetikleme gibi farklı etki mekanizmalarını da kullandıkları öne sürülmektedir (10).

AMP'ler bakteriler üzerine genellikle düşük minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinde etki ederler ve oluşturdukları öldürücü etki kısa sürede gerçekleştiğinden minimum bakterisit konsantrasyonuna ait değerleri de genellikle MİK değerlerinin iki katını geçmemektedir. Bu maddelerin klinik kullanımda olan antibiyotiklere karşı dirençli veya duyarlı olan suşlar üzerine oluşturdukları MİK değerleri arasında ise önemli bir fark bulunmamaktadır. Gösterdikleri bu antimikrobik etki, birçok antibiyotiğin *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* gibi dirençli mikroorganizmalar ya da metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz üreten (GSBL+) *Escherichia coli*, MDR Gram negatif bakteriler gibi yüksek antibiyotik direnci gösteren türler üzerine olan etkileri ile yarışabilecek düzeydedir (17). Çok hızlı ve geniş spektrumlu öldürme kinetiklerinin yanısıra AMP'leri etkileyebilen direnç mekanizmaları da çok azdır ve bunlar genellikle MİK değerini sadece 2-4 katına çıkarabilmektedir. Bununla birlikte *Burkholderia cepacia* ve *Serratia* türleri gibi az sayıda mikroorganizma AMP'lere karşı doğal olarak direnç göstermektedir (18). Günümüzde LL-37, indolicidin, melittin gibi pek çok doğal veya sentetik AMP'nin in vitro aktivitesi ile ilgili olarak gerek ülkemizde gerek yurtdışında birçok çalışma yapılmakta ve umut verici sonuçlar elde edilmektedir (19).

Günümüzde gerek hastane ve gerekse toplum kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer alan ve oluşturdukları enfeksiyonların tedavisi güç olan patojenlerin başında *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *Acinetobacter spp*, gibi Gram negatif ve MRSA, VRE, *Streptococcus pneumoniae* gibi Gram pozitif bakteriler gelmektedir. Çalışmamızda AMP'lerin tek başlarına ya da kliniklerde sık olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonları halinde, kliniklerden izole edilmiş Gram pozitif bakterilerden MRSA ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) ile Gram negatif bakterilerden MDR / GSBL (+) ve GSBL (-) *E. coli* suşlarına karşı olan in vitro etkileri araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Konak savunma peptidleri olarak adlandırılan antimikrobiyal peptidler (AMP)'ler çok çeşitli organizmalar tarafından üretilen ve doğal bağışıklık yanıtının önemli komponentleri olan biyolojik moleküllerdir. Bu peptidlerin savunma sisteminde rol alan ilk bağışıklık elemanı olmalarının yanında, vücut direncine ve tepkisine göre kendilerini adapte edebilmeleri ve diğer savunma elemanlarıyla ve mikroorganizmalarla etkileşime girebilmeleri de diğer önemli özelliklerindedir. AMP'ler, özellikle mukozayla kaplı yüzeylerde bulunan epitel hücreler ve fagositik hücreler tarafından, düşük enerjiyle seri bir şekilde sentezlenmekte ve kolaylıkla büyük miktarlarda saklanabilmektedir. Depo edildiği yerlerde hazır bekleyen bu peptidler, enfeksiyondan kısa bir süre sonra yüksek miktarlara ulaşarak ve birbirleri ile ya da lizozim, laktoferrin gibi konağa ait diğer doğal savunma faktörleriyle ve çeşitli antibiyotiklerle de sinerjistik etki meydana getirerek birçok mikroorganizma türünün üremesini hızla inhibe etmektedir (14, 20).

AMP'ler oldukça homolog genler tarafından, her peptid için bir gen bulunacak şekilde kodlanmaktadır. Genlerde kodlanan bu peptidlerin ilk translasyon ürünleri prepropeptidler olup; bu prepropeptidler endoplazmik retikulumu hedef alan bir N-terminal sinyal dizisi, bir pro segmenti ve antimikrobik aktivite gösteren kısım olan bir C-terminal katyonik peptid olmak üzere üç kısımdan ibarettir. Genellikle anyonik yüklü olan Pro segmentinin biyolojik fonksiyonları arasında, C-terminalinin doğru bir şekilde katlanması, hücrelerarası geçişin düzenlenmesi ve olgun peptidlerin aktivitelerinin inhibe edilmesi yer almaktadır. Propeptidler hücre içindeki sürecin ileri safhalarında ya da hücre dışına salgılandıktan sonra parçalanırlar. AMP'ler ya propeptid ya da olgun C-terminal peptid şeklinde depo edilebilirler (21).

AMP'ler 1939 yılında Dubos tarafından, *Bacillus* suşundan bir antimikrobiyal ekstrenin elde edilmesi ile keşfedilmiştir. Bu ekstrenin fareleri pnömokok enfeksiyonundan koruyabildiği gösterilmiştir (22). Bundan bir yıl sonra ise Hotchkiss ve Dubos bu ekstrattan gramisidin olarak adlandırılan AMP'yi izole etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, intraperitoneal uygulama ile ilişkili bazı toksisite raporlarına rastlanmakla birlikte, gramisidinin yara ve ülserlerin topikal tedavisi için etkili bir madde olduğu bulunmuştur (23). 1941 yılında, başka bir AMP olan tirosidinin hem



Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere karşı etkili olduğu keşfedilmiş, ancak tirozidinin insan kan hücrelerine toksik etki gösterdiği saptanmıştır (24). İlk hayvan kaynaklı AMP ise 1956 yılında tavşan lökositlerinden izole edilen defensindir. Daha sonraki yıllarda, inek sütünden laktoferrin, kurbağa derisinden bombinin, arıların venomundan melittin, ipek böceğinden sekropinler ve Güney Afrika kurbağasının derisinden magaininler gibi peptidler tanımlanmış, aynı zaman zarfında insan lökositlerindeki lizozomların AMP içerdiği de kanıtlanmış ve memelilerin lökositlerinden katelisidinler ile vertebralılar ve memelilerin nötrofillerinden defensinler izole edilmiştir (25).

Günümüze kadar izole edilen ve üzerlerinde çalışmalar yapılan peptid yapısındaki bu maddelerin sayısı hızla artmış ve toplamda 5000'den fazla sayıda doğal ya da sentetik AMP keşfedilmiştir (26). Bu AMP'ler insanlar da dahil olmak üzere memelilerde, birçok bakteride, böcekler, sürüngenler, kuşlar ve diğer pek çok omurgasız ve omurgalı hayvan ve bitkilerde bulunmaktadır. Yüksek yapıli organizmalardaki AMP'ler makrofajlar, nötrofiller ve lenfositlerin yanı sıra dış çevreye maruz kalan doku ve organların epitel hücre duvarları ile de ilişkili olup, işgalci patojenlere karşı immün sistemin ilk basamağında rol alırlar (12). Ribozomlarda sentezlenen bu peptidler küçük, katyonik, amfifilik yapıda, moleküler ağırlığı  $\leq 5$  kDa olan, 12-52 aminoasit içeren, geniş spektrumlu mikrobisidal aktiviteye sahip moleküllerdir (16). AMP'ler, antibiyotiklerden farklı olarak birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakterileri, mantarları, HIV, herpes simplex ve influenza gibi bazı zarflı virüsleri ve parazitler gibi ökaryot hücreli canlıları da içine alan çok geniş bir etki spektrumuna sahiptirler (27). Bunun yanısıra bazılarının antitümör, anti-endotoksik, hemolitik, kemotaktik, mitojenik, immünomodülatör, kontraseptif vb. aktiviteleri de bulunabilmektedir (28).

## **2.1. Antimikrobik peptidlerin yapısal özellikleri**

Günümüze kadar çok fazla sayıda AMP molekülü tanımlanmış olmasına rağmen, bu peptidler sentez edildikleri bölgeye göre temel olarak iki gruba ayrılırlar (29- 32):

1- Non-ribozomal olarak sentez edilen peptid antibiyotikler (örneğin gramisidinler, polimiksinler, basitrasinler, glikopeptidler vb.)

## 2- Ribozomal olarak sentez edilen peptidler (doğal peptidler)

Non-ribozomal olarak sentez edilen peptidler genellikle bakteriler tarafından bol miktarda üretilen ya da mantar ve *Streptomyces*'lerde bulunan karmaşık yapıdaki antibiyotikler olup bazen de bu maddelerin modifiye edilmesi yoluyla yarı sentetik olarak elde edilmektedirler. Ribozomal olarak sentez edilen doğal AMP'lerin yapıları ise net olarak tanımlanmıştır. Bunlar bakterilerden insanlara kadar tüm canlılar tarafından sentezlenerek doğal bağışıklık sisteminin en önemli bölümlerinden birini oluşturmada ve enfeksiyon etkenine karşı spesifik immün yanıtın oluşturulmasına kadar geçen süre içinde mikroorganizmaları etkisiz hale getirebilmektedirler.

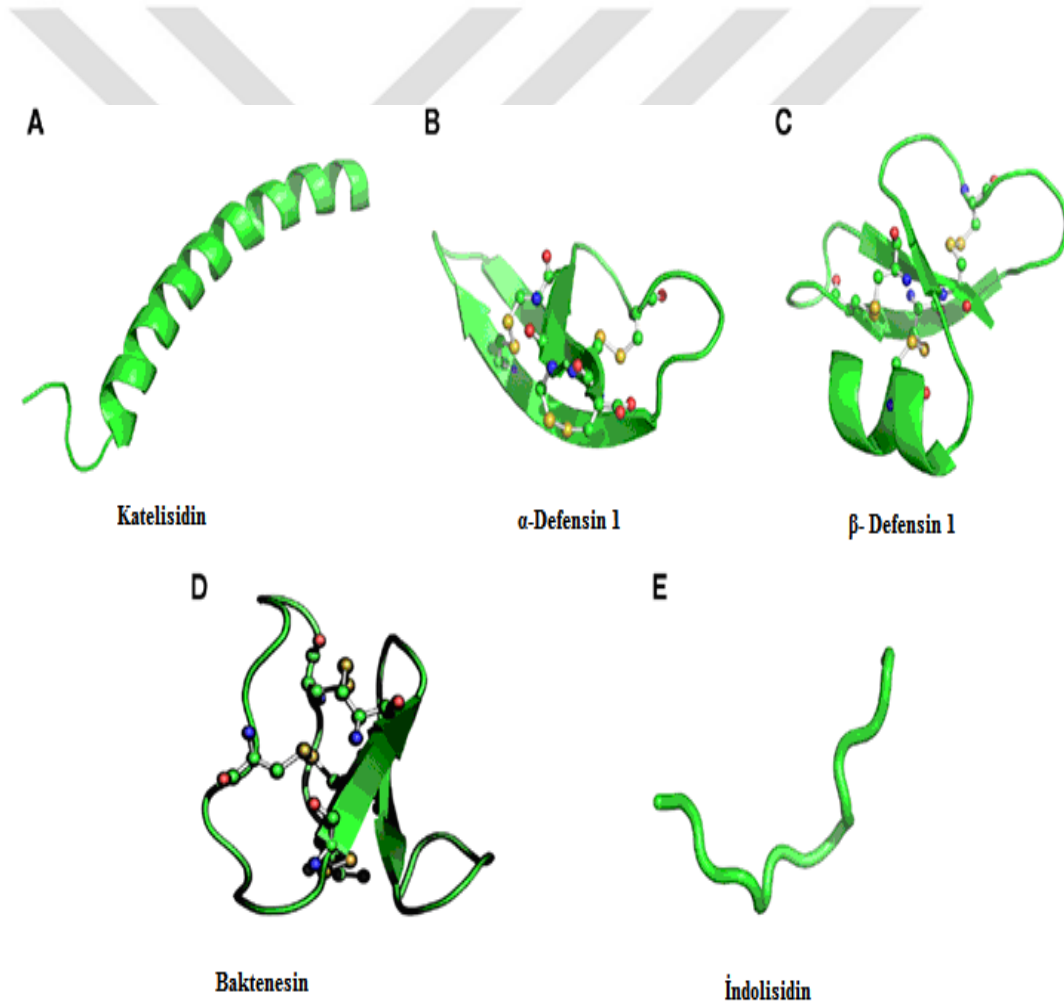
AMP'lerin yapıları primer ve sekonder yapılar olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Bu peptidler primer olarak genellikle 12 - 50 aminoasit uzunluğunda, yaklaşık % 50 oranında hidrofobik aminoasit içeren ve sahip oldukları bazik yapıdaki lizin ve arjinin amino asitlerinin etkisiyle pozitif yüklü bir yapıdadır. Bu pozitif yük genellikle +2 değerinde olup bazen +4, +6 ya da +7 olabilmektedir. AMP'lerin sekonder yapısı ise içerdikleri disülfid bağlarının yardımıyla ya da bakteri membranına temas etmeleri sonucunda kendi üzerlerine katlanarak üç boyutlu amfipatik yapıların oluşması suretiyle meydana gelir. Bu yapılar hem polar pozitif yüklü aminoasitlerden oluşan bir hidrofilik kısım, hem de non-polar, nötral aminoasit yan zincirleri içeren bir hidrofobik kısımdan oluşmaktadır. AMP'ler bu yapıları ile hidrofobik bir iç kısım ve negatif yüklü hidrofilik dış grupları bulunan bakteri membranıyla çok iyi ilişki kurabilmektedir (10). AMP'lerin üç boyutlu sekonder yapıları aşağıda belirtildiği şekilde gruplara ayrılmaktadır.

### 2.1.1. $\alpha$ -helezonal peptidler

Bu gruptaki peptidlerin özellikleri, 20 - 40 aminoasit uzunluğunda olup sistein içermeksizin lineer ya da  $\alpha$ -helezon yapısında olmaları ve genellikle molekülün merkezinde zayıf bir kıvrım içermeleridir (Şekil 2.1A).  $\alpha$ -helezonal peptidler arasında mellitin, magaininler, sekropinler, katelisinler, buforin II, LL-37 ve farklı canlılardan izole edilmiş miyeloid antimikrobik etkili peptidler olan PMAP (domuzdan), SMAP (koyundan) ve BMAP (sığırdan) bulunmaktadır (25, 33, 34).

### 2.1.2. $\beta$ şeridi içeren peptidler

Bu gruptaki peptidlerin karakteristik özellikleri, 16 - 40 aminoasit uzunluğunda olup sisteyince zengin olmaları ve yapılarında  $\beta$  şeridi içermeleridir. İçerdikleri  $\beta$  şeritleri birbirine iki ya da daha fazla disülfid köprüsü ile bağlanmış antiparalel bir yapıda bulunmakta olup (Şekil 2.1B) bazen bu yapıya ilave olarak küçük bir helezonal kısım da içerebilirler (Şekil 2.1C) (33, 34).  $\beta$  şeridi içeren peptidler birçok bitki ve hayvan türü tarafından sentezlenebilmekte olup birçoğunun antibakteriyel olduğu kadar antifungal aktiviteleri de bulunmaktadır. Bu gruptaki peptidler arasında  $\alpha$  ve  $\beta$  defensinler, protegrinler ve takiplesinler sayılabilmektedir (25).



**Şekil 2.1. Antimikrobiyal peptidlerin sekonder yapıları:** A:  $\alpha$  helezon yapısındaki peptid, B:  $\beta$  şeridi içeren peptid, C:  $\alpha$  helezon  $\beta$  şeridi yapılarının karışımı peptid, D: halka yapısındaki peptid, E: uzun zincirli peptid

### 2.1.3. Halka yapısındaki peptidler

Bu gruptaki peptidlerin en belirgin özelliği yapılarında tek bir disülfit, amid ya da izopeptid bağı ile meydana gelmiş bir halka içermeleridir (Şekil 2.1D). Halka yapısındaki peptidler arasında baktenesin ve tanatin bulunmaktadır (25, 34).

### 2.1.4. Uzun zincirli peptidler

Bu gruptaki peptidler 40 -80 aminoasit uzunluğunda olup yüksek oranda pirolin ya da glisin içerirler. Klasik sekonder yapılardan yoksun olan bu peptidler son şekillerini aminoasitler arasındaki bağlar yerine hidrojen ya da Van der Waals bağlarıyla, membran lipitleriyle aralarında gerçekleşen etkileşim sonucu alırlar (Şekil 2.1E) (25, 34). Uzun zincirli peptidler arasında indolisidin, PR 39 ve profeninler bulunmaktadır (33).

Yukarıda anlatılan sekonder yapılar arasından doğada en yaygın bulunanlar  $\beta$  şeridi ve  $\alpha$ -helezon içeren AMP'lerdir. Bununla birlikte yukarıda söz edilen grupların dışında da bazı AMP'ler bulunmaktadır. Bunlar laktoferrin, bakterisidal permeabilite artırıcı protein (BPI) ya da tavuk ovatransferrin gibi molekül ağırlığı daha büyük olan katyonik proteinlerin proteolitik olarak sindirilmeleri ile meydana gelebilirler. Bu tip peptidlere örnek olarak laktoferrisin B verilebilir (33, 25).

## 2.2. Antimikrobik peptidlerin etki mekanizmaları

Antimikrobik etkili peptidlerin pozitif yüklü ve hidrofobik yapıda olmaları, bu maddelerin bakteri membranyla etkileşime girmeleri için çok önemlidir. AMP'lerin birçoğu bu özelliklerinden dolayı herhangi bir reseptöre ihtiyaç duymaksızın direkt olarak negatif yüklü olan bakteri yüzeyine bağlanarak etkisini gösterir. Bugüne kadar en çok çalışılan AMP'ler hedef hücre zarına etki ederek iki tabakalı lipit tabakasının parçalanmasına neden olan katyonik peptidlerdir. Bu AMP'lerin büyük çoğunluğu hem hidrofilik hem hidrofobik etki gösteren amfipatik karakterli maddeler olup bu tür yapılar AMP'lere, lipid bileşenlerine (hidrofobik kısım) ve fosfolipid gruplarına (hidrofilik kısım) bağlanma yeteneği sağlamaktadır (35).

Araştırmacılar bazı AMP'lerin düşük konsantrasyonlarda membran bütünlüğünü bozmadan da mikroorganizmaları öldürebildiğini kanıtlamışlardır. Bu AMP'ler hücre zarı ile doğrudan etkileşmek yerine DNA replikasyonu ve protein sentezi gibi hücre içerisindeki bazı önemli mekanizmaları inhibe ederek mikroorganizmaları öldürürler (36). Örneğin Buforin II, hücelere difüze olarak, hücre membranına zarar vermeden, DNA ve RNA ya bağlanır (37). Bunun dışında drosocin, pyrrococin ve apidaesin de bu tür AMP'lere örnek olarak verilebilen, 18-20 aminoasit taşıyan ve hücre içi hedeflere karşı aktif olan AMP'lerdir (38, 39).

Yapılan çeşitli çalışmalardan elde edilen bulgular doğrultusunda AMP'lerin etki mekanizmaları, hücrenin membran bütünlüğünü bozmaları (negatif olarak yüklenen hücre zarı ile etkileşim) ve belirli hücre içi hedeflerle etkileşime girmeleri şeklinde ikiye ayrılmaktadır.

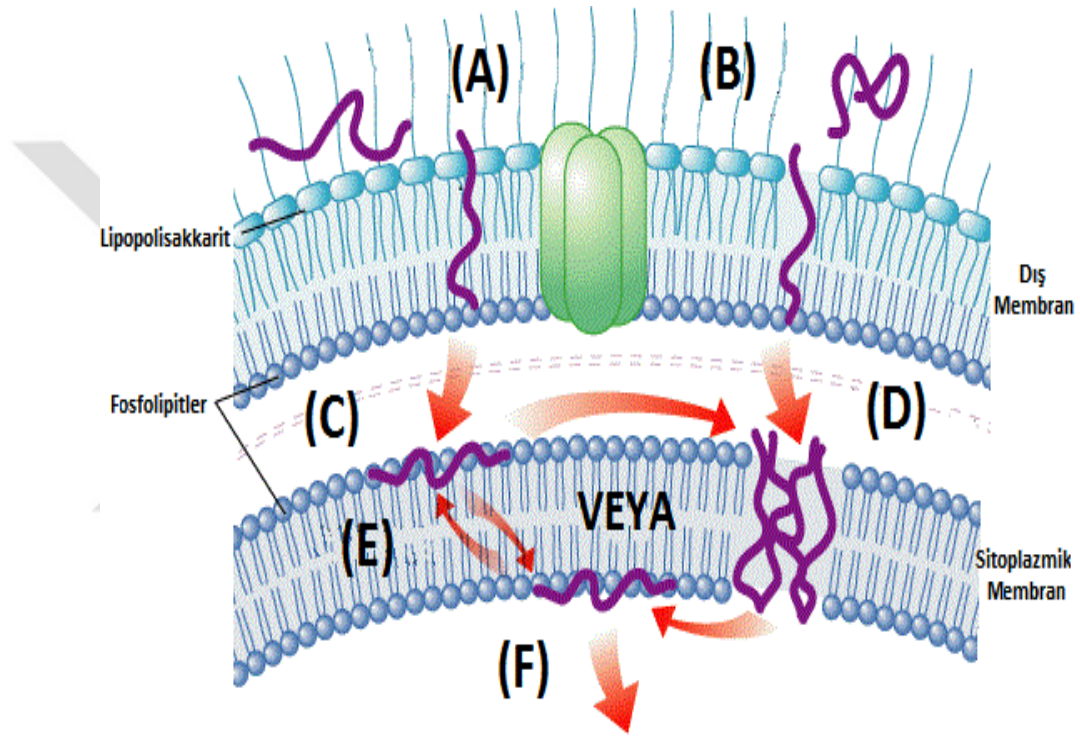
### **2.2.1. Membran Aktif AMP'ler**

AMP'lerin birçoğu pozitif yüklü ve hidrofobik olma özellikleri ile, herhangi bir reseptöre ihtiyaç duymaksızın direkt olarak negatif yüklü olan bakteri yüzeyine bağlanarak etkilerini gösterirler. Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarit (LPS) tabakası ve Gram pozitif bakterilerde bulunan ve asidik bir polisakkarit olan lipoteikoik asit, AMP'lerin bağlanabilmesi için gerekli olan negatif yükü temin eder. Ayrıca bakterilerin fosfolipit yapısındaki iç membranının da negatif yüklü oluşu antimikrobik etkiyi kolaylaştırmaktadır (40).

Memelilerde bulunan ökaryot hücrelerin sitoplazma zarı, bakteri hücresinden farklı olarak fosfatidilkolin ve sfingomiyelin gibi elektriksel olarak nötral, zwitteriyonik fosfolipitlerden yapılmıştır. Bakteri dış membranı ise negatif yüklü fosfatidilgliserol ve kardiyolipinden oluşmaktadır. Ayrıca memeli hücrelerinde kolesterol bulunurken bakterilerin dış membranında bulunmamaktadır. Bu farklılıklar, AMP'lerin insan hücreleri üzerine önemli toksik etkileri olmaksızın bakteriler üzerindeki öldürücü etkilerini açıklamaktadır (41).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki birçok AMP, bakteriler üzerindeki öldürücü etkilerini yapılarına, hidrofobikliklerine, büyüklüklerine veya aminoasit dizilişlerine bağlı olmaksızın küçük miktarda dahi gerçekleştirebilmektedirler. Bu etki AMP'lerin ortak bir mekanizma ile fosfolipit yapısındaki negatif yüklü sitoplazma membranına bağlanması ve bakteriye nüfuz etmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu etkileşimin

sonucunda bakteri hücrenin membranında hücre içi ile dış ortam arasında iyonlar ve sıvılar için bir geçiş yolu meydana gelir. Ancak katyonik peptidlerin sitoplazma membranına ulaşabilmesi için öncelikle Gram negatif bakterilerin LPS içeren dış membranını veya Gram pozitif bakterilerin lipoteikoik asit içeren hücre duvarını geçmeleri gerekmektedir (41, 42).



**Şekil 2.2. Antimikrobiyal peptidlerin bakteri dış ve sitoplazma membranından geçişi:**

- A: AMP lipopolisakkarit tabakasına yapışır ve iki değerlikli katyonları nötralize ederek oluşturduğu çatlaktan içeri girer.
- B: AMP lipopolisakkarit tabakasındaki iki değerlikli katyon bağlanma noktalarına bağlanarak hücre membranını bozar ve dış membrandan içeri girer.
- C: AMP'ler sitoplazma membranına paralel olarak bağlanırlar.
- D: AMP'ler sitoplazma membranında birikerek agregatlar oluştururlar.
- E: Sitoplazma membranında fosfolipitlerin yüzey değişimi ve AMP'lerin kanallar oluşturması,
- F: AMP'lerin sitoplazma membranından geçerek hücre içine taşınması

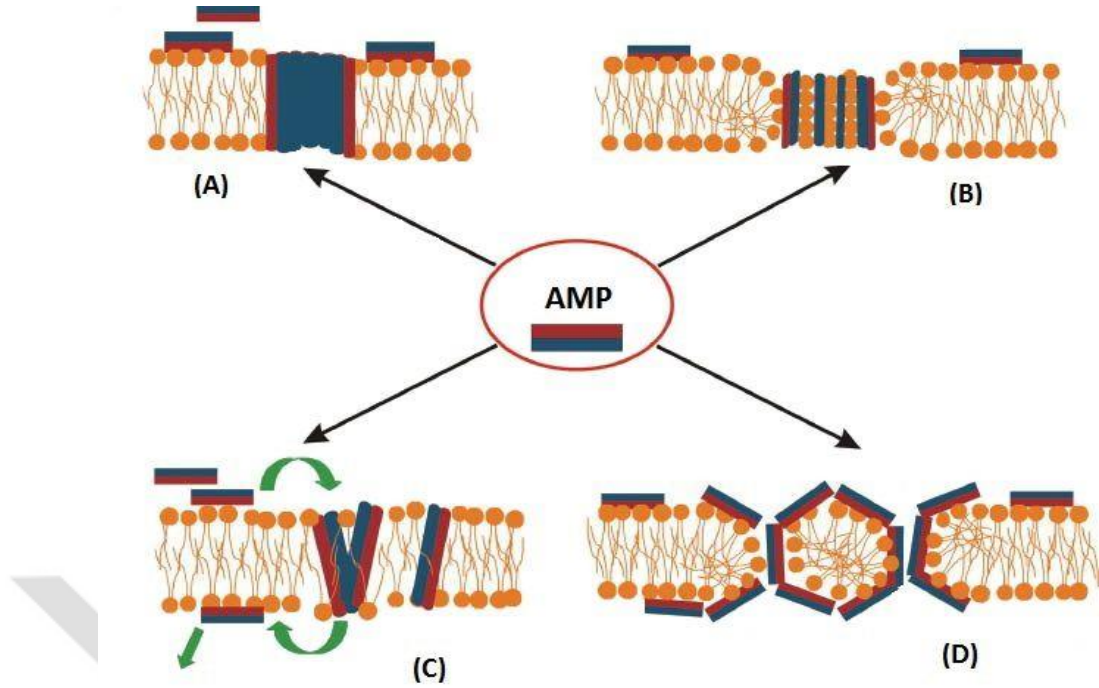
AMP'ler, Gram negatif bakterilerin LPS yapısındaki dış membranını geçmek için aminoglikozitler ve polimiksinler gibi polikationik antibiyotiklerin hücre içine alınmak üzere kullandıkları yola benzer bir şekilde kendi geçişlerini destekleyen yolu kullanırlar. Bu yolla hücre içine girişin mekanizmasına göre pozitif yüklü olan kationik peptid Şekil 2.2A'da görüldüğü gibi ilk olarak negatif yüklü ve polianyonik bir yüzey olan LPS ile etkileşir. AMP'lerin LPS'e olan afiniteleri iki değerlikli katyonlar olan ve LPS'i bir arada tutan  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$ 'dan üç kat daha fazla olduğu için peptidlerle bu iyonlar yarışmalı olarak yer değiştirirler. Bunun sonucunda kationik peptidler hücre yüzeyinde birikerek LPS'i kısmen nötralize eder ve dış membranın normal bariyer bütünlüğünü bozarlar. Bütünlüğünü yitirmiş dış membran bu şekilde hidrofobik yapılar, küçük proteinler, antimikrobik maddeler ve en önemlisi AMP'lerin kendisi için geçirgen hale gelir. Böylece kationik peptidler kendi destekledikleri yolla dış membrandan geçerek fosfolipit yapıdaki sitoplazma membranına ulaşmış olurlar (43). Bu mekanizma aynı zamanda AMP'lerin, LPS'lerin serbest şekilleri olan endotoksinlere bağlanıp bunları inhibe ederek nasıl antiendotoksin aktivitesi gösterdiklerini ve antibiyotiklerle ne şekilde sinerjistik etki oluşturduklarını da açıklamaktadır (44).

AMP'lerin kendi destekledikleri yolla bakterinin dış membranından geçmesi, bu maddelerin öldürücü etkileri için gerekli fakat yeterli değildir. Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için asıl öldürücü olan AMP'lerin negatif yüklü sitoplazma membranı ile elektrostatik olarak etkileşmesidir. Bu olay sırasında kationik peptidlerin hidrofilik grupları ile membran fosfolipitlerinin hidrofobik zincirleri karşı karşıya gelir, peptidler şekil 2.2C'de görüldüğü gibi membrana paralel bir konum alarak membranın bütünlüğünü bozan kanalların oluşmasına yol açarlar (Şekil 2.2E) (42). Bu olayı açıklamak için çok sayıda model membran çalışmaları yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Bu mekanizmalardan başlıcaları Tablo 2.1'de özetlenmiş, Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1 Membran aktif AMP'lerin etki mekanizmaları**

<b>Etkileşim modeli</b>	<b>Mekanizması</b>	<b>Referans</b>
Kilim modeli	AMP monomerleri membran yüzeyine bağlanarak membranı örterler. Daha sonra AMP molekülleri çift tabakalı lipit tabakada porlar oluşturarak deterjana benzer bir etki ile membranın parçalanmasına yol açarlar.	(45, 46)
Membran incelmesi	AMP'ler lipid tabakasının yalnızca bir yüzüne yerleşirler. Bu zincir bölgesinde lipid moleküller arasında bir boşluk meydana gelir. Bu boşluk, bir kuvvet oluşturur ve bunu doldurmak için komşu lipid moleküllerini çeker.	(47)
Miçeller agregat modeli	Değişik sayıdaki peptid molekülü tarafından oluşturulan topluluklar, konsantrasyonlarına ve sitoplazma membranının elektrik potansiyeline bağlı olarak membranda yeniden yerleşirler. Bu topluluklar membran boyunca miçellere benzeyen bölgesel agregasyonlar meydana getirerek iyonların geçişi için normal olarak membranda bulunmayan kanalların açılmasına neden olurlar.	(48)
Toroidal model	AMP'ler lipit membran içinde dikey olarak bulunurlar. Hidrofobik bölgeleri membranın polar grupları ile yer değiştirir. Membranın hidrofobik kısımlarında yarıklar oluşur.	(48, 49)
Fıçı tahtası modeli	Fıçı görüntüsündeki peptid molekülleri hücre zarına ilk olarak paralel hale gelir. Daha sonra fıçı şekli oluşturulur ve AMP'ler çift katlı membran düzlemine dik olarak yerleşirler.	(50)





**Şekil 2.3. Membran model mekanizmaları:** A: Fıçı tahtası modeli, B: Toroidal modeli, C: Miçel agregat modeli, D: Kilim modeli

### 2.2.2. Hücre içinde etkili AMP'ler

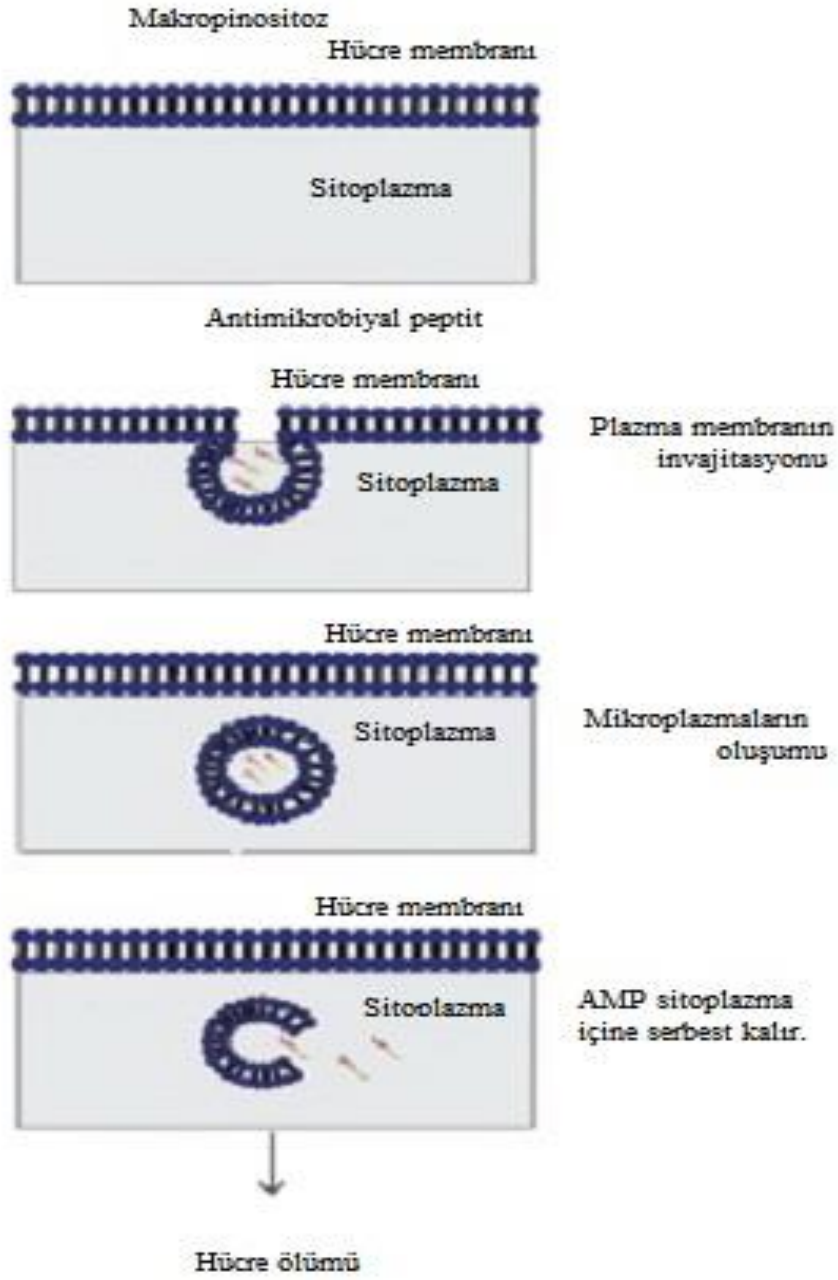
Önceki çalışmalarda genellikle, AMP tarafından bakteriyel hücre zarının geçirgen hale getirilmesinin, öldürmenin asıl mekanizması olduğu düşünülmüş ve AMP'lerin yeterli konsantrasyonlarda kullanılması ile kanallar ve porların açılması suretiyle hücre zarı yapısının bozulmasının mikroorganizmaları öldürebileceği gösterilmiştir. Ancak bazı AMP'ler, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve üzerinde bu etkilerini gösterirken bazılarının MİK'den daha düşük miktarlarda hücre zarı geçirgenliğini bozduğu, bazılarının ise hiç hücre membranını etkilemeksizin hedef hücreleri öldürebildiği gösterilmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda bir grup AMP'nin özellikle hücre içi etkinliğinin bulunduğu ve bunların membrandan ziyade, hücre içindeki hedeflerle etkileşime geçtiği bildirilmektedir (51).

Bir bakteri hücreesindeki toplam proteinlerin üçte biri hücre zarı ile ilgili olup bu proteinler, besin maddelerinin etkin geçişi, solunum, protonları harekete geçirme kuvveti, ATP üretimi ve hücre içi iletişim gibi hücre için kritik olan bazı işlevlere sahiptir (52). Bu proteinlerin işlevleri, hücrenin AMP'lerle etkileşimi ile değişebilmekte ve hücre lizisi oluşmasa dahi hücre fonksiyonlarında bozulma ve ölüm

gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle AMP'lerin hızlı öldürücü etkileri, yalnızca hücre membran bütünlüğünün bozulmasından dolayı değil, aynı zamanda bazı işlevsel proteinlerin inhibe edilmesinden ileri gelmektedir. Örneğin, domuz bağırsağından elde edilen PR-39 prolitik etki ile protein ve DNA sentezini durdurarak, non-litik bir süreç ile bakteri hücrelerini öldürmekte, indolisin ise stoplazmaya geçip DNA'daki belirli bir bölgeye bağlanarak etki göstermektedir (53-55). İnsan bağırsak sistemlerinden salgılanan AMP'ler olan tPMP-1 ve aHNP-1, bakteri hücrelerine girdikten sonra bir saat içinde DNA ve protein sentezini inhibe etmekte olup apidaesin de benzer şekilde, por oluşturmak yerine protein aracılı aktif taşıma ile stoplazmaya geçerek bir dizi moleküler etkileşimle protein sentezini inhibe etmektedir (56).

Bir grup hücre içi etkinliği olan AMP, bakteriye ait proteaz enzimini inhibe ederek etkinlik göstermektedir. Örneğin histatin 5 adlı peptid, gingivaliste etkili olan proteazı inhibe ederek bakterinin periodontal dokudaki yıkımını durdururken (57), eNAP-2'nin de mikrobiyal serin proteazlara karşı anti-proteaz etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (58). Hücre içi etkinliği olan AMP'lerden bazıları da çoklu hedeflere sahiptir. Örneğin seminal plazmin, RNA polimerazı inhibe ederek birçok antimikrobiyal maddeye oranla çok daha düşük konsantrasyonda RNA sentezini durdurabilmektedir (59). Diğer yandan, aynı AMP hedef hücredeki otolizin proteinini etkinleştirerek bakteriyi otolize yönlendirebilmektedir (60).

AMP'lerin yukarıda bahsedildiği şekilde çeşitli hücre içi mekanizmaları engelleyerek etki gösterebildiğinin anlaşılması ile bu AMP'lerin hücre içine alımı ile ilgili çeşitli teoriler geliştirilmiştir (61). Bu mekanizmalar arasında en fazla kabul gören iki teori direk penetrasyon ve endositozdur. Jones'a (62) göre, AMP'lerin endositoz ile hücre içine girişinde makropinositoz ve reseptöre bağımlı endositoz mekanizmaları yer almaktadır (Şekil 2.4). Makropinositozda hücre zarı içe doğru bükülerek, dinamin proteinlerinin de yardımı ile AMP'leri içlerine alan kabarcık şeklinde oluşumlar meydana gelmektedir. Bu kabarcıklar makropinozom olarak adlandırılır ve etraflarındaki tek katmanlı zar yapısı ile küçük hücreler gibi görünürler (63). Reseptör bağımlı endositoz mekanizmasında ise, zarın bir kısmı çukur oluşturmakta ve ardından klattrin ve kaveolin proteinleri ile kaplanmaktadır. Daha sonra, bu proteinlere bağlanan AMP'leri de içlerine alan çukurlar, zardan hücre içine kadar gelişmeye başlar ve makropinositozda olduğu gibi kabarcık şeklindeki yapıları oluştururlar (62, 64).



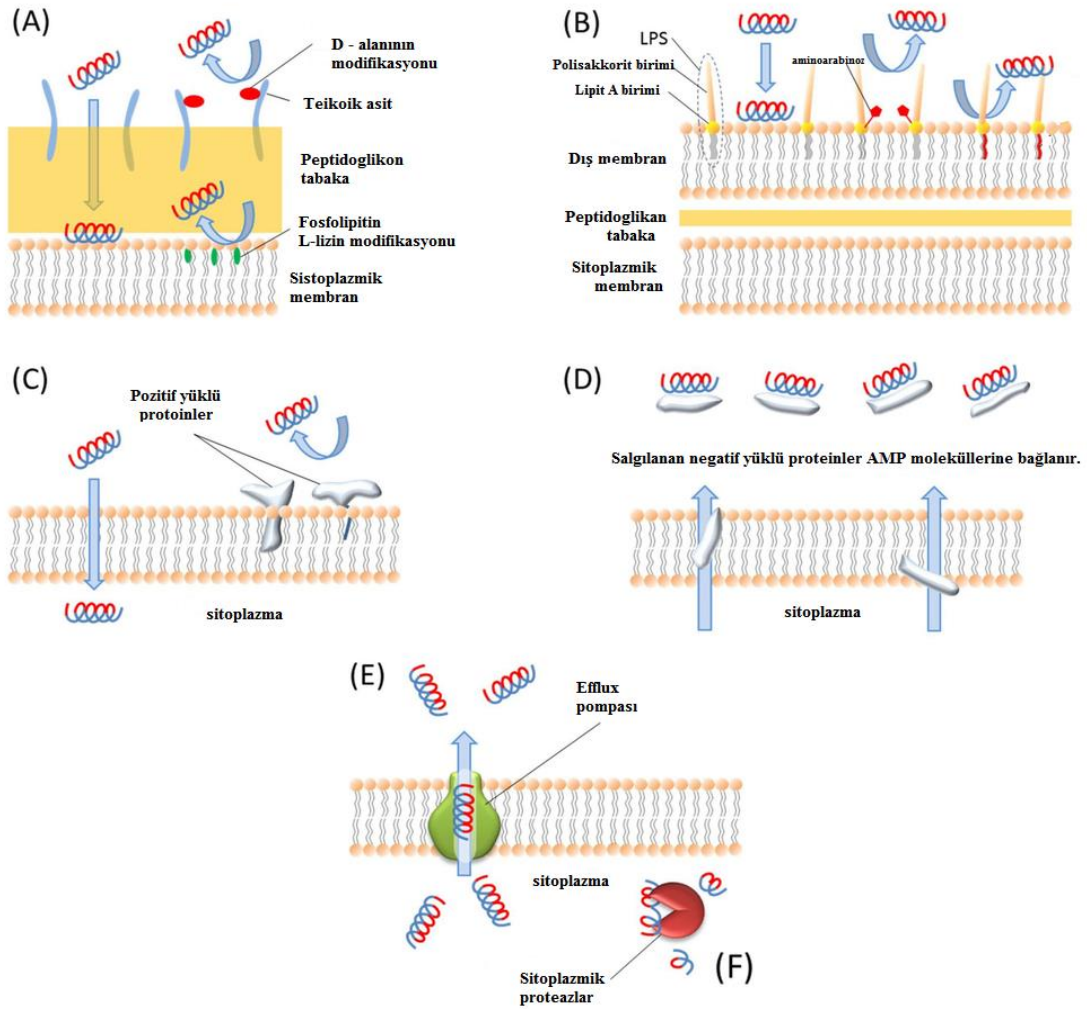
Şekil 2.4. AMP'lerin hücre içine alınma mekanizmaları

Genel olarak bir AMP, mikroorganizmaların bakteri ya da mantar gibi sadece bir sınıfına karşı etkilidir. Fakat bazı AMP'ler aynı anda farklı türde mikroorganizmalara karşı farklı etki mekanizmaları ile etkili olabilmektedir. Örneğin, indolisidin bakteri, mantar ve HIV'e karşı etkilidir. Bu madde antifungal aktivitesini hücre zarına zarar vererek sergilerken, hücre içine girip DNA sentezini engelleyerek bakterilere, integraz enzimini inhibe ederek ise HIV'e karşı etkinlik göstermektedir (65, 66). AMP'ler genellikle çok ilaca dirençli bakterileri de antibiyotik dirençlerinden bağımsız olarak öldürebilmektedir. Örneğin, nisin de vankomisin gibi hücre duvar sentezini engelleyerek etki göstermesine rağmen, MRSA suşlarının vankomisine dirençli iken nisine karşı ise duyarlı oldukları bildirilmiştir (67).

### **2.3. Antimikrobik peptidlere direnç mekanizmaları**

AMP'lerin antibiyotiklerden farklı etki mekanizması ve hedef aldığı çeşitli hücre içi yapılar nedeniyle bunlara karşı direnç gelişmesi kolay olmasa da bu durumun hiçbir zaman meydana gelmeyeceğini söylemek gerçekçi değildir. Bununla birlikte bazı mikroorganizmalar da yapısal özellikleri ile AMP'lere karşı doğal olarak dirençlidirler. Bu şekilde AMP'lere doğal direnç gösteren bakteriler arasında *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* ve *Burkholderia* türleri sayılabilmektedir (18). AMP'lerin potansiyel klinik kullanımlarını ve etki mekanizmalarını sınırlayabilecek en önemli durumlardan bir diğeri de, bunların vücutta bulunan proteinazlarca inaktive edilmeleri ve bu nedenle ortaya çıkabilecek dirençli mutantların oluşumudur (68).

Birçok çalışmada katyonik peptidlere karşı gelişen direncin virülans genleri ile ilgili olduğu varsayıyorsa da bu düşünce her zaman geçerli değildir (18, 69). Bu konuda yapılan çalışmalar, AMP'lere karşı yapısal ve uyarılabilir direnç olmak üzere iki ana direnç mekanizmasının bulunduğunu göstermiştir (18). Yapısal direnç mekanizmaları arasında elektrostatik koruma, hücre büyümesinin farklı aşamalarındaki zar potansiyeli değişiklikleri ve biyofilm oluşumunu yer almaktadır. Uyarılabilir direnç mekanizmaları ise zar moleküllerinin substitüsyonunun değişimini ve açılmasını, bazı proteolitik enzimlerin aktivasyonunu, efflux pompasını ve hücre içi hedeflerin değişimlerini içerir (18, 70, 71). AMP'lere karşı geliştirilen bu direnç mekanizmaları, şekil 2.5'te şematize olarak gösterilmiştir.



**Şekil 2.5. AMP direnç mekanizmalarının şematik gösterimi:** (A) Gram-pozitif bakteriler, teikoik asitin ve fosfolipitlerin modifikasyonu.(B) Gram-negatif bakterilerde lipopolisakkarit moleküllerinden Lipit A'nın aminoarabinoz ya da açillenme modifikasyonu. (C) Bakterilerin bazı pozitif yüklü proteinler eksprese ederek bunları membrana entegre etmesi.. (D) Bakterilerin negatif yüklü iyonlar üreterek bu iyonları ekstraselüler yapıda saklayarak. (E) Efflux pompası ile dışarı atılması(F) Hücre içindeki AMP'lerin preteaz enzimleri ile degregasyona uğraması.

Çeşitli AMP'lere karşı gelişebilmekte olan uyarılabilir direnç mekanizmalarına örnek olarak *S. aureus*'un bazı AMP'lere olan direnci verilebilir. Bu AMP'lerin bazı *S. aureus* suşlarına karşı olan etkinliği, bakterinin hücre yüzeyinde bulunan adezin moleküllerinin inhibe edilmesine gerçekleşmektedir. Bu adezin molekülleri, polimerik substratlardır ve salgılandıktan sonra hücre yüzeyinde kalan pozitif yüklü polimerler oldukları için, yine pozitif yüklü olan AMP'lere karşı elektriksel olarak itici bir güç

oluşturabilirler (72). Bir başka örnek olarak da *Salmonella typhimurium*'un AMP'lere karşı kendini savunmada kullandığı, genetik olarak kodlanan ve hücre zarına bağlı bulunan bir lipid A değişim sistemi verilebilmektedir (73). Bu sistemde PhoQ, zara bağlı bir sensor kinaz ve PhoP ise, hücre içi müdahale düzenleyicisidir. PhoQ, hücre dışında bulunan yüksek miktardaki pozitif yükün varlığı ile etkinleşir ve AMP direnciyle ilişkili oldukları belirlenen bazı genlerin yeniden düzenlenmesine neden olan PhoP'yi fosforile eder. Bu sistem,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  gibi iki değerli katyonların hücre dışındaki miktarları düşük yada normal olduğunda ise etkin değildir (74).

Bakteriler tarafından AMP'lere karşı geliştirilen dirençte rol alan mekanizmalar da antibiyotik direnç mekanizmalarında olduğu gibi maddelerin hücreye girişinin engellenmesi, hücreden dışarı atılmasını, enzimatik olarak inactive edilmesi yada hücredeki hedef moleküllerin değişikliğe uğratılması gibi mekanizmaları içermektedir.

### 2.3.1. Hücre içine girişin engellenmesi

Gram negatif bakterilerde dış membranın ana bileşenini LPS'ler oluşturur ve katyonik peptidler etkilerini LPS'e bağlanıp kendi geçişlerini denetleyen yolu kullanarak bakteri hücrelerine girmeleri sonucunda gösterirler. Katyonik peptidlerle LPS arasında elektrostatik olarak gerçekleşen bu tanıma ve bağlanma olayının engellenmesi LPS'in bulunmaması ile olabilir ki, buna örnek olarak bakterisine dirençli *Borrelia burgdorferi* suşları verilebilir (75). Bir diğer direnç gelişimi LPS'de bulunan fosfat gruplarının esterlenmesi ile negatif yükün azalması şeklinde olabilir ki buna örnek olarak da katyonik peptidlere karşı doğal olarak dirençli bakteriler olan *Proteus* ya da *Burkholderia* türleri verilebilir (76, 77). Ayrıca, Gram negatif bakterilerin dış membranından geçerken önemli bir giriş yolu olan LPS'e bağlanmak yerine bazı peptidlerin membranın diğer bileşenlerini tercih etmeleri bunların etkisiz kalmalarına neden olabilmektedir. Buna örnek olarak patojen *Yersinia* türlerinin defensinlere ve poliLys, poliOrn, sekropin PI, melittin ve polimiksin B'ye karşı gösterdikleri direnç verilebilir (78). Ayrıca *Haemophilus influenzae*'nin dış membranında yer alan LPS'in yapısında fosforilkolinin bulunmasının, LL-37/hCAP18 peptidine karşı direncin gelişmesine etkisinin olduğu gösterilmiştir (79). *Leishmania*'da potasyum gradientinin düşürülmesi ile membranın elektriksel potansiyelinin değişmesi sekropin A-melittin hibritinin aktivitesini düşürmekte (80), benzer şekilde yüksek düzeydeki tuz konsantrasyonu da elektrostatik etkileşmeyi inaktive etmekte ve özellikle *P.*

*aeruginosa*'ya karşı başta polimiksinler olmak üzere çeşitli AMP'lerin aktivitelerini azaltmaktadır (81).

AMP'ler esas hedeflerine ulaşabilmek için öncelikle bakterilerin peptidoglikan tabakasını, anyonik yapıdaki oligosakkarit zincirleri ya da ökaryotik hücrelerin ekstraselüler matriksi gibi çeşitli bariyerleri geçmek zorundadır. Bunlardan ekstraselüler matriksin belli başlı yapısını oluşturan heparin, defensinlerin tümörisidal aktivitesini ve sekropin A-mellitin hibritinin nüfuz etme yeteneğini inhibe etmektedir. Benzer şekilde eritrositlerin membran glikoproteinlerinde bulunan siyalik asit, magainin ve mellitine karşı direncin oluşmasına neden olmaktadır (82). Gram pozitif bakteriler olan *S. aureus* ve *S. xylosus*'un lipoteikoik asitlerinde bulunan D-alanin gruplarının esterlenmesi sonucu bu suşların defensinler, protegrinler, takiplesin ve magainin II gibi çeşitli katyonik peptidlere karşı dirençli hale geldikleri bildirilmiştir (83). Membranda bulunan anyonik fosfolipitlerin düşük miktarda bulunmaları da AMP'lere karşı doğal olarak dirençli olan *Serratia* türleri ya da çeşitli Gram negatif bakterilerin spheroplast şekillerinde görülen direncin mekanizmasını açıklamaktadır (84).

### 2.3.2. Peptidlerin proteolizi

Peptidlerde bulunan yüksek miktardaki bazik yapılı aminoasitler, tripsin ve benzeri proteinazlar tarafından kolayca parçalanabilmektedir. Patojen bakteri türlerinde bulunan proteinazların seviyesi ile bu bakterilerin virülanslıkları orantılıdır. Örneğin, bazı *P. aeruginosa* türleri ve balarılarında bulunan *Bacillus larvae* gibi patojenlerde sekropine özgü parçalayıcı enzimler bulunmaktadır (85). Benzer şekilde *Salmonella*'larda magainine karşı magaininaz benzeri aktiviteye sahip metalloproteinazlar ve *S. enterica*'da katelisinine karşı etkili proteazlar tanımlanmıştır (86). Ayrıca *E. coli* ve *S. aureus*'da laktoferrisin B'ye karşı görülen direncin de proteazlarla bağlantılı olduğu gösterilmiş, bunun yanı sıra *S. aureus*'da LL-37'yi parçalayan areolizin adlı metalloproteinaz tanımlanmıştır (87, 88).

### 2.3.3. Peptidlerin hücre dışına pompalanması

Bazı bakterilerde, hücre dışına pompa sistemi olarak adlandırılan ve protonların itici gücüne bağlı olarak çeşitli antibiyotiklere, organik boyalara ve dezenfektanlara karşı direnç görülmesine neden olan sistemler tanımlanmıştır. Aynı şekilde antimikrobik etkili katyonik peptidlerin de peptidin hücre içine girip öldürücü etkisini göstermesine fırsat vermeden hücre dışına pompalanmasını sağlayan sistemler

tanımlanmıştır. Örneğin, *Neisseria gonorrhoeae*'da görülen protegrin, takiplesin ve LL-37 direnci, diğer çoğul ilaç direncini sağlayan pompalar gibi çalışan ve mtr genine bağlı bir hücre dışına pompa sisteminden kaynaklanmaktadır. *Yersinia* türleri ve Stafilokoklar için de benzer bir mekanizma ortaya çıkarılmıştır (18, 86, 89).

#### **2.3.4. Hücre içindeki hedeflerin değişikliğe uğraması**

Bazı AMP'ler öldürücü etkilerini çeşitli hücre içi bileşenlerini etkilemek suretiyle göstermekte olup bu hedeflerde meydana gelebilecek değişiklikler AMP'lerin etkisini engelleyebilmektedir. Örneğin, *E. coli*'deki gyrB geninde meydana gelen bir mutasyon, mikrosin B17'nin hedef aldığı DNA giraz enziminde değişiklik yaparak bakterinin bu maddeye karşı duyarlılığını belirgin bir şekilde azaltmasına yol açmaktadır (18, 90).

Bilindiği gibi, ilk keşfedilen antibiyotik olan penisilin klinik kullanıma girmesinden hemen sonra bu maddeye karşı direnç gelişebildiği de ortaya konulmuştur. Penisilin, ilaç olarak kullanılmaya başlandığı sıralarda doğada kendisine karşı dirençli mutantların gelişimine izin verecek kadar fazla miktarda sentezlenmemekteydi. Ancak penisilinlerin yaygın şekilde kullanılmaya başlanmasının ardından dirençli suşlar seçilerek hızla çoğalmaya başlamış, sonradan keşfedilen diğer antibiyotik grupları da benzer bir akıbete uğramışlardır. AMP'ler ise milyonlarca yıldır doğada birçok canlı tarafından bol miktarda sentezlenerek kullanılmış ancak buna rağmen bu maddelere karşı önemli bir direnç gelişimi söz konusu olmamıştır. Çeşitli bakterilerde AMP'lere yönelik direnç sağlayan bazı mekanizmalar bulunmasına rağmen, bakteri membranının genel çift tabakalı lipid yapısı, bakterilerin AMP'lere karşı tam bir direnç geliştirmesini zorlaştırmakta olup, bu nedendir ki AMP'lere karşı bildirilen direnç, antibiyotik direnci kadar güçlü ve yaygın değildir. Bu durum, gelecekte de AMP'lerin ciddi bir direnç problemi ile karşılaşmaksızın önemli bir antibiyotik grubu olarak insanlığa hizmet edeceğinin göstergesidir (91).

#### **2.4. Antimikrobik peptidlerin klinik kullanımları**

AMP'ler bakteriler, mantarlar, bazı parazitler ve virüsleri de içine alan çok geniş bir etki spektrumuna sahip, çeşitli patojenlere karşı hızlı öldürücü etki gösterebilen, direnç gelişme potansiyeli düşük ve hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığı düzenleyici etkileri bulunan maddelerdir. Sahip oldukları bu avantajları nedeniyle, özellikle de antibiyotik direncinin tehdit edici boyutlara ulaştığı şu dönemlerde,



AMP'lerin tedavi edici potansiyellerinden yararlanmak için önemli çabalar sarfedilmektedir. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi amacıyla yeni antimikrobiyal maddelerle ilgili arayışta olan birçok ilaç şirketi, bu AMP'lerden biri yada birkaçını bir an önce pazara sokma gayreti içindedir. Son araştırmalar genellikle, doğal AMP'lerin biyolojik olarak aktif olan çekirdek bölgelerini içeren, nispeten küçük molekülü ve uygun maliyetli yarı sentetik moleküller üzerinde durmaktadır. Bu kapsamda birçok firma tarafından üretilen çeşitli sentetik yada yarı sentetik AMP türevleri, erken klinik öncesi çalışmalardan klinik çalışmaların faz III evresine kadar, ilaç gelişiminin çeşitli aşamalarında yer almakta olup bu maddelerle ilgili bilgiler tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2'de de görüldüğü gibi AMP'lerin klinikteki kullanım alanlarını bulmakla ilgili çok sayıda çalışma devam etmekle birlikte bu çalışmalardan bazıları biraz daha ön plana çıkmaktadır. Bunlar arasında bir magainin türevi olan **MSI-78** (Cytalex; Magainin Pharmaceuticals Inc., Plymouth Meeting, Pa/ MacroChem.) ile yapılan faz III klinik çalışmalarında bu maddenin etkisi toplam 926 polimikrobik diyabetik ayak ülseri bulunan hasta üzerinde topikal olarak denenmiştir. Sonuçta, uygulanan bu tedavinin oral ofloksasin tedavisiyle eşdeğer olduğu ve çok daha az yan etkinin görüldüğü bildirilmiştir (92). Benzer şekilde **Omiganan** (MX-226/CSL-001) ile yürütülen iki ayrı Faz III klinik çalışması tamamlanmıştır. 3000'den fazla hastada kateter kolonizasyonunu azaltmak ve mikrobiyolojik olarak doğrulanan tünel enfeksiyonlarının azaltılmasında ilk kez istatistiksel olarak anlamlı etkinlik ortaya koyulmuştur (93).

Protegrin benzeri bir peptid olan **IB-367** ile yapılan faz I klinik çalışmalarında bu madde, sağlıklı kişilerde ağızdaki mukoza iltihabına neden olan mikroorganizmalar üzerine lokal olarak kullanılmıştır. Sonuçta IB-367'nin Gram pozitif bakteri yükünü  $10^3$  kat düşürdüğü, Gram negatif bakteri ve mayaların sayısında da belirgin bir azalma meydana getirdiği, bunun yanı sıra herhangi bir yan etkisinin ise görülmediği bildirilmiştir (94). Aynı madde ile yapılan faz III klinik çalışmalarında ise bu maddenin aerosol formu sağlıklı kişilerde ve *P. aeruginosa*'nın etken olduğu akciğer enfeksiyonu bulunan kistik fibrozlu hastalarda denenmiştir. Elde edilen bulgular IB-367'nin hasta grubunda bulunanlarda bakteri yükünü oldukça azalttığını, bunun yanı sıra önemli bir yan etkisinin bulunmadığını göstermiştir (95).

**Tablo 2.2. Çeşitli klinik çalışma aşamalarda bulunan AMP'ler (92-99)**

<b>Peptid adı</b>	<b>Tanımı</b>	<b>Kullanım amacı</b>	<b>Şirketi</b>	<b>Faz çalışması</b>
Omiganan (MBI-226, MX-226, CLS-001)	İndolisidin'in sentetik analogu	Kateter infeksiyonlarının, şiddetli akne ve roseceanın önlenmesinde topikal antiseptik	Mıgenix/BioWest therapeutics Cutanea Life Sciences	III/II
Pexiganan (MSI-78)	Maganin 2'nin sentetik analogu	Topikal antibiyotik-diabetik ülserlerde	MacroChem	III
Isegranin (IB-367)	Protegrin 1 türevi	Oral mukozitten korunmada	Ardea Biosciences	III
LTX-109	Peptidomimetik	Topikal antibiyotik-Kolonize olmuş nazal MRSA	Lytic Biopharma	I/II
hLF1-11	Lactoferrin türevi	Bakteriyemi ve mantar enfeksiyonlarında	AM Pharma	I/II
OP-145	LL-37 türevi	Kronik orta kulak tedavisinde	Octoplus	II
Novexatin - NP213	Siklik arginin bazlı heptamer	Fungusidal	Novabiotics	II
NVB302	B sınıfı lantibiyotik	Clostridium difficile	Novacta (Welwyn Garden City, UK)	I
MU1140	Lantibiyotik	Gram pozitif bakteriler (Clostridium difficile, MRSA)	Oragenics (Tapma, Florida)	Klinik öncesi
Arenicin	21 aarjinin ve hidrofobik aa lerce zengin	Çoklu dirençli Gram pozitif bakteriler	Adenium Biotech Copenhagen	Klinik öncesi
Avidocin ve purocin	Pseudomonas aeruginosa'dan modifiye edilmiş R-tipi bakteriyosinler	Dar spektrumlu antibiyotik	AvidBiotics (S.San Francisco, California)	Klinik Öncesi
IMX 924	Sentetik 5-aminoasit peptidi	Gram pozitif ve negatif bakteriler	Iminex (Coquitlam, British Columbia, Canada)	Klinik Öncesi

**Lytixar (LTX-109)**, elektostatik etkileşimler ile hücre lizisine ve ölümüne neden olur. MRSA'ların nazal dekolonizasyonunun topikal tedavisinde etkinliğini kanıtlamıştır. Faz 1 ve 2 çalışmalarında iyi tolerans ve asgari düzeyde bir sistemik biyoyararlanım göstermiştir. Geniş bir bakteri yelpazesine karşı in vitro antimikrobiyal aktivitesi ile MRSA, VRE ve MDR *Pseudomonas* suşlarına, aynı zamanda hifli mantarlara ve maya mantarlarına karşı çok iyi bir etkinlik göstermektedir. Direnç gelişimine düşük eğilim göstermektedir. Fungal ve bakteriyel biyofilmlerde karşı etkili olduğu saptanmıştır (96).

Siklik arginin bazlı heptamer olan **Novexatin (NP213)** faz I ve faz II çalışmaları devam eden fungisidal etkili maddedir. Novexatin onikomikoz tedavisi için topikal olarak formülize edilmiş olup, tırnak mantarı enfeksiyonuna sebep olan mantarları öldürerek tırnak görüntüsünü hızlı bir şekilde düzelttiği iddia edilmiştir. Boyut, yük, hidrofiliklik ve siklik yapı özellikleri moleküle hızlı penetrasyon sağlarken, sistemik olarak deri yoluyla emilimini de önlemektedir (97).

B tipi lantibiyotikler sınıfının bir üyesi olarak geliştirilen **NVB 302** maddesi Faz I çalışmalarında olup, 64 sağlıklı gönüllünün katıldığı tek bir artan doz ve çoklu artan doz çalışmalarında, sorunlu hipervirülan suşlar dahil olmak üzere *Clostridium difficile*'ye karşı güçlü etkinlik, normal bağırsak florasındaki *C.difficile* suşları için geliştirilmiş seçicilik gösterilmiştir. Ayrıca *C. difficile* ile oluşturulmuş hayvan modellerinde etkin, hedef bölgede yüksek seviyelere ulaşan, iyi tolere edilen, üstün prognoz özellikleri ile umut verici bir aktivite sergilediği gösterilmiştir (98).

**MU1140**, *Streptococcus mutans* suşundan türetilmiş, tip A (I) lantibiyotiklere ait bir peptidtir. Ribozomal olarak sentezlenir, 19 ila 34 amino asit arasında değişiklik göstererek geniş translasyon sonrası modifikasyon sağlamaktadır. Belirleyici özelliği, doğada fazla bulunmayan amino asitler ve diğer işlevsel gruplar olan lanthionine (LAN) veya metillanthyonin (MeLan) taşımasıdır. Klinik öncesi çalışmalarda MRSA, VRE, *C. difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* ve şarbon da dahil olmak üzere, birçok patojen Gram pozitif bakteriye karşı etkinlik göstermiştir (99).

## 2.5. Çalışmada kullanılan antimikrobik peptidler

### 2.5.1. Temporin A

Temporin A *Rana temporaria* türü kurbağaların (Kırmızı Avrupa kurbağası) epitel hücrelerinde bulunan yüksek derecede hidrofobik bir AMP çeşididir. Temporinler amfipatik  $\alpha$ -helikal polipeptidler olup genellikle 10–14 amino asit uzunluğunda ve yalnızca bir ya da iki adet pozitif yüklü amino asit içeren peptidlerdir (100). Hayvanlardan izole edilen en küçük AMP'lerden biri olan Temporin A, 21 amino asit içeren temporinler grubunun bir üyesidir. Temporin A, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı etkili bir madde olup bakterisidal aktivite gösterdiği konsantrasyonlarda insan kırmızı kan hücreleri üzerine toksik etkisi bulunmamaktadır. Temporin A'nın bakteriler üzerine olan öldürücü etkisini açıklamak üzere çeşitli hipotezler ortaya konulmuştur. Buna göre önce hücre membranının hidrofobik kor kısmının içine girmekte, bakteriyal fosfolipitlerin anyonik kısımları ile etkileşerek DNA'ya bağlanmak ya da enzim aktivitesini engellemek suretiyle etki göstermektedir (101). Temporin A, sentetik olarak katı faz peptid sentezleme yöntemleri ile sentezlenebilmektedir. Yapılan klinik çalışmalar göstermiştir ki, saf olarak elde edilen bu sentetik peptid birçok Gram pozitif bakteri türüne ve özellikle MRSA ve MSSA suşlarına karşı orta / iyi derecede aktivite göstermekte, ancak *Enterococcus faecium*'un VRE suşlarına karşı daha zayıf bir aktivitesi bulunmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda da gösterilmiştir ki, primer yada sekonder yapıları modifiye edilmiş sentetik analoglar üreterek doğal peptidler ile antimikrobik aktiviteyi arttırırken, ortaya çıkabilecek toksisite riskini de azaltmak mümkün olabilmektedir (102).

### 2.5.2. Apidaesin 1B

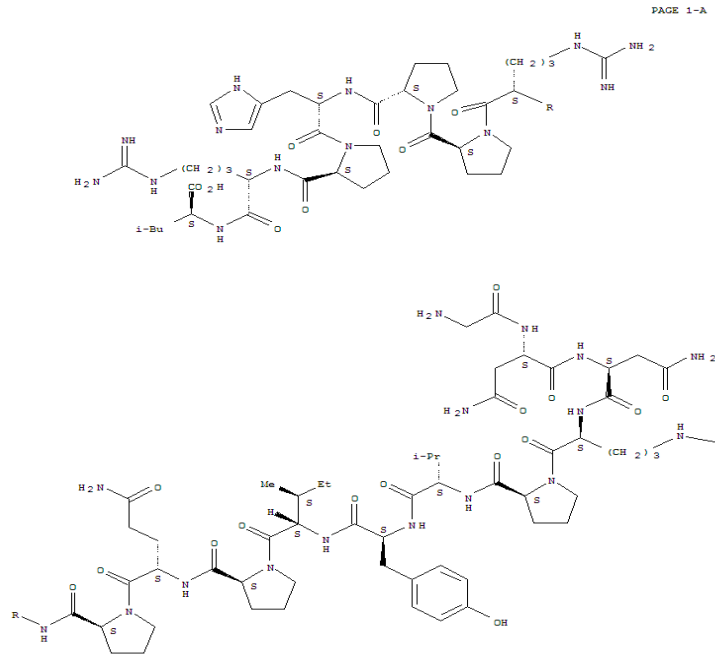
Apidaesinler prolin ve arginin açısından zengin AMP'ler arasındaki bugüne kadar bilinen en yaygın grubu oluşturmaktadır. Apidaesin 1B'nin de içerisinde bulunduğu tüm apidaesin türü peptidler sığır nötrofilinde ve domuz bağırsağında bulunan ya da böcekler tarafından üretilen ve şekil 2.6'da da görüldüğü gibi 18 ila 20 amino asit içeren moleküllerdir (56). Apidaesinler yapısal olarak iki bölgeden oluşurlar. Bunlardan biri genel antibakteriyel aktiviteden sorumlu olan sabit bölge, diğeri ise antibakteriyel etki spektrumunun genişliğinden sorumlu olan değişken bölgedir.

Apidaesinlerin bakteriyel proteinler üzerinde sterospesifik etki ile bakterileri öldürdükleri öne sürülmekte olup etki mekanizması, peptidlerin bir dış zar bileşenine

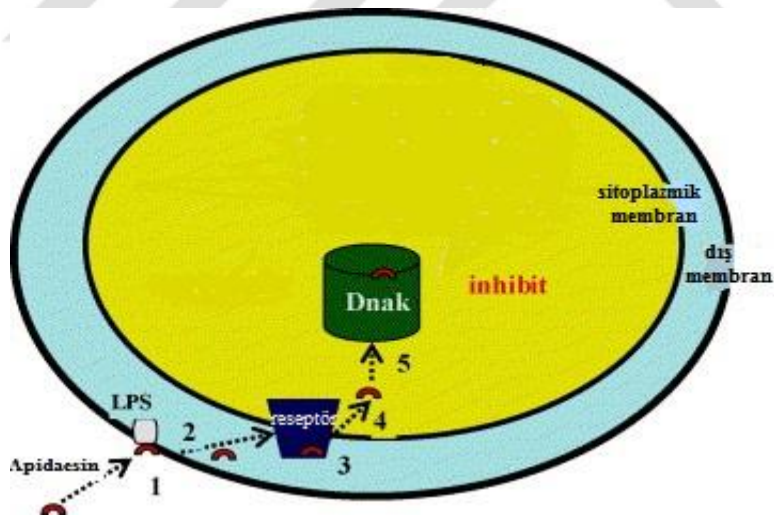
spesifik olmayan bağlarla bağlanması ile başlar. Apidaesinlerin kuvvetli pozitif yükleri, Gram negatif bakterilerin negatif yüklü dış membranları ile spesifik olmayan bir biçimde etkileşime girmektedir. Bu bağlanmayı periplazmik boşluğun istilasının takip ettiği ve özel bir reseptör molekülü ile geri dönüşümsüz olarak bağlanarak iç membranda bulunan permeaz tipi bir taşıyıcı sistemi yardımıyla peptidin, nihai hedefi olan hücrenin iç kısmına yerleştiği düşünülmektedir. Ancak apidaesinlerin hücrelere nihai olarak ne şekilde girdikleri, hala üzerinde çalışılan bir konudur.

Otvos ve ark. (38) apidaesin, pitriosin ve drososin adlı AMP'lerin bakteriyel LPS tabakasına, 70 kDa ısı şok proteini DnaK'ya spesifik bir şekilde, 60 kDa şaperon (proteinlerin katlanarak üç boyutlu hâle gelmesi işlemi için yer alan refakatçi proteinler) GroEL'e ise non spesifik olarak bağlandıklarını gözlemlemişlerdir. Peptidin DnaK'ya bağlanabilmesinin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği gibi DnaK proteini *E.coli*'de, ATPaz ve otofosforilasyon aktivitesi ve bakterinin yaşamda kalması için çok önemli olan DNA sentezinin başlangıcında görev almaktadır (103). Bu gözlemler, DnaK proteininin apidaesinler için nihai hedef olabileceğini düşündürmekte olup apidaesinler de dahil olmak üzere birçok küçük prolin açısından zengin AMP'nin DnaK'nın iki ana işlevini inhibe ederek bakterileri öldürdükleri sonucuna varılmıştır. Bu işlevlerden biri ATPaz aktivitesi, diğeri ise yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanmasını inhibe etmeleridir.

Apidaesinler, bitki ve hayvan hücreleri için toksik etki göstermediklerinden dolayı, yeni antibiyotik ilaçların bileşiminde yer almak için oldukça uygun moleküllerdir (104).



Şekil 2.6 Apidaesin 1B'nin yapısı



Şekil 2.7 Apidaesinin etki mekanizması:

- 1: Apidaesin ilk dış membran komponentine (muhtemelen LPS tabakasına) non spesifik olarak bağlanır.
- 2: Perioplazmik boşluğa yayılır.
- 3: Sitoplazmik membran üzerindeki reseptör molekülüne (permeaz tipi taşıyıcı sistemin en muhtemel birleşeni) spesifik ve geri dönüşsüz olarak bağlanır.
- 4: Hücre içine transloke olur.
- 5: Hedef DnaK proteinine bağlanır. ATPaz aktivitesini ve katlanan DnaK proteinlerinin yeniden katlanma yeteneğini inhibe eder (105).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Antimikrobik maddeler ve çözeltileri

Çalışmamızda çeşitli antibiyotikler ve antimikrobik etkili katyonik peptidler kullanılmıştır. Antimikrobik etkili katyonik peptidlerden temporin A (aktivitesi % 99) ve apidaecin 1B (aktivitesi % 96) Anaspec tarafından; antibiyotiklerden doksisisiklin (aktivitesi 992 µg/mg) Eczacıbaşı İlaç Sanayii ve Ticaret A.Ş., eritromisin (aktivitesi 850 µg/mg) Sigma-Aldrich, klindamisin (aktivitesi 862 µg/mg), piperasilin (aktivitesi 996 µg/mg) ve sefotaksim (aktivitesi 920 µg/mg) Bilim İlaç San. ve Tic. A.Ş., linezolid (aktivitesi 1000 µg/mg), vankomisin (aktivitesi 1000 µg/mg), meropenem (aktivitesi 997 µg/mg), gentamisin (aktivitesi 616 µg/mg) ve levofloksasin (aktivitesi 999 µg/mg) Koçak Farma İlaç ve Kimya San. A.Ş., tarafından temin edilmiştir.

Antimikrobik etkili katyonik peptidlerin stok çözeltilerini hazırlamak üzere her maddeden aşağıdaki formüllerden birine göre hesaplanan miktarda tartım yapılmış, uygun çözücü ile çözündürülmüş ve seyreltici ile istenen hacime tamamlanmıştır.

(A)

$$\text{Tartılan antibiyotiğin miktarı (mg)} = \frac{\text{Çözücünün hacmi (ml)} \times \text{İstenen konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Antibiyotiğin aktivitesi (µg/mg)}}$$

(B)

$$\text{Kullanılan çözücünün hacmi (ml)} = \frac{\text{Antibiyotiğin miktarı (mg)} \times \text{Antibiyotiğin aktivitesi (µg/mg)}}{\text{İstenen konsantrasyon (µg/ml)}}$$

AMP'lerden temporin A ve apidaecin 1B'nin 640 µg/ml; antibiyotiklerden doksisisiklin, eritromisin, klindamisin, piperasilin, sefotaksim, gentamisin ve levofloksasinin 5120 µg/ml, vankomisinin 2560 µg/ml, linezolid ve meropenemin ise 1280 µg/ml'lik stok çözeltileri A formülüne göre hesaplanan miktarda tartımları yapılarak hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler altı ay içinde deneylerde kullanılmak üzere – 80°C'lik derin dondurucuda saklanmış, meropenem ise B formülüne göre hesaplanan miktarda tartılarak günlük olarak hazırlanmıştır. Antimikrobik maddelerin

hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan maddeler tablo 3.1’de bildirilmiştir (106).

**Tablo 3.1.Deneylerde kullanılan antimikrobik maddelere ait çözücü ve seyrelticiler**

<b>Antibiyotik</b>	<b>Çözücü</b>	<b>Seyreltici</b>
Doksisiklin	Damıtık su	Damıtık su
Eritromisin	% 96 etanol	Damıtık su
Klindamisin	Damıtık su	Damıtık su
Linezolid	Damıtık su	Damıtık su
Vankomisin	Damıtık su	Damıtık su
Piperasilin	Damıtık su	Damıtık su
Sefotaksim	Damıtık su	Damıtık su
Meropenem	Damıtık su	Damıtık su
Gentamisin	Damıtık su	Damıtık su
Levofloksasin	1/2 hacim damıtık su, sonra eriyene kadar 0.1 mol/l NaOH damlatılır	Damıtık su
Temporin A	Damıtık su	Sığır serum albümini <sup>1</sup>
Apidaecin 1B	Damıtık su	Sığır serum albümini <sup>1</sup>

1 % 0.01’lik asetik asit içinde sığır serum albümininin % 0.2’lik çözeltisi



### 3.2. Besiyerleri

#### 3.2.1. Triptik Soya Agar (Difco)

Toz haldeki triptik soya agardan (TSA) 40 g tartılıp, 1000 ml damıtık suda çözündürülmüş ve 5 ve 15'er ml'lik hacimlerde deney tüplerine dağıtılarak otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra 5'er ml besiyeri içeren tüpler yatık durumda bekletilip soğutularak eğik TSA besiyerleri elde edilmiş; 15 ml TSA besiyeri içeren tüpler ise kullanılacağı zaman eritilerek petri kutularına dökülmüştür.

#### 3.2.2. Mueller Hinton Buyyon (Difco)

Toz haldeki Mueller Hinton buyyonundan (MHB) 21 g tartılıp, 1000 ml damıtık suda çözündürülmüş ve deney tüplerine 3'er ml, Erlen Meyer şişelerine ise 200'er ml'lik hacimlerde dağıtılarak otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 15 dakika steril edilmiştir.

### 3.3. Bakteri suşları

Çalışmamızda Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı rutin laboratuvarlarında izole edilen, altı adet MRSA, Grup Florence Nightingale hastanelerinin mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen altı adet metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA), altışar adet çoğul ilaç dirençli / GSBL (+) ve duyarlı *E. coli* suşu kullanılmıştır. Deney şartlarının standardizasyonunu sağlamak için ise *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) ve *E. coli* ATCC 25922 standart suşları kullanılmıştır.

#### 3.3.1. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması

Çalışmada kullanılacak bakteri suşlarının eğik TSA besiyerlerinde bulunan saf kültürlerinden Petri kutularındaki TSA besiyerlerine azaltma yöntemi ile ekim yapılmış, 37<sup>0</sup>C'lik etüvde bir gece inkübe edildikten sonra meydana gelen kolonilerden üç dört tanesi alınarak içerisinde 3'er ml MHB besiyeri bulunan tüplere ekim yapılmıştır. Ekim yapılan bu tüplerin McFarland cihazında (Biosan/DEN-1) 0.5 McFarland standardına göre bulanıklığı ayarlanmış ve yaklaşık 1 x 10<sup>8</sup> CFU/ml'lik bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. Uygulanışı 3.5.1 kısmında bildirilen Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) yöntemi kullanılan mikrodilüsyon deneylerinde, 10<sup>8</sup> CFU/ml'lik bakteri, MHB besiyerinde 1/100 oranında seyreltilmiş ve inokulum olarak kullanılacak olan 10<sup>6</sup> CFU/ml'lik bakteri süspansiyonları elde edilmiştir (106).

### 3.3.2. İnokulumdaki bakteri sayısının belirlenmesi

Hazırlanışı 3.3.1. kısmında bildirilen inokulum, steril fizyolojik tuzlu su ile  $10^{-3}$  ve  $10^{-4}$  oranlarında seyreltilmiş, her seyreltmeden 100 µl alınıp Petri kutularında bulunan TSA besiyerlerine tatbik edilerek tüm yüzeye yayılmış ve kurutulduktan sonra 37°C'lik etüvde bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörü de hesaba katılarak bakteri süspansiyonunun mililitresinde bulunan bakteri sayısı (CFU/ml) tespit edilmiştir.

### 3.4. Diğer malzemeler

Çalışmada polistiren (Greiner 650160) ve polipropilenden (Nunc 267334) yapılmış U tabanlı 96 kuyuluk steril mikropklaklar ve polipropilen tüpler kullanılmıştır. Besiyerlerinin, antimikrobik madde içeren çözeltilerin ve bakteri süspansiyonlarının mikropklaklara tatbik edilmesinde tek kanallı (Gilson, PipetmanNeo) ve sekiz kanallı (Gilson, PipetmanNeoMultichannel) otomatik pipetör ve pipetörlere ait otoklavda steril edilmiş plastik uçlar kullanılmıştır.

### 3.5. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesi

#### 3.5.1. Deney koşullarının standardizasyonu

Çalışmada kullanılan yöntemlerin ve çalışma koşullarının uluslararası standartlara uygun olup olmadığının belirlenmesi için Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından bildirilen *S. aureus* ATCC 29213 ve *E. coli* ATCC 25922 standart suşları kullanılmıştır (106). Bu amaçla antibiyotiklerin MHB besiyeri içinde 3.5.2. kısmında anlatıldığı şekilde bir seri dilüsyonları yapılmış ve bu şekilde piperasilin ve gentamisin 256 - 0.25 µg/ml, sefotaksim 256 - 0.016 µg/ml, levofloksasin 256 - 0.008 µg/ml, meropenemin 8 - 0.004 µg/ml, eritromisin 128 - 0.062 µg/ml, doksisisiklin, klindamisin, linezolid ve vankomisin ise 32 - 0.031 µg/ml arasında değişen konsantrasyonları elde edilmiştir. Daha sonra kuyulara hazırlanan bakteri süspansiyonları ilave edilmiş, mikroplağın üzeri steril bir kapakla kapatılarak, buharlaşmayı engellemek üzere naylon bir kılıfın içine yerleştirilmiş ve 37°C'lik etüvde 18 - 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonları MİK değerleri olarak kabul edilmiştir.

### **3.5.2. Çalışmada kullanılan antimikrobik peptidlerin MİK değerlerinin saptanması**

AMP'lerin cam ya da polistiren yüzeylere yapışmasını önleyerek temporin A ve apidaecin 1B'nin gerçek MİK değerlerinin saptanması amacıyla modifiye CLSI yöntemi kullanılmıştır (107). Her aşamasında polipropilenden yapılmış malzemeler kullanılan bu yöntemde, hazırlanışı 3.1 kısmında anlatılan temporin A ve apidaecin 1B'nin stok çözeltilerinin % 0.2 oranında sıgır serum albümini içeren % 0.01'lik asetik asit çözeltisi ile dilüsyonları yapılarak deneyde kullanılan peptid konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Daha sonra yapılışı 3.5.3 kısmında bildirilen CLSI yöntemindeki gibi çalışılarak AMP'lere ait MİK değerleri tespit edilmiştir.

### **3.5.3. CLSI yöntemi ile çalışmada kullanılan antibiyotiklerin MİK değerlerinin saptanması**

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerden doksisisiklin, eritromisin, klindamisin, linezolid ve vankomisin *S. aureus*; piperasilin, sefotaksim, meropenem, gentamisin ve levofloksasin ise *E. coli* suşlarına karşı MİK değerleri CLSI tarafından yayınlanmış olan mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilmiştir (106). Bu amaçla polistiren mikroplağın 1 numaralı kolonu dışındaki tüm kuyularına hazırlanışı 3.2.2. kısmında bildirilen MHB besiyerinden 50'şer µl tatbik edilmiş, 1 ve 2 numaralı kolonlara MHB besiyerinde hazırlanmış antibiyotik çözeltileri çalışılacak en yüksek konsantrasyonların iki katı konsantrasyonda olacak şekilde 50'şer µl ilave edilmiş ve pipetör yardımıyla 2'den 11 numaralı kolona kadar bir seri dilüsyon yapılmıştır. Daha sonra mikroplağın A sırasındaki 12 numaralı kuyu dışındaki tüm kuyulara, hazırlanışı 3.3.1. kısmında anlatılan bakteri süspansiyonundan 50'şer µl ilave edilmiş ve bu şekilde 1-11 numaralı kuyularda antibiyotiklerin istenilen son konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Bu konsantrasyonlar piperasilin ve gentamisin için 256 - 0.25 µg/ml, sefotaksim için 256 - 0.016 µg/ml, levofloksasin için 256 - 0.008 µg/ml, meropenem için 8 - 0.004 µg/ml, eritromisin için 128 - 0.062 µg/ml, doksisisiklin, klindamisin, linezolid ve vankomisin için ise 32 - 0.031 µg/ml arasında olacak şekilde hazırlanmıştır. İçerisine yalnız MHB besiyeri konulan A sırasındaki 12 numaralı kuyu (negatif kontrol) steriliteyi, diğer 12 numaralı kuyular ise (pozitif kontrol) bakteri suşlarının üremesini kontrol etmek amacıyla kullanılmıştır. Ekim yapılan mikroplaklar steril bir kapakla kapatılarak, buharlaşmayı engellemek üzere naylon bir kılıfın içine yerleştirilmiş ve 37°C'de 18-24

saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün bulanıklığın görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonları MİK değerleri olarak kabul edilmiştir.

#### 3.5.4. Çalışmada kullanılan suşların antibiyotiklere duyarlılık oranlarının belirlenmesi

CLSI'nın, antibiyotiklerin çeşitli bakteri suşlarına karşı duyarlılık ve direnç oranlarını belirlemek üzere yayınladığı sınır değerler esas alınarak çalışmada kullanılan 12'şer adet *S. aureus* ve *E. coli* suşunun duyarlılık yüzdeleri belirlenmiştir. CLSI tarafından bildirilen sınır değerler Tablo 3.2 ve 3.3'de gösterilmiştir (108).

**Tablo 3.2. *S. aureus* suşları için CLSI'da belirtilen duyarlılık sınır değerleri**

Antibiyotikler	MİK (µg/ml)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Doksisiklin	≤ 4	8	≥16
Eritromisin	≤ 0.5	1-4	≥8
Klindamisin	≤ 0.5	1-2	≥4
Linezolid	≤ 4	-	≥8
Vankomisin	≤ 4	8-16	≥32

**Tablo 3.3. *E. coli* suşları için CLSI'da belirtilen duyarlılık sınır değerleri**

Antibiyotikler	MİK (µg/ml)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Piperasilin	≤ 16	32-64	≥128
Sefotaksim	≤ 1	2	≥4
Meropenem	≤ 1	2	≥4
Gentamisin	≤ 4	8	≥16
Levofoksasin	≤2	4	≥8

### **3.6. Minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) değerlerinin belirlenmesi**

Çalışmada kullanılan bakteri suşlarına karşı AMP'lerin MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile saptandıktan sonra MBK değerleri araştırılmıştır. Bu amaçla AMP'lerin MİK değerleri bulunduktan sonra üreme görülmeyen kuyulardan otomatik pipetör ile iki kez 10'ar µl'lik örnek alınarak Petri kutusundaki TSA besiyerlerinin yüzeyine tatbik edilmiş ve kurutulduktan sonra 37<sup>0</sup>C'lik etüvde bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün meydana gelen koloniler sayılmış ve 3.3.2. kısmında bildirildiği şekilde CFU/ml'si belirlenen inokulumun % 0.1'ini temsil eden rejeksiyon değerine eşit veya altında olan sayı tayin edilmiştir (109). Bu şekilde rejeksiyon değeri esas alındığında inokulumun % 99.9'unu öldüren en düşük antimikrobik madde konsantrasyonu MBK değeri olarak kabul edilmiştir.

### **3.7. Antimikrobik maddelerin kombinasyon halinde oluşturdukları etkinin mikrodilüsyon “checkerboard” yöntemi ile belirlenmesi**

“Checkerboard” yönteminin esası, dikey düzlemde birinci antibiyotiğin, denenen suşa karşı saptanan MİK değerinin iki katı konsantrasyondaki çözeltilerinin bir seri kuyu içinde yukardan aşağıya doğru MİK değerinin dört dilüsyon altına kadar, yatay düzlemde ise çalışmada kullanılan diğer antibiyotiğin aynı suşa karşı önceden saptanan MİK değerinin iki katı konsantrasyondaki çözeltilerinin bir seri kuyu içinde sağdan sola doğru antibiyotiğin MİK değerinin dört dilüsyon altına kadar seyreltilerek her kuyuda her iki antibiyotiğin farklı konsantrasyondaki çözeltilerini içeren kombinasyonlarının elde edilmesidir (110). Bu yöntemle göre, denenen antibiyotiklere ait MİK değerlerinin katları olan konsantrasyonların kullanılmasıyla iki antibiyotiğin kombinasyon halinde dilüsyonlarının elde edilişi Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

A Antibiyotiği µg/ml		1	2	3	4	5	6	7	B Antibiyotiği µg/ml	
16	A	16/0					16/4	16/8		
8	B	8/0				8/2				
4	C									
2	D	2/0			2/1					
1	E									
0.5	F								0.5/8	
0	G						0/4			
		0	0.25	0.5	1	2	4	8		

A ve B Antibiyotiklerinin MİK Değerleri

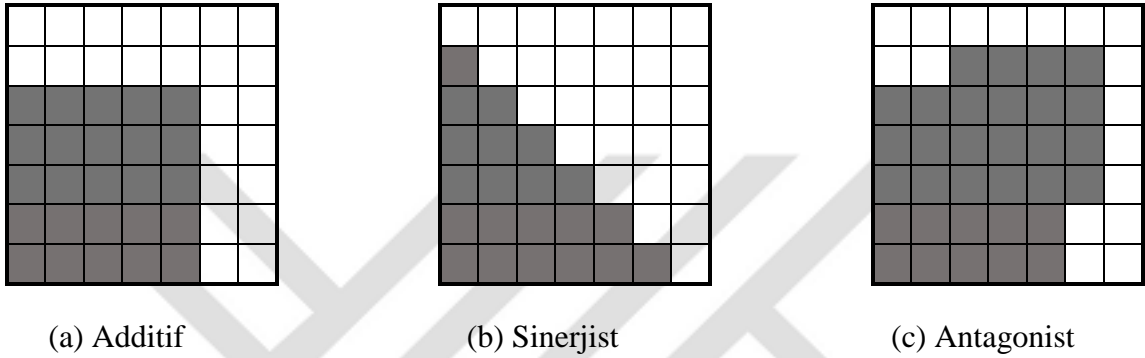
**Şekil 3.1. Mikrodilüsyon “Checkerboard” yöntemi ile iki antibiyotiğin kombinasyon halinde elde edilen konsantrasyonları.**

Bu çalışmada dikey düzlemde antibiyotikler (doksisisiklin, eritromisin, klindamisin, linezolid, vankomisin, piperasilin, sefotaksim, meropenem, gentamisin ve levofloksasin) ile yatay düzlemde AMP’ler (temporin A ve apidaecin 1B) olmak üzere, yukarıda açıklanan “checkerboard” yöntemine göre mikrolaktaki kuyulara uygulanarak elde edilen farklı kombinasyonlar bakteri suşları üzerinde denenmiştir.

Bunun için MHB besiyerinde incelenecek iki antimikrobik etkili maddenin denenecek konsantrasyonlarının dört katı konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanarak bunlardan 25’er µl alınmış ve mikrolaktaki kuyulara yukarıda anlatıldığı şekilde tatbik edilmiştir. Daha sonra 3.3.1. kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanan  $1 \times 10^6$  CFU/ml’lik bakteri süspansiyonlarından 50’er µl alınarak kuyulara ilave edilmiş ve her kuyuda toplam 100 µl hacminde karışım elde edilmiştir.

Deney yapılırken çalışma şartlarının ve besiyerinin sterilite kontrolünü yapmak üzere her mikrolaktaki bir kuyuya yalnız MHB besiyeri konmuş, mikroplağın A

sırasındaki 1 numaralı kuyu ise bakteri suşlarının üremesini kontrol etmek için kullanılmıştır. Ekim yapılan mikropaklar steril bir kapakla kapatılarak buharlaşmayı engellemek üzere naylon bir kılıfın içine yerleştirilmiş ve 37<sup>0</sup>C’de 18 - 20 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün üreme görülmeyen kuyularda bulunan iki antimikrobik etkili maddenin konsantrasyonları saptanmış ve sonuçlar fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) indeksine göre belirlenmiştir (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2. Mikrodilüsyon “Checkerboard” yöntemiyle antibiyotik kombinasyonlarının değerlendirilmesi**

Her antimikrobik maddenin FİK değeri üreme antimikrobik maddelerin kombinasyon halinde bulunduğu, üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antimikrobik madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı suşa karşı saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilmiştir (110). FİK indeksi ise, her iki antimikrobik maddeye ait FİK değerlerinin toplanması sonucunda elde edilmiştir. Buna göre,

$$\frac{A}{MİK_A} + \frac{B}{MİK_B} = FİK_A + FİK_B = FİK \text{ indeksi}$$

A : A antibiyotiğinin, B antibiyotiği ile kombinasyon halinde üremeyi durdurduğu kuyudaki en düşük konsantrasyonu

MİK<sub>A</sub> : A antibiyotiğinin tek başına denenen suşa karşı saptanan MİK değeri

FİK<sub>A</sub> : A antibiyotiğinin fraksiyonel inhibitör konsantrasyonudur.

Aynı tanımlar B, MİK<sub>B</sub> ve FİK<sub>B</sub> için de geçerlidir.

Bu hesaplamalara göre çalışmada elde edilen sonuçlar FİK indeksi esas alınarak aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir (111).

- FİK indeksi  $\leq 0.5$  olan kombinasyonlar sinerjistik,
- FİK indeksi = 0.5 – 4.0 olan kombinasyonlar additif,
- FİK indeksi  $\geq 4.0$  olan kombinasyonlar antagonist.

### 3.8. “Time-kill curve” yöntemiyle antibiyotiklerin kombinasyon halinde oluşturdukları etkilerin saptanması

#### 3.8.1. Antibiyotiklerin kombinasyon halinde etkilerinin araştırılması

“Time kill curve” (zamana bağlı öldürme) yöntemi ile deneylerde kullandığımız antimikrobik etkili peptidlerin tek başlarına ve antibiyotiklerle kombinasyon halindeki etkileri CLSI’da bildirilen esaslara göre belirlenmiştir (109). 3.5.2. bölümde anlatıldığı şekilde antimikrobiyal peptidlerin çalışılan suşlara karşı saptanan 1xMİK ve 1/2xMİK değerleri ile tüm antibiyotiklerin 1xMİK konsantrasyonlarındaki çözeltileri kombine edilerek kullanılmıştır (107).

Çalışmamızda temporin A’nın tek başına ve antibiyotiklerden doksisisiklin, eritromisin, klindamisin, linezolid ve vankomisin ile olan kombinasyonlarının bir MSSA ve bir MRSA olmak üzere iki adet *S. aureus* suşuna karşı; apidaecin 1B’nin ise tek başına ve antibiyotiklerden piperasilin, sefotaksim, meropenem, gentamisin ve levofloksasin ile kombinasyonlarının bir GSBL (+) / MDR ve bir GSBL (-) olmak üzere iki adet *E. coli* suşuna karşı, zaman ölüm eğrileri araştırılmıştır.

Bu amaçla çalışmada kullanılan ve hazırlanışı 3.1 bölümünde anlatılan antimikrobik maddelerin stok çözeltilerinden 10xMİK değerindeki çözeltileri hazırlanmış, bunlardan birer mililitre alınarak içerisinde 8 ml, kombinasyon deneylerinde ise 7 ml MHB bulunan deney tüplerine ilave edilmiştir. Bu tüplere hazırlanışı 3.3.1. bölümünde anlatılan inokulumdan MHB içerisinde  $10^7$  CFU/ml olacak şekilde elde edilen bakteri süspansiyonundan 1’er ml ilave edilmiştir. Bu şekilde her tüpte antimikrobiyal peptidlerin 1xMİK ve 1/2xMİK konsantrasyonlarında tek başlarına ve 1xMİK konsantrasyonundaki antibiyotiklerle kombinasyon halindeki çözeltileri ve suşların  $10^6$  CFU/ml’lik süspansiyonlarını içeren toplam 10 ml’lik hacimler elde edilmiştir. Kontrol için ise sadece 1 ml  $10^7$  CFU/ml’lik bakteri süspansiyonu ve 9 ml MHB besiyeri içeren tüpler hazırlanmıştır. Bu tüpler  $37^{\circ}\text{C}$ ’de, 70 devir/dakika hızındaki



çalkalayıcı su banyosunda inkübasyona bırakılarak 0, 1, 2, 4, 6, 8 ve 24. saatlerde bu tüplerden alınan örneklerde canlı bakteri sayımı yapılmıştır. Alınan örnekler ya doğrudan ya da uygun oranlarda steril fizyolojik tuzlu su ile seyreltikten sonra her seyreltmeden 100'er µl olmak üzere Petri kutusundaki TSA besiyerinin yüzeyine yayılmış, kuruduktan sonra 37<sup>0</sup>C'lik etüvde bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörü dikkate alınarak süspansiyonun mililitresinde bulunan bakteri sayısı (CFU/ml) tüm Petri kutularında belirlenen sayıların ortalaması alınarak saptanmıştır. Elde edilen değerler zaman "x" ekseninde, bakteri sayısının logaritmik değeri "y" ekseninde olacak şekilde gösterilerek zaman-ölüm eğrileri çizilmiş, sonuçlar CLSI verilerine göre aşağıdaki şekilde yorumlanmıştır.

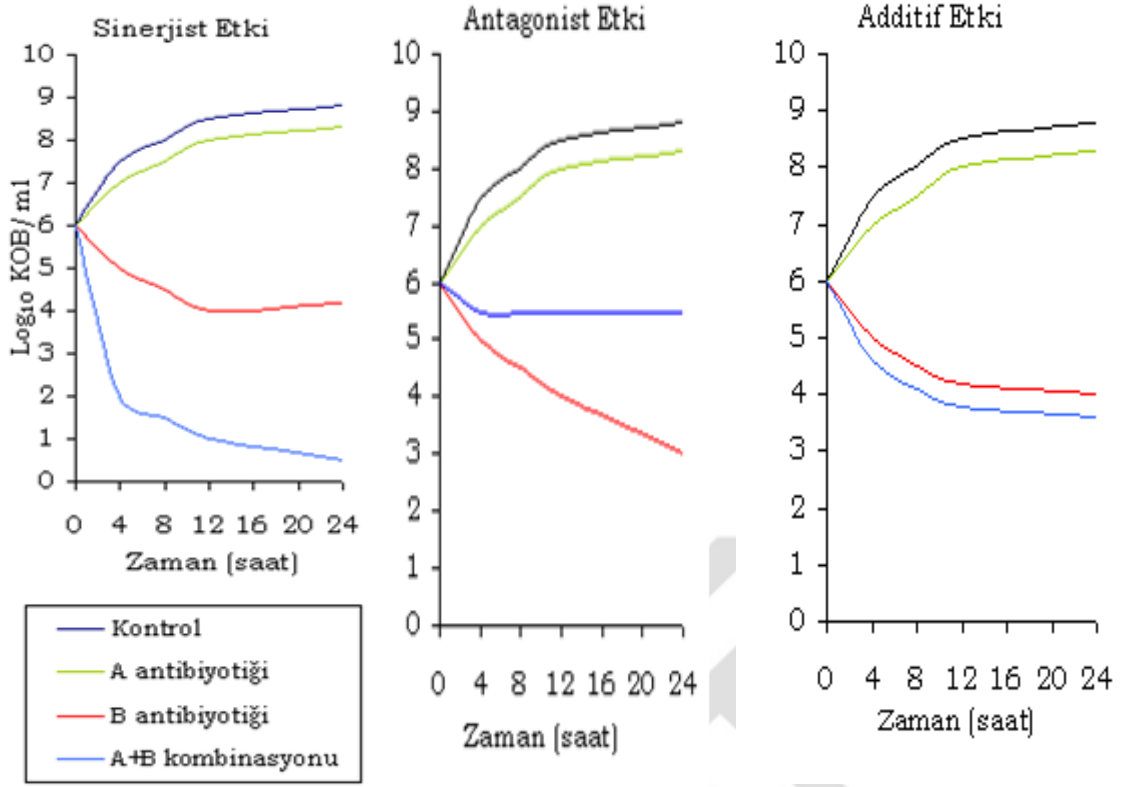
a) Sinerjistik etki: AMP'ler ve antibiyotiklerin 24. saatte kombinasyon halinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının, kombinasyonda bulunan antibiyotiklerden daha aktif olanın tek başına oluşturduğu etki ile elde edilen bakteri sayısına göre 100 kat ya da daha fazla ( $\geq 2 \log_{10}$ ) azalmış olması sinerjistik etki olarak kabul edilmiştir.

b) Additif etki: AMP'ler ve antibiyotiklerin 24. saatte kombinasyon halinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının, kombinasyonda bulunan antibiyotiklerden daha aktif olanın tek başına oluşturduğu etki ile elde edilen bakteri sayısına göre <10 kat ( $1 \log_{10}$ ) azalmış ya da artmış olması additif etki olarak kabul edilmiştir.

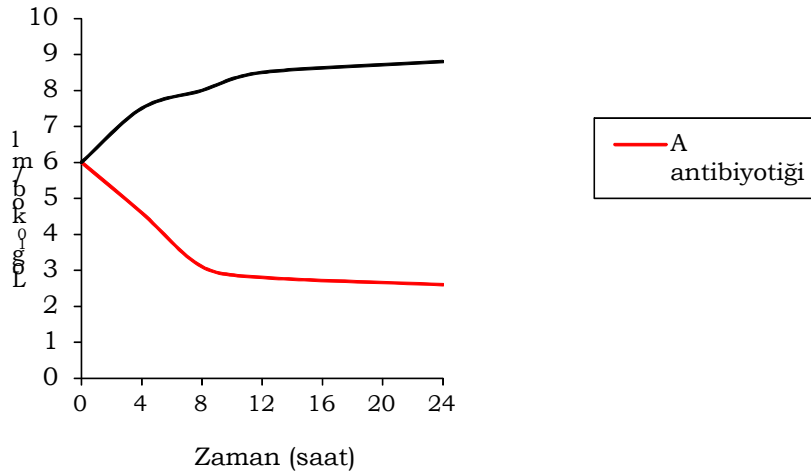
c) Antagonist etki: AMP'ler ve antibiyotiklerin 24. saatte kombinasyon halinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının, kombinasyonda bulunan antibiyotiklerden daha az aktif olanın tek başına oluşturduğu etki ile elde edilen bakteri sayısına göre 100 kat ya da daha fazla ( $\geq 2 \log_{10}$ ) artmış olması antagonist etki olarak kabul edilmiştir. Bu değerlendirmelere ait grafik örnekleri Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

### 3.8.2. Antibiyotiklerin bakterisidal etkilerinin araştırılması

3.8.1. bölümünde anlatılan time kill curve deneylerinde temporin A ve apidaesin 1B'nin tek başlarına ve antibiyotiklerle olan kombinasyonlarının iki adet *S. aerus* ve iki adet *E.coli* suşu üzerine göstermiş oldukları  $\geq 3 \log_{10}$ 'luk azalma CLSI verilerine göre bakterisidal etki olarak yorumlanmıştır (109). Bakterisidal etkinin gösterilmesine ait örnek grafik Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Time kill curve yöntemiyle antibiyotik kombinasyonlarının değeriendirilmesini gösteren örnek grafikler



Şekil 3.4. Time kill curve yöntemiyle antibiyotiklerin bakterisidal etkisini gösteren örnek grafik

## 4. BULGULAR

### 4.1. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin saptanmasına ait bulgular

#### 4.1.1. Deney koşullarının standardizasyonuna ait bulgular

Çalışmada, deney koşullarının standardizasyonu amacıyla standart suş olarak *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) ve *E. coli* ATCC 25922 suşları kullanılmıştır. Çalışma boyunca mikrodilüsyon yöntemi ile doksisisiklin, eritromisin, klindamisin, linezolid, vankomisin, piperasilin, sefotaksim, meropenem, gentamisin ve levofloksasinin bu suşlara karşı saptanan MİK değerleri CLSI tarafından önerilen sınırlar içerisinde kalmıştır (106). Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve AMP'lerin standart suşlara karşı saptanan MİK değerleri sırasıyla tablo 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1. Antibiyotiklerin standart suşlara karşı saptanan MİK değerleri**

Antibiyotik	MİK (µg/ml)		
	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>
	ATCC 29213	ATCC 43300	ATCC 25922
Doksisisiklin	0,125	0,062	-
Eritromisin	0,25	>128	-
Klindamisin	0,062	>32	-
Linezolid	2	2	-
Vankomisin	1	2	-
Piperasilin	-	-	2
Sefotaksim	-	-	0,062
Meropenem	-	-	0,008
Gentamisin	-	-	0,5
Levofloksasin	-	-	0,031

-: Denenmemiştir

**Tablo 4.2. AMP'lerin standart suşlara karşı saptanan MİK değerleri**

Antimikrobiyal peptidler	MİK (µg/ml)		
	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	MRSA ATCC 43300	<i>E.coli</i> ATCC 25922
Temporin A	8	8	-
Apidaesin 1B	-	-	16

-: Denenmemiştir

#### 4.1.2. Çalışmada kullanılan AMP'ler ve antibiyotiklerin MİK değerlerine ait bulgular

Çalışmada 3.1 bölümünde bildirilen AMP'lerden temporin A ve apidaesin 1B ile antibiyotiklerin altışar adet MRSA, MSSA, MDR/GSBL+ *E. coli* ve GSBL (-) *E. coli* suşlarına karşı MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Bu çalışmaların sonucunda AMP ve antibiyotiklerin toplam 12'şer adet *S. aureus* ve *E. coli* suşuna karşı saptanan MİK aralıkları ile suşların % 50'sini ve % 90'ını inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonlarına ait bulgular sırasıyla tablo 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3. Antimikrobik maddelerin 12 adet *S. aureus* suşuna karşı saptanan MİK aralıkları, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri (µg/ml)**

	MSSA (n:6)			MRSA (n:6)		
	MİK aralığı	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>	MİK aralığı	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>
Temporin A	8	8	8	8	8	8
Doksisiklin	0.062 -2	0.125	0.125	0.25-4	4	4
Eritromisin	0.25-0.5	0.5	0.5	0.125->128	0.5	16
Klindamisin	0.062-0.125	0.125	0.125	0.125-0.5	0.125	0.25
Linezolid	2	2	2	2	2	2
Vankomisin	0.5	0.5	0.5	0.5-2	0.5	1

n: Çalışmada kullanılan suş sayısı

**Tablo 4.4. Antimikrobik maddelerin 12 adet *E. coli* suşuna karşı saptanan MİK aralıkları, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri (µg/ml)**

	<i>E.coli</i> (n:6)			MDR <i>E.coli</i> (n:6)		
	MİK aralığı	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>	MİK aralığı	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>
Apidaesin 1B	16-32	16	16	8-32	16	16
Piperasilin	1->256	4	>256	128->256	>256	>256
Sefotaksim	0.031->256	0.062	2	64->256	128	>256
Meropenem	0.008-0.062	0.016	0.016	0.008-4	0.016	0.031
Gentamisin	0.5-2	1	1	1-256	2	128
Levofloksasin	0.016-256	0.062	16	16-32	16	32

n: Çalışmada kullanılan suş sayısı

#### 4.1.3. Çalışmada kullanılan suşların antibiyotiklere duyarlılık oranlarının belirlenmesine ait bulgular

Çalışmada kullanılan 12'şer adet *S. aureus* ve *E. coli* suşunun CLSI'nın yayınladığı sınır değerler esas alınarak belirlenen antibiyotiklere duyarlılık oranları sırasıyla Tablo 4.5 ve 4.6'da bildirilmiştir.

**Tablo 4.5. 12 adet *S. aureus* suşunun antibiyotiklere duyarlılık oranları (%)**

Antibiyotik	MSSA (n:6)			MRSA (n:6)		
	Du	Od	Di	Du	Od	Di
Doksisiklin	100	-	-	100	-	-
Eritromisin	100	-	-	50	16,67	33,33
Klindamisin	100	-	-	100	-	-
Linezolid	100	-	-	100	-	-
Vankomisin	100	-	-	100	-	-

Du: Duyarlı, Od: Orta duyarlı, Di: Dirençli, n: suş sayısı

**Tablo 4.6. 12 adet *E. coli* suşunun antibiyotiklere duyarlılık oranları (%)**

Antibiyotik	<i>E. coli</i> (n:6)			MDR <i>E. coli</i> (n:6)		
	Du	Od	Di	Du	Od	Di
Piperasilin	66,67	-	33,33	-	-	100
Sefotaksim	66,67	16,67	16,67	-	-	100
Meropenem	100	-	-	83,33	-	16,67
Gentamisin	100	-	-	50	-	50
Levofloksasin	66,67	-	33,33	-	-	100

Du: Duyarlı, Od: Orta duyarlı, Di: Dirençli, n: suş sayısı

#### 4.2. Minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) saptanmasına ait bulgular

Çalışmada kullanılan AMP'lerin 12'şer adet *S. aureus* ve *E. coli* suşuna karşı MBK değerleri CLSI'da bildirilen esaslara göre belirlenmiş, tespit edilen MBK aralıkları ile suşların % 50'sini ve % 90'ını öldüren en düşük AMP konsantrasyonlarına ait bulgular tablo 4.7'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7. Antimikrobiyal peptidlerin 12 adet *S. aureus* ve *E. coli* suşuna karşı saptanan MBK aralıkları, MBK<sub>50</sub> ve MBK<sub>90</sub> değerleri (µg/ml)**

	Temporin A			Apidaesin 1B		
	MBK aralığı	MBK <sub>50</sub>	MBK <sub>90</sub>	MBK aralığı	MBK <sub>50</sub>	MBK <sub>90</sub>
MSSA (n:6)	8-16	8	16	-	-	-
MRSA	8	8	8	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	16-32	16	16
MDR <i>E. coli</i>	-	-	-	8-16	16	16

-: Denenmemiştir

#### 4.3. Mikrodilüsyon “checkerboard” yöntemi ile AMP’lerin kombinasyon halindeki etkilerine ait bulgular

Çalışmada kullanılan AMP’lerden Temporin A’nın doksisiklin, eritromisin, klindamisin, linezolid ve vankomisin ile oluşturulan ikili kombinasyonlarının *S. aureus* suşlarına karşı etkileri; apidaesin 1B’nin ise piperasilin, sefotaksim, meropenem, gentamisin ve levofloksasin ile oluşturulan ikili kombinasyonlarının *E. coli* suşlarına karşı etkileri mikrodilüsyon “checkerboard” yöntemi ile araştırılmış, elde edilen bulgular FİK indeksine göre değerlendirilmiştir.

MİK değerleri  $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$  olarak saptanan antibiyotikler ile çalışılan suşların dahil edilmediği checkerboard deneylerinde suşların hiçbirine karşı antagonist etkinin görülmediği saptanmış olup elde edilen sonuçlar tablo 4.9 ve 4.10’da gösterilmiştir.

**Tablo 4.8. Temporin A’nın antibiyotiklerle oluşturulan kombinasyonlarının *S.aureus* suşları üzerine etkileri**

Suşlar/ Antibiyotikler	FİK indeksi						
	0,5	0,625	0,75	1	1,5	2	3
MSSA (n:6)							
Doksisiklin	-	-	-	-	3	3	-
Eritromisin	-	-	-	-	-	5	1
Klindamisin	-	1	-	-	-	4	1
Linezolid	-	-	-	1	-	5	-
Vankomisin	-	3	-	1	-	2	-
MRSA (n:6)							
Doksisiklin	-	2	2	1	-	1	-
Eritromisin	-	-	-	-	-	6	-
Klindamisin	-	-	-	1	-	3	2
Linezolid	-	2	1	-	1	2	-
Vankomisin	-	4	-	1	-	1	-

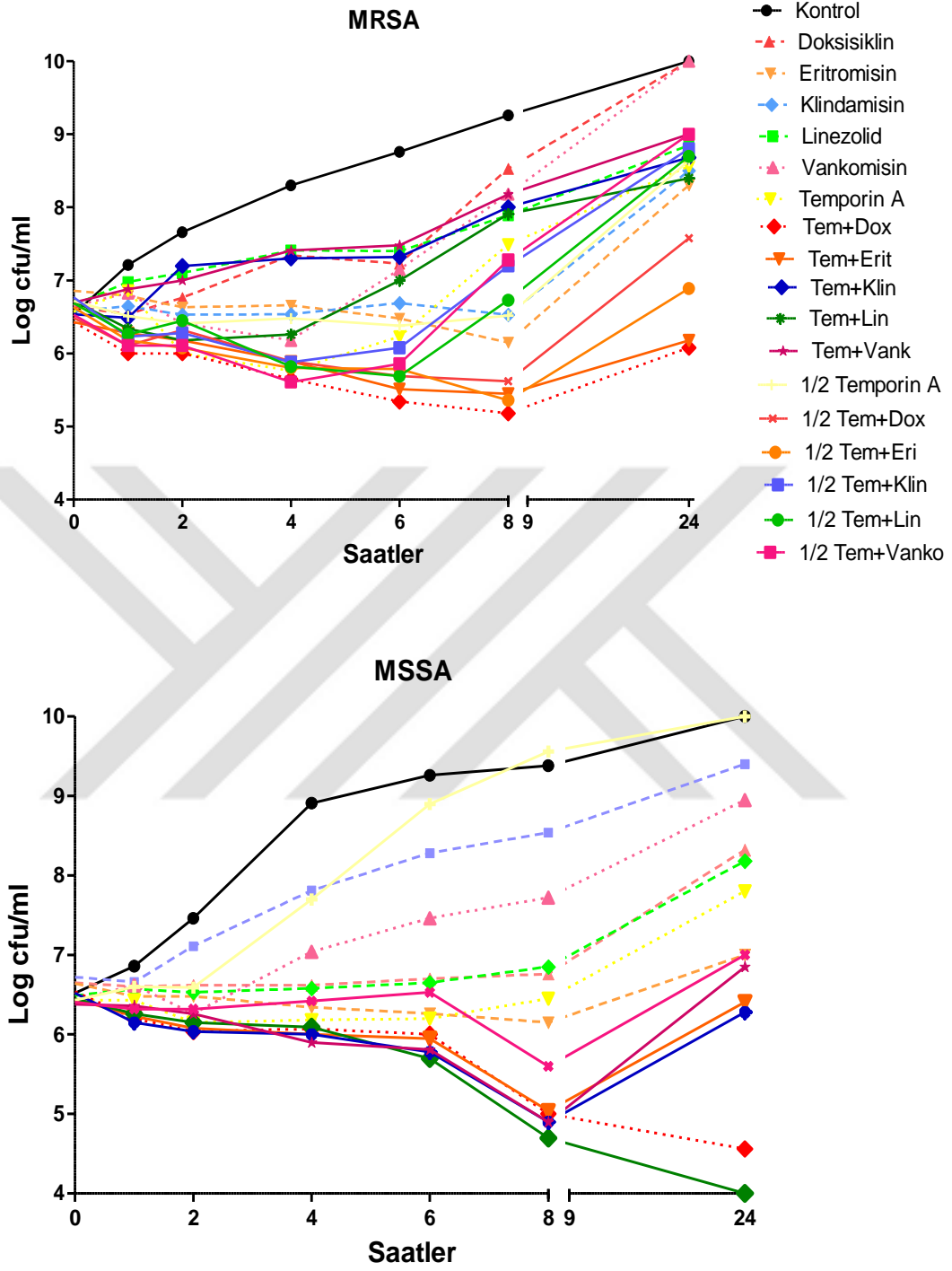
**Tablo 4.9. Apidaesin 1B'nin antibiyotiklerle oluşturulan kombinasyonlarının *E. coli* suşları üzerine etkileri**

Suşlar/ Antibiyotikler	Sinerjizm oranları %	0,25	0,312	0,5	0,625	0,75	1	1,25	2
<i>E. coli</i> (n:6)									
Piperasilin	25	-	1	-	-	1	-	-	2
Sefotaksim	20	1	-	-	2	1	1	-	-
Meropenem	-	-	-	-	2	2	-	1	1
Gentamisin	33,33	-	1	1	2	2	-	-	-
Levofloksasin	-	-	-	-	1	2	2	-	-
MDR <i>E. coli</i> (n:6)									
Piperasilin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sefotaksim	-	-	-	-	2	-	-	-	-
Meropenem	16,67	-	1	-	1	1	-	-	3
Gentamisin	33,33	-	-	1	2	-	-	-	-
Levofloksasin	-	-	-	-	-	2	2	-	2

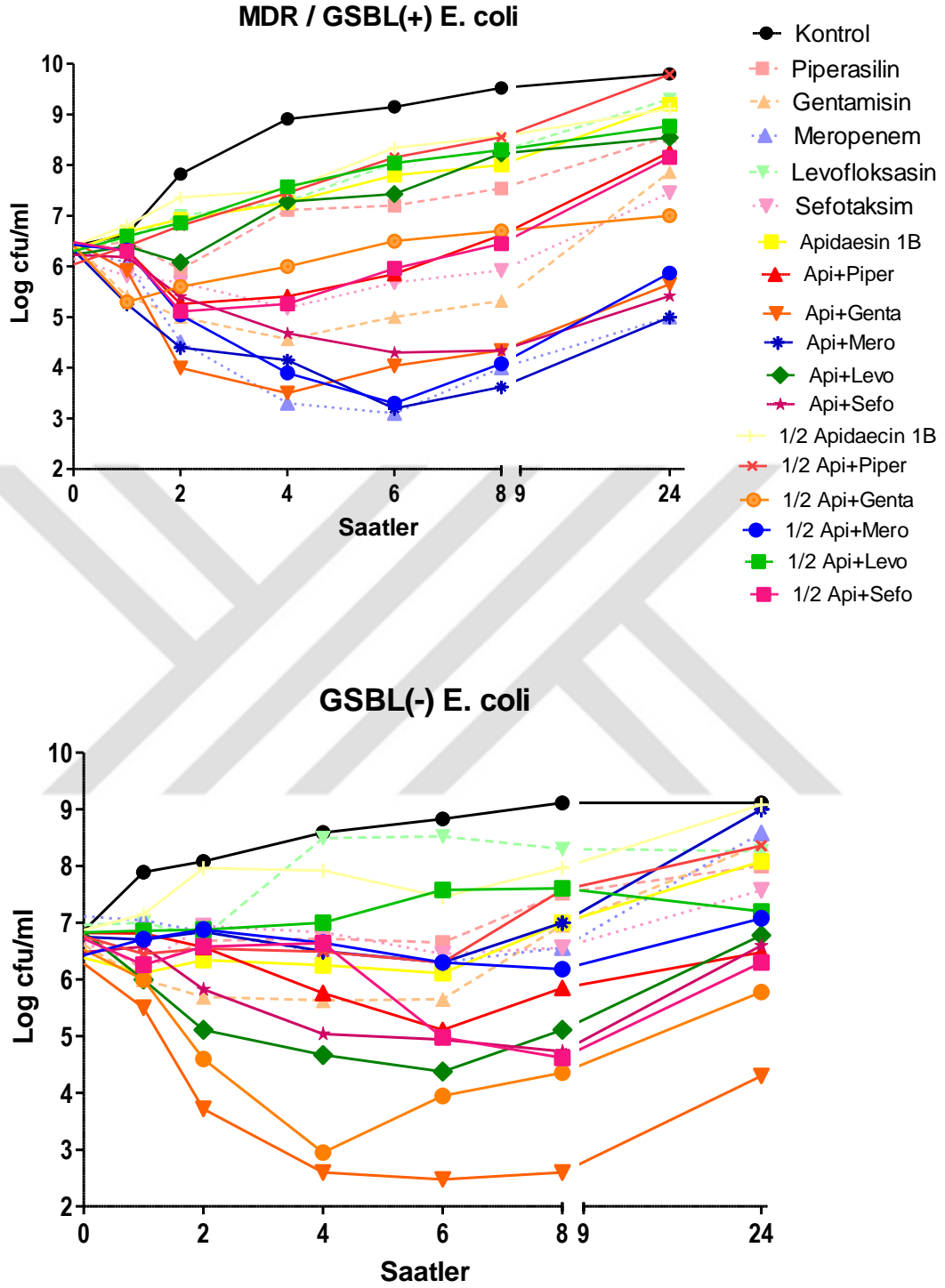
#### 4.4. Time kill curve yöntemi ile AMP'lerin kombinasyon halindeki etkilerine ait bulgular

Çalışmamızda temporin A'nın birer adet MRSA ve MSSA olmak üzere iki adet *S. aureus*; apidaesin 1B'nin ise birer adet MDR / GSBL (+) ve GSBL (-) olmak üzere iki adet *E. coli* suşuna karşı tek başlarına ve antibiyotiklerle kombinasyon halinde oluşturdukları etkiler time kill curve yöntemi ile araştırılmış ve zaman-ölüm eğrileri çizilmiştir. Elde edilen bulgulara ait grafikler sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2 'te gösterilmiştir.





Şekil 4.1. MRSA ve MSSA suşlarına karşı Temporin A ve antibiyotik kombinasyonlarına ait zaman ölüm grafikleri



Şekil 4.2. MDR / GSBL+ ve GSBL - *E.coli* suşlarına karşı apideasin 1B ve antibiyotik kombinasyonlarına ait zaman ölüm grafikleri

## 5. TARTIŞMA

İnsanlık tarihinin en önemli buluşlarından olan antibiyotikler, özellikle uygunsuz ve gereksiz kullanımları sonucu gelişen direnç problemi nedeniyle etkilerini önemli oranda kaybetmeye başlamışlardır. Günümüzde, tedavide kullanılacak hiçbir etkili antibiyotiğin bulunmadığı çoklu ve ekstrem dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*, MRSA, vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) ve VRE, GSBL (+) / MDR *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşları ile bu suşların başta hastane kaynaklı enfeksiyonlar olmak üzere toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da gün geçtikçe artan görülme oranları, antibiyotik direncinin halk sağlığı açısından nasıl ciddi bir tehdit oluşturduğunu ve gelecekte de oluşturmaya devam edeceğini gözler önüne sermektedir. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) tarafından bildirilen raporlarda da bu bakterilerin birçok antibiyotiğe karşı, özellikle yoğun bakım ünitelerinde, çok yüksek oranda direnç geliştirdikleri ve bu direnç oranlarının her yıl daha da arttığı belirtilmiştir (112, 113).

Söz konusu olan bakterilerden *S.aureus*, *Staphylococcus* cinsi içerisinde yer alan çok sayıdaki tür arasında, günümüzde kullanılan birçok antibiyotiğe hızla direnç kazanması ve bu sebeple oluşturduğu enfeksiyonlara daha sık rastlanması nedeniyle insan enfeksiyonlarındaki en önemli patojendir (114). Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesi içerisinde yer alan ve doğada yaygın olarak bulunan Gram pozitif koklardır. Normal flora elemanı olarak memelilerin deri ve mukoz membranlarında bulunurlar. Stafilokoklar çoğunlukla buldukları yerde iyi huylu ve simbiyotik bir ilişkiye sahip olmakla birlikte deri ve mukozal yaralanma, enjeksiyon veya cerrahi müdahaleler ile tesadüfen doku içine girmeleri sonucunda patojen hale geçebilirler (115). Patojen stafilokoklar çevre koşullarına oldukça dirençli olmaları, fizyolojik olmayan çeşitli çevresel koşullarda dahi varlıklarını sürdürebilmeleri, kurumuş çeşitli materyallerden aylar sonra bile izole edilebilmeinden dolayı major bir insan patojeni olmaya devam etmekte ve enfeksiyon kontrol önlemlerine rağmen her dönem tıp dünyasında önemini koruması beklenmektedir.

*S. aureus* izolatlarında görülen en önemli sorun, giderek artan oranlardaki metisilin direncidir. 1961 yılında İngiltere’de ilk MRSA suşu olan COL izolatı, *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde antistafilokokkal penisilinlerden metisilin kullanımının başlamasından sadece iki yıl sonra tanımlanmıştır (116). Metisilin

(oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) direncine sahip stafilokoklar, ürettikleri beta laktamaz enzimi sayesinde, sefalosporinler de dahil olmak üzere tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençlidirler. Bu dirençten, *mecA* geninin kodladığı farklı bir penisilin bağlayan protein olan PBP2a üretiminin sorumlu olduğu tespit edilmiştir (117). MRSA kökenlerinde genellikle fenotipik olarak hem tüm beta-laktam antibiyotiklere hem de aminoglikozitler, linkozamidler ve makrolidlere karşı olmak üzere çoğul ilaç direnci gözlenmektedir (118). İlk ortaya çıktıkları tarihlerde sadece hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri olarak düşünülen MRSA'lar, günümüzde toplum kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında da giderek artan oranda görülmekte, ciddi morbidite ve mortaliteye neden olmakta ve yüksek bir ekonomik yük oluşturmaktadır (119).

Günümüzde yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere hastane kaynaklı *S.aureus* suşlarının çoğu beta laktamaz üretmekte ve MRSA suşları tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olmakla birlikte, prevalansın ülkeler arasında farklılıklar gösterdiği de rapor edilmektedir (119). Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde MRSA epidemiyolojisi NNIS sistemi ile yıllık değişiklikler bazında takip edilerek kayıt altına alınmakta olup bazı yoğun bakım ünitelerinde MRSA izolasyon oranlarının % 80'in üzerine çıktığı bildirilmektedir (120-122). Bunun yanısıra Klevens ve ark. (123) 1992-2003 yıllarında yaptıkları bir araştırmada, *S. aureus* suşları arasındaki MRSA oranının yıllık % 3.1 oranında arttığını ve 2003 yılında % 64 düzeylerinde olduğunu tespit etmişlerdir. Avrupa'da ise The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) tarafından antimikrobiyal duyarlılık verileri toplanarak kaydedilmektedir. EARSS verilerine göre 2013 yılı MRSA oranları Kıbrıs'ta % 32.5, Yunanistan'da % 40.3, Bulgaristan'da % 19.2, Romanya'da % 64.5, İtalya'da % 35.8, Almanya'da % 12.8, Fransa'da % 17.1 ve İngiltere'de % 13.8 olarak bildirilmiştir (124).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de MRSA'lar dirençli hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır (125). Türkiye genelindeki nozokomiyal MRSA enfeksiyonlarının oranı ise Sağlık Bakanlığı'nın Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Raporu'na göre 2011 yılında % 55,3 ve 2012 yılında ise % 53,9 olarak bulunmuştur (126, 127). Derbentli (128) tarafından 2000-2003 yılları arasında yapılan bir araştırmada MRSA prevalansı % 46.6 olarak bulunurken farklı merkezlerde yapılan diğer çalışmalarda Arıdoğan ve ark. (129) tarafından 2004 yılında % 41.0, Vardar-Ünlü ve ark.'larının (130) 2004-2005 yılları arasında yaptığı çalışmada

% 53.6, Bozca ve ark.'larının 2005-2006 yıllarında yaptığı çalışmada % 34, Kurutepe ve ark. (131) tarafından 2007 yılında % 32.4 ve Duman ve ark. (132) tarafından 2009 yılında % 36.4 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı rutin laboratuvarlarında izole edilen, altı adet MRSA ve Grup Florence Nightingale hastanelerinin mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen altı adet MSSA suşuna karşı, gelecekte yeni ve etkili bir antibiyotik grubu olarak kullanılmaya hazırlanılan AMP'lerden Temporin A'nın tek başına ve çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonları halindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin, CLSI'nın bildirdiği mikrodilüsyon yöntemine göre, MSSA ve MRSA suşlarının % 90'ını inhibe eden konsantrasyonları doksisisiklin için sırasıyla 0,125 ve 4 µg/ml, eritromisin için 0,5 ve 16 µg/ml, klindamisin için 0,125 ve 0,25 µg/ml, linezolid için 2 ve 2 µg/ml, vankomisin için ise 0,5 ve 1 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre antibiyotiklerden klindamisin ve vankomisin MRSA suşlarına karşı olan  $MİK_{90}$  değerleri MSSA suşlarına göre iki kat, doksisisiklin ve eritromisininkiler ise 32 kat daha yüksek olarak tespit edilmiştir. AMP'lerden temporin A'nın ise, antibiyotiklere karşı olan direnç durumlarından etkilenmeksizin tüm *S. aureus* suşlarına karşı 8 µg/ml'lik konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre *S. aureus* suşlarına karşı çalışmamızda kullanılan antibiyotiklerden tartım bazında en etkili olanın klindamisin olduğu ve bu antibiyotiği vankomisin ile linezolidin takip ettiği belirlenmiştir. CLSI'nın bildirdiği sınır değerlerine göre çalışmada kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık durumlarına bakıldığında MSSA suşları tüm antibiyotiklere % 100 duyarlıyken MRSA suşları eritromisine % 50, diğer antibiyotiklere ise % 100 duyarlı olarak bulunmuşlardır.

Çalışmamızda kullanılan diğer önemli hastane enfeksiyonu etkeni ise *E. coli*'dir. Barsak florasında yer alan ve birçok patojen türü barındıran *Enterobacteriaceae* ailesinin en önemli üyelerinden olan *E.coli*, genellikle zararsız bir kommensal olmasına rağmen bazı suşları patojenik olup, besin kaynaklı enteritlerin başlıca etkeni olarak bilinmektedir. İnsanlarda hastalık yapabilen patojen *E.coli* suşları genellikle enterik / diyarejenik ve barsak dışı enfeksiyon etkenleri şeklinde gruplanırlar. Patojen *E.coli* suşları, dünya çapında morbidite ve mortaliteye neden olan patojenler arasında üst sıralarda yer almakta olup, enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle beta-laktam grubu

antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak günümüzde, *E. coli* suşlarında bu antibiyotiklere karşı gittikçe artan oranlarda direnç görülmesi nedeniyle, bu enfeksiyonların tedavisinde büyük güçlükler yaşanmaktadır (133).

Beta-laktam grubu antibiyotikler, başta Gram negatifler olmak üzere birçok bakteri tarafından sentezlenen ve sayıları bir hayli fazla olan beta-laktamaz enzimleri tarafından hidroliz edilerek inaktif hale getirilebilmektedir. Özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) olarak adlandırılan beta laktamazların üretimi, pek çok antibiyotiğin tedavide kullanımını sınırlandırmakta ve prognozu olumsuz yönde etkilemektedir (134-136). Dünyada ilk kez 1983 yılında ortaya çıktığı bilinen GSBL sentezleyen izolatlar, daha sonra dünyanın birçok ülkesinden bildirilmeye başlanmıştır (137, 138). GSBL üretimi özellikle *E. coli* ve *Klebsiella* türlerinde görülmektedir. Uygunsuz antibiyotik kullanımı ve hastane ortamındaki kolay yayılım nedeni ile tüm dünyada hızla artan GSBL sıklığı, özellikle geniş spektrumlu sefalosporinlerin yoğun kullanıldığı hastanelerde daha fazla görülmektedir (139-141).

*E. coli* suşları, hem toplum (% 80-85) hem de hastane (% 50) kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarının en sık izole edilen etkeni olup, GSBL üreten *E. coli* suşlarının oranını belirlemek üzere birçok çalışma yürütülmekte, ancak bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar gerek ülkeler, gerekse aynı ülkenin farklı bölgeleri arasında farklılık göstermektedir (142, 143-145). GSBL sıklığını gösteren çalışmalardaki farklı sonuçların başlıca sebebinin çeşitli bölgelerde farklı hasta sayıları, grupları ve örneklerinin olması, hastaların farklı sosyoekonomik duruma sahip olmaları ve çalışmaların yapıldığı bölgelerdeki antibiyotik kullanım politikaları arasındaki farklılıklar olduğu düşünülmektedir.

Genellikle nozokomiyal enfeksiyon etkenleri olarak karşımıza çıkan GSBL(+) mikroorganizmalarla meydana gelen enfeksiyonlar son yıllarda toplum kaynaklı olarak da karşımıza çıkmaktadır. Her ne kadar bölgeler arasında farklılıklar bulunsa da, hem dünyada hem de ülkemizde GSBL ve antibiyotik direnç oranlarında giderek artış görülmekte, özellikle toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarına yol açan *E. coli* izolatlarının GSBL üretimindeki çarpıcı artışlar bu konudaki kaygıları arttırmaktadır (146-148). İspanya'da yapılan bir çalışmada GSBL üreten *E. coli* oranı % 0,5 olarak bulunmuş, aynı çalışma 6 yıl sonra tekrar yapıldığında ise bu oranın % 4,1'e çıktığı bildirilmiştir (149-150). Yurdumuzda yapılan ve GSBL oranlarındaki artışı gösteren Akyar ve ark.'nın çalışmasında ise *E. coli* suşlarında saptanan GSBL oranları 5 yıl

boyunca izlenmiş ve 2004-2008 yılları arasındaki GSBL oranları yıllara göre sırasıyla % 3.8, % 5.9, % 9.4 , % 13.7 ve % 17.2 olarak bildirilmiştir (151).

Çalışmamızda Grup Florence Nightingale hastanelerinin mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen altışar adet MDR / GSBL (+) ve duyarlı / GSBL (-) *E. coli* suşuna karşı, AMP'lerden Apidaesin 1B'nin tek başına ve çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonları halindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin CLSI'nın bildirdiği mikrodilüsyon yöntemine göre GSBL (+) ve (-) *E. coli* suşlarının % 90'ını inhibe eden konsantrasyonları piperasilin için sırasıyla >256 ve >256 µg/ml, sefotaksim için 2 ve >256 µg/ml, meropenem için 0,016 ve 0,031 µg/ml, gentamisin için 1 ve 128 µg/ml, levofloksasin için ise 16 ve 32 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre antibiyotiklerden meropenem, levofloksasin ve piperasilinin GSBL (+) *E. coli* suşlarına karşı olan MİK<sub>90</sub> değerleri GSBL (-) *E. coli* suşlarına göre en az iki kat, gentamisin ve sefotaksiminkiler ise 128 kat ve daha yüksek olarak tespit edilmiştir. AMP'lerden apidaesin 1B'nin ise, antibiyotiklere karşı olan direnç durumlarından etkilenmeksizin tüm *E. coli* suşlarına karşı 16 µg/ml'lik konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre *E. coli* suşlarına karşı çalışmamızda kullanılan antibiyotiklerden tartım bazında en etkili olanın meropenem olduğu ve bu antibiyotiği levofloksasin ile gentamisinin takip ettiği belirlenmiştir. CLSI'nın bildirdiği sınır değerlerine göre çalışmada kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık durumlarına bakıldığında GSBL (+) *E. coli* suşlarının piperasilin, sefotaksim ve levofloksasine % 100, gentamisin ve meropeneme karşı sırasıyla % 50 ve % 16,17 oranlarında dirençli oldukları, GSBL (-) *E. coli* suşlarının ise piperasilin, sefotaksim ve levofloksasine % 66,67, gentamisin ve meropeneme ise % 100 duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için antibiyotik seçimi yaparken genellikle antibiyotiklerin inhibitör etkileri dikkate alınmaktadır. Ancak yetersiz tedavinin genellikle mortaliteyle sonuçlandığı ciddi enfeksiyonların tedavisinde, bakterisidal aktivitenin de bilinmesi önem taşımaktadır. Böyle durumlarda antimikrobiyal maddeye ait MİK değerlerinin yanı sıra MBK değerlerinin de saptanması yarar sağlamaktadır. Çalışmamızda denenen AMP'lere ait MBK değerleri genellikle MİK değerlerine eşit ya da bu değerlerin iki katı konsantrasyonlarda bulunmuştur.. Bu sonuçlar, duyarlı

bakterilerle meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde, AMP'lerle gerekli bakterisidal etkinin sağlanabileceğini göstermektedir.

Basit ve komplike olmayan enfeksiyonlarda genellikle tek antibiyotikle tedavi rejimi tavsiye edilmesine rağmen, immün yetmezlik ve kistik fibroz gibi belirli risk gruplarında bulunan kişilerde oluşan enfeksiyonlarla endokardit, menenjit ve septisemi gibi ciddi ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin kombinasyon halinde oluşturdukları olumlu etkilerden yararlanılmaktadır. Antibiyotiklerin kombinasyon halinde kullanılmasının başlıca amaçları arasında sinerjistik etkileşim ile etki spektrumunu genişletmek, dirençli subpopulasyonların ortaya çıkışını önlemek veya geciktirmek, bakterisidal etkiyi arttırmak ya da hızlandırmak, elde edilen sinerjistik etki ile antibiyotiklerin daha düşük dozda uygulanmasını sağlamak suretiyle toksik yan etkileri azaltmak ve polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde başarı ile kullanmak yer almaktadır (152).

Kombine antibiyotik tedavisi sırasında antibiyotikler, birbirleri ile dört farklı şekilde etkileşirler. Bunlar sinerjistik, antagonist, additif ve indifferens etkileşimlerdir. Pozitif bir etkileşim olan sinerjizmde, kombinasyonu oluşturan antibiyotiklerin birarada oluşturdukları etki, her bir antibiyotikğin tek başına kullanımı ile oluşan etkilerin toplamına göre önemli miktarda artmıştır. Negatif bir etkileşim olan antagonizmde ise, kombinasyonda yer alan antibiyotiklerin birlikte oluşturdukları etki, her bir ilacın tek başına kullanımı sonucunda oluşan etkilere göre önemli ölçüde azalmıştır. Kısmi bir sinerjiyi ifade eden additif etki, kombinasyondaki antibiyotiklerin birarada oluşturdukları etkinin, antibiyotiklerin ayrı ayrı etkilerinin toplamına eşit olması olarak tanımlanırken; ilaçların birbiriyle etkileşmemesi olarak da tanımlanan indifferens etkide ise antibiyotik kombinasyonunun etkisi, daha etkili olan antibiyotikğin tek başına meydana getirdiği etki ile eşit düzeydedir (153).

Deneysel olarak sinerjistik etki, kombinasyonu oluşturan her bir antibiyotikğin MİK değerinde en az dört kat düşüş olması ile belirlenir (154). Kombinasyonlardaki sinerjistik etkileşim üç farklı mekanizma ile ortaya çıkabilmektedir (155). Bu mekanizmalar arasında  $\beta$ -laktam + aminoglikozid kombinasyonunda olduğu gibi antibiyotiklerin farklı yollarla farklı hedef bölgeleri inhibe etmesi (156), trimetoprim + sülfonamid kombinasyonunda görüldüğü gibi aynı yolla farklı hedeflerin inhibisyonu (157) ve oritavansin (klorobifenil / vankomisin) örneğinde görüldüğü gibi farklı yollarla aynı hedef bölgenin inhibisyonu yer almaktadır (155, 158). Antagonist etki ise deneysel



olarak, kombinasyonu oluşturan her bir antibiyotığın MİK değerinde en az dört kat artış olması ile belirlenmekte ve farklı mekanizmalar sonucu ortaya çıkabilmektedir. Kombinasyon tedavileri sırasında kesinlikle istenmeyen bir etki olan antagonizmin olası mekanizmaları arasında ilacın bağlandığı yapılar için rekabet, diğer antibiyotik ile bağlanma noktasının değiştirilmesi, yada diğer ilacın yarattığı uyarı ile antibiyotığın inaktivasyonu sayılabilmektedir (159).

Kombinasyon tedavisine karar verilirken tedavide kullanılması düşünülen iki antibiyotığın etken mikroorganizmaya karşı olan etkisinin bilinmesi gerekir. Uygun bir kombinasyonun seçimi için, deney hayvanları ve insana ait bulguların elde edilmesinde yaşanan güçlükler nedeniyle in vitro bilgiler esas alınarak sinerjistik etkinin varlığı ve antagonist etkinin bulunmadığı araştırılmış olmalıdır. Antibiyotiklerin kombinasyon halindeki in-vitro etkilerini tayin etmek için kalitatif sonuç veren mikrodilüsyon “checkerboard” (dama tahtası) ve kantitatif sonuç veren “time kill curve” (zaman ölüm eğrisi) yöntemleri geliştirilmiştir (106,110,111,160).

Çalışmamızda, antibiyotik kombinasyonlarının etkisini ölçmek için birçok araştırmacı tarafından tercih edilen, kolay uygulanan ve hızlı sonuç veren geleneksel bir yöntem olan mikrodilüsyon checkerboard tekniği ile AMP’lerden temporin A’nın doksisisiklin, eritromisin, klindamisin, linezolid ve vankomisin ile kombinasyonlarının *S. aureus*; apidaesin 1B’nin ise piperasilin, sefotaksim, meropenem, gentamisin ve levofloksasin ile kombinasyonlarının *E. coli* suşlarına karşı etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *S. aureus* suşlarına karşı temporin A’nın içinde bulunduğu kombinasyonların tümünün, *E. coli* suşlarına karşı ise apidaesin 1B’nin içinde bulunduğu kombinasyonların çoğunun additif etkili oldukları, sinerjistik etkinin ise % 17 - 33 oranları arasında bulunduğu tespit edilmiştir. Çalışılan kombinasyonların hiçbiri ile antagonist etki görülmemiştir.

Birçok araştırmacı tarafından yürütülen ve AMP’lerin antibiyotiklerle kombinasyon halinde gerek in vitro, gerekse in vivo antibakteriyal etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Giacometti ve ark. (161) tarafından yapılan çalışmada, temporin A + linezolid kombinasyonunun metisiline dirençli *S. epidermidis* suşlarının oluşturduğu subkutanöz fare gözaltı torbası enfeksiyon modelinde bakteriyel yükü büyük oranda düşürdüğü gösterilmiştir. Yine Giacometti ve ark.’nın (162) yürütmüş olduğu bir başka çalışmada, temporin A’nın hastane enfeksiyonu etkeni *E. faecalis* suşlarını 1-16 µg/ml’lik konsantrasyonda inhibe ettiği ve

imipenem yada amoksisilin + klavulanik asit ile olan kombinasyonlarının sinerjistik etkili olarak bulunduğu bildirilmiştir. Anabilim Dalı'mızda Döşler ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada AMP'lerden nisin ve melittinin hem MSSA hem de MRSA suşlarını sırasıyla 0,5-4 ve 2-32 µg/ml'lik konsantrasyonda inhibe ettikleri, nisin + ampisilin ya da daptomisin ve melittin + vankomisin kombinasyonlarının gerek MSSA ve MRSA, gerekse *E. faecalis* suşlarına karşı sinerjistik etkili oldukları gösterilmiştir (163) Yine Döşler ve ark. (164) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise katyonik peptid yapıdaki bir antibiyotik olan kolistin ve melittinin *E. coli* suşlarını sırasıyla 0,125-1 ve 4-16 µg/ml'lik konsantrasyonlarda inhibe ettikleri ve kolistin + imipenem ya da seftazidim kombinasyonları ile melittin + imipenem yada amikasin kombinasyonlarının *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarına karşı sinerjistik etki gösterdikleri bildirilmiştir.

AMP'ler kendi geçişlerini destekleyen yolla bakteri dış membranından geçerken kendileriyle birlikte diğer antibiyotiklerin de hücre içine girmesine olanak sağlamaktadır. Bu durum, dış membrandaki geçirgenliğin azalması sonucunda çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştiren bakterilerin yeniden duyarlı hale gelmelerini ve bu şekilde antibiyotiklerle AMP'lerin birbirlerinin etkilerini arttırmalarını sağlamaktadır. Bu da AMP'lerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde tek başlarına veya diğer antibiyotiklerle oluşturdukları sinerjistik etkileri ile güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro aktivitesini belirlemede kullanılan checkerboard yöntemi basit, güvenilir ve kolay uygulanabilir bir yöntem olmakla birlikte antibiyotiklerin etkinliğinin zamanlamasıyla ilgili bilgi verememektedir. Bu durumu aşmak üzere çalışmamızda time kill curve yöntemi kullanılarak antimikrobik maddeler ve kombinasyonlarının zaman içindeki aktivitelerine ait profilleri ortaya çıkarılmıştır. Bu amaçla *S. aureus* suşları arasından birer adet MSSA ve MRSA, *E. coli* suşları arasından ise birer adet GSBL (+) ve (-) olan suş seçilerek çalışmada kullanılan AMP'ler ve antibiyotiklerin tek başlarına ve kombinasyon halinde oluşturdukları etkilerin 0-24. saat arasındaki zaman ölüm grafikleri elde edilmiştir.

Zamana bağlı öldürme grafiklerinden elde edilen bulgulara göre MSSA suşuna karşı denenen AMP + antibiyotik kombinasyonlarından temporin A + doksisisiklin ile temporin A + klindamisin sinerjistik etkili oldukları, buna karşılık her iki kombinasyonun da checkerboard deneylerinde aditif etkili oldukları belirlenmiştir.

Bununla birlikte FİK indeksleri gözönüne alındığında temporin A + klindamisin kombinasyonu, zamana bağlı öldürme deneylerinde görülen sinerjistik etkiye benzer şekilde 0,625 gibi düşük FİK indeksine sahipken, temporin A + doksisiklin kombinasyonunun FİK indeksinin ise 1,5 olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde MRSA suşuna karşı denenen kombinasyonlardan temporin A + doksisiklin ile temporin A + eritromisin, zamana bağlı öldürme deneylerinde sinerjistik etkili olarak bulunmuş olup checkerboard deneylerinde aditif etkili olarak bulunan bu kombinasyonların FİK indeksleri sırasıyla 0,625 ve 2 olarak belirlenmiştir.

GSBL (-) *E. coli* suşu ile elde edilen zamana bağlı öldürme grafiklerinin sonuçlarına göre apidaesin 1B + gentamisin ile apidaesin 1B + sefotaksim kombinasyonlarının sinerjistik etkili oldukları, aynı kombinasyonların checkerboard deneyi sonuçlarına bakıldığında FİK indekslerinin sırasıyla 0,625 ve 0,25 olduğu gözlenmiştir. GSBL (+) *E. coli* suşu ile elde edilen zamana bağlı öldürme deneyi sonuçlarına göre ise yalnızca apidaesin 1B + gentamisin kombinasyonunun sinerjistik etkili olduğu, aynı kombinasyonun checkerboard deneylerinde de 0,5'lik FİK indeksi ile sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık checkerboard deneylerinde 0,312 gibi düşük FİK indeksi ile GSBL (-) ve (+) *E. coli* suşlarına karşı sinerjistik etkili oldukları saptanan sırasıyla apidaesin 1B + piperasilin ve apidaesin 1B + meropenem kombinasyonlarının zamana bağlı öldürme deneylerinde ise aditif etkili oldukları tespit edilmiştir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar incelendiğinde AMP'lerle antibiyotiklerin kombinasyon halinde oluşturdukları etkinin zamana bağlı öldürme grafikleri yoluyla gösterildiği çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu araştırmalar arasında yer alan Gunderson ve ark.'nın (165) çalışmasında kolistin + seftazidim kombinasyonunun MDR *P. aeruginosa* suşlarına karşı sinerjistik etkili olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Lee ve ark. (166) da yaptıkları çalışmada kolistin + rifampin kombinasyonunun MDR *A. baumannii* suşlarına karşı sinerjistik etkili olduğunu bildirmişlerdir. Döşler ve ark. (167) tarafından yürütülen bir başka çalışmada AMP'lerden nisinin konsantrasyona bağlı olarak hızlı bakterisidal aktivite gösterdiği ve gerek siprofloksasinle gerekse vankomisinle olan kombinasyonlarının hem MSSA hem de MRSA suşlarına karşı sinerjistik etkili olduğu tespit edilmiştir.

Gerek çalışmamızda elde edilen, gerekse diğer araştırmacılar tarafından bildirilen sonuçlardan da görülebileceği gibi antimikrobik maddelerin kombinasyon halindeki etkilerini belirlemede kullanılan checkerboard ve zamana bağlı öldürme deneyleri, genellikle paralel sonuçlar verseler de her zaman için aynı kombinasyonlar ile aynı etkiler gözlenememektedir. Bu nedenle araştırmacılar tarafından çalışmalarına en uygun yöntemin titizlikle belirlenmesi ve elde edilen sonuçların daha fazla sayıda bakteri suşu ile kanıtlandıktan sonra mutlaka in vivo deneylerle de desteklenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Tüm olumlu özellikleri göz önüne alındığında AMP'lerin gelecekte yeni ve etkili bir antibiyotik grubu olarak ilk sıralarda yer alacakları birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir. Ancak bu maddelerin ilaç olarak patent alıp klinik kullanıma girebilmeleri için antimikrobik aktivitelerinin yanı sıra farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin belirlenmesi, olası stabilite ve toksisite gibi problemlerin giderilmesi ve uygun formülasyonlarının hazırlanması gerekmekte olup bu amaçla yürütülen gerek hayvan modeli çalışmalarını gerekse insanlar üzerinde yapılan faz II, faz III klinik çalışmalarında alınan sonuçlar son derece ümit vericidir. Ancak yine de bu çalışmaların sayıları henüz çok sınırlıdır ve daha pek çok in vivo ve in vitro çalışma ile desteklenmeleri gerekmektedir. Çalışmamızda elde edilen bulguların da, AMP'lerin klinik kullanıma girebilmesi için yapılan çalışmalara yardımcı olarak yerini alacağı ve AMP'lerin yakın gelecekte tek başlarına ya da antibiyotiklerle kombinasyonları halinde klinik kullanıma girecekleri düşüncesindeyiz.

## SONUÇLAR

- Çalışmamızda kullandığımız bakterilerden MSSA ve GSBL (-) *E. coli* suşlarının denenen antibiyotiklere karşı direnç oranları % 0 - % 33 arasındayken, MRSA ve GSBL (+) / MDR *E. coli* suşlarının ise denenen antibiyotiklere karşı % 17 - % 100 oranlarında dirençli oldukları saptanmıştır.
- Çalışmamızda kullanılan AMP'lerden temporin A ve apidaesin 1B'nin, çalışılan *S. aureus* ve *E. coli* suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlı ya da dirençli olmalarından etkilenmeksizin, tüm suşlara karşı aynı konsantrasyonda (sırasıyla 8 ve 16 µg/ml) etki ettikleri gözlenmiştir.
- Çalışmamızda kullanılan AMP'lerin MBK değerleri de belirlenmiş, bu değerlerin MİK değerlerine eşit ya da en fazla iki katı konsantrasyonlarda olduğu belirlenmiştir.
- AMP'lerden temporin A'nın doksisiklin, eritromisin, klindamisin, linezolid ve vankomisin ile kombinasyonlarının mikrodilüsyon checkerboard yöntemi ile *S. aureus* suşlarına karşı olan etkilerini araştırdığımızda, FİK indeksi değerlerinin 0,625 - 3 arasında bulunduğu, bu değerlere göre tüm kombinasyonların aditif etkili oldukları saptanmıştır.
- AMP'lerden apidaesin 1B'nin piperasilin, sefotaksim, meropenem, gentamisin ve levofloksasin ile kombinasyonlarının mikrodilüsyon checkerboard yöntemi ile *E. coli* suşlarına karşı etkinliği araştırıldığında, FİK indeksi değerlerinin 0,25 - 2 arasında bulunduğu, bu değerlere göre çalışılan kombinasyonların % 17 - % 33 oranlarına sinerjistik etkili oldukları saptanmıştır.
- Çalışılan kombinasyonların hiçbiri ile antagonist görülmemiştir.
- Zamana bağlı öldürme deneyleri ile temporin A'nın antibiyotikler ile birer adet MSSA ve MRSA suşuna karşı olan etkilerini araştırdığımızda, MSSA suşuna karşı temporin A'nın klindamisin ve doksisiklin ile kombinasyonlarının, MRSA suşuna karşı ise doksisiklin ve eritromisin ile olan kombinasyonlarının sinerjistik etkili oldukları belirlenmiştir.
- Zamana bağlı öldürme deneyleri ile apidaesin 1B'nin antibiyotikler ile birer adet GSBL (-) ve GSBL (+) *E. coli* suşuna karşı olan etkilerini araştırdığımızda, GSBL (-) *E. coli* suşuna karşı apidaesin 1B'nin gentamisin ve sefotaksim ile

kombinasyonlarının, GSBL (+) *E. coli* suşuna karşı ise apidaesin 1B'nin yalnız gentamisin ile olan kombinasyonunun sinerjistik etkili olduğu belirlenmiştir.



## KAYNAKLAR

1. Van Hoek A, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts PA, Aarts JMH. Acquired antibiotic resistance: an overview. *Frontiers Antimic Resist Chemother* 2011; **2**: 203.
2. Tenover CF, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med* 2006; **119**: S3-S10.
3. Jacoby GA. History of drug-resistant microbes. İçinde Mayers DG, editör. *Antimicrobial Drug Resistance Volume-1 Mechanisms of Drug Resistance*. Humana Press; 2009. pp. 3-7.
4. Abriouel H, Omar NB, Molinos AC, Lopez RL, Grande MJ, Viedma PM ve ark. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int J Food Microbiol* 2008; **123**: 38-49.
5. Rojas AR, Beltran JR, Couce A, Blazquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>
6. Song JH. What's new on the antimicrobial horizon? *Intl J Antimicrob Agents* 2008; **32**: 207-13.
7. An Initiative of the Risk Response Network. Global Risks 2013. In: Howell L, ed. Insight report. 8<sup>th</sup> ed. Switzerland: World Economic Forum; 2013. p.28-33.
8. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE JR, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 657-68.
9. Infectious Diseases Society of America. Bad bugs, no drugs. As antibiotic discovery stagnates. A public health crisis brews (2004). <http://www.idsociety.org>.
10. Hancock RE. Peptide Antibiotics. *Lancet* 1997; **349(9049)**: 418-22.
11. Toke O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* 2005; **80(6)**: 717-735.
12. Rinaldi AC. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Curr Opin Chem Biol* 2002; **6**: 799-804.

13. Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M. Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94** : 8686-8690.
14. Travis SM, Singh PK, Welsh MJ. Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. *Curr Opin Immunol* 2001; **13**: 89-95.
15. Wang G, Li X, Wang Z. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: D933–D937.
16. Hancock RE, Diamond G. The Role of Cationic Antimicrobial Peptides in Innate Host Defences. *Trends Microbiol* 2000; **8(9)**: 402-410.
17. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial Peptides for Therapeutic Use: Obstacles and Realistic Outlook. *Curr Opin Pharmacol* 2006; **6**: 468–472.
18. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 2003; **55**: 27-55.
19. Dosler S, Mataraci E. In vitro pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant staphylococcus aureus biofilms. *Peptides* 2013; **49**: 53-8.
20. Brown KL, Hancock REW. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**: 24–30.
21. Nicolas P, Vanhoye D, Amiche M. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides* 2003; **24**: 1669-1680.
22. Dubos RJ. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infections in mice. *J Exp Med* 1939; **70**: 11–17.
23. Van Epps HL. Rene dubos: Unearthing antibiotics. *J Exp Med* 2006; **203**: 259.
24. Rammelkamp CH, Weinstein L. Toxic effects of tyrothricin, gramicidin and tyrocidine. *J Infect Dis* 1942; **71**: 166–173.
25. Hancock RE, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 1998; **16**: 82-88.
26. Zhao X, Wu H, Lu H, Li G, Huang Q. Lamp: A database linking antimicrobial peptides. *PLoS One* 2013; **8**: e66557. doi: 10.1371/journal.pone.0066557.
27. Hancock RE, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 8856-8861.
28. Kamysz W, Okroj M, Lukasiak J. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**: 461-469.
29. Hancock REW, Falla T, Brown MH. Cationic bactericidal peptides. *Adv Microb Physiol* 1995; **37**: 135-75.



30. Kleinkauf H, Dohren H von. Peptide antibiotics beta-lactams and related compounds. *Crit Rev Biotechnol* 1988; **8**: 1-32.
31. Perlman D, Bodansky M. Biosynthesis of peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem* 1971; **40**: 449-64.
32. Hancock REW, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **6**: 1317-23.
33. Brogden KA, Ackermann M, McCray Jr PB, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents* 2003; **22**: 465-478.
34. Powers JP, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 2003; **24**: 1681-1691.
35. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 491–511.
36. Brogden, KA. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**: 238–250.
37. Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin ii: Buforin ii kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **244**: 253–257.
38. Otvos LOI, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, Bulet P, Blaszczyk-Thurin M. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochem* 2000; **39**: 14150–14159.
39. Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L. The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochem* 2001; **40**: 3016–3026.
40. Hancock RE. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol* 1997; **5**: 37-42.
41. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Biology of Microorganisms*. 8. Ed. Prentice Hall International Inc USA 1997: 52-108.
42. Hancock RE, Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett* 2002; **206**: 143-149.
43. Sawyer JG, Martin NL, Hancock REW. Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1988; **56**: 693-698.
44. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* 1999; **23**: 329-344.
45. Bechinger B. Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: A 31p solid-state nmr spectroscopy study. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1712**: 101–108.

46. Bolintineanu DS, Kaznessis YN. Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: A review. *Peptides* 2011; **32**: 188–201.
47. Mecke A, Lee DK, Ramamoorthy A, Orr BG, Holl MMB. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: An atomic force microscopy study of msi-78 in lipid bilayers. *Biophys J* 2005; **89**: 4043–4050.
48. Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1999; **38**: 7235–7242.
49. Brogden KA. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**: 238–250.
50. Zhang L, Rozek A, Hancock RE. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J Biol Chem* 2001; **276**: 35714–35722.
51. Otvos L. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *J Pept Sci* 2005; **11**: 697–706.
52. Zhang YM, Rock CO. Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J Lipid Res* 2009; **50**: S115–S119.
53. Hsu, CH, Chen C, Jou ML, Lee AY, Lin YC, Yu YP, Huang WT, Wu SH. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: Evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 4053–4064.
54. Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin p1 and pr-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* 1993; **61**: 2978–2984.
55. Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J* 2009; **276**: 6483–6496.
56. Castle M, Nazarian A, Yi SS, Tempst P. Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *J Biol Chem* 1999; **274**: 32555–32564.
57. Nishikata M, Kanehira T, Oh H, Tani H, Tazaki M, Kuboki Y. Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **174**: 625–630.
58. Couto MA, Harwig SS, Lehrer RI. Selective inhibition of microbial serine proteases by enap-2, an antimicrobial peptide from equine neutrophils. *Infect Immun* 1993; **61**: 2991–2994.
59. Scheit KH, Reddy ES, Bhargava PM. Seminalplasmin is a potent inhibitor of *E. coli* RNA polymerase in vivo. *Nature* 1979; **279**: 728–731.
60. Chitnis S.N, Prasad KS, Bhargava PM. Isolation and characterization of autolysis-defective mutants of *Escherichia coli* that are resistant to the lytic activity of seminalplasmin. *J Gen Microbiol* 1990; **136**: 463–469.

61. Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J* 2009; **276**: 6483–6496.
62. Jones AT. Macropinocytosis: Searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med* 2007; **11**: 670–684.
63. Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Graslund A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys* 2011; **2011**: 414-729.
64. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 603–612.
65. Krajewski K, Marchand C, Long YQ, Pommier Y, Roller PP. Synthesis and hiv-1 integrase inhibitory activity of dimeric and tetrameric analogs of indolicidin. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; **14**: 5595–5598.
66. Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **160**: 91–96.
67. Brumfitt W, Salton MR, Hamilton-Miller JM. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 731–734.
68. MacFarlane ELA, Kwasnicka A, Hancock RE. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosites. *Microbiology* 2000; **146**: 2543-2554.
69. Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 1998; **47**: 415-433.
70. Yeaman MR, Bayer AS, Koo SP, Foss W, Sullam PM. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *J Clin Invest* 1998; **101**: 178–187.
71. Gunn JS. Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J Endotoxin Res* 2001; **7**: 57–62.
72. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, Otto M. Polysaccharide intercellular adhesin (pia) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* 2004; **6**: 269–275.
73. Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ. A two-component regulatory system (phoP-phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 5054–5058.
74. Bader MW, Sanowar S, Daley ME, Schneider AR, Cho U, Xu W, Klevit RE, Le Moual H, Miller SI. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* 2005; **122**: 461–472.

75. Scocchi M, Romeo D, Cinco M. Antimicrobial activity of two bactericins against spirochetes. *Infect Immun* 1993; **61**: 3081-3083.
76. Jones AL, Beveridge TJ, Woods DE. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 1996; **64**: 782-790.
77. Sidorczyk Z, Zahringer U, Rietschel ET. Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* re-mutant. *Eur J Biochem* 1983; **137**: 15-22.
78. Vieser LG, Hiemstra PS, Van Den Barselaar MT, Ballieux PA, Van Furth R. Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect Immun* 1996; **64**: 1653-1658.
79. Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, Weiser JN. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory track. *Infect Immun* 2000; **68**: 1664-1671.
80. Diaz-Achirica P, Ubach J, Guinea A, Andreu D, Rivas L. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-18), a synthetic cecropin A-mellitin hybrid peptide. *Biochem J* 1998; **330**: 453-460.
81. Friedrich C, Scott MG, Karunaratne N, Yan H, Hancock REW. Salt-resistant alpha helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1542-1548.
82. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Antibiyotikler. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2003.
83. Peschel A, Collins LV. Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* 2001; **22**: 1651-1659.
84. Tsang JC, Weber DA, Brown DA. Evidence for complex formation between polymyxin B and lipopolysaccharides from *Serratia marcescens*. *J Antibiot* 1976; **29**: 735-742.
85. Jarosz J. Identification of immune inhibitor from *Pseudomonas aeruginosa* of inducible cell-free antibacterial activity in insects. *Cytobios* 1997; **89**: 73-80.
86. Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides?. *Trends Microbiol* 2002; **10**: 179-186.
87. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, Lupa B, Suder P, Silberring J, Reed M, Pohl J, Shafer W, McAleese F, Foster T, Travis J, Potempa J. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4673-4679.

88. Ulvatne H, Haukland HH, Samuelsen O, Kramer M, Vorland LH. Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 461-467.
89. Shafer WM, Qu XD, Waring AJ, Lehrer RI. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 1829-1833.
90. del Castillo FJ, del Castillo I, Moreno F. Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase. *J Bacteriol* 2001; **183**: 2137-2140.
91. Zasloff M. Reconstructing one of nature's designs. *Trends Pharmacol Sci* 2000; **21**: 236-238.
92. Lamb HM, Wiesman LR. Pexiganan acetate. *Drugs* 1998; **56**: 1047
93. Nicole J, Afacan Amy TY, Yeung Olga MP, Robert EW Hancock. Therapeutic Potential of Host Defense Peptides in Antibiotic-resistant Infections. *Curr Pharm Des* 2012; **18**: 807-819.
94. Mosca DA, Hurst MA, So W, Viajar BSC, Fujii CA, Falla TJ. IB-367, a protegrin peptide with in vitro and in vivo activities against the microflora associated with oral mucositis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1803-1808.
95. Fricker J. A natural antibiotic for cystic fibrosis. *Drug Discov Today* 2002; **7**: 159-160.
96. Olsen WM, et al. 2011. LTX-109 is an effective, novel agent for nasal decolonization of MRSA/MSSA—results from a phase I/IIa study, abstr. L1-275. Abstr. 51st Intersci. Conf. *Antimicrob Agents Chemother*
97. <http://www.novabiotics.co.uk/pipeline/np213-novexatin>
98. Crowther GS, Baines SD, Todhunter S, et al. Evaluation of NVB302 versus vancomycin activity in an in vitro human gut model of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 168–76.
99. Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; **70**: 1060–75.
100. Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, Barra D. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur Biochem* 1996 Dec 15; **242(3)**: 788-92.
101. Capparelli R, Romanelli A, Iannaccone M, Nocerino N, Ripa R, Pensato S, Pedone C, Iannelli D. Synergistic antibacterial and anti-inflammatory activity

- of temporin A and modified temporin B in vivo. *PLoS One* 2009 Sep 28; **4(9)**: e7191.
102. Wade D, Andreu D, Mitchell SA, Silviera AMV, Boman A, Boman, HG and Merriçeld RB. *Int J Pept Protein Res* 1992; **40**: 429-436.
  103. Zylicz M, LeBowitz JH, McMacken R, Georgopoulos C. The DnaK protein of *Escherichia coli* possesses an ATPase and autophosphorylating activity and is essential in an in vitro DNA replication system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 1983. pp. 6431–6435.
  104. Li WF, Ma GX, Zhou XX. *Peptides* 2006 Sep; **27(9)**: 2350-9.
  105. Li WF, Ma GX, Zhou XX. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides* 2006; **27**: 2350–2359.
  106. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard M07-A10. Wayne, PA: CLSI 2015.
  107. Steinberg DA, Hurst MA, Fujii CA, Kung AH, Ho JF, Cheng FC, et al. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 1738–42.
  108. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, informational supplement M100-S24. Wayne PA: CLSI; 2014.
  109. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, approved guideline M26-A. Wayne PA: NCCLS; 1999.
  110. Pillai SK, Moellering RCJr, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005. pp. 365–440.
  111. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 1.
  112. Hadadi A, Pasoulinejad M, Maleki Z, Yonesian M, Shirani A, Kourorian Z. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli of nosocomial origin at 2 hospital university in Iran. *Diagn Microbiol and Infect Dis* 2008; **60**: 301-305.
  113. Oztürk R, Çetinkaya- Şardan Y, Kurtoğlu D. Sağlıkta Dönüşüm Programı, Hastane Enfeksiyonlarının Önlenmesi, Türkiye Deneyimi Eylül 2004–Aralık 2010. (Health Transformation Pro-gram, Hospital Infections Prevention, Turkey

- Experience, September 2004-December 2010) Ankara, Turkey: Sağlık Bakanlığı Yayın; 2011.
114. Ünal S. Stafilocoklarda metisilin ve enterokoklarda vankomisin direncinin belirlenmesi. *ANKEM Derg* 2007; **21**: 166-70.
  115. Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington: DC 2003: 284-404.
  116. Stefani S, Goglio A. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: related infections and antibiotic resistance. *Int J Infect Dis* 2010; **14(Suppl 4)**: 19-22.
  117. Sancak B. Staphylococcus aureus ve Antibiyotik Direnci, *Mikrobiyol Bul* 2011; **45(3)**: 565-576.
  118. Ekşi F.ve ark., Gaziantep Üniversitesi Hastanesinde İzole Edilen Staphylococcus aureus Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 2008; **22(4)**: 203-208.
  119. Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A. The economic impact of Staphylococcus aureus infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis* 1999; **5**: 9-17.
  120. Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the superbug. *Int J Infect Dis* 2010; **14**: 7-11.
  121. Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 1-9.
  122. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis* 2007; **45**: 171-6.
  123. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 389-9
  124. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2013, <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistancesurveillance-europe-2013.pdf>, Erişim Tarihi 16 Haziran 2015.
  125. Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Gazi H, Teker A, Özbakkaloğlu B. Metisiline dirençli ve duyarlı suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. *İnfeksiyon Derg* 2007; **21**: 187191.
  126. Şencan İ, Kalaycı MZ, Kabasakal E, Oku FC, Şardan YÇ, Aşçıoğlu S. (2013). Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Özet Veri 2011, 1-32.

127. Şencan İ, Kalaycı MZ, Kabasakal E, Oku FC, Şardan YÇ, Aşçıoğlu S. (2013). Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Özet Veri 2012, 1-32.
128. Derbentli Ş. Cerrahi enfeksiyonlarda dirençli Gram pozitif bakteri sorunu. *ANKEM Derg* 2004; **18(ek2)**: 215-21.
129. Arıdoğan A, Atasever L, Bal Ç. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; **34**: 20-3.
130. Vardar-Ünlü G, Ünlü M, Yağmuroğlu A. Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokok izolatlarında mupirosin direnci. *ANKEM Derg* 2006; **20(4)**: 222-5.
131. Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Gazi H. Metisilin dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. *İnfeksiyon Derg* 2007; **21**: 187-91.
132. Duman Y, Serindağ A, Tekerekoğlu MS. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus*'ların antimikrobiallere direnç durumu. *İnönü Univ Tıp Fak Derg* 2009; **16**: 145-8.
133. Işıkgöz Taşbakan M, Pullukçu H, Sipahi OR, Yamazhan T, Arda B, Ulusoy S. A pooled analysis of the resistance patterns of *Escherichia coli* strains isolated from urine cultures in Turkey: a comparison of the periods 1997-2001 and 2002-2007.
134. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Ríos MJ, et al. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 1407-14.
135. Öksüz L, Gürler N, Akıncı N, Şirin A. İki aylık bir dönemde pediatrik poliklinik hastalarının idrar örneklerinden izole edilen GSBL oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları. *ANKEM Derg* 2008; **22**: 14-19.
136. Akova M. Dikkat: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) var! *ANKEM Derg* 2004; **18**: 98-103.
137. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 52-9.
138. Gür D, Pitt TL, Hall LM, Akalın HE, Livermore DM. Diversity of *Klebsiella* with extended-spectrum beta-lactamases at a Turkish university hospital. *J Hosp Infect* 1992; **22**: 163-7.



139. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 2007; **7**: 459-469.
140. Pfaller MA, Jones RN and the MYSTIC Study Group (Americas). MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) results from the Americas: resistance implications in the treatment of serious infections. *J Antimicrob Chemother* 2000; **46**: 25-37.
141. Le J, Nguyen T, Okamoto M, McKamy S, Lieberman JM. Impact of empiric antibiotic use on development of infections caused by extended spectrum betalactamase bacteria in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* 2008; **27**: 314-318.
142. Paterson DL, Bonomo LA. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18 (4)**: 657-686.
143. Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S ve ark. SENTRY Asia-Pacific Participants. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; **52(4)**: 323-329.
144. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, et al. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3280-4.
145. Gur D, Gulay Z, Akan OA, et al. Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. *Mikrobiyol Bul* 2008; **42**: 537-44.
146. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-production *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1089-94.
147. Öztürk S, Birengel S, Tekeli A, Dolapçı İ, Azap A, Karamercan G. Toplum kökenli üriner sistem infeksiyonlarında GSBL (+) *E. coli* izolatlarında risk faktörleri ve moleküler tiplendirme. EKMUD Kongresi 24-28 Ekim Ankara. Poster 29. 2007
148. Canton R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extendedspectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14(1)**: 144-53.
149. Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli*

- and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49(5)**: 2122-2125.
150. Angel DM, Ramón HJ, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006); Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **27(9)**: 503-510.
151. Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T, Sarıgüzel Sar N, Gültekin M ve ark. Beş yılda izole edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella* spp. suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı. *ANKEM Derg* 2010; **24(1)**: 34-41.
152. Arman D. (2007). Antibiyotiklerin farmakokinetik ve farmakodinamiği, Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (editör). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Bilimsel Tıp Yayınevi, s75-90.
153. King TC, Schlessinger D, Krogstad DJ. The assessment of antimicrobial combinations. *Rev Infect Dis* 1981; **3**: 627-33.
154. Rand KH, Houck HJ, Brown P, Bennett D. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 613-15. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.37.3.613>
155. Fischbach MA. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol* 2011; **14**: 519-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.08.003>
156. Mehta KC, Dargad RR, Borade DM, Swami OC. Burden of antibiotic resistance in common infectious diseases: Role of antibiotic combination therapy. *J Clin Diagn Res* 2014; **8**: ME05-8. <http://dx.doi.org/10.7860/jcdr/2014/8778.4489>
157. Derbentli Ş. Antimikrobiyal Maddeler. In Bozkaya E, ed. *Tıbbi Mikrobiyoloji I*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 107-41.
158. Zhanel GG, Schweizer F, Karlowsky JA. Oritavancin: mechanism of action. *Clin Infect Dis* 2012; **54(Suppl 3)**: S214-9. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir920>
159. Fleming, W. W. (1997). Mechanisms of drug action. In *Modern Pharmacology with Clinical Applications*, 5th edn, (Craig, C. R. & Stitzel, R. E., Eds), pp. 9–11. Little, Brown and Company, New York, NY.
160. Aktaş G. Antibiyotik Kombinasyonları ve Sinerjistik Etkileşimleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2014; **44(2)**: 47-55. doi:10.5222/TMCD.2014.047

161. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Orlando F, D'Amato G, Kamysz W, Mocchegiani F, Sisti V, Silvestri C, Łukasiak J, Rocchi M, Saba V, Scalise G. Temporin A soaking in combination with intraperitoneal linezolid prevents vascular graft infection in a subcutaneous rat pouch model of infection with *Staphylococcus epidermidis* with intermediate resistance to glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Aug; **48(8)**: 3162-4.
162. Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, D'Amato G, Silvestri C, Del Prete MS, Licci A, Lukasiak J, Scalise G. In vitro activity and killing effect of temporin A on nosocomial isolates of *Enterococcus faecalis* and interactions with clinically used antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2005 Feb; **55(2)**: 272-4.
163. Döşler S, Gerçek AA. In vitro activities of antimicrobial cationic peptides melittin and nisin alone and in combination with antibiotics against gram positive bacteria, *J Chemother* 2012; **24(3)**: 137-143.
164. Döşler S, Karaaslan E, Gerçek AA. Antibacterial and antibiofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram negative bacteria, *J Chemother* 2015.
165. Gunderson BW, Ibrahim KH, Hovde LB, Fromm TL, Reed MD, Rotschafer JC. Synergistic activity of colistin and ceftazidime against multiantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003Mar; **47(3)**: 905-9.
166. Lee HJ, Bergen PJ, Bulitta JB, Tsuji B, Forrest A, Nation RL, Li J. Synergistic activity of colistin and rifampin combination against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Aug; **57(8)**: 3738-45.
167. Döşler S, Gerçek AA. In vitro activities of nisin alone or in combination with vancomycin and ciprofloxacin against methicillin resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* strains, 2011; **57**: 511-516.

**ETİK KURUL KARARI**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1942

Tarih : 25.12.2014

Konu : Yard.Doç.Dr.Sibel DÖŞLER

Sayın Yard.Doç.Dr.Sibel DÖŞLER  
İ.Ü.Eczacılık Fakültesi

İlgi : İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Dekanlığının 05/11/2014 gün ve 1235 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Bio.Merve ATAMAN'ın yürüteceği 2014/1702 dosya numaralı "Antimikrobiyal Peptidlerin Çeşitli Enfeksiyon Etkenlerine Karşı In Vitro Antibakteriyel Aktivitelerinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/12/2014 tarih ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

  
Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN  
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu